

Гильяно Н.Я.², Бондарев Г.Н.², Коневега Л.В.²,
Носкин Л.А.², Журишкина Е.В.², Алчинова И.Б.¹

Возможные механизмы селективного действия ингибиторов гликолиза на эндотелиоциты и клетки карциномы человека в культуре

¹ — ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

² — НИЦ «Курчатовский институт», ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П.Константинова», 188300, Гатчина, Ленинградская обл., Орлова роща

Известно, что продукция энергии и синтез макромолекул в опухолевых клетках зависят от метаболизма глюкозы в большей степени, чем в неопухолевых. Проведено сравнительное исследование эффективности ингибиторов гликолиза 2-дезоксид-Д-глюкозы (2-DG) и натриевой соли дихлоруксусной кислоты (DCA) в индукции гибели клеток, нарушении прогрессии клеток по циклу и изменений внутриклеточного уровня кислородных радикалов в эндотелиоцитах (линия ECV304) и клетках карциномы человека (линия HeLa G-63). Показано, что ингибирование различных стадий гликолиза приводит к нарушению пролиферации и к гибели только клеток HeLa G-63. Ингибитор киназы пируват дегидрогеназы DCA и 2-DG, ингибитор транспорта глюкозы и процесса гликозилирования, индуцировали дозозависимый селективный цитотоксический эффект. Увеличение внутриклеточного уровня кислородных радикалов, индуцируемое DCA, в клетках HeLa G-63 предполагает, что цитотоксический эффект DCA опосредован активацией митохондриальных функций. Зависимость цитотоксического эффекта 2-DG от уровня глюкозы в питательной среде позволяет предположить, что не только окислительный стресс, но и энергетическое голодание вовлечены в этот процесс.

Ключевые слова: 2-дезоксид-Д-глюкоза (2-DG), натриевая соль дихлоруксусной кислоты (DCA), активные формы кислорода (АФК), ECV304, HeLa G-63, проточная цитометрия

Giliano N.Y., Bondarev G.N., Konevega L.V., Noskin L.A., Zhurishkina E.V., Alchinova I.B.

Possible mechanism of the selective action of the inhibitors of glycolysis in the endothelial cells and the human carcinoma cells in the culture

FSBSI «Institute of General Pathology and Pathophysiology» NRC «Kurchatov Institute»,

FBIS «B.P.Konstantinov Petersburg Nuclear Physics Institute»

It is known that the production of energy and synthesis of macromolecules in cancer cells depend on the glucose metabolism to a greater extent than in non-tumor. In this paper we carry out a comparative study of the effectiveness of the two modifiers glycolysis 2 — D-deoxyglucose (2-DG) and dichloroacetate (DCA) in the induction of the cell death, changes in the cell cycle progression and in the alteration of the intracellular ROS levels in endothelial cells (line ECV304) and human carcinoma cells (line HeLa G-63) in order to identify cause-effect relations between these events. It has been shown that inhibition of the various stages of the glycolysis result in blocking cells in G2/M phase of the cell cycle and the induction of the cell death. This effect was record for HeLa G-63 cells only. DCA is inhibitor of the pyruvate dehydrogenase kinase and 2-DG is inhibitor of the glucose transport and glycosylation induced selective dose-dependent cytotoxic effect in HeLa G-63 cells. The increase of intracellular levels of the oxygen radicals induced by DCA in the cells HeLa G-63 suggests that the cytotoxic effect of the DCA is mediated by activation of the mitochondrial functions. The cytotoxic effect of 2-DG depend on the level of glucose in the culture medium, therefore we suggest that not only the oxidative stress, but and the energy depletion involved in selective response of the cancer cells on the actions of the inhibitors of glycolysis.

Key words: 2-D-deoxyglucose (2-DG), sodium dichloroacetate (DCA), reactive oxygen spices, ECV304, HeLa G-63, flow cytometry

Малигнантная трансформация клетки сопровождается рядом метаболических изменений, в том числе и аэробным гликолизом, который может быть следствием нарушения митохондриального дыхания из-за митохондриальных дефектов, адаптации к гипоксическому окружению, онкогенных сигналов и нарушения экспрессии метаболических ферментов [1, 2]. Несмотря на гетерогенность клеток в опухолях, почти все опухолевые клетки демонстрируют усиленное включение и утилизацию глюкозы, в то время как митохондриальная активность в них в значительной степени подавлена [3]. Первая стадия гликолиза — это фосфорилирование 6-го углерода глюкозы гексокиназой. Известно, что глюкозный аналог 2-DG конкурирует с глюкозой как за транспорт в клетку, так и за сайт связывания с гексокиназой [4]. При фосфорилировании 2-DG образуется 2-DG-6P, который аккумулируется в клетке и нарушает конвертирование 2-D-глюкозо-6-фосфата в 2-D-фруктозо-6-фосфат. Ингибирование 2-DG этой стадии гликолиза вызывает истощение внутриклеточного уровня АТФ, блокирование прогрессии по клеточному циклу и гибель клеток *in vitro* [5]. Следует отметить гетерогенность эффектов 2-DG в различных опухолях [6], и пока остается не выясненной взаимосвязь между усилением гликолиза и апоптотической гибелью клеток. Однако изменения в редоксном статусе, обусловленные снижением регенерации NADH и лактата из-за ингибирования гликолиза, предполагают запуск апоптоза [7]. К тому же показано, что 2-DG может селективно убивать опухолевые клетки как при аэробных условиях (через ингибирование процесса гликозилирования), так и при гипоксии (через ингибирование гликолиза) [4]. Последняя стадия гликолиза — это индукция киназы пируватдегидрогеназы (PDK), которая приводит к инактивации пируватдегидрогеназного комплекса (PDC). PDC катализирует необратимое декарбоксилирование пирувата до ацетил-СоА, CO₂ и NADH [8].

