

## КЛЕТочНАЯ РАДИОБИОЛОГИЯ

УДК 616.091.8:615.03:57.085.23: 539.1.047

### ЦИТОСТАТИЧЕСКИЕ И РАДИОМОДИФИЦИРУЮЩИЕ ЭФФЕКТЫ D-ГЛЮКОЗАМИНА НА КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА В КУЛЬТУРЕ

© 2021 г. Н. Я. Гильяно<sup>1,\*</sup>, М. М. Дуботолова<sup>1</sup>, Л. А. Носкин<sup>1</sup>, Л. В. Коневега<sup>1</sup>,  
С. И. Степанов<sup>1</sup>, Ф. М. Ибатуллин<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова, НИЦ “Курчатовский институт”,  
Гатчина, Россия

\*E-mail: gilyano\_nj@pnpi.nrcki.ru

Поступила в редакцию 29.01.2020 г.

После доработки 14.12.2020 г.

Принята к публикации 16.12.2020 г.

На трех линиях клеток человека исследовали роль цитостатического фактора в цитотоксическом эффекте  $\gamma$ -облучения до и после обработки клеток ингибитором гликолиза D-глюкозамин (GlcN). Показано, что обработка клеток GlcN приводила к аккумуляции клеток в  $G_1$ -фазе клеточного цикла. Предрадиационная обработка клеток GlcN приводит к значительному (более чем в 2 раза) увеличению доли апоптотически гибнущих опухолевых клеток (линий HeLa G 63, Her G2) по сравнению с отдельным воздействием, чего не наблюдается для неопухолевых клеток (ECV 304). GlcN индуцировал селективно направленную радиосенсибилизацию опухолевых клеток. Синергический эффект регистрировался через 48 ч после облучения. Предполагается, что GlcN ингибирует АТФ зависимые пострадиационные репарационные процессы.

**Ключевые слова:** клеточный цикл,  $\gamma$ -кванты  $^{60}\text{Co}$ , апоптоз, D-глюкозамин (GlcN), цитометрия, культура клеток человека

DOI: 10.31857/S0869803121020089

D-глюкозамин, природный аминсахар, являясь важной компонентой гликопротеинов, протеогликанов и глюкозаминогликанов. Показана его антиоксидантная и противовоспалительная способность. Молекулярный механизм противовоспалительного действия D-глюкозамина состоит в ингибировании транслокации внутрь клеточного ядра транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B посредством связывания с рецептором CD44. Взаимодействуя с белком CD44, D-глюкозамин активирует внутриклеточные сигнальные процессы и влияет на синтез других белков протеома [1, 2]. Более полувека назад была показана противоопухолевая активность D-глюкозамина [3]. Показана токсичность D-глюкозамина для нескольких малигнанных клеточных линий и *in vivo* опухолей при концентрациях, имеющих малый эффект на нормальные клетки [4–6]. Известно, что D-глюкозамин ингибирует гликолиз, снижая активность гексокиназы. Показано, что ингибиторы гликолиза нарушают прогрессию клеток по циклу, аккумулируя их либо в  $G_1$ , либо в  $G_2/M$  фазах клеточного цикла [6–8]. Регуляция клеточного цикла является важным фактором, модифицирующим радиочувствительность клеток. Блокирование прогрессии клеток по циклу способствует

частичной синхронизации их и последующее облучение может привести к увеличению цитотоксического эффекта ионизирующего излучения.

Радиомодифицирующий эффект ингибиторов гликолиза интенсивно исследуется как *in vitro*, так и *in vivo*, но в основном это касается 2-дезоксид-Д-глюкозы (2-DG) [7, 9, 10]. Показано, что 2-DG селективно усиливает радиационно-индуцированные повреждения в опухолевых клетках, не влияя на нормальные клетки [10, 11]. Исследований, оценивающих влияние нетоксичных концентраций GlcN на радиочувствительность опухолевых клеток, в доступных нам источниках информации не обнаружено.

Ранее нами была показана повышенная чувствительность клеток карциномы шейки матки (линия HeLa G63) к двум аналогам глюкозы D-глюкозамину и 2-DG при концентрациях (1.5; 3; 5; 10 ммоль/л), нетоксичных для эндотелиоцитов (линия ECV 304). Оба аналога со сходным механизмом действия при этих концентрациях включали в клетках различные чек-пойнты: GlcN блокировал клетки в  $G_1$ -фазе, а 2-DG – в  $G_2/M$ . При сочетанной обработке клеток GlcN и 2-DG регистрировали большую гибель опухолевых клеток, чем при отдельном воздействии. Предполагает-

ся, что синергетический эффект при сочетанной обработке является результатом блокирования пролиферации сразу в двух точках клеточного цикла [6].

