

DOI: 10.15690/vramn849

Е.В. Шахристова, Е.А. Степовая, О.Л. Носарева, Е.В. Рудиков, В.В. Новицкий

Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Российская Федерация

Глутатион и глутаредоксин в росковитинопосредованном ингибировании пролиферации клеток аденокарциномы молочной железы

Обоснование. Опухоли молочной железы занимают первое место в структуре онкологической заболеваемости и смертности среди женщин в мире, в том числе и в России. Многие белки, контролирующие пролиферацию иммортализованных клеток, являются редоксрегулируемыми, что играет важную роль в модуляции пролиферативной активности клеток, особенно при опухолевом росте. Исследование вклада глутаредоксина и глутатиона в распределение клеток по фазам клеточного цикла позволит не только определить молекулярные мишени регуляции пролиферации, но и в перспективе разработать методы таргетной терапии и диагностики социально значимых заболеваний, в том числе рака молочной железы. **Цель исследования** — оценить роль глутатиона и глутаредоксина в молекулярных механизмах регуляции пролиферации клеток аденокарциномы молочной железы линии MCF-7 при действии росковитина — ингибитора циклинзависимых протеинкиназ. **Методы.** Исследование выполнено с использованием культуры клеток аденокарциномы молочной железы линии MCF-7, инкубируемых в присутствии и отсутствии росковитина в конечной концентрации 20 мкМ в течение 18 ч. С помощью проточной цитофлуориметрии определяли продукцию активных форм кислорода, распределение клеток по фазам клеточного цикла и количество аннексинположительных клеток. Концентрацию общего, восстановленного и окисленного глутатиона, SH-групп протеинов и белковосвязанного глутатиона определяли спектрофотометрическим методом. Содержание глутаредоксина, циклина E и циклинзависимых протеинкиназ оценивали с помощью специфических моноклональных антител методом вестерн-блоттинга. **Результаты.** Установлено, что при действии росковитина в клетках линии MCF-7 происходила остановка клеточного цикла в G₂/M фазах при снижении содержания циклина E и циклинзависимой протеинкиназы 2, что сопровождалось активацией запрограммированной гибели клеток. В опухолевых клетках, инкубированных в присутствии росковитина, активировался окислительный стресс, сопровождающийся повышенной генерацией активных форм кислорода, снижением концентрации восстановленного глутатиона и повышением содержания глутаредоксина, что способствовало увеличению глутатионилирования белков на фоне снижения концентрации SH-групп протеинов. **Заключение.** Пролиферация клеток аденокарциномы молочной железы при действии росковитина снижается не только вследствие уменьшения содержания циклинов и активности циклинзависимых протеинкиназ, но и в результате изменения соотношения про- и антиоксидантов внутри клетки. Глутатион и глутаредоксин, участвуя в реакциях глутатионилирования/деглутатионилирования белков в клетках линии MCF-7 при индуцированном росковитином окислительном стрессе, способствовали модуляции функциональных свойств протеинов, что привело к нарушению прогрессии фаз клеточного цикла, указывая на возможность редокс-регуляции пролиферации.

Ключевые слова: пролиферация, система глутатиона, глутаредоксин, циклинзависимые протеинкиназы, аденокарцинома молочной железы. (Для цитирования: Шахристова Е.В., Степовая Е.А., Носарева О.Л., Рудиков Е.В., Новицкий В.В. Глутатион и глутаредоксин в росковитинопосредованном ингибировании пролиферации клеток аденокарциномы молочной железы. Вестник РАМН. 2017;72 (4):261–267. doi: 10.15690/vramn849)

Обоснование

По данным Международного агентства по исследованию рака, в мире ежегодно выявляется около 1,676 млн новых случаев злокачественных новообразований молочной железы, и опухоли данной локализации занимают первое место в структуре онкологической заболеваемости и смертности среди женщин [1]. В последние годы смертность от рака молочной железы в Российской Федерации лидирует среди причин смерти от злокачественных новообразований (16,7%) и продолжает увеличиваться в абсолютных и относительных показателях [2]. Изучение молекулярных механизмов опухолевой прогрессии, сопровождаемой активной пролиферацией трансформированных клеток, дисрегуляцией апоптоза на фоне развития окислительного стресса, является одним из приоритетных направлений трансляционной медицины. Опухолевый рост характеризуется интенсификацией процессов свободно-радикального окисления и дисбалансом в системе антиоксиданты-прооксиданты, что приводит к увеличению уровня активных форм кислорода (АФК),