Обработка опухолевых клеток DCA, ингибитором киназы пируватдегидрогеназы, увеличивала окисление глюкозы и понижала уровень лактата. Поскольку окисление глюкозы происходит в митохондриях, предполагают, что митохондрии опухолевых клеток, возможно, функционально подавлены, а не окончательно повреждены, что позволяет рассматривать препараты, подобные DCA, в качестве новых противоопухолевых агентов [9]. DCA также индуцировал митохондриально-зависимый апоптоз и снижал пролиферацию как *in vitro*, так и *in vivo* [10]. Способность DCA менять гликолитический фенотип в опухолевых клетках через ингибирование киназы пируватдегидрогеназы приводит к снижению выживаемости опухолевых клеток и роста опухоли. Торможение

роста опухоли некоторые исследователи объясняют увеличением апоптотической гибели клеток после обработки DCA [10—12]. Ряд авторов считает, что DCA действует больше как цитостатический агент, а не цитотоксический [13, 14]. Предполагается, что DCA активирует окислительное фосфорилирование и способствует апоптотической гибели по двум механизмам. Первый — увеличение потока через электронную транспортную сеть, приводящее к деполяризации митохондриальной мембраны и высвобождению апоптотического эффектора — цитохрома С. Второй — увеличение генерации АФК и активация вольтажзависимого K⁺-ионного канала, что приводит к утечке ионов калия и активации каспаз [15].

Цель исследования — изучение эффективности ингибиторов гликолиза 2-DG и DCA в индукции гибели клеток, нарушении прогрессии клеток по циклу и изменений внутриклеточного уровня АФК в эндотелиоцитах (линия ECV304) и клетках карциномы человека (линия HeLa G-63).

Методика

Работа выполнена на модельной системе, состоящей из двух клеточных линий человека, одна из которых опухолевая (HeLa G-63), а вторая перевиваемая, трансформированная (ECV 304), но сохранившая некоторые характеристики исходной эндотелиальной линии. Клетки культивировали на среде Игла с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки. В качестве антибиотика использовали гентамицин. Клетки выращивали в пенициллиновых флаконах с покровными стеклами, что позволяло одновременно проводить морфологический и цитометрический анализ одной и той же популяции клеток. Клетки, выращенные на покровных стеклах, фиксировали этанолом, затем окрашивали ацетоорцеином и анализировали на световом микроскопе «Motic», снабжённом цифровой фотокамерой. На стёклах регистрировали клетки с характерными для апоптоза морфологическими признаками. Клетки, выросшие на поверхности флаконов, снимали раствором Версена, полученную клеточную суспензию центрифугировали и осадок суспендировали в растворе, содержащем 0,1% бромистого этидия, за 15 мин до анализа на цитометре и без последующей отмывки красителя для оценки распределения клеток по содержанию ДНК.

Внутриклеточный уровень активных форм кислорода (АФК) регистрировали цитометрически с помощью флуоресцентного красителя 2',7'-дихлорфлуоресцина диацетата (DCFH-DA). Клетки инкубировали в среде, содержащей 20 мкМ DCFH-DA, в течение 15 мин при 37°C. DCFH-DA конвертируется с помощью внутриклеточной эстеразы до 2,7-дихлорфлуоресцина (DCFH). В присутствии H₂O₂ или дру-

гих оксидантов DCFH окисляется до высокофлуоресцентного 2,7-дихлорфлуоресцеина (DCF, $\lambda_{em} = 535$ нм, зелёная флуоресценция). После инкубации с красителем клетки дважды отмывали в холодном фосфатном буфере и далее измеряли на проточном цитометре. Для детекции внутриклеточного аниона супероксида использовали дигидроэтидин (DHE), окисленная форма которого имеет максимум эмиссии при $\lambda_{em} = 590\text{—}610$ нм, (красная флуоресценция). Клеточную суспензию инкубировали в темноте с DHE (конечная концентрация 5—10 мкМ), в течение 30 мин при 37°C, а затем анализировали на проточном цитометре.

В качестве ингибиторов гликолиза использовали 2-DG (Sigma, USA) и натриевую соль дихлоруксусной кислоты (DCA), синтезированную в лаборатории биоорганической и медицинской химии Бондаревым Г.Н.

Цитометрический анализ проводили на проточном цитометре, созданном в группе радиобиологии и медицины ПИЯФ [16]. Анализ гистограмм (процентное отношение клеток с различным содержанием ДНК к общему числу проанализированных клеток) проводили с помощью компьютерной программы (созданной сотрудником ПИЯФ РАН Н.В.Клоповым), которая является модифицированной формой известной программы Dean [17]. В каждом случае анализировали не менее 20 тыс. клеток. Эксперимент повторяли не менее 5 раз.

Статистическая обработка результатов проводилась в программе Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, США).