Цель работы заключалась в оценке цитостатического и радиомодифицирующего действия GlcN при облучении трех клеточных линий человека  $\gamma$ -квантами  $^{60}\text{Co}$ .

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Работа выполнена на клетках карциномы шейки матки (линия HeLa G 63), гепатокарциномы (линия Hep G2) и на эндотелиоцитах (линия ECV 304) человека. В клетках линии Hep G2 отсутствует активность NAPRT (NA-фофорибозил трансфераза). Клетки культивировали в среде Игла с добавлением 10%-ной эмбриональной сыворотки и гентамицина (50 мкг/мл) ("Биолот").

Клетки выращивали в пенициллиновых флаконах с покровными стеклами, что позволяло одновременно проводить морфологический и цитометрический анализ одной и той же популяции клеток. В работе использованы гидрохлорид D-глюкозамина и 2-дезоксид-D-глюкоза ("Sigma"). Для обработки клеток готовили 1-молярные растворы (моль/л) этих агентов в питательной среде, из которых затем готовили растворы исследуемых концентраций (3 и 10 ммоль/л). Обработку клеток проводили в течение 24 ч до облучения  $\gamma$ -квантами  $^{60}\text{Co}$ . Цитометрический и морфологический анализы эффективности обработки клеток растворами ингибиторов гликолиза и  $\gamma$ -квантами  $^{60}\text{Co}$  проводили через 48 ч.

Облучение клеток  $\gamma$ -квантами  $^{60}\text{Co}$  проводили на установке "Исследователь" ПИЯФ им. Б.П. Константинова при мощности дозы 7 Гр/мин. Минимальная доза, технически достижимая на данной установке при проведении экспериментов, была 6.7 Гр (спуск-подъем образца 57 с; погрешность в определении дозы в пределах 10–15%). Дозовые характеристики установки проверяются ежегодно службой дозиметрии ПИЯФ им. Б.П. Константинова с использованием ферросульфатного метода, последнее измерение проводили за неделю до облучения.

Клетки, выращенные на покровных стеклах, фиксировали 96%-ным этанолом, затем окрашивали ацетоорсеином и учитывали морфологические изменения, такие как фрагментация ядер, наличие микроядер, вакуолизация цитоплазмы с помощью светового микроскопа "Motic" (Китай) или прижизненно окрашивали DAPI или Hoechst 33242 и анализировали на флуоресцентном микроскопе EVOS (Thermo Fisher Scientific, США). Для каждого образца анализировали не менее 1000 клеток. Для проточно-цитометрического анализа, проведенного на двух цитометрах (FACS, США, и

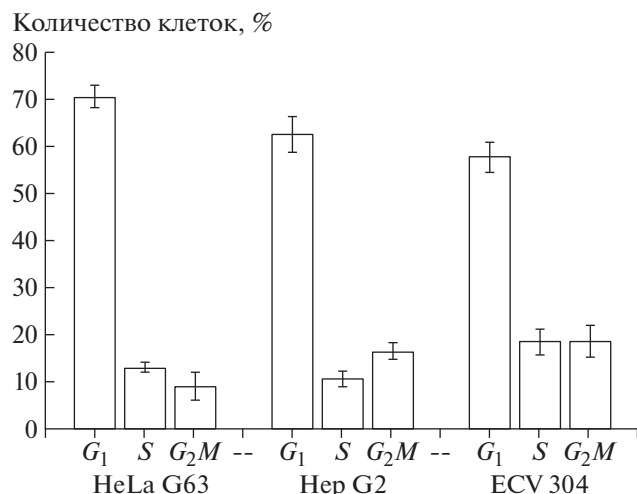
экспериментальном приборе, созданном в лаборатории медицинской биофизики ПИЯФ им. Б.П. Константинова), клетки, выросшие на поверхности флаконов, снимали раствором Версена ("Биолот"). Клеточную суспензию центрифугировали, осадок суспендировали в растворе, содержащем 0.1% бромистого этидия и оценивали 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 [12].

Статистическую обработку результатов проводили в программе Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, США). 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 ( $M \pm \sigma$ ). Сравнение средних значений проводили с помощью  $t$ -критерия Стьюдента. Статистически значимыми принимали отличия при  $p \leq 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис. 1 представлены результаты 24-часовой обработки клеток 3 ммоль/л GlcN и видно накопление клеток в  $G_1$ -фазе клеточного цикла в большей степени при обработке клеток карциномы HeLa G 63 и Hep G2 (70%) и в меньшей клеток ECV 304 (60%). Эти результаты подтверждают данные других исследователей [8] и наши ранее полученные данные, из которых следовало, что GlcN при этой концентрации (3 ммоль/л) блокирует прогрессию клеток по циклу, что и приводило к аккумуляции клеток в  $G_1$ -фазе, в отличие от второго ингибитора гликолиза 2-DG, обработка которым приводила к аккумуляции клеток в  $G_2/M$ -фазах клеточного цикла [6, 13].