вызывающих обратимую или необратимую окислительную модификацию биомолекул с нарушением их структуры и функций [3–7]. В поддержании внутриклеточного редокс-гомеостаза важную роль играют системы глутатиона, глутаредоксина, тиоредоксина и другие, функционирование которых приводит к снижению уровня АФК, изменению активности факторов транскрипции и экспрессии ряда генов при адаптивных реакциях клеток на изменяющиеся условия. Многие белки, контролирующие пролиферацию как нормальных, так и трансформированных клеток, являются редоксрегулируемыми, что играет важную роль в модуляции пролиферации при опухолевом росте [3, 7–9]. Исследования возможностей по изменению функциональной активности белков-регуляторов пролиферации (циклинов и циклинзависимых протеинкиназ) и вклада глутаредоксина и глутатиона в распределение клеток по фазам клеточного цикла позволят не только определить молекулярные мишени регуляции пролиферации, но и в перспективе разработать методы таргетной терапии и диагностики социально значимых заболеваний, в том числе рака молочной железы.

Цель исследования — оценить роль глутатиона и глутаредоксина в молекулярных механизмах регуляции пролиферации клеток аденокарциномы молочной железы линии MCF-7 при действии росковитина — ингибитора циклинзависимых протеинкиназ.

Методы

Дизайн исследования

Выполнено экспериментальное нерандомизированное исследование *in vitro* на культуре клеток линии MCF-7.

Критерии соответствия

В исследовании были использованы клетки аденокарциномы молочной железы человека линии MCF-7, полученные из Российской коллекции клеточных культур Института цитологии РАН (Санкт-Петербург). Культура клеток включалась в исследование, если после обработки смесью трипсин-версен доля жизнеспособных клеток в микроскопическом тесте с трипановым синим (Serva, США) составляла не менее 85%. Были сформированы 2 группы: первая — интактные клетки линии MCF-7, инкубированные в питательной среде без внесения дополнительных веществ (n=6), вторая — клетки линии MCF-7, культивируемые в питательной среде с добавлением росковитина (n=6).

Условия проведения

Клетки линии MCF-7 культивировали в полной питательной среде, содержащей 90% ЕМЕМ (ПанЭко,

Россия), 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Invitrogen, США), 1% заменимых аминокислот (ПанЭко, Россия), 10 мкг/мл бычьего инсулина (ПанЭко, Россия), 0,3 мг/мл L-глутамин (ПанЭко, Россия) и 100 мкг/мл гентамицина (ICN, США), при 37°C и 5% двуокиси углерода (CO₂).

Продолжительность исследования

После культивирования клеток аденокарциномы молочной железы и получения необходимого их количества клетки делили на 2 группы и инкубировали в присутствии и отсутствии росковитина в течение 18 ч, после чего клеточный материал использовали для количественного определения исследуемых показателей.

Описание медицинского вмешательства

Росковитин (ROSC, Sigma Aldrich, США) — ингибитор циклинзависимых протеинкиназ — вносили в лунку культурального планшета в конечной концентрации 20 мкМ [10] и инкубировали в течение 18 ч при 37°C и 5% CO₂. К интактным клеткам линии MCF-7 добавляли культуральную среду в том же объеме, что и ингибитор, и инкубировали в тех же условиях.

Исходы исследования

Основной исход исследования

После 18 ч инкубации клеток линии MCF-7 с ROSC происходила остановка пролиферации вследствие блокирования АТФ-связывающего домена циклинзависимых протеинкиназ 2, 5, 7 [11], и клеточный цикл аденокарциномы молочной железы останавливался в G₂/M фазах.

E.V. Shakhristova, E.A. Stepovaya, O.L. Nosareva, E.V. Rudikov, V.V. Novitsky

Siberian state medical university, Tomsk, Russian Federation

Glutathione and Glutaredoxin in Roscovitine-Mediated Inhibition of Breast Cancer Cell Proliferation

