

Received: 25.01.2017  
Accepted: 10.07.2017  
Published: 08.12.2017

## 3-Bromopirogronian jako potencjalny farmaceutyk w świetle danych eksperymentalnych

### 3-Bromopyruvate as a potential pharmaceutical in the light of experimental data

Izabela Szczuka, Andrzej Gamian, Grzegorz Terlecki

Katedra i Zakład Biochemii Lekarskiej, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu

#### Streszczenie

3-Bromopirogronian (3-BrPA) jest halogenowanym analogiem kwasu pirogronowego, znanym od ponad czterech dekad jako alkilator atakujący grupy –SH wielu białek. Do komórek zwierzęcych dostaje się tak jak mleczan, tj. dzięki działaniu transporterów kwasów monocarboxylowych. Wzrost zainteresowania tym związkiem, w ostatnim czasie, wynika głównie z nadziei związanej z jego działaniem antynowotworowym. Polega ono na zaburzeniu metabolizmu energetycznego komórek nowotworowych przez hamowanie aktywności enzymów szlaku glikolizy (heksokinazy II, dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego, kinazy fosfoglicerynianowej) oraz łańcucha oddechowego (dehydrogenazy bursztynianowej). Znane są dwa przypadki klinicznego zastosowania tego związku w leczeniu chorych z nowotworem w zaawansowanym stadium. Stosując 3-BrPA osiągnięto złagodzenie przebiegu reumatoidalnego zapalenia stawów u myszy SKG. Związek ten działa także przeciw pasożytniczo: obniża żywotność *Trypanosoma brucei*, zmniejsza wewnątrzkomórkową proliferację *Toxoplasma gondii* i obniża aktywność metaboliczną *Schistosoma mansoni*. Ma również właściwości przeciwgrzybicze; silnie działa zwłaszcza na *Cryptococcus neoformans*, a także na *Saccharomyces cerevisiae*. Wykazano również jego hamujące działanie na enzymy bakteryjne: liazę izocytrynianową u *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas indigofera* oraz liazę metyloizocytrynianową, dehydrogenazę bursztynianową i syntazę kwasu aceto hydroksyloowego *Escherichia coli*. Wszędzie tam, gdzie komórki niepożądane (nowotworowe, pasożytnicze) różnią się od prawidłowych intensywniejszą glikolizą i wyższymi potrzebami energetycznymi istnieje szansa skutecznego użycia 3-BrPA. Jednak związek ten działa na wszystkie komórki i dlatego wydaje się, że jego przyszłość jako farmaceutyku jest zależna od opracowania odpowiednich metod jego skutecznego i bezpiecznego stosowania.

#### Słowa kluczowe:

3 – bromopirogronian • alkilator • glikoliza • komórki nowotworowe • pasożyty

#### Summary

3-Bromopyruvate (3-BrPA) is an halogenated analogue of pyruvic acid known for over four decades as an alkylating agent reacting with thiol groups of many proteins. It enters animal cells like a lactate: via monocarboxylic acid transporters. Increasing interest in this compound, in recent times, is mainly due to hopes associated with its anticancer action. It is based on the impairment of energy metabolism of tumor cells by inhibiting enzymes in the glycolysis pathway (hexokinase II, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, phosphoglycerate kinase) and the oxidative phosphorylation (succinate dehydrogenase). Two cases of clinical application of this compound in the treatment of advanced cancers were reported. By using 3-BrPA, rheumatoid arthritis in SKG mice has been reduced. This compound has also antiparasitic activity: lowers cell viability of *Trypanosoma brucei*, decreases intracellular proliferation of *Toxoplasma gondii*

and reduces the metabolic activity of *Schistosoma mansoni*. It also has antifungal properties; particularly it acts strongly on *Cryptococcus neoformans*, as well as *Saccharomyces cerevisiae*. An inhibitory effect on bacterial enzymes was also described on: isocitrate lyase from *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas indigofera* and 2-methylisocitrate lyase, succinate dehydrogenase and acetohydroxylic acid synthase from *Escherichia coli*. Wherever undesirable (cancer, parasitic) cells differ from normal by more intense glycolysis and higher energy needs, there is a good chance of successful 3-BrPA use. However, this compound acts on all cells and it, therefore, seems that its future as a pharmaceutical is dependent upon the development of appropriate methods for its effective and safe application.

**Keywords:** 3-bromopyruvate • alkylating agent • glycolysis • cancer cells • parasites

**GICID:** 01.3001.0010.6666  
**DOI:** 10.5604/01.3001.0010.6666  
**Word count:** 4544  
**Tables:** 1  
**Figures:** 2  
**References:** 60

**Adres autorów:** dr hab. Grzegorz Terlecki, prof. nadzw., Katedra i Zakład Biochemii Lekarskiej, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu; ul. Chałubińskiego 10, 50-368 Wrocław; e-mail: grzegorz.terlecki@umed.wroc.pl; izabela.szczuka@umed.wroc.pl

**Wykaz skrótów:** **3-BrPA** – 3-bromopirogronian; **AIF** – czynnik indukujący apoptozę; **DCs** – komórki dendrytyczne; **FISH** – metoda fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ*; **FLC** – rak wątrobowokomórkowy w postaci fibrolamellarnej; **GAPDH** – dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego; **HKII** – heksokinaza II; **IC<sub>50</sub>** – stężenie inhibitora hamujące proliferację komórek w 50%; **LDH** – dehydrogenaza mleczanowa; **MCT** – transportery kwasów monokarboksylowych; **MIC** – minimalne stężenie hamujące; **PDR** – oporność plejotropowa; **PGK** – kinaza fosfoglicerynianowa; **pH<sub>i</sub>** – pH wewnątrzkomórkowe; **SDH** – dehydrogenaza bursztynianowa; **TACE** – chemoembolizacja przezcётnicza (transcatheter arterial chemoembolization); **Th17** – limfocyty wytwarzające interleukinę 17; **Treg** – limfocyty T regulatorowe; **VDAC** – zależny od potencjału kanał anionowy (voltage dependent anion channel).