На рис. 2 представлены гистограммы одного из трех экспериментов по оценке влияния  $\gamma$ -квантов, испускаемых при распаде  $^{60}\text{Co}$ , на изменения в распределении клеток по содержанию ДНК через 24 ч после облучения. На гистограммах также приведены средние значения этого распределения по трем независимым экспериментам для клеток линии Hep G2 и по пяти независимым экспериментам для клеток HeLa G63 и ECV 304. Из гистограмм видно, что облучение клеток  $^{60}\text{Co}$  в дозе 7 Гр приводило к аккумуляции клеток в  $G_2/M$  [4с = 75–88%] фазах клеточного цикла вне зависимости от типа клеток. При этом доля клеток с содержанием ДНК <2с (клетки с фрагментированными ядрами) увеличивалась незначи-



**Рис. 1.** Распределение клеток HeLa G63, Hep G2, ECV 304 по фазам клеточного цикла после 24-часовой обработки их 3 ммоль/л раствором GlcN.

**Fig. 1.** The distribution of HeLa G63, Hep G2, ECV 304 cells according to the phases of the cell cycle after 24 hours of processing them with 3 mmol/l GlcN.

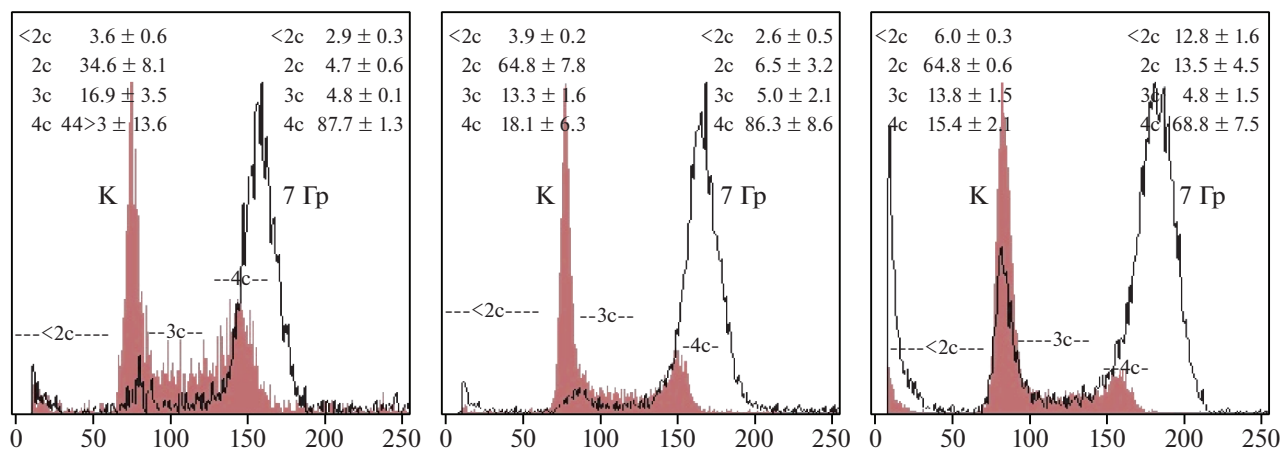
тельно (в пределах 1%) при фиксации клеток через 24 ч после облучения, что может свидетельствовать о том, что этого времени недостаточно для реализации программы радиационно-индуцированного апоптоза. Следует отметить, что клетки линии Hep G2 оказались более чувствительны к действию ионизирующего излучения, поскольку уровень клеток с содержанием ДНК <2с увеличился вдвое с 6% без облучения до 12.8% после об-

лучения по сравнению с необлученным контролем.

При увеличении временного интервала между облучением и фиксацией клеток до 48 ч распределение клеток по содержанию ДНК существенно отличается от фиксации клеток через 24 ч. Результаты представлены на рис. 3, из которого видно, что острое облучение  $\gamma$ -квантами  $^{60}\text{Co}$  в дозе 7 Гр с последующей 48-часовой инкубацией клеток приводило к снижению доли клеток, аккумулярованных в  $G_2/M$  (4с), по сравнению с фиксацией через 24 ч после облучения и увеличению доли клеток с содержанием ДНК <2с во всех линиях. Быстрее всех выходили из блока  $G_2/M$  клетки линии Hep G2, а медленнее клетки линии ECV 304, у которых даже после 48 ч после облучения 67% клеток находились в  $G_2/M$ -фазах.