Background: Breast tumors are number one cause of cancer morbidity and mortality among women around the world, and Russia is not an exception. Many proteins that control proliferation of immortalized cells are redox-regulated, which is essential for modulating cellular proliferative activity, especially during tumor growth. Studying the role of glutaredoxin and glutathione in cell cycle phase distribution will allow not only to identify the molecular targets regulating cell proliferation, but also to develop methods of diagnosis and targeted therapy of socially sensitive diseases, including breast cancer, in the future. **Aims:** To evaluate the role of glutathione and glutaredoxin in the molecular mechanisms regulating MCF-7 breast cancer cell proliferation under the effects of roscovitine, a cyclin-dependent protein kinase inhibitor. **Materials and methods:** The MCF-7 cell line (human breast adenocarcinoma) was used in the study. The cell culture was incubated in the presence and absence of roscovitine in the final concentration of 20 μmol for 18 h. The production of reactive oxygen species, the distribution of cells between cell cycle phases and the amount of Annexin V positive cells were determined using flow cytometry. The concentrations of total, reduced and oxidized glutathione, protein SH groups and protein-bound glutathione were measured by spectrophotometry. The levels of glutaredoxin, cyclin E and cyclin-dependent protein kinases were estimated by Western blotting with monoclonal antibodies. **Results:** The effects of roscovitine in the MCF-7 cells resulted in cell cycle arrest in G₂/M phases with the decreased levels of cyclin E and cyclin-dependent protein kinase 2. It was accompanied by activation of programmed cell death. In tumor cells incubated in the presence of roscovitine, oxidative stress was triggered, which was accompanied by the elevated generation of reactive oxygen species, the decrease in the concentration of reduced glutathione, and the rise in the level of glutaredoxin. It contributed to the increase in protein glutathionylation against the backdrop of the decreased SH group concentration. **Conclusions:** Breast cancer cell proliferation under the effects of roscovitine is reduced following not only the decrease in the cyclin level and cyclin-dependent protein kinase activity, but also the shift in the intracellular oxidant/antioxidant ratio. Roscovitine-induced oxidative stress in the MCF-7 cells contributed to protein glutathionylation with the changes in the protein structure and functions. It results in impaired cell cycle progression, indicating a possibility to regulate cellular proliferation through modulating functional properties of redox-dependent proteins using the glutathione/glutaredoxin system.

Key words: proliferation, glutathione system, glutaredoxin, cyclin-dependent kinase, breast adenocarcinoma.

(**For citation:** Shakhristova EV, Stepovaya EA, Nosareva OL, Rudikov EV, Novitsky VV. Glutathione and Glutaredoxin in Roscovitine-Mediated Inhibition of Breast Cancer Cell Proliferation. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2017;72 (4):261–267. doi: 10.15690/vramn849)

Методы регистрации исходов

Клетки линии MCF-7 культивировали в полной питательной среде, как описано выше, адгезионным методом с использованием культуральных флаконов (Jet Biofil, China, Китай), полистероловая поверхность которых специфически обработана для лучшей адгезии.

Образование АФК, представленных перекисными группировками гидро- и липопероксидов, в культуре клеток линии MCF-7 оценивали с использованием флуоресцентного зонда 2,7-дихлорфлуоресцеиндиацетата (Sigma-Aldrich, США), превращающегося внутри клетки в 2,7-дихлорфлуоресцеин, который, связываясь с пероксидами, флуоресцирует [12]. Количественно внутриклеточную продукцию АФК оценивали по интенсивности флуоресценции 2,7-дихлорфлуоресцеина на проточном лазерном цитометре BD FaCSCanto II (Becton Dickinson, США), для визуализации флуоресценции использовали микроскоп Axiostar plus (Carl Zeiss, Германия) при суммарном увеличении в 100 раз. Концентрации общего, восстановленного (GSH), окисленного (GSSG) глутатиона и величины отношения восстановленной формы трипептида к окисленной определяли спектрофотометрическим методом, предложенным М. Anderson (1985) в модификации I. Rahman и соавт. [13]. Уровень белковосвязанного глутатиона определяли после предварительного высвобождения трипептида боргидратом натрия из связи с белками [14] спектрофотометрическим методом, описанным ранее. Концентрацию SH-групп белков определяли спектрофотометрическим методом по способности тиоловых соединений взаимодействовать с 5,5-дитиобис-2-нитробензойной кислотой. Содержание белка в клетках определяли по взаимодействию Кумасси голубого G-250 с остатками аминокислот лизина и аргинина белковых молекул [15].

Методом вестерн-блоттинга с использованием соответствующих моноклональных антител определяли внутриклеточное содержание глутаредоксина (Abcam, США), циклина E (Abcam, США), циклинзависимых протеинкиназ 2 (Sigma Aldrich, США) и 4 (Thermo Scientific, США) по протоколу фирмы-производителя. Расчет содержания исследуемых белков проводили относительно концентрации референсного протеина β-актина.