Результаты и обсуждение

Цитометрический анализ распределения клеток по содержанию ДНК позволяет проследить как за прогрессией клеток по циклу: 2с- G₁; 3с- S; 4с- G₂/M, так и оценить цитотоксичность препаратов: клетки с гиподиплоидным содержанием ДНК (<2с) или sub-G₁-популяцию идентифицируют как апоптоз

[18]. В серии экспериментов клетки ECV304 и HeLa G-63 были рассеяны по пенициллиновым флаконам в концентрации 5×10^5 в 1 мл. Через 24 ч в питательную среду были добавлены либо DCA, либо 2-DG в концентрациях 20, 40, 80 мМ, после чего клетки культивировали еще 48 ч. Выбор концентраций и продолжительности обработки были обусловлены результатами других исследований, согласно которым 48-часовая инкубация клеток с DCA в концентрации 17 мМ не индуцировала апоптотическую гибель клеток, а при увеличении концентрации до 25 мМ и выше апоптоз регистрировался, но отсутствовала селективная гибель опухолевых клеток [13]. В таблице представлены результаты пяти независимых экспериментов по оценке влияния различных концентраций ингибиторов гликолиза на распределение клеток ECV 304 и HeLa G63 по содержанию ДНК.

Как видно из таблицы, в контроле существенных различий между клеточными линиями как в спонтанном уровне клеток с гиподиплоидным содержанием ДНК ECV 304, HeLa G-63, так и в скорости прогрессии по циклу (% соотношение распределения клеток по фазам клеточного цикла) не наблюдается. Инкубация клеток в течение 48 ч в среде с различными концентрациями DCA и 2-DG индуцировала дозозависимое увеличение доли клеток с гиподиплоидным содержанием ДНК только в линии HeLa G63. При всех использованных концентрациях этих ингибиторов регистрировалась селективная цитотоксичность в отношении клеток карциномы человека. Ингибиторы меняли также и распределение клеток HeLa G-63 по фазам клеточного цикла. С увеличением концентрации существенно снижается доля клеток в G₁-фазе(2с) и увеличивается доля sub-G₁(<2с) фракции, из чего можно предположить, что ингибиторы нарушают прогрессию клеток из G₁ в S-фазу. Мы проверили это предположение, оценив распределение клеток по содержанию ДНК в различные сроки после посева. Флакон Карреля с монослоем клеток HeLa G63 и ECV 304 был рассеян по пенициллиновым

Таблица

Содержание ДНК	Линия клеток							
	ECV 304				HeLa G63			
	<2с Sub-G ₁	2с G ₁ -фаза	3с S-фаза	4с G ₂ /M	<2с Sub-G ₁	2с G ₁ -фаза	3с S-фаза	4с G ₂ /M
Контроль	5,9 ± 1,5	56,6 ± 3,9	13,6 ± 3,1	24,6 ± 2,4	6,8 ± 2,7	58,2 ± 5,8	11,3 ± 3,4	23,4 ± 4,5
DCA 20 мМ	7,7 ± 1,6	56,9 ± 6,6	13,2 ± 3,7	23,6 ± 6,1	17,9 ± 4,1	52,5 ± 12,3	9,8 ± 0,5	19,8 ± 6,5
40 мМ	8,8 ± 3,6	54,7 ± 4,9	13,8 ± 4,5	22,7 ± 5,6	51,5 ± 9,8	27,0 ± 8,6	6,0 ± 1,0	15,5 ± 2,5
80 мМ	15,8 ± 3,9	48,6 ± 6,7	13,0 ± 3,4	22,6 ± 4,9	86,0 ± 5,6	7,7 ± 2,4	3,2 ± 1,2	3,1 ± 1,3
2D-G 20 мМ	5,2 ± 1,5	65,2 ± 6,1	12,1 ± 3,4	17,5 ± 5,5	12,2 ± 2,1	59,0 ± 4,3	9,8 ± 0,6	19,0 ± 5,3
40 мМ	9,3 ± 2,6	58,5 ± 5,3	10,5 ± 1,5	21,7 ± 2,1	24,8 ± 2,5	49,6 ± 5,7	9,8 ± 2,1	15,8 ± 3,6
80 мМ	7,3 ± 2,1	59,7 ± 3,4	8,3 ± 2,3	23,9 ± 4,1	41,8 ± 2,9	37,7 ± 2,1	7,8 ± 3,1	12,7 ± 2,9

флаконам с покровными стеклами, и через 3 ч после посева в питательную среду был добавлен либо DCA, либо 2-DG в концентрации 40 мМ. Часть клеток фиксировали через 24 ч после инкубации с ингибиторами, а часть через 48 ч. Из гистограмм, представленных на рис. 1, видно, что 24-часовая обработка клеток HeLa G63 с 40 мМ DCA (А) и 40 мМ 2-DG (В) не увеличивала sub-G₁(<2с) фракцию, но индуцировала аккумуляцию клеток в G₂/M фазах клеточного цикла. Через 48 часов (Б и Г) инкубации клеток блок G₂/M исчезает, но увеличивается sub-G₁(<2с) фракция, что позволяет предположить, что DCA и 2-DG индуцирует необратимое блокирование пролиферации в G₂/M, которое приводит к гибели клетки. На клетках ECV 304 блокирование пролиферации не зарегистрировано (Д и Ж).

Параллельный морфологический анализ, выполненный на клетках, выросших на покровных стеклах, выявил клетки с характерными для апоптоза морфологическими признаками (конденсация хроматина и фрагментация ядер). Наши результаты согласуются с данными, полученными на клетках колоректального рака [19]. Авторы показали, что после обработки клеток 20 мМ DCA наблюдалось значительное снижение пролиферации, которое было ассоциировано с апоптотической гибелью и остановкой клеток в G₂/M фазе клеточного цикла. Для неканцерогенных клеток этот эффект DCA отсутствовал. Очевидно, что цитотоксичность DCA для опухолевых клеток частично может быть обусловлена и его цитостатическим эффектом. Предполагается, что ингибирование киназы пируватдегидрогеназы DCA с последующей активацией митохондрий приводит к повышению внутриклеточного уровня АФК [15].