Предрадиационная инкубация клеток HeLa G63 с GlcN в концентрации 3 ммоль/л приводила к существенному увеличению доли клеток с содержанием ДНК <2с (в 7 раз по сравнению с облучением без GlcN и в 3 раза по сравнению с GlcN без облучения), т.е. предобработка клеток GlcN более чем в 2 раза увеличивала долю клеток с содержанием ДНК <2с. Вдвое снижалась доля клеток, заблокированных в  $G_2/M$  (4с)  $61.7 \pm 1.9\%$  только при облучении и  $32.3 \pm 0.4\%$  при (GlcN + облучение). Очевидно, что в апоптоз уходят клетки заблокированные в фазах  $G_2/M$  (4с).

Для клеток линии Hep G2 предрадиационная инкубация с GlcN привела к увеличению доли клеток с содержанием ДНК <2с вдвое  $24.6 \pm 3.8\%$  по сравнению с GlcN  $10.3 \pm 1.9\%$  и втрое по срав-

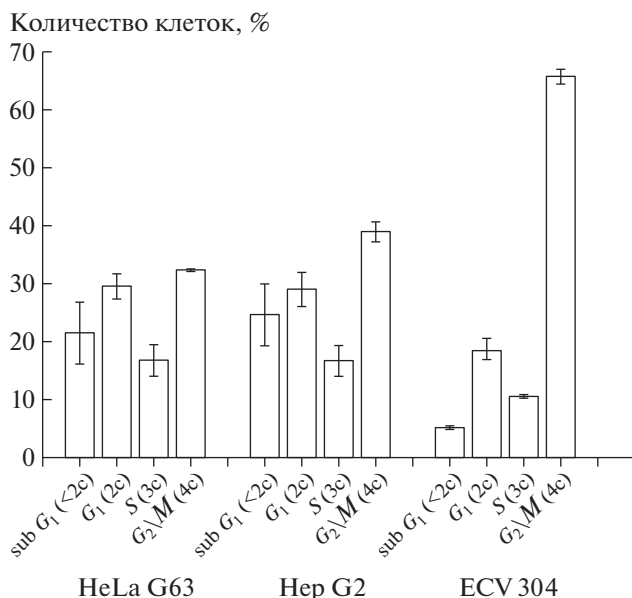


**Рис. 2.** Гистограммы распределения клеток по содержанию ДНК до и после облучения  $\gamma$ -квантами  $^{60}\text{Co}$  в дозе 7 Гр одного из пяти экспериментов.

Заштрихованная гистограмма – без облучения, не заштрихованная – через 24 ч после облучения  $\gamma$ -квантами  $^{60}\text{Co}$  в дозе 7 Гр.

**Fig. 2.** Histograms of the distribution of cells by DNA content before and after irradiation with  $\gamma$ -quantum of  $^{60}\text{Co}$  rays at a dose of 7 Gy of one of 5 experiments.

The shaded histogram – without irradiation, not shaded – 24 hours after irradiation with  $\gamma$ -quantum of  $^{60}\text{Co}$  at a dose of 7 Gy.



**Рис. 3.** Распределение клеток по фазам клеточного цикла через 48 ч после облучения  $\gamma$ -квантами  $^{60}\text{Co}$  в дозе 7 Гр и обработки 3 ммоль/л GlcN.

**Fig. 3.** Distribution of cells according to the phases of the cell cycle 48 hours after irradiation with  $\gamma$ -quantum of  $^{60}\text{Co}$  at a dose of 7 Gy and treatment with a 3 mmol/l GlcN.

нению с облучением  $7.6 \pm 0.5\%$ . Коэффициент синергизма для линии Hep G2, рассчитанный как отношение величины доли клеток с содержанием ДНК  $<2c$  при сочетанном воздействии к сумме величин при раздельном воздействии, был 1.37. Существенно снижалась доля клеток как в  $G_1$ -фазе, так и в  $G_2/M$ , что позволяет предположить, что фракция погибающих клеток увеличилась за счет клеток из этих фаз клеточного цикла.

Для клеток линии ECV 304 увеличение временного интервала между облучением и фиксацией клеток также привело к снижению доли клеток, заблокированных в  $G_2/M$ , с  $87.7 \pm 1.3\%$  через 24 ч до  $67.4 \pm 3.1\%$  через 48 ч после облучения. Однако, в отличие от клеток HeLa G63 и Hep G2, прерадиационная инкубация клеток ECV 304 с 3 ммоль/л GlcN существенно не изменила распределения клеток по фазам цикла. Так, клеток в  $G_1$ -фазе было  $19.2 \pm 1.8\%$  без обработки GlcN и  $18.6 \pm 2.0\%$  при облучении с GlcN. Клеток в  $G_2/M$ -фазах было  $67.4 \pm 3.1\%$  без обработки раствором GlcN и  $65.6 \pm 1.2\%$  при облучении после обработки. При этом доля клеток с содержанием ДНК  $<2c$  при облучении клеток ECV 304 обработанным раствором GlcN увеличивалась до  $5.2 \pm 0.4\%$  по сравнению с контролем  $1.4 \pm 0.9\%$ , но практически не отличалось от раздельной обработки клеток GlcN  $5.0 \pm 3.2\%$  и облучением  $4.4 \pm 1.9\%$ . Коэффициент синергизма для эндотелиоцитов,