Для оценки распределения опухолевых клеток по фазам клеточного цикла (G_0/G_1 , G_2/M и S) использовали набор CycleTest PLUS DNA Reagent Kit (Becton Dickinson, США), принцип метода которого основан на способности стехиометрического связывания ядерной ДНК с пропилид йодидом, флуоресцирующим при длине волны 580–650 нм, с последующим подсчетом интенсивности свечения изолированных ядер с помощью проточной цитофлуориметрии и дальнейшим анализом полученных данных с использованием пакета программ ModFit LT 3.2 (Verity Software House, США). Определение количества аннексинположительных клеток проводили методом проточной цитофлуориметрии с использованием FITC-меченного аннексина V, связывающегося с фосфатидилсеринем, и пропилид йодида, интеркалирующего с молекулой ДНК, по протоколу фирмы-производителя (eBioscience, Австрия). Количество аннексинположительных клеток выражали в процентах от общего числа клеток.

Этическая экспертиза

Локальный этический комитет ГБОУ ВПО «СибГМУ» Минздрава России утвердил протокол исследования и за-

ключил, что документация представлена в полном объеме, замечаний нет, работа соответствует требованиям этической экспертизы (регистрационный № 3555, заключение выдано 23.12.2013).

Статистический анализ

Принципы расчета размера выборки

Размер выборки предварительно не рассчитывался.

Методы статистического анализа данных

Статистическую обработку полученных результатов проводили при помощи пакета программ SPSS 11.0. Проверка на соответствие выборок нормальному закону распределения проводилась с использованием критерия Шапиро–Уилка. В связи с тем, что распределение значений оцениваемых показателей не соответствовало нормальному, для описания групп использовали медиану (Me) и интерквартильный интервал [Q_1 ; Q_3]. Достоверность различий независимых выборок оценивали с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни для малых групп. Различия считались достоверными при достигнутом $p < 0,05$.

Результаты

Объекты (участники) исследования

В результате культивирования клеток линии MCF-7 было наработано достаточное количество клеточного материала, чтобы сформировать обе группы исследования и провести инкубацию клеток в присутствии и отсутствии ROSC с последующей оценкой изучаемых параметров.

Основные результаты исследования

В результате проведенных исследований нами установлено, что ROSC, действуя на клетки аденокарциномы молочной железы, способствовал снижению прогрессии фаз клеточного цикла, что выражалось в уменьшении содержания циклинзависимой протеинкиназы 2 и циклина E в 1,4 и 1,6 раза ($p < 0,01$) соответственно (табл.) и сокращении количества клеток линии MCF-7 в G_0/G_1 в 1,4 раза ($p < 0,01$) в G_2/M фазах ($p < 0,01$) в G_2/M фазах по сравнению с соответствующими показателями в интактной культуре (рис. 1). Остановка клеточного цикла в G_2/M фазах при действии ROSC сопровождалась активацией запрограммированной гибели клеток линии MCF-7 с увеличением количества аннексинположительных клеток в 2,1 раза ($p < 0,01$) по сравнению с интактной культурой. Кроме того, в опухолевых клетках, инкубированных в присутствии ROSC, активировался окислительный стресс, сопровождаемый повышенной в 1,6 раза ($p < 0,01$) генерацией АФК (рис. 2), снижением концентрации GSH в 1,8 раза ($p < 0,01$), уменьшением величины отношения GSH/GSSG в 2,1 раза ($p < 0,01$) и увеличением содержания глутаредоксина в 1,3 раза ($p < 0,01$) по сравнению со значениями аналогичных показателей в интактной культуре (см. табл.). Активация окислительного стресса, индуцированного ROSC в клетках аденокарциномы молочной железы, приводила к увеличению глутатионилирования белков в 2,6 раза ($p < 0,01$), на фоне которого снижалась концентрация SH-групп протеинов в 3,1 раза ($p < 0,01$) по сравнению со значениями аналогичных показателей в интактной культуре (см. табл.).