Используя два флуоресцентных зонда, пероксид-чувствительный 2,7- DCFH-DA и супероксид-чувствительный DHE, мы оценили влияние DCA на внутриклеточный уровень АФК в клетках ECV 304 и HeLa G63. Ранее нами было показано, что эти клеточные линии различаются по внутриклеточному уровню оксида азота (NO). В клетках ECV-304, экспрессирующих конститутивную изоформу NO-синтазы, он был ниже, чем в клетках HeLa G63, экспрессирующих индуцибельную изоформу NOS. Мы предположили, что различия в базальном внутриклеточном уровне NO определяют клеточные ответы на действие агентов, модифицирующих уровень свободных радикалов (ингибиторы NO-синтазы или антиоксиданты) в этих клеточных линиях [20—22]. На рис. 2 представлены гистограммы одного из пяти экспериментов по оценке внутриклеточного уровня АФК. При инкубировании клеток HeLa G-63 как с DHE (А), так и с DCFH-DA(Б) интенсивность флуоресценции была значительно больше,

чем в клетках ECV 304. Пик флуоресценции клеток HeLa G63 был на 20-м канале, а ECV 304 на 6-м-8-м каналах. Обработка клеток DCA в концентрации 20 мМ в течение 6 ч индуцировала увеличение внутриклеточного уровня АФК более чем в 2 раза в клетках HeLa G63 (В) и практически не влияла на таковой в клетках ECV 304 (Г). Очевидно, что повышенный базальный уровень АФК, увеличенный ещё и обработкой DCA, способствовал индукции апоптотической гибели клеток HeLa G63. Взаимосвязь между апоптотической гибелью клеток и увеличением внутриклеточного уровня АФК, зарегистрированная нами при обработке DCA клеток HeLa G63, согласуется с результатами исследований [2, 10, 23], выполненных на других клеточных линиях, и подтверждает один из возможных механизмов противоопухолевого действия DCA, а именно — увеличение генерации АФК за счет усиления окислительного фосфорилирования и активации вольтажзависимого K⁺-ионного канала, что приводит к утечке ионов калия и активации каспаз [10]. Селективность действия 2-DG в отношении опухолевых клеток отмечалась

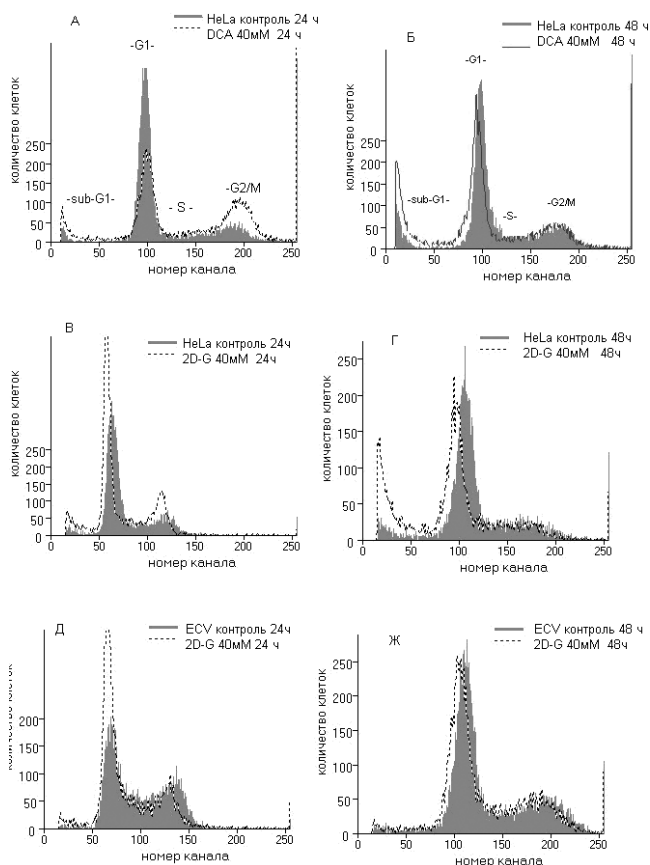


Рис. 1. Гистограммы распределения клеток по содержанию ДНК после 24-часовой инкубации клеток в питательной среде с 40мМ DCA (А) и 2-D-G (В) и 48-часовой инкубации с DCA (Б) и 2-D-G (Г).

рядом авторов [4, 24]. Более того регистрировалась гетерогенная чувствительность различных видов опухолей к токсическому эффекту 2-DG. Предполагается, что это обусловлено рядом факторов: степенью зависимости от глюкозы, гликолиза, источника энергии при снижении уровня АТФ, окислительного стресса и др. [25—27].