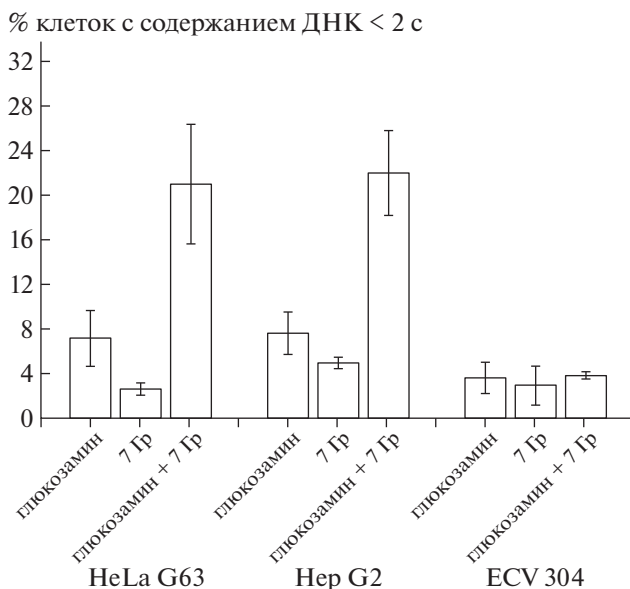
рассчитанный как отношение величины доли клеток с содержанием ДНК  $<2c$  при сочетанном воздействии к сумме величин при раздельном воздействии, был 0.89. Очевидно, что клетки линии ECV 304 более устойчивы к индуцированной GlcN радиосенсибилизации по сравнению с клетками гепатокарциномы (Hep G2) и карциномы шейки матки (HeLa G63).

На рис. 4 представлены результаты экспериментов по оценке уровня клеток с содержанием ДНК  $<2c$  (апоптотически гибнущих клеток) после раздельной и сочетанной обработки клеток 10 ммоль/л GlcN и  $\gamma$ -квантами  $^{60}\text{Co}$  в дозе 7 Гр. Из диаграмм видно, что радиочувствительность клеточных линий, оцененная по уровню популяции клеток с содержанием ДНК  $<2c$ , для клеток линии HeLa G63 и ECV 304 была примерно одинаковой, что подтверждает ранее опубликованные данные, в которых радиочувствительность этих клеточных линий оценивалась нами по уровню радиационно-индуцированных хромосомных повреждений [14]. Сравнительный анализ индукции апоптотической гибели клеток при раздельном и сочетанном воздействии GlcN и  $\gamma$ -квантами  $^{60}\text{Co}$  выявил большую чувствительность клеток линии HeLa G63 и Hep G2 к обработке GlcN, чем клетки линии ECV 304. Сочетанное воздействие GlcN и  $\gamma$ -квантов  $^{60}\text{Co}$  вдвое и втрое увеличивало эффективность по сравнению с раздельными обработками клеток карциномы линии HeLa G63 и Hep G2. Иными словами, для этих клеток регистрируется существенный синергетический эффект, чего не наблюдается для линии ECV 304. При этом стоит отметить, что GlcN не только увеличивает эффективность облучения  $\gamma$ -квантами  $^{60}\text{Co}$ , но сам проявляет селективную цитотоксичность в отношении опухолевых клеток.