## WSTĘP

3-Bromopirogronian (3-BrPA) jest halogenowanym analogiem kwasu pirogronowego, wykazującym cechy elektrofilowego alkilatora. Początkowo, ze względu na jego dużą reaktywność wobec grup tiolowych, wykorzystywany był w technikach analitycznych znakowania białek [4,51]. W 1969 r. zespół Bakera i Rabina po raz pierwszy doniósł o wpływie 3-BrPA na aktywność enzymu – dehydrogenazy glutaminianowej [3]. W 1976 r. Fonda, badając mechanizm inhibicji dekarboksylazy glutaminianowej, dostarczyła dowodów na alkilujące działanie 3-BrPA na reszty cysteiny w białkach [20]. Właściwości te zostały potwierdzone wynikami badań nad wpływem 3-BrPA na aldolazę 2-keto-3-deoksy-6-fosfoglukonianową [35] oraz na kompleks dehydrogenazy pirogronianowej u *Escherichia coli* [1].

Inne doniesienia poszerzały wiedzę o zakresie działania omawianego związku na enzymy szlaków metabolicznych komórki, a zwłaszcza: glikolizy – heksokinazę II (HKII) [23,60], dehydrogenazę aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH) [21,53], kinazę fosfoglicerynianową (PGK) [42] oraz fosforylacji oksydacyjnej – dehydrogenazę bursztynianową (SDH) [42,49]. Działanie ma szczególny wpływ

na metabolizm komórek nowotworowych, wykazujących tzw. „efekt Warburga”, czyli pozyskujących energię głównie w wyniku glikolizy, mimo obecności tlenu [14,58]. Jako pochodna pirogronianu, 3-BrPA pokonuje barierę błonową tą samą drogą – z udziałem transporterów kwasów monokarboksylowych (MCT), które ulegają nadekspresji w komórkach nowotworowych [22]. Ów selektywny wychwyty oraz inhibicja głównych enzymów odmiennego, w porównaniu do zdrowych komórek, metabolizmu energetycznego komórek nowotworowych wskazują na potencjał 3-BrPA, jako stosunkowo nietoksycznego – w porównaniu z innymi, dotychczas stosowanymi, związkami alkilującymi – wybiórczego i obiecującego preparatu przeciwnowotworowego [30,40,41].

Opublikowano także dwie prace kazuistyczne dotyczące prób leczenia zaawansowanych nowotworów z zastosowaniem 3-BrPA [18,31].

3-BrPA znajduje zastosowanie jako związek o właściwościach przeciwpasożytniczych. Dowiedziono, iż powoduje inhibicję ruchliwości i obniża żywotność *Trypanosoma brucei* [5] oraz zmniejsza wewnątrzkomórkową proliferację *Toxoplasma gondii* [13], jak również obniża aktywność metaboliczną *Schistosoma mansoni* [34].

Wykazano również jego przeciwgrzybicze własności; opisano bójcze działanie na wiele szczepów patogennych, zwłaszcza na *Cryptococcus neoformans* [17] oraz hamujące na proliferację wielu szczepów *Saccharomyces cerevisiae* [33], mogących być potencjalną przyczyną zakażeń oportunistycznych [43].

Podejmowane są badania nad wpływem 3-BrPA na enzymy bakteryjne ważnych szlaków metabolicznych – liazę izocytrynianową w cyklu kwasów trójkarboksylowych u *Escherichia coli* [29], *Mycobacterium tuberculosis* [50] i *Pseudomonas indigofera* [47], liazę 2-metyloizocytrynianową występującą w cyklu metyloizocytrynianowym [25,56], kompleks dehydrogenazy bursztynianowej w procesie dekarboksylacji oksydacyjnej [1] oraz syntazę kwasu acetohydroksylowego w szlaku biosyntezy aminokwasów rozgałęzionych *Escherichia coli* [44,52].

Dotychczasowe badania dowiodły, iż 3-BrPA działa alkilująco na enzymy pochodzące zarówno z komórek organizmów eukariotycznych ssaków (szczególnie na komórki nowotworowe, ze względu na ich odmienny metabolizm), przywr, pierwotniaków i grzybów oraz na enzymy o pochodzeniu prokariotycznym, hamując procesy glikolizy i oddychania komórkowego, obniżając poziom ATP i prowadząc do śmierci komórek.

### 3-BROMOPIROGRONIAN – BUDOWA I REAKCJA

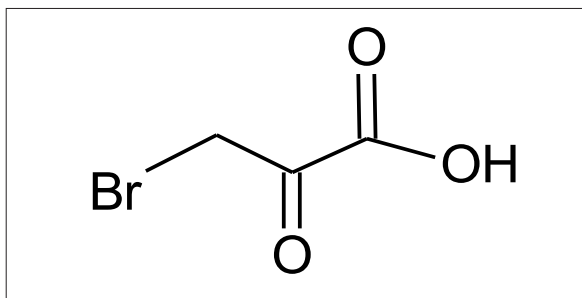
3-BrPA, o wzorze strukturalnym przedstawionym na ryc.1, jest syntetyczną pochodną kwasu pirogronowego. Jako jego strukturalny analog może wnikać do komórki tą samą drogą. Za pobór 3-BrPA do komórki odpowiadają transportery kwasów monokarboksylowych – MCT1, kodowane przez gen *SLC16A1* [6]. U drożdży *Saccharomyces cerevisiae* głównym nośnikiem 3-BrPA jest transporter Jen1p, jednak nie ma on homologicznego odpowiednika w organizmie ludzkim [33].

Alkilacja z zastosowaniem 3-BrPA opiera się na reakcji substytucji nukleofilowej  $S_N2$  (ryc.2). Elektroujemność atomu bromu wzmacnia reaktywność sąsiedniego węgla grupy  $\alpha$ -karbonylowej wobec nukleofili i cząsteczek wody. Atom bromu w opisywanym związku zostaje zastąpiony przez reagenta nukleofilowego, będącego donorem elektronów, jaką jest grupa tiolowa np. w białkach [19,24].