Зависимость этих двух клеточных линий от глюкозы оценивали в экспериментах по культивированию клеток в питательной среде с низким содержанием глюкозы (1 г/л). Результаты экспериментов представлены на рис. 3. Из гистограмм видно, что культивирование в среде с низким содержанием глюкозы существенно повышает цитотоксический эффект 2-DG в клетках HeLa G63. При инкубации клеток в нормальной питательной среде (4,5 г/л глюкозы) доля клеток с гиподиплоидным содержанием ДНК в контроле составляла 5% (А), а после добавления в среду 40 мМ 2-DG увеличивалась до 44% (Б). При культивировании клеток с этой же концентрацией 2-DG, но в питательной среде с низким содержанием глюкозы доля клеток с гиподиплоидным содержанием ДНК увеличивалась до 63% (В), что указывает на сильную зависимость этой клеточной линии от уровня глюкозы в питательной среде. Следует отметить, что в клетках линии ECV 304 при культиви-

ровании их как в нормальной среде (Д), так и в среде с низким содержанием глюкозы и с концентрацией 2-DG 40 мМ (5 Е) фракция клеток с гиподиплоидным содержанием ДНК (7%) практически не отличается от контрольной (6%) (Г), что свидетельствует о меньшей зависимости выживаемости этих клеток как от уровня глюкозы, так и от гликолиза. Регистрируемые различия между HeLa G63 и ECV 304 в отношении к уровню глюкозы в питательной среде свидетельствуют о различии метаболических путей получения энергии. Для опухолевых клеток HeLa G63 это гликолитический путь, для ECV 304 — окислительное фосфорилирование, характерное для немалигнизированных клеток [28]. Почти все опухолевые клетки демонстрируют усиленное включение и утилизацию глюкозы. Эта особенность опухолевых клеток сейчас широко используется в медицинской практике для регистрации метастазирующих опухолей с помощью позитрон-эмиссионного сканирования включения 2-(¹⁸F)-2-дезоксид-Д-глюкозы. При этом остается открытым вопрос, когда и почему опухолевая клетка переходит на этот метаболический путь [29].

Известно, что малигнантной трансформации клеток млекопитающих способствуют онкобелки и опухолевые супрессорные белки, воздействием на пролиферацию, регуляцию клеточного цикла. К агентам, индуцирующим мутации в генах, кодирующих эти белки, обычно относят ионизирующее излучение, химические мутагены, вирусы. Кроме того, показано, что гипоксия и/или стрессовые условия, голодание (например, отсутствие глюкозы) могут инициировать и ускорять процесс малигнантной трансформации. Усиленный гликолиз требуется для того, чтобы адаптироваться к гипоксическим условиям, когда рост опухоли опережает ее васкуляризацию. В ответ на снижение уровня кислорода в тканях увеличивается экспрессия индуцибельного гипоксией транскрипционного фактора альфа 1 (HIF-1 α). HIF-1 α может прямо регулировать экспрессию генов, вовлеченных как в локальные, так и глобальные реакции на гипоксию, включая большинство гликолитических ферментов [30, 31]. Гипоксия вызывает прогрессирующую продукцию кислородных радикалов и хронически высокий уровень АФК, который со временем стабилизируется в клетках через увеличение экспрессии HIF-2 α , что дает возможность клеткам выживать. Можно предположить, что повышенный внутриклеточный уровень АФК в клетках HeLa G63 обусловлен этими факторами.

Таким образом, нами показано, что ингибирование различных стадий гликолиза приводит к нарушению пролиферации и гибели опухолевых клеток. Селективность действия DCA в отношении опухолевых

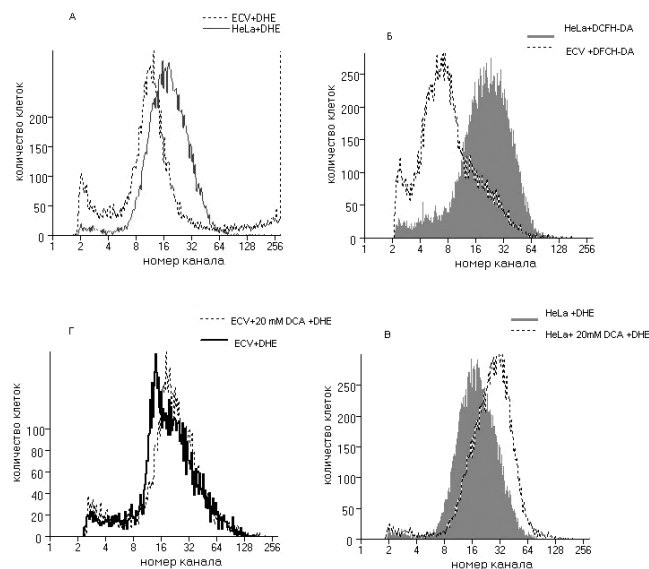


Рис. 2. Внутриклеточный уровень кислородных радикалов в эндотелиоцитах (ECV 304) и в клетках карциномы (HeLa G63) человека: А — базальный уровень АФК в ECV 304 и в клетках HeLa G63, оцененный с помощью DHE; Б — базальный уровень АФК в клетках ECV 304 HeLa G63, оцененный с помощью DCFH-DA; В — внутриклеточный уровень АФК после обработки клеток HeLa G63 20 мМ DCA; Г — внутриклеточный уровень АФК после обработки клеток ECV 304 20 мМ DCA