Результаты цитометрического анализа подтверждаются морфологическим анализом состава клеточной популяции до и после сочетанного воздействия GlcN и  $\gamma$ -квантами  $^{60}\text{Co}$ , представленного на рис. 5. На фотографиях отчетливо видны различия между клетками HeLa G63 и ECV 304. Так, для клеток HeLa G63 регистрируется значительное увеличение апоптотической гибели клеток при сочетанном воздействии через 48 ч после облучения. При этом кроме фрагментации ядерного материала хорошо видна вакуолизация цитоплазмы и нарушения целостности клеточных мембран. Для клеток ECV 304 наглядно проявляется образование микроядер разных размеров, которые при цитометрическом анализе выявляются как клетки с содержанием ДНК  $<2c$  и нет фрагментации ядерного материала, характерного для апоптотической гибели клеток.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Регуляция клеточного цикла является важным фактором, модифицирующим радиочувствительность клеток. Показана различная радиочувствительность клеток, облученных в различных фазах клеточного цикла. Меньшую радиочувствительность проявляют клетки в *S*-фазе, большую — в *G*<sub>2</sub>/*M* и *G*<sub>1</sub>-фазах. Повышенная зависимость опухолевых клеток от глюкозы, в силу их метаболической особенности, позволяет использовать аналоги глюкозы в качестве ингибиторов клеточной пролиферации для селективной синхронизации клеточной популяции. Выявленные нами ранее различия в блокировании пролиферации в двух фазах клеточного цикла двумя аналогами глюкозы — 2-DG и GlcN, а также синергетический эффект при сочетанном воздействии этих агентов, позволили нам предположить, что цитостатический эффект играет важную роль в цитотоксичности ингибиторов гликолиза. GlcN в используемых нами концентрациях нетоксичен для нормальных клеток [6]. Показано, что низкие концентрации GlcN подавляют активность гена *STAT3*, стимулирующего пролиферацию и выживаемость опухолевых клеток [15]. Ионизирующее излучение действует эффективнее на активно пролиферирующие клетки, блокируя в основном переход из *G*<sub>2</sub>/*M*-фазы. При сочетанном воздействии GlcN и  $\gamma$ -квантами блокирование клеток происходит сразу в двух точках клеточного цикла: *G*<sub>1</sub> и *G*<sub>2</sub>-фазах, преодолеть которые при дефиците АТФ опухолевым клеткам значительно труднее. Второй аналог глюкозы 2-деокси-D-глюкоза (2-DG) блокирует пролиферацию в *G*<sub>2</sub>-фазе клеточного цикла [13] и селективно усиливает радиационно-индуцированные повреждения в опухолевых клетках, не влияя на нормальные клетки. При этом радиосенсибилизирующий эффект 2-DG небольшой [16]. По-видимому, цитостатический эффект 2-DG (блокирование клеток в *G*<sub>2</sub>/*M*) нивелируется более мощным блокированием клеток в этих же фазах ионизирующим излучением [11]. Кроме того, 2-DG индуцирует модификации радиационного ответа, которые прямо не коррелируют с изменениями уровня АТФ. Очевидно, что взаимосвязь энергетического метаболизма и радиобиологических ответов является очень сложной по своей природе и требует дальнейших исследований. Известно, что глюкозамин также ингибирует N-гликозилирование, которое коррелирует с глюкозамин-индуцированной цитотоксичностью. Предполагается, что глобальное ингибирование N-гликозилирования белков может быть основным механизмом, лежащим в основе мультиплетных биохимических и клеточных эффектов глюкозамина [17]. Результаты систематического анализа молекулярных механизмов воздействия глюкозамина и результаты протеомных



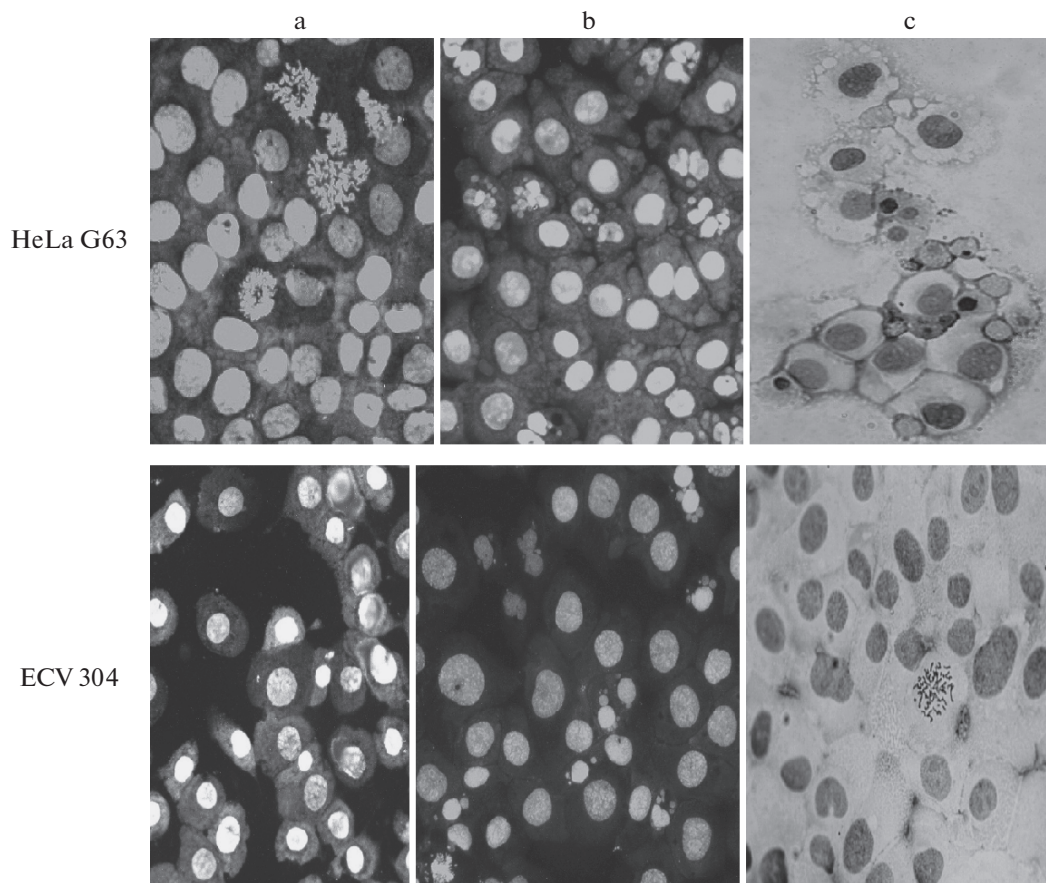
**Рис. 4.** Уровень клеток с содержанием ДНК <2с после отдельной и сочетанной обработки клеток 10 ммоль/л GlcN и облучения  $\gamma$ -квантами <sup>60</sup>Co в дозе 7 Гр.