Stabilność związku jest ściśle związana z odczynem środowiska. 3-BrPA charakteryzuje się krótkim czasem półtrwania (około 77 min) w warunkach fizjologicznych, tj. w pH 7,4. Okres znacznie się wydłuża po obniżeniu wartości pH, jak to się dzieje w tkankach zmienionych nowo-

Tabela 1. Wykaz enzymów hamowanych przez 3-BrPA

Enzym	Szlak metaboliczny	Reprezentatywne źródła enzymów	Referencje
HKII		ludzkie komórki nowotworowe SKOV-3, MDA-MB-231, MDA-MB-435	[23,60]
GAPDH	Glikoliza	<i>Trypanosoma brucei</i> , królicze komórki nowotworowe Vx-2, ludzkie komórki nowotworowe HepG2, Hep3B, SK-Hep1, pierwotne ludzkie komórki nowotworowe raka jelita grubego	[5,21,53]
PGK		ludzkie komórki nowotworowe HepG2	[42]
SDH	łańcuch oddechowy	ludzkie komórki nowotworowe HepG2	[42,49]
Liaza izocytrynianowa	Cykl Krebsa	<i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas indigofera</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	[29,47,50]
Syntaza kwasu acetohydroksylowego	Biosynteza aminokwasów rozgałęzionych	<i>Escherichia coli</i>	[44,52]
Kompleks dehydrogenazy pirogronianowej	Dekarboksylacja oksydacyjna	<i>Escherichia coli</i>	[1]
Aldolaza 2-keto-3-deoksy-6-fosfoglukonianu	Szlak Entnera-Doudoroffa	<i>Pseudomonas putida</i>	[35]



Ryc. 1. Wzór strukturalny 3-bromopirogronianu

tworowo, w których pH płynu zewnątrzkomórkowego osiąga wartości 6,5-7,0 [24].

### Wpływ na metabolizm energetyczny komórek nowotworowych

Metabolizm komórek nowotworowych oparty jest głównie na intensywnej glikolizie zachodzącej w warunkach tlenowych [14]. Taki sposób pozyskiwania energii przez komórki nowotworowe jest korzystny w warunkach mikrośrodowiska tworzonego przez rozwijający się nowotwór, w którym dochodzi do hipoksji i kwasicy. Otto Warburg, w latach 20 ub.w., zauważył, że tkanki guza wątroby przejawiają wzmożoną aktywność glikolityczną, mimo obecności tlenu [58]. Zjawisko również zaobserwowano w wielu innych typach nowotworów i opisano jako „efekt Warburga”. Na jego wystąpienie wpływ mają defekty metaboliczne w mitochondriach, częściowo spowodowane mutacjami lub delecjami w mtDNA, prowadzącymi do zdefektowania białek łańcucha oddechowego, nieprawidłowej ekspresji enzymów metabolicznych oraz niedotlenienia komórki. Jest to spowodowane szybkim wzrostem i ekspansją guza, wyprzedzającymi zwykle generację unaczynienia, a zatem niedostatecznym ukrwieniem tkanki zmienionej nowotworowo [59]. Obecnie wiadomo, że komórki nowotworowe wykazują różny stopień nasilenia procesu glikolizy w zależności od rodzaju komórki i warunków jej wzrostu. W warunkach tlenowych do 60% wytworzonego przez komórki nowotworowe ATP pochodzi z przemian glikolitycznych, podczas gdy prawidłowe komórki generują większość ATP przez cykl kwasów trójkarboksylowych i fosforylację oksydacyjną w mitochondriach [11,38].

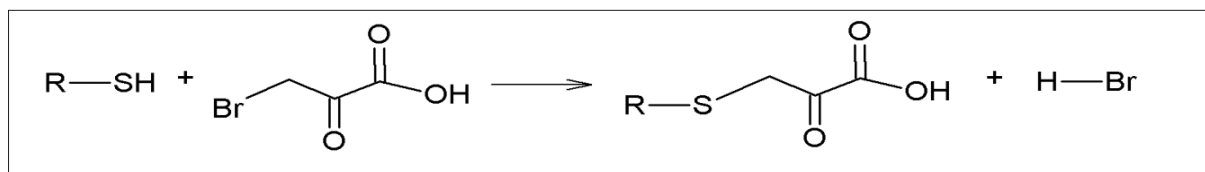
Niestety, adaptacja metaboliczna w odpowiedzi na te czynniki najczęściej wiąże się ze zmniejszeniem wrażli-

wości na powszechnie stosowane środki przeciwnowotworowe. Jednocześnie, ów swoisty profil metaboliczny, umożliwia badanie takich związków, których działanie ukierunkowane jest na glikolizę w nowotworach, umożliwiając osiągnięcie zarówno selektywności, jak i skuteczności terapeutycznej. Jednym z nich jest 3-BrPA, działający hamująco na główne enzymy szlaku glikolitycznego – HKII [23,60], GAPDH [21,53] i PGK [42].

Heksokinaza jest enzymem z klasy transferaz katalizującym ATP-zależną fosforylację glukozy do glukozo-6-fosforanu. Reakcja jest fizjologicznie nieodwracalna i jest pierwszym stopniem regulacji glikolizy. HKII jest jedną z czterech izoform tego enzymu (I-IV), która w odróżnieniu od I i III, zachowuje zdolność katalityczną w obu domenach, podwajając szybkość tworzenia się glukozo-6-fosforanu [55]. Występuje u ssaków głównie w tkankach insulinowrażliwych: mięśni szkieletowych, tłuszczowej i w sercu, a jej nadekspresję stwierdzono w wielu typach nowotworów [15,46,60]. Metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) wykazano, że w guzach następuje co najmniej pięciokrotna amplifikacja genu kodującego HKII [45]. HKII wiąże się z błoną mitochondrialną przez zależny od potencjału kanał anionowy (VDAC) [38]. Badania z zastosowaniem techniki immunoprecypitacji białek wskazują na tworzenie się kompleksów HKII z czynnikiem indukującym apoptozę (AIF).

Badania z wykorzystaniem m.in. techniki Western blotting, przeprowadzone na lizatach komórek HL-60 (linia komórkowa ludzkiej ostrej białaczki promielocytarnej) inkubowanych z 3-BrPA (100  $\mu$ M; 1,3,5 h) wykazują, iż po jego zastosowaniu prążek HKII przesuwa się znacząco w kierunku wyższej masy, co potwierdza kowalencyjną modyfikację HKII w obrębie reszt cysteiny, ponieważ działanie tego alkilatora skierowane jest na grupy sulfhydrylowe. Modyfikacja hamuje aktywność enzymatyczną HKII, a także powoduje jej oddysocjowanie od mitochondriów [12]. Jednak Shoshan [51] uważa, że inhibicja HKII *per se* nie powoduje indukowanej śmierci komórki. Kluczowa może się okazać translokacja AIF spowodowana oderwaniem się kompleksów AIF/HKII od błony mitochondrialnej i uwolnieniem w ten sposób czynnika indukującego apoptozę do cytosolu [12,28].