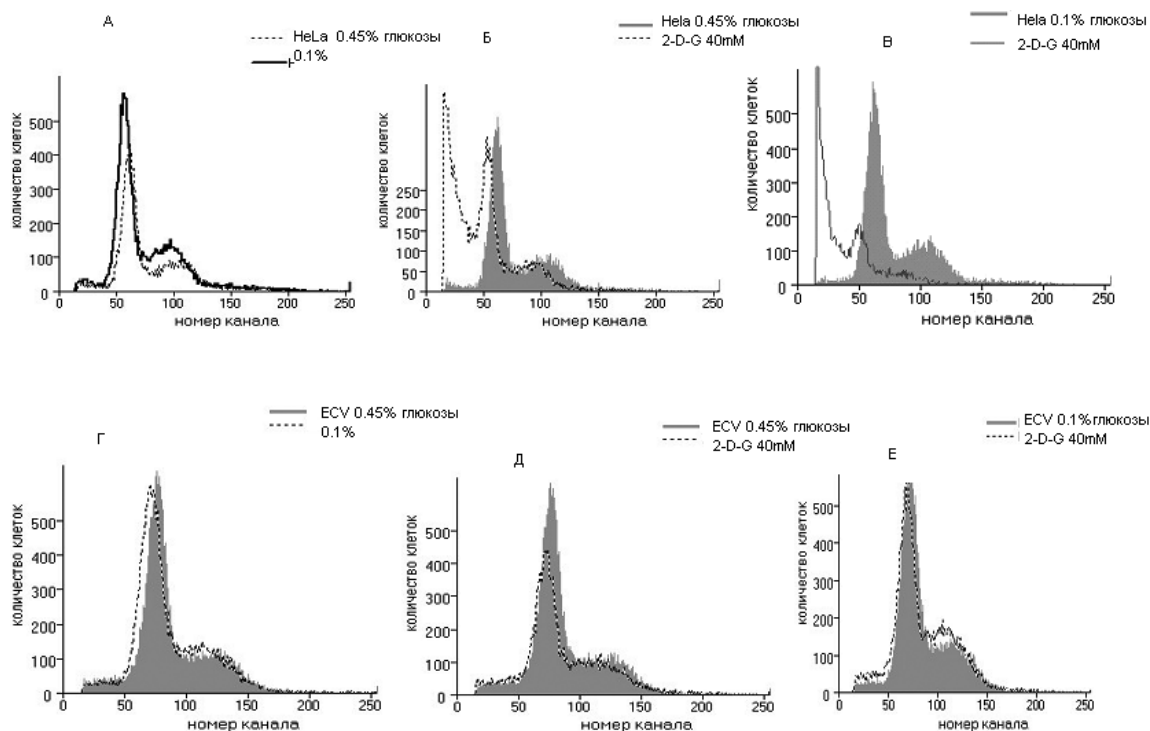


Рис. 3. Сочетанный цитотоксический эффект 2-DG (40 мМ) и питательной среды с низким содержанием глюкозы (1 г/л) на клетки карциномы (HeLa G63) (верхняя панель) и эндотелиоцитов (ECV 304) человека (нижняя панель).

клеток линии HeLa G63 обусловлена увеличением внутриклеточного уровня АФК, который в этих клетках исходно выше, чем в линии ECV 304. Селективность действия 2-DG в отношении опухолевых клеток линии HeLa G63 обусловлена большей зависимостью этой линии от уровня глюкозы, что подтверждается усилением ее цитотоксичности при снижении уровня глюкозы в питательной среде.

Авторы выражают благодарность Г.И. Красоцкой, Ф.М. Ибатуллину и С.И. Степанову за чрезвычайно полезное содействие в проведении исследований.

Список литературы

1. Warburg O, Posener K, Negelein E. Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle. *Biochem Z.* 1924; 152: 309-44.
2. Warburg O. *The metabolism of tumors.* London: Constable and Co; 1930.
3. Gogvadze V, Zhivotovsky B, Orrenius S. The Warburg effect and mitochondrial stability in cancer cells. *Mol Aspects Med.* 2010; 31 (1): 60-74.
4. Kurtoglu M, Maher JC, Lampidis TJ. Differential toxic mechanisms of 2-deoxy-D-glucose versus 2-fluorodeoxy-D-glucose in hypoxic and normoxic tumor cells. *Antioxid Redox Signal.* 2007; 9 (9): 1383-90.

5. Maher JC, Krishan A, Lampidis TJ. Greater cell cycle inhibition and cytotoxicity induced by 2-deoxy-D-glucose in tumor cells treated under hypoxic vs aerobic conditions. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2004; 53: 116-22.

6. Dwarakanath B.S., Zolzer F, Chandna S, et al. Heterogeneity in 2-deoxy-D-glucose induced modifications in energetic and radiation responses of human tumor cell lines. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2001; 51: 1151-61.

7. Hockenbery D.M., Oltvai Z.N., Yin X.M., et al. Bcl2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell.* 1993; 75: 241-51.

8. Stacpoole P.W. The pharmacology of dichloroacetate. *Metabolism.* 1989; 38 (11):1124-4.

9. Dromparis P., Sutendra G., Michelakis E.D. Metabolic modulation as a novel cancer treatment. *Heart Metab.* 2011; 51: 20-6.

10. Bonnet S., Archer S.L., Allalunis-Turner J, et al. A mitochondria-K⁺ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth. *Cancer Cell.* 2007; 11 (1): 37-51.

11. Wong J.Y., Huggins G.S., Debidda M, et al. Dichloroacetate induces apoptosis in endometrial cancer cells. *Gynecol Oncol.* 2008; 109: 394-402.

12. Cao W., Yacoub S., Shiverick K.T., et al. Dichloroacetate (DCA) sensitizes both wild-type and over expressing Bcl-2 prostate cancer cells in vitro to radiation. *Prostate.* 2008; 68: 1223-31.

13. Stockwin L.H., Yu S.X., Borgel S., et al. Sodium Dichloroacetate (DCA) selectively targets cells with defects in the mitochondrial ETC. *Int J Cancer.* 2010; 127 (11): 2510-9

14. Sun W., Zhou S., Chang S.S., et al. Mitochondrial mutations contribute to HIF1alpha accumulation via increased reactive oxygen species and up-regulated pyruvate de-

hydrogenase kinase 2 in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2009; 15: 476-84.