**Fig. 4.** The level of cells with DNA content <2c after separate and combined treatment of cells with 10 mmol/l GlcN and irradiated with  $\gamma$ -quantum of <sup>60</sup>Co at a dose of 7 Gy.

исследований эффектов глюкозамина показали, что глюкозамин не взаимодействует ни с геномной ДНК, ни с РНК транскриптома, а продукты биотрансформации глюкозамина являются просто отдельными метаболитами из метаболома. Фармакологические эффекты глюкозамина опосредуются исключительно взаимодействием с определенными белками протеома.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, обработка клеток ингибитором гликолиза D-глюкозамином нарушает прогрессию клеток по циклу, синхронизируя их в *G*<sub>1</sub>-фазе клеточного цикла, что приводит к апоптотической гибели опухолевых клеток (HeLa G 63; Hep G2), и последующее облучение  $\gamma$ -квантами в дозе 7 Гр приводит к значительному увеличению апоптоза по сравнению с отдельным воздействием каждого из этих агентов, чего не наблюдается для опухолевых клеток (ECV 304). Таким образом, очевидна селективно-направленная радиосенсибилизация опухолевых клеток, индуцированная D-глюкозамином. При этом стоит отметить, что глюкозамин не только увеличивает эффективность облучения  $\gamma$ -квантами, но сам проявляет селективную цитотоксичность в отношении опухолевых клеток. Поскольку проявление эффекта регистрируется не сразу, а через 48 ч и позже, то можно предположить, что D-глюкозамин инги-



**Рис. 5.** Морфологические изменения клеток HeLa G 63 (верхняя панель) и ECV 304 (нижняя панель), обработанных 10 ммоль/л раствором GlcNCl и облученных  $^{60}\text{Co}$  в дозе 7 Гр: а – без обработки, б – через 48 ч, с – через 72 ч после обработки.

**Fig. 5.** Morphological changes of HeLa G 63 cells (upper panel) and ECV 304 (lower panel) treated with 10 mmol/l GlcN and irradiated with  $\gamma$ -quantum of  $^{60}\text{Co}$  at a dose of 7 Gy: a – without treatment, b – 48 hours after treatment, c – 72 hours after treatment.

бирует АТФ-зависимые пострадиационные репарационные процессы.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Oh H.J., Lee J.S., Song D.K., et al.* D-glucosamine inhibits proliferation of human cancer cells through inhibition of p70S6K // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007. V. 360. № 4. P. 840–845.
2. *Dalirfardouei R., Kafrimi G., Jamialahmadi K.* Molecular mechanisms and biomedical applications of glucosamine as a potential multifunctional therapeutic agent // *Life Sci.* 2016. V. 152. P. 21–29.
3. *Quastel J.H., Cantero A.* Inhibition of tumor growth by D-glucosamine // *Nature.* 1953. V. 171. P. 252–254.
4. *Zhang L., Liu W.S., Han B.Q., et al.* Antitumor activities of D-glucosamine and its derivatives // *J. Zhejiang University. Sci. B.* 2006. V. 7. P. 608–614.
5. *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 alpha // *Toxicol. In Vitro.* 2012. V. 26. P. 42–50.
6. *Гильяно Н.Я., Носкин Л.А., Журишкина Е.В. и др.* Комбинация низких доз глюкозамина и 2-DG усиливает цитотоксический эффект в опухолевых клетках человека в культуре // *Патол. физиология и эксперим. терапия.* 2019. Т. 63. № 2. С. 41–49. [*Giliano N. Ya., Noskin L. A., Zhurishkina E. V., et al.* The combination of low doses of glucosamine and 2-DG enhances the cytotoxic effect in human tumor cells in culture // *Pathological physiology and experimental therapy.* 2019. V. 63. № 2. P. 41–49. (In Russian)]
7. *Varshney R., Dwarakanath B., Jain V.* Radiosensitization by 6-aminonicotinamide and 2-deoxy-D-glucose in human cancer cells // *Int. J. Radiat. Biol.* 2005. V. 81. № 5. P. 397–408.
8. *Wang L.S., Chen S.J., Zhang J.F., et al.* Anti-proliferative potential of Glucosamine in renal cancer cells via inducing cell cycle arrest at G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase // *BMC Urol.* 2017. V. 17. № 1. P. 1–10.
9. *Dwarkanath B.S., Zolzer F., Chandana S. et al.* Heterogeneity in 2-deoxy-D-glucose-induced modifications