Innym enzymem glikolitycznym modyfikowanym przez 3-BrPA jest GAPDH, zależna od  $\text{NAD}^+$  oksydoreduktaza katalizująca reakcję utleniania aldehydu 3-fosfoglicerynowego do 1,3-bisfosfoglicerynianu. Białko zawiera



Ryc. 2. Schemat reakcji alkilacji z zastosowaniem 3 – BrPA

resztę cysteiny (Cys152) w centrum katalitycznym. Wysoki poziom mRNA oraz ekspresji GAPDH wykryto m.in. w nowotworach jelita grubego [53], płuc [54] i trzustki [36], natomiast nadekspresję genu kodującego to białko stwierdzono w późnym stadium patologicznym ludzkiego raka stercza [48].

Ganapathy-Kanniappan i wsp. w 2009 r. przedstawili dowody na kowalencyjną modyfikację GAPDH przez dołączenie reszty pirogronianu pochodzącej z 3-BrPA. W teście *in vitro* (przeprowadzonym na oczyszczonym białku) aktywność tego enzymu gwałtownie spadła po inkubacji z alkilatorem w stężeniu 100  $\mu\text{M}$ . Ten sam zespół przeprowadził również badania na trzech liniach komórkowych ludzkiego raka wątrobowokomórkowego: HepG2, Hep3B i SK-Hep1 oraz linii króliczego nowotworu wątroby VX-2, z których jednoznacznie wynika, iż aktywność GAPDH we wszystkich lisatach komórkowych poddanych działaniu 3-BrPA w różnych stężeniach wykazywała spadek zależny od dawki tego alkilatora [21]. Inny zespół badawczy dowiódł, iż traktowanie komórek HepG2 3-BrPA o stężeniu 150  $\mu\text{M}$  przez 30 min w 37°C jest wystarczające do nieodwracalnej modyfikacji i hamowania aktywności GAPDH o 90%, podczas gdy przeżywalność komórek w tych warunkach była jeszcze niemal stuprocentowa [42]. Wprawdzie nie zbadano dotąd szlaków sygnałowych łączących inhibicję GAPDH z wejściem komórki w proces apoptozy, jednak za bardzo prawdopodobne można uznać, iż alkilacji poddana zostaje reaktywna reszta Cys152. Modyfikacja może być przyczyną translokacji enzymu do jądra komórkowego i jego bezpośredniej ubiquitynacji i degradacji [10].

Enzymem, którego wrażliwość na działanie 3-BrPA udowodniono, jest PGK. Jest białkiem enzymatycznym z klasy transferaz, katalizującym konwersję 1,3-bis-fosfoglicerynianu do 3-fosfoglicerynianu.

Pereira da Silva i wsp., badając wpływ 3-BrPA na wybrane enzymy glikolityczne w ludzkich komórkach HepG2, wykazali 70% spadek aktywności PGK po inkubacji z 3-BrPA (150  $\mu\text{M}$ , 30 min, 37°C) w stosunku do kontroli [42]. W 1995 r. Jones i wsp. donieśli o wpływie 3-BrPA na aktywność metaboliczną plemników dzika euroazjatyckiego (*Sus scrofa*) podkreślając znaczną inhibicję GAPDH (80% utrata aktywności po 30 s inkubacji z 0,5 mM 3-BrPA) i PGK (80% hamowanie w identycznych warunkach) [27].

Wydaje się, że 3-BrPA może wpływać na metabolizm energetyczny komórki także poza szlakiem glikolizy. Dowodzą tego wyniki badań przeprowadzonych nad wpływem tego związku na SDH. Enzym ten jest białkiem żelazo-siarkowym, tworzy kompleks II łańcucha oddechowego, przemiany zachodzącej w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Katalizuje reakcję w cyklu kwasów trójkarboksylowych, utleniania bursztynianu do fumaranu, przy jednoczesnej redukcji ubiquinonu.

W 1971 r. przedstawiono dowody na nieodwracalną inhibicję SDH przez 3-BrPA [49]. Podczas badań nad metabo-

lizmem energetycznym komórek linii HepG2 wykazano również, iż związek hamuje aktywność SDH w około 70% w stężeniu 150  $\mu\text{M}$ , po półgodzinnej inkubacji w medium pozbawionym glukozy [42].

Przedstawione właściwości 3-BrPA zachęciły badaczy do podjęcia prób zastosowania go do walki z komórkami nowotworowymi. Badania nad wpływem 3-BrPA na metabolizm energetyczny przeprowadzono na wielu nowotworowych liniach komórkowych oraz na modelach zwierzęcych. Ich szczegółowe omówienie znajduje się w pracy przeglądowej „The anticancer agent 3-bromopyruvate: a simple but powerful molecule taken from the lab to the bedside” [2].

Oprócz omówionych właściwości sugerowana jest również protekcyjna funkcja 3-BrPA w terapii reumatoidalnego zapalenia stawów. Wykorzystując mysz model tej choroby (myszy SKG) oraz badania *in vitro* na komórkach zaangażowanych w proces zapalny (limfocyty wytwarzające interleukinę 17 – Th17, komórki dendryczne – DCs oraz limfocyty T regulatorowe – Treg) wykazano, że można złagodzić ten proces stosując 3-BrPA. Wykorzystano to, że podstawowe w tego typu zapaleniu komórki Th17 i DCs wykazują znacznie intensywniejszą glikolizę niż inne z powodu m.in. dużej aktywności HKII. Podanie 3-BrPA, który jest silnym inhibitorem tego enzymu, spowodowało wygaszenie aktywności komórek Th17, zahamowało aktywację DCs oraz ułatwiło różnicowanie komórek Treg. Osiągnięto złagodzenie procesu reumatoidalnego zapalenia stawów [39].

### 3-BROMOPIROGRONIAN – PRÓBY ZASTOSOWAŃ KLINICZNYCH

Podjęto także ryzyko terapeutycznego zastosowania omawianego alkilatora. Dotychczas udokumentowano dwie próby zastosowania 3-BrPA u ludzi z nowotworami. Pierwsza próba [31], pochodząca z 2012 r., dotyczyła przypadku regresji pierwotnego guza wątroby w przebiegu zaawansowanego raka wątrobowokomórkowego w postaci fibrolamelarnej (FLC), w wyniku podawania 3-BrPA metodą TACE u szesnastolatka. Pacjent, od postawienia diagnozy przeżył dwa lata, znacznie dłużej niż prognozowano. Terapia 3-BrPA poprawiła również jakość jego życia. Zmarł jednak z powodu przecięcia wątroby, spowodowanego nieskuteczną detoksykacją i brakiem możliwości usuwania resztek martwych komórek pozostałych po działaniu 3-BrPA.