Таблица. Содержание глутатиона, глутаредоксина, SH-групп белков, глутатионилирование протеинов и изменение пролиферации клеток линии MCF-7 при действии ингибитора циклинзависимых протеинкиназ росковитина (ROSC), Me [Q₁; Q₃]

Показатель	Группы	
	Интактные MCF-7	MCF-7 + ROSC
Восстановленный глутатион (GSH), нмоль/мг белка	3,67 [3,60; 3,72]	2,02 [#] [1,98; 2,34]
Окисленный глутатион (GSSG), нмоль/мг белка	0,38 [0,37; 0,43]	0,42 [0,41; 0,43]
Величина отношения GSH/GSSG	9,71 [9,55; 9,73]	4,69* [4,67; 5,54]
Глутаредоксин, усл. ед.	1,43 [1,39; 1,45]	1,79* [1,77; 1,85]
SH-группы белков, нмоль/мг белка	2,91 [2,22; 3,03]	0,93* [0,91; 1,15]
Белковосвязанный глутатион, нмоль/мг белка	0,17 [0,16; 0,22]	0,44* [0,43; 0,47]
Циклин E, усл. ед.	1,18 [1,14; 1,21]	0,73* [0,58; 0,78]
Циклинзависимая протеинкиназа 2, усл. ед.	0,96 [0,94; 1,12]	0,69* [0,62; 0,79]
Циклинзависимая протеинкиназа 4, усл. ед.	0,35 [0,28; 0,41]	0,45 [0,36; 0,58]
Аннексинположительные клетки, %	14,25 [13,20; 15,25]	30,40* [28,70; 30,90]

Примечание. [#] — $p < 0,05$, уровень значимости различий по сравнению с интактными клетками MCF-7; * — $p < 0,01$, уровень значимости различий по сравнению с интактными клетками MCF-7.

264

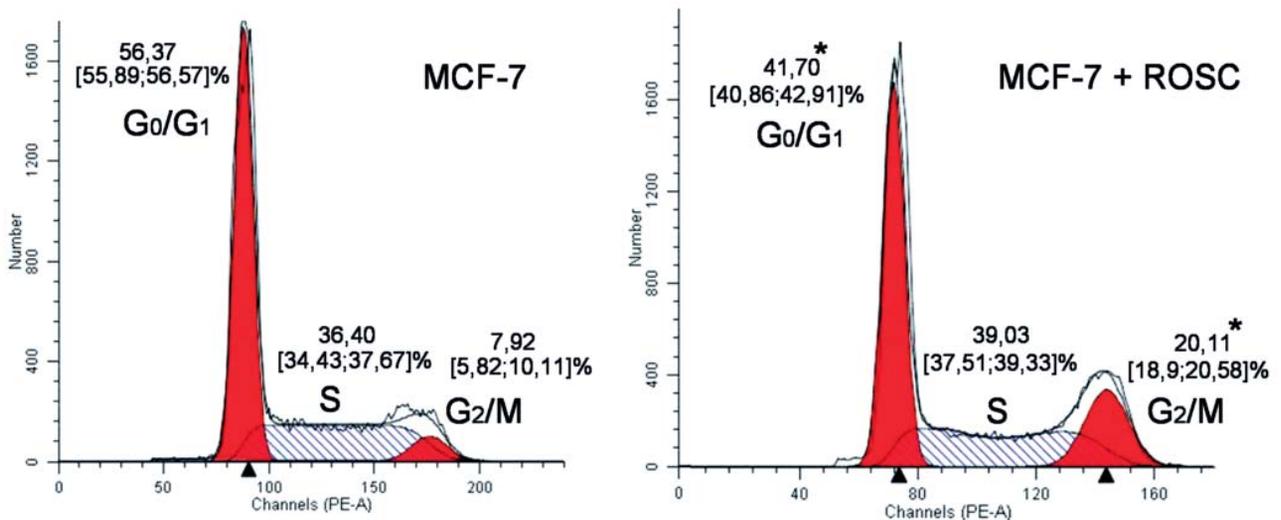


Рис. 1. Распределение клеток аденокарциномы молочной железы по фазам клеточного цикла при действии ингибитора циклинзависимых протеинкиназ росковитина (ROSC)

Примечание. Здесь и на рис. 2: * — $p < 0,01$, уровень значимости различий по сравнению с интактными клетками MCF-7.

Обсуждение

Резюме основного результата исследования

Остановка пролиферации клеток аденокарциномы молочной железы при действии ROSC достигается не только его ингибирующим влиянием на циклинзависимые протеинкиназы, но и активацией свободно-радикального окис-

ления и изменением редокс-статуса опухолевых клеток. Также нами выявлена активация обратимой окислительной модификации белков, а именно глутатионилирования внутриклеточных протеинов, в том числе редоксчувствительных регуляторов пролиферации и апоптоза клеток, что может лежать в основе снижения прогрессии фаз клеточного цикла и запуска запрограммированной гибели.