15. Michelakis E.D., Webster L., Mackey J.R. Dichloroacetate (DCA) as a potential metabolic-targeting therapy for cancer. *Br J Cancer.* 2008; 99 (7): 989-94.

16. Stepanov S.I., Konyshov V.N., Kotlovanova L.V. Karyotyping of individual cells with flow cytometry. *Cytometry.* 1996; 23: 279-83.

17. Dean P.N., Cray J.W., Dolbear F.A. The analysis and interpretation of DNA distributions measured by flow cytometry. *Cytometry.* 1982; 3: 188-95.

18. Watson J.V. *Flow Cytometry Data Analysis: Basic Concepts and Statistics.* Cambridge: CUP; 2005.

19. Madhok B.M., Yeluri S., Perry S.L., et al. Dichloroacetate induces apoptosis and cell-cycle arrest in colorectal cancer cells. *British Journal of Cancer.* 2010; 102: 1746-52.

20. Гильяно Н.Я., Конева Л.В., Носкин Л.А. Модификация внутриклеточного уровня свободных радикалов и апоптоз в эндотелиоцитах и клетках карциномы человека в культуре. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2010; 150 (11): 577-81.

21. Гильяно Н.Я., Степанов С.И., Конева Л.В., Носкин Л.А. Внутриклеточный уровень NO и его модифицируемость ингибиторами и индукторами NO-синтазы в клетках карциномы и эндотелиоцитах человека. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2007; 143 (2): 211-3.

22. Гильяно Н.Я., Семенова Е.Г., Федорцева Р.Ф., Конева Л.В. Характеристика спонтанно трансформированной эндотелиальной клеточной линии человека ECV304. II. Функциональные особенности клеток. *Цитология.* 2008; 50 (7): 576-85.

23. Michelakis E.D., Sutendra G., Dromparis P., et al. Metabolic modulation of glioblastoma with dichloroacetate. *Sci Transl Med.* 2010; 2: 31-4.

24. Dwarakanath B.S. Cytotoxicity, radiosensitization, and chemosensitization of tumor cells by 2-deoxy-D-glucose in vitro. *J Cancer Res Ther.* 2009; 5 (1): 27-31.

25. Aft R.L., Zhang F.W., Gius D. Evaluation of 2-deoxy-D-glucose as a chemotherapeutic agent: Mechanism of cell death. *Br J Cancer.* 2002; 87: 805-12.

26. Ahmad I.M., Abdalla M.Y., Aykin-Burns N, et al. 2-Deoxyglucose combined with wild-type p53 over-expression enhances cytotoxicity in human prostate cancer cells via oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2008; 44: 826-34.

27. Coleman M.C., Asbury C.R., Daniels D, et al. 2-Deoxy-D-glucose causes cytotoxicity, oxidative stress, and radiosensitization in pancreatic cancer. *Free Radic Biol Med.* 2008; 44: 322-31.

28. Ярцева Н.М., Федорцева Р.Ф. Характеристика спонтанно трансформированной эндотелиальной клеточной линии человека ECV304. Множественные хромосомные перестройки. *Цитология.* 2008; 50 (7): 568-76.

29. Upadhyay M., Samal J., Kandpal M. et al. The Warburg effect: insights from the past decade. *Pharmacol Ther.* 2013; 137 (3): 318-30.

30. Kondoh H. Cellular life span and the Warburg effect. *Experimental cell research.* 2008; 314: 1923-8.

31. Кирова Ю.И. Влияние гипоксии на динамику содержания HIF-1 α в коре головного мозга и формирование адаптации у крыс с различной резистентностью к гипоксии. *Патол. физиол. и эксперим. терапия.* 2012; 3: 51-5.

References

1. Warburg O, Posener K, Negelein E. Uber den Stoffwechsel der Carcinomzelle. *Biochem Z.* 1924; 152: 309-44.

2. Warburg O. *The metabolism of tumors.* London: Constable and Co; 1930.

3. Gogvadze V, Zhivotovsky B, Orrenius S. The Warburg effect and mitochondrial stability in cancer cells. *Mol Aspects Med.* 2010; 31 (1): 60-74.

4. Kurtoglu M, Maher J.C., Lampidis T.J. Differential toxic mechanisms of 2-deoxy-D-glucose versus 2-fluorodeoxy-D-glucose in hypoxic and normoxic tumor cells. *Antioxid Redox Signal.* 2007; 9 (9): 1383-90.

5. Maher J.C., Krishan A, Lampidis T.J. Greater cell cycle inhibition and cytotoxicity induced by 2-deoxy-D-glucose in tumor cells treated under hypoxic vs aerobic conditions. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2004; 53: 116-22.

6. Dwarakanath B.S., Zolzer F, Chandna S, et al. Heterogeneity in 2-deoxy-D-glucose induced modifications in energetic and radiation responses of human tumor cell lines. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2001; 51: 1151-61.

7. Hockenbery D.M., Oltvai Z.N., Yin X.M. et al. Bcl2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell.* 1993; 75: 241-51.

8. Stacpoole P.W. The pharmacology of dichloroacetate. *Metabolism.* 1989; 38 (11):1124-4.

9. Dromparis P., Sutendra G., Michelakis E.D. Metabolic modulation as a novel cancer treatment. *Heart Metab.* 2011; 51: 20-6.

10. Bonnet S., Archer S.L., Allalunis-Turner J. et al. A mitochondria-K⁺ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth. *Cancer Cell.* 2007; 11 (1): 37-51.

11. Wong J.Y., Huggins G.S., Debidda M. et al. Dichloroacetate induces apoptosis in endometrial cancer cells. *Gynecol Oncol.* 2008; 109: 394-402.