Inny przypadek, opisany w 2014 r. [18], to 28-letni mężczyzna ze zdiagnozowanym czerniakiem złośliwym, w IV stopniu zaawansowania. 3-BrPA podawano w powolnej infuzji dożylniej w celu zmniejszenia ewentualnego toksycznego działania na układ krwiotwórczy, wątrobę i nerki. Wpływ 3-BrPA na nowotwór oceniano mierząc aktywność LDH w surowicy. Pacjent zmarł kilka miesięcy po rozpoczęciu leczenia z powodu powikłań związanych z zaawansowanym stadium nowotworu.



## Wpływ 3-BrPA na organizmy pasożytnicze

Podjęto wiele prób na poziomie laboratoryjnym zastosowania 3-BrPA także do innych działań terapeutycznych. Odnotowano wpływ 3-BrPA na organizmy pasożytnicze będące czynnikiem etiologicznym chorób również u ludzi: *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma brucei* oraz *Schistosoma mansoni*.

*Toxoplasma gondii* jest bezwzględnie wewnątrzkomórkowym pierwotniakiem pasożytniczym, którego żywicielem pośrednim może być człowiek, u którego wywołuje toksoplazmozę, natomiast ostatecznym są zwierzęta z rodziny kotowatych. Szacuje się, iż zakażenie tym pasożytem dotyczy około 1/3 ludności świata. Infekcja pierwotna przebiega zazwyczaj bezobjawowo, jednak zakażenie *T. gondii* stwarza poważne zagrożenie dla kobiet w okresie ciąży, ze względu na możliwość powstania uszkodzeń płodu, a także u pacjentów z obniżoną odpornością [37].

Stosowane metody leczenia ograniczają się do działania na tachyzoity, aktywną postać wegetatywną pasożyta, bez lub z niewielkim wpływem na bradyzoity, pozostające w cystach tkankowych i charakteryzujące się skrajnym zmniejszeniem tempa wzrostu. Głównym źródłem energii bradyzoitów jest szlak glikolityczny. W 2015 r. przeprowadzono badania na linii komórkowej nabłonka nerki makaka *Macaca mulatta* LLC-MK2, zainfekowanej tachyzoitami szczepu RH *T. gondii*. Wykazano, że 3-BrPA w stężeniu 10  $\mu\text{M}$  jest skuteczny w zwalczaniu wewnątrzkomórkowej proliferacji pasożyta, która zmniejsza się o 42% po 24-godzinym działaniu. Ponadto omawiany alkilator nie wykazywał negatywnego działania na komórki LLC-MK2, których przeżywalność po 6 dniach trwania doświadczenia sięgała 93%. W cytowanej pracy przedstawiono również wyniki badań nad łącznym działaniem 3-BrPA (10  $\mu\text{M}$ ) oraz atowakwonu (50 nM), leku z grupy naftalenów, stosowanego również w zakażeniach *Toxoplasma gondii* u pacjentów z HIV/AIDS. Łączne działanie tych związków w 73% hamowało wewnątrzkomórkową proliferację *T. gondii*, w porównaniu do hodowli kontrolnej, po 24 godzinach inkubacji. Zaobserwowano również, iż 3-BrPA indukuje tworzenie struktur podobnych do cyst tkankowych w komórkach zakażonych tachyzoitami *Toxoplasma gondii* [13] i choć autorzy cytowanej pracy nie komentują tego, można się domyślać, że struktury te są dla zaatakowanych komórek bezpieczniejsze niż wolna, aktywna postać pasożyta.

*Trypanosoma brucei* to pierwotniak pasożytujący we krwi kręgowców, wywołujący u ludzi zakaźną trypanozę afrykańską, zwaną śpiączką afrykańską oraz naganę u bydła. Przenoszony jest przez muchy z rodzaju tse-tse i występuje endemicznie w rejonie Afryki subsaharyjskiej. Metabolizm pasożyta opiera się na charakterystycznej dla niego odmianie szlaku glikolitycznego zachodzącego w glikosomach, w którym pirogronian jest uwalniany do krwiobiegu gospodarza [5,57].

W 1993 r. wykazano, że 3-BrPA, jako inhibitor enzymów glikolitycznych, znacząco wpływa na metabolizm *T. brucei*, zmniejszając przeżywalność pasożyta. W stężeniu  $\text{IC}_{50}$  wynoszącym 5,6  $\mu\text{M}$  wstrzymuje wyrzut pirogronianu powodując hamowanie GAPDH, natomiast w  $\text{IC}_{50} = 13,4 \mu\text{M}$  zmniejsza ruchliwość *Trypanosoma brucei*. Oba procesy są niemal całkowicie hamowane przez 3-BrPA w stężeniu powyżej 25  $\mu\text{M}$ . Wykazano również, że enzym GAPDH, pochodzący z komórek pasożyta, jest niemal 20-krotnie bardziej wrażliwy na działanie 3-BrPA niż erytrocytarny [5]. Natomiast Vanderheyden i wsp. opublikowali wyniki badań nad regulacją pH wewnątrzkomórkowego ( $\text{pH}_i$ ) *Trypanosoma brucei* na różnych etapach rozwoju tego świdrowca. Zdolność do regulacji  $\text{pH}_i$  jest podstawowa dla tego pasożyta, bo większość z jego enzymów wykazuje aktywność w wąskim zakresie pH. Stosowano wiele analogów pirogronianu, w tym 3-BrPA (10 mM). Związki te powodowały znaczący spadek  $\text{pH}_i$ , jak również zmniejszały poziom wypływu pirogronianu i  $\text{H}^+$  z komórek. Wyniki potwierdzają hipotezę, mówiącą, iż w postaciach bytujących w krwiobiegu gospodarza głównym mechanizmem kontroli wewnątrzkomórkowego pH jest wyrzut pirogronianu z towarzyszącym mu wypływem protonów [57].

*Schistosoma mansoni* jest jednym z najbardziej rozpowszechnionych gatunków z rodzaju *Schistosoma*. Ta rozdzielnopłciowa przywra bytuje w naczyniach krwionośnych żywiciela ostatecznego, którym może być człowiek. Jej metabolizm oparty jest głównie na glikolizie. Wywołuje schistosomatozę, występującą endemicznie w Afryce, części Ameryki Południowej oraz na Karaibach [8].