- in energetics and radiation responses of human tumor cell lines // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2001. V. 50. № 4. P. 1051–61.
10. Singh D., Banerji A.K., Dwarakanath B.S. et al. Optimizing cancer radiotherapy with 2-deoxy-D-glucose dose escalation studies in patients with glioblastoma multiforme // *Strahlenther Onkol.* 2005. V. 181. № 8. P. 507–514.
  11. Prasanna V.K., Venkataramana N.K., Dwarakanath B.S., Santhosh V. // *J. Cancer Res. Ther.* 2009. Suppl. 1. P. S44–47.
  12. Watson J.V. *Flow Cytometry Data Analysis: Basic Concepts and Statistics.* Cambridge University Press, 2005.
  13. Гильяно Н.Я., Бондарев Г.Н., Коневега Л.В. и др. Возможные механизмы селективного действия ингибиторов гликолиза на эндотелиоциты и клетки карциномы человека // *Патол. физиология и эксперим. терапия.* 2014. Т. 58. № 4. [Giliano N.Ya., Bondarev G.N., Konevega L.V., et al. Possible mechanisms for the selective action of glycolysis inhibitors on endotheliocytes and human carcinoma cells // *Pathological physiology and experimental therapy.* 2014. V. 58. № 4. (In Russian)]
  14. Гильяно Н.Я., Бондарев Г.Н., Коневега Л.В. и др. Модификация клеточной радиочувствительности ингибиторами NO-синтазы // *Радиационная биология. Радиэкология.* 2005. Т. 45. № 1. С. 63–70. [Giliano N.Ya., Bondarev G.N., Konevega L.V. et al. Modification of cellular radiosensitivity by NO synthase inhibitors // *Radiation Biology. Radioecology.* 2005. V. 45. № 1. С. 63–70. (In Russian)]
  15. Chesnokov V., Sun Ch., Itakura K. Glucosamine suppresses proliferation of human prostate carcinoma DU145 cells through inhibition of STAT3 signaling // *Cancer Cell Int.* 2009. V. 9. С. 25.
  16. Islamian J.P., Aghaee F., Farajollahi A., et al. Combined Treatment with 2-Deoxy-D-Glucose and Doxorubicin Enhances the in Vitro Efficiency of Breast Cancer Radiotherapy // *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2015. V. 16. № 18. P. 8431–8438.
  17. Chesnokov V., Gong B., Sun C., Itakura K. Anti-cancer activity of glucosamine through inhibition of N-linked glycosylation // *Cancer Cell Int.* 2014. V. 14. № 45. С. 1–10.

## Cytostatic and Radiomodifying Effects of D-Glucosamine on Human Cells in Culture

N. Ya. Giliano<sup>a, #</sup>, M. M. Dubotolova<sup>a</sup>, L. A. Noskin<sup>a</sup>, L. V. Konevega<sup>a</sup>,  
S. I. Stepanov<sup>a</sup>, and F. M. Ibatullin<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Petersburg Institute of Nuclear Physics B. P. Konstantinova, Research Center “Kurchatov Institute”, Gatchina, Russia

<sup>#</sup>E-mail: gilyano\_nj@pnpi.nrcki.ru

The role of the cytostatic factor in the cytotoxic effect of  $\gamma$ -quantum  $^{60}\text{Co}$  before and after treatment of cells with a glycolysis inhibitor d-glucosamine was studied on 3 human cell lines. It was shown that treatment of cells with d-glucosamine hydrochloride led to the accumulation of cells in the  $G_1$  phase of the cell cycle. The pre-radiation treatment of cells with d-glucosamine leads to a significant (more than 2-fold) increase in the proportion of apoptotically dying tumor cells (lines HeLa G 63, Hep G2), compared with separate exposure, which is not observed for non-tumor cells (ECV 304). d-glucosamine induced selectively directed radiosensitization of tumor cells. A synergistic effect was recorded 48 hours after irradiation. d-glucosamine is believed to inhibit ATP-dependent post-radiation repair processes.

**Keywords:** cell cycle,  $\gamma$ -quantum  $^{60}\text{Co}$ , apoptosis, d-glucosamine, cytometry, human cell culture