12. Cao W., Yacoub S., Shiverick K.T., et al. Dichloroacetate (DCA) sensitizes both wild-type and over expressing Bcl-2 prostate cancer cells in vitro to radiation. *Prostate.* 2008; 68: 1223-31.

13. Stockwin L.H., Yu S.X., Borgel S., et al. Sodium Dichloroacetate (DCA) selectively targets cells with defects in the mitochondrial ETC. *Int J Cancer.* 2010; 127 (11): 2510-9.

14. Sun W., Zhou S., Chang S.S., et al. Mitochondrial mutations contribute to HIF1 α accumulation via increased reactive oxygen species and up-regulated pyruvate dehydrogenase kinase 2 in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2009; 15: 476-84.

15. Michelakis E.D., Webster L., Mackey J.R. Dichloroacetate (DCA) as a potential metabolic-targeting therapy for cancer. *Br J Cancer.* 2008; 99 (7): 989-94.

16. Stepanov S.I., Konyshov V.N., Kotlovanova L.V. Karyotyping of individual cells with flow cytometry. *Cytometry.* 1996; 23: 279-83.

17. Dean P.N., Cray J.W., Dolbear F.A. The analysis and interpretation of DNA distributions measured by flow cytometry. *Cytometry.* 1982; 3: 188-95.

18. Watson J.V. *Flow Cytometry Data Analysis: Basic Concepts and Statistics.* Cambridge: CUP; 2005.

19. Madhok B.M., Yeluri S., Perry S.L. et al. Dichloroacetate induces apoptosis and cell-cycle arrest in colorectal cancer cells. *British Journal of Cancer.* 2010; 102: 1746-52.

20. Gil'jano N.Ja., Koneva L.V., Noskin L.A. Modification of the level of intracellular free radicals and apoptosis in endothelial cells and human carcinoma cells in culture.

Bjulleten' jeksperimen-tal'noj biologii i mediciny. 2010;150 (11): 577-81. (in Russian)

21. Gil'jano N.Ja., Stepanov S.I., Konevega L.V., Noskin L.A. Intracellular levels of NO and its inhibitor-modifiability and inducers of NO-synthase in endothelial cells and human carcinoma. *Bjulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny.* 2007; 143 (2): 211-3. (in Russian)

22. Gil'jano N.Ja., Semenova E.G., Fedorceva R.F., Konevega L.V. Characteristics of spontaneously transformed human endothelial cell line ECV304. II. Functional characteristics of cells. *Citologija.* 2008; 50 (7): 576-85. (in Russian)

23. Michelakis E.D., Sutendra G, Dromparis P, et al. Metabolic modulation of glioblastoma with dichloroacetate. *Sci Transl Med.* 2010; 2: 31-4.

24. Dwarakanath B.S. Cytotoxicity, radiosensitization, and chemosensitization of tumor cells by 2-deoxy-D-glucose in vitro. *J Cancer Res Ther.* 2009; 5 (1): 27-31.

25. Aft R.L., Zhang F.W., Gius D. Evaluation of 2-deoxy-D-glucose as a chemotherapeutic agent: Mechanism of cell death. *Br J Cancer.* 2002; 87: 805-12.

26. Ahmad I.M., Abdalla M.Y., Aykin-Burns N. et al. 2-Deoxyglucose combined with wild-type p53 over-expressi-

on enhances cytotoxicity in human prostate cancer cells via oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2008; 44: 826-34.

27. Coleman M.C., Asbury C.R., Daniels D, et al. 2-Deoxy-D-glucose causes cytotoxicity, oxidative stress, and radiosensitization in pancreatic cancer. *Free Radic Biol Med.* 2008; 44: 322-31.

28. Jarceva N.M., Fedorceva R.F. Characteristics of spontaneously transformed human endothelial cell line ECV304. Multiple chromosomal aberrations. *Citologija.* 2008; 50 (7): 568-76. (in Russian)

29. Upadhyay M., Samal J., Kandpal M. et al. The Warburg effect: insights from the past decade. *Pharmacol Ther.* 2013; 137 (3): 318-30.

30. Kondoh H. Cellular life span and the Warburg effect. *Experimental cell research.* 2008; 314: 1923-8.

31. Kirova Ju.I. Effect of hypoxia on the dynamics of the HIF-1 α content in the cerebral cortex and the formation of adaptation in rats with different resistance to hypoxia. *Patol. fiziol. i jeksperim. terapija.* 2012; 3: 51-5. (in Russian)

Поступила 29.10.14

Received 29.10.14

Сведения об авторах:

Бондарев Геннадий Николаевич — канд. хим. наук, Петербургский институт ядерной физики им. Б.П.Константинова, НИЦ «Курчатовский институт», ст. науч. сотр., лаб. органической и медицинской химии

Конева Леонид Владимирович — канд.биол. наук, Петербургский институт ядерной физики им. Б.П.Константинова, НИЦ «Курчатовский институт», ст. науч. сотр. лаб. молекулярной генетики, e-mail: konevega@omrb.pnpi.spb.ru

Носкин Леонид Алексеевич — д. биол. наук, проф., Петербургский институт ядерной физики им. Б.П.Константинова, НИЦ «Курчатовский институт», зав. лаб. медицинской биофизики, e-mail: noskin@omrb.pnpi.spb.ru

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

Алчинова Ирина Борисовна — канд. биол. наук, ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», лаб. физико-химической и экологической патофизиологии, вед. науч. сотр., e-mail: AlchinovaIrina@yandex.ru