W ramach badań nad antyschistosomalnym działaniem różnych leków sprawdzono również działanie 3-BrPA. Zastosowano metodę mikrokalorymetryczną, która służy do pomiaru ilości wytwarzanego ciepła (aktywności metabolicznej). Wykazano, iż po zastosowaniu 0,5 mM 3-BrPA aktywność metaboliczna *S. mansoni* była na granicy detekcji, natomiast w obecności glukozy (20 mM) i takiego samego stężenia alkilatora aktywność wynosiła już około 10% wartości kontrolnej [34].

## Przeciwgrzybicze działanie 3-bromopirogronianu

Oprócz pasożytów, także grzyby stały się obiektem badań nad leczniczym zastosowaniem 3-BrPA. W ostatnich latach opublikowano prace wskazujące na przeciwgrzybicze działanie 3-BrPA wobec drożdży *Saccharomyces cerevisiae* oraz patogennego szczepu *Cryptococcus neoformans*.

Przeprowadzono badania nad mechanizmami cytotoxiczności oraz transportu 3-BrPA w komórkach drożdży *Saccharomyces cerevisiae* [33]. Ten zazwyczaj niepatogenny gatunek jest popularnym, eukariotycznym modelem do badań zarówno genetycznych, jak i z zakresu biologii molekularnej. W przypadku pacjentów z deficytami odporności drożdżak ten może powodować zakażenia oportunistyczne, kolonizując m.in. układ oddechowy, moczowo-płciowy, czy pokarmowy [43].

Jako analog pirogronianu, 3-BrPA wnika do komórek *S. cerevisiae* tą samą drogą – przez transporter Jen1p. Dowiedziono, że związek ten hamuje proliferację drożdży w minimalnym stężeniu hamującym wynoszącym 1,8 mM, w pożywce pozbawionej glukozy [33].

*Cryptococcus neoformans* jest grzybem podstawkowym, za wirulencję którego odpowiadają: polisacharydowa otoczka, wytwarzanie melaniny i zdolność do proliferacji w temperaturze 5-40°C [7,16]. Stanowi czynnik etiologiczny kryptokokozy, choroby będącej istotną przyczyną śmiertelności pacjentów z obniżoną odpornością, zwłaszcza z HIV/AIDS oraz poddanych immunosupresji. Leczenie opiera się na łącznym stosowaniu amfoterycyny B oraz fluorocytozyny lub flukonazolu, co w porównaniu do stosowania wyłącznie amfoterycyny B, jest mniej toksyczne i bardziej skuteczne [17,26]. Na leki te jednak grzyby szybko nabywają oporności [9].

Zespół prof. Stanisława Ułaszewskiego wykazał w 2013 r., iż 3-BrPA może być obiecującym lekiem przeciwkryptokokowym, ze względu na dużą toksyczność na *Cryptococcus neoformans* w niskich dawkach i nieznaczną cytotoksyczność wobec zdrowych komórek ssaczych. Nie jest również substratem dla pomp zaangażowanych w zjawisko oporności plejotropowej (PDR), zatem nie może być usuwany z komórki i nie generuje fenotypów opornych. Wartość minimalnego stężenia hamującego 3-BrPA wobec *C. neoformans* była najniższa spośród testowanych 110 szczepów grzybów i wynosiła 0,12-0,15 mM.

Zaobserwowano również spadek poziomu wewnątrzkomórkowego ATP: o 20% po 15 min, 40% po 30 min oraz 55% po godzinnej inkubacji z 3-BrPA w stężeniu wynoszącym 1/8 MIC [17].

## PODSUMOWANIE

Wnioski płynące z wyników przeprowadzonych dotychczas badań nad terapeutycznym zastosowaniem 3-BrPA są niejednoznaczne.

Niewątpliwie 3-BrPA, związek o małej cząsteczce i prostej budowie, względnie tani w produkcji, ma właściwości bardzo istotne z punktu widzenia potrzeb terapii wielu chorób i niszczenia czynników chorobotwórczych, takich jak: komórki nowotworowe, pasożyty, grzyby i bakterie. Należą do nich: bardzo dobra rozpuszczalność w wodzie, łatwe wnikanie do komórek, a nade wszystko bardzo skuteczne ograniczanie wytwarzania ATP przez hamowanie głównych szlaków energetycznych komórki, przede wszystkim glikolizy i, w mniejszym stopniu, łańcucha oddechowego. Wszędzie tam, gdzie komórki niepożądane (nowotworowe, pasożytnicze) różnią się od prawidłowych intensywniejszą glikolizą i wyższymi potrzebami energetycznymi istnieje szansa skutecznego użycia 3-BrPA. Oczywiście ten związek działa na wszystkie komórki i dlatego wydaje się, że jego przyszłość jako farmaceutyku jest zależna od opracowania odpowiednich metod jego skutecznego i bezpiecznego stosowania.

## PIŚMIENICTWO

- [1] Apfel M.A., Ikeda B.H., Speckhard D.C., Frey P.A.: *Escherichia coli* pyruvate dehydrogenase complex. Thiamin pyrophosphate-dependent inactivation by 3-bromopyruvate. *J. Biol. Chem.*, 1984; 259: 2905-2909
- [2] Azevedo-Silva J., Queirós O., Baltazar F., Ułaszewski S., Goffeau A., Ko Y.H., Pedersen P.L., Preto A., Casal M.: The anticancer agent 3-bromopyruvate: a simple but powerful molecule taken from the lab to the bedside. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 2016; 48: 349-362
- [3] Baker J.P., Rabin B.R.: Effects of bromopyruvate on the control and catalytic properties of glutamate dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.*, 1969; 11: 154-159
- [4] Banas T., Gontero B., Drews V.L., Johnson S.L., Marcus F., Kemp R.G.: Reactivity of the thiol groups of *Escherichia coli* phosphofructo-1-kinase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1988; 957: 178-184
- [5] Barnard J.P., Reynafarje B., Pedersen P.L.: Glucose catabolism in African trypanosomes. Evidence that the terminal step is catalyzed by a pyruvate transporter capable of facilitating uptake of toxic analogs. *J. Biol. Chem.*, 1993; 268: 3654-3661
- [6] Birsoy K., Wang T., Possemato R., Yilmaz O.H., Koch C.E., Chen W.W., Hutchins A.W., Gultekin Y., Peterson T.R., Carette J.E., Brummelkamp T.R., Clish C.B., Sabatini D.M.: MCT1-mediated transport of a toxic molecule is an effective strategy for targeting glycolytic tumors. *Nat. Genet.*, 2013; 45: 104-108
- [7] Bose I., Reese A.J., Ory J.J., Janbon G., Doering T.L.: A yeast under cover: the capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot. Cell*, 2003; 2: 655-663
- [8] Brown M.: Schistosomiasis. *Clin. Med.*, 2011; 11: 479-482
- [9] Cannon R.D., Lamping E., Holmes A.R., Niimi K., Baret P.V., Keniya M.V., Tanabe K., Niimi M., Goffeau A., Monk B.C.: Efflux-mediated antifungal drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2009; 22: 291-321
- [10] Cardaci S., Desideri E., Ciriolo M.R.: Targeting aerobic glycolysis: 3-bromopyruvate as a promising anticancer drug. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 2012; 44: 17-29
- [11] Chen Z., Lu W., Garcia-Prieto C., Huang P.: The Warburg effect and its cancer therapeutic implications. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 2007; 39: 267-274
- [12] Chen Z., Zhang H., Lu W., Huang P.: Role of mitochondria-associated hexokinase II in cancer cell death induced by 3-bromopyruvate. *Biochim. Biophys. Acta*, 2009; 1787: 553-560
- [13] De Lima L.P., Seabra S.H., Carneiro H., Barbosa H.S.: Effect of 3-bromopyruvate and atovaquone on infection during *in vitro* interaction of *Toxoplasma gondii* and LLC-MK2 cells. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2015; 59: 5239-5249
- [14] Dell'Antone P.: Energy metabolism in cancer cells: how to explain the Warburg and Crabtree effects? *Med. Hypotheses*, 2012; 79: 388-392
- [15] Deng Y., Lu J.: Targeting hexokinase 2 in castration-resistant prostate cancer. *Mol. Cell. Oncol.*, 2015; 2: e974465
- [16] Dyląg M.: Etiologiczne czynniki kryptokokozy – co warunkuje ich patogenność? *Med. Dośw. Mikrobiol.*, 2015; 67: 221-231
- [17] Dyląg M., Lis P., Niedźwiecka K., Ko Y.H., Pedersen P.L., Goffeau A., Ułaszewski S.: 3-Bromopyruvate: a novel antifungal agent against the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2013; 434: 322-327

- [18] El Sayed S.M., Mohamed W.G., Seddik M.A., Ahmed A.S., Mahmud A.G., Amer W.H., Nabo M.M., Hamed A.R., Ahmed N.S., Abd-Allah A.A.: Safety and outcome of treatment of metastatic melanoma using 3-bromopyruvate: a concise literature review and case study. *Chin. J. Cancer*, 2014; 33: 356-364
- [19] Fischer G., Sieber M., Schellenberger A.: The carbonyl reactivity of 3-bromopyruvate and related compounds. *Bioorg. Chem.*, 1982; 11: 478-484
- [20] Fonda M.L.: Bromopyruvate inactivation of glutamate apodecarboxylase. Kinetics and specificity. *J. Biol. Chem.*, 1976; 251: 229-235
- [21] Ganapathy-Kanniappan S., Geschwind J.F., Kunjithapatham R., Buijs M., Vossen J.A., Tchernyshyov I., Cole R.N., Syed L.H., Rao P.P., Ota S., Vali M.: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) is pyruvylated during 3-bromopyruvate mediated cancer cell death. *Anticancer Res.*, 2009; 29: 4909-4918
- [22] Ganapathy-Kanniappan S., Kunjithapatham R., Geschwind J.F.: Anticancer efficacy of the metabolic blocker 3-bromopyruvate: specific molecular targeting. *Anticancer Res.*, 2013; 33: 13-20
- [23] Gandham S.K., Talekar M., Singh A., Amiji M.M.: Inhibition of hexokinase-2 with targeted liposomal 3-bromopyruvate in an ovarian tumor spheroid model of aerobic glycolysis. *Int. J. Nanomedicine*, 2015; 10: 4405-4423
- [24] Glick M., Biddle P., Jantzi J., Weaver S., Schirch D.: The antitumor agent 3-bromopyruvate has a short half-life at physiological conditions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2014; 452: 170-173
- [25] Grimm C., Evers A., Brock M., Maerker C., Klebe G., Buckel W., Reuter K.: Crystal structure of 2-methylisocitrate lyase (PrpB) from *Escherichia coli* and modelling of its ligand bound active centre. *J. Mol. Biol.*, 2003; 328: 609-621
- [26] Huston S.M., Mody C.H.: Cryptococcosis: an emerging respiratory mycosis. *Clin. Chest Med.*, 2009; 30: 253-264
- [27] Jones A.R., Gillan L., Milmlow D.: The anti-glycolytic activity of 3-bromopyruvate on mature boar spermatozoa in vitro. *Contraception*, 1995; 52: 317-320
- [28] Kim J.S., Ahn K.J., Kim J.A., Kim H.M., Lee J.D., Lee J.M., Kim S.J., Park J.H.: Role of reactive oxygen species-mediated mitochondrial dysregulation in 3-bromopyruvate induced cell death in hepatoma cells: ROS-mediated cell death by 3-BrPA. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 2008; 40: 607-618
- [29] Ko Y.H., McFadden B.A.: Alkylation of isocitrate lyase from *Escherichia coli* by 3-bromopyruvate. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1990; 278: 373-380
- [30] Ko Y.H., Smith B.L., Wang Y., Pomper M.G., Rini D.A., Torbenson M.S., Hullahen J., Pedersen P.L.: Advanced cancers: eradication in all cases using 3-bromopyruvate therapy to deplete ATP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004; 324: 269-275
- [31] Ko Y.H., Verhoeven H.A., Lee M.J., Corbin D.J., Vogl T.J., Pedersen P.L.: A translational study "case report" on the small molecule "energy blocker" 3-bromopyruvate (3BP) as a potent anticancer agent: from bench side to bedside. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 2012; 44: 163-170
- [32] Lis P., Jurkiewicz P., Cal-Bąkowska M., Ko Y.H., Pedersen P.L., Goffeau A., Ułaszewski S.: Screening the yeast genome for energetic metabolism pathways involved in a phenotypic response to the anti-cancer agent 3-bromopyruvate. *Oncotarget*, 2016; 7: 10153-10173
- [33] Lis P., Zarzycki M., Ko Y.H., Casal M., Pedersen P.L., Goffeau A., Ułaszewski S.: Transport and cytotoxicity of the anticancer drug 3-bromopyruvate in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 2012; 44: 155-161
- [34] Manneck T., Keiser J., Müller J.: Mefloquine interferes with glycolysis in schistosomula of *Schistosoma mansoni* via inhibition of enolase. *Parasitology*, 2012; 139: 497-505
- [35] Meloche H.P., Monti C.T., Hogue-Angeletti R.A.: Identification of the bromopyruvate-sensitive glutamate within the active site of 2-keto-3-deoxygluconate-6-P aldolase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1978; 84: 589-594
- [36] Mikuriya K., Kuramitsu Y., Ryozaawa S., Fujimoto M., Mori S., Oka M., Hamano K., Okita K., Sakaida I., Nakamura K.: Expression of glycolytic enzymes is increased in pancreatic cancerous tissues as evidenced by proteomic profiling by two-dimensional electrophoresis and liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry. *Int. J. Oncol.*, 2007; 30: 849-855
- [37] Montoya J.G., Liesenfeld O.: Toxoplasmosis. *Lancet*, 2004; 363: 1965-1976
- [38] Nakashima R.A., Mangan P.S., Colombini M., Pedersen P.L.: Hexokinase receptor complex in hepatoma mitochondria: evidence from N,N'-dicyclohexylcarbodiimide-labeling studies for the involvement of the pore-forming protein VDAC. *Biochemistry*, 1986; 25: 1015-1021
- [39] Okano T., Saegusa J., Nishimura K., Takahashi S., Sendo S., Ueda Y., Morinobu, A.: 3-bromopyruvate ameliorate autoimmune arthritis by modulating Th17/Treg cell differentiation and suppressing dendritic cell activation. *Sci. Rep.*, 2017; 7: 42412
- [40] Oronsky B.T., Reid T., Knox S.J., Scicinski J.J.: The scarlet letter of alkylation: a mini review of selective alkylating agents. *Transl. Oncol.*, 2012; 5: 226-229
- [41] Pedersen P.L.: 3-Bromopyruvate (3BP) a fast acting, promising, powerful, specific, and effective "small molecule" anti-cancer agent taken from labside to bedside: introduction to a special issue. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 2012; 44: 1-6
- [42] Pereira da Silva A.P., El-Bacha T., Kyaw N., dos Santos R.S., da-Silva W.S., Almeida F.C., Da Poian A.T., Galina, A.: Inhibition of energy-producing pathways of HepG2 cells by 3-bromopyruvate. *Biochem. J.*, 2009; 417: 717-726
- [43] Posteraro B., Sanguinetti M., D'Amore G., Masucci L., Morace G., Fadda G.: Molecular and epidemiological characterization of vaginal *Saccharomyces cerevisiae* isolates. *J. Clin. Microbiol.*, 1999; 37: 2230-2235
- [44] Pue N., Guddat L.W.: Acetohydroxyacid synthase: a target for antimicrobial drug discovery. *Curr. Pharm. Des.*, 2014; 20: 740-753
- [45] Rempel A., Mathupala S.P., Griffin C.A., Hawkins A.L., Pedersen P.L.: Glucose catabolism in cancer cells: amplification of the gene encoding type II hexokinase. *Cancer Res.*, 1996; 56: 2468-2471
- [46] Roberts D.J., Miyamoto S.: Hexokinase II integrates energy metabolism and cellular protection: Akt ing on mitochondria and TORCing to autophagy. *Cell Death Differ.*, 2015; 22: 248-257
- [47] Roche T.E., McFadden B.A., Williams J.O.: Modification of the active site of isocitrate lyase from *Pseudomonas indigofera*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1971; 147: 192-200
- [48] Rondinelli R.H., Epner D.E., Tricoli J.V.: Increased glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene expression in late pathological stage human prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.*, 1997; 1: 66-72
- [49] Sanborn B.M., Felberg N.T., Hollocher T.C.: The inactivation of succinate dehydrogenase by bromopyruvate. *Biochim. Biophys. Acta*, 1971; 227: 219-231
- [50] Sharma V., Sharma S., zu Bentrup K., McKinney J.D., Russell D.G., Jacobs W.R.Jr., Sacchettini J.C.: Structure of isocitrate lyase, a persistence factor of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat. Struct. Biol.*, 2000; 7: 663-668
- [51] Shoshan M.C.: 3-Bromopyruvate: targets and outcomes. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 2012; 44: 7-15
- [52] Silverman P.M., Eoyang L.: Alkylation of acetohydroxyacid synthase I from *Escherichia coli* K-12 by 3-bromopyruvate: evidence for a single active site catalyzing acetolactate and acetohydroxybutyrate synthesis. *J. Bacteriol.*, 1987; 169: 2494-2499
- [53] Tang Z., Yuan S., Hu Y., Zhang H., Wu W., Zeng Z., Yang J., Yun



J., Xu R., Huang P.: Over-expression of GAPDH in human colorectal carcinoma as a preferred target of 3-bromopyruvate propyl ester. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 2012; 44: 117-125

[54] Tokunaga K., Nakamura Y., Sakata K., Fujimori K., Ohkubo M., Sawada K., Sakiyama S.: Enhanced expression of a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene in human lung cancers. *Cancer Res.*, 1987; 47: 5616-5619

[55] Tsai H.J., Wilson J.E.: Functional organization of mammalian hexokinases: both N- and C-terminal halves of the rat type II isozyme possess catalytic sites. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1996; 329: 17-23

[56] Upton A.M., McKinney J.D.: Role of the methylcitrate cycle in propionate metabolism and detoxification in *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology*, 2007; 153: 3973-3982

[57] Vanderheyden N., Wong J., Docampo R.: A pyruvate-proton symport and an H<sup>+</sup>-ATPase regulate the intracellular pH of *Trypanosoma brucei* at different stages of its life cycle. *Biochem. J.*, 2000; 346: 53-62

[58] Warburg O.: On the origin of cancer cells. *Science*, 1956; 123: 309-314

[59] Xu R.H., Pelicano H., Zhou Y., Carew J.S., Feng L., Bhalla K.N., Keating M.J., Huang P.: Inhibition of glycolysis in cancer cells: a novel strategy to overcome drug resistance associated with mitochondrial respiratory defect and hypoxia. *Cancer Res.*, 2005; 65: 613-621

[60] Zhang Q., Zhang Y., Zhang P., Chao Z., Xia F., Jiang C., Zhang X., Liu H.: Hexokinase II inhibitor, 3-BrPA induced autophagy by stimulating ROS formation in human breast cancer cells. *Genes Cancer*, 2014; 5: 100-112

---

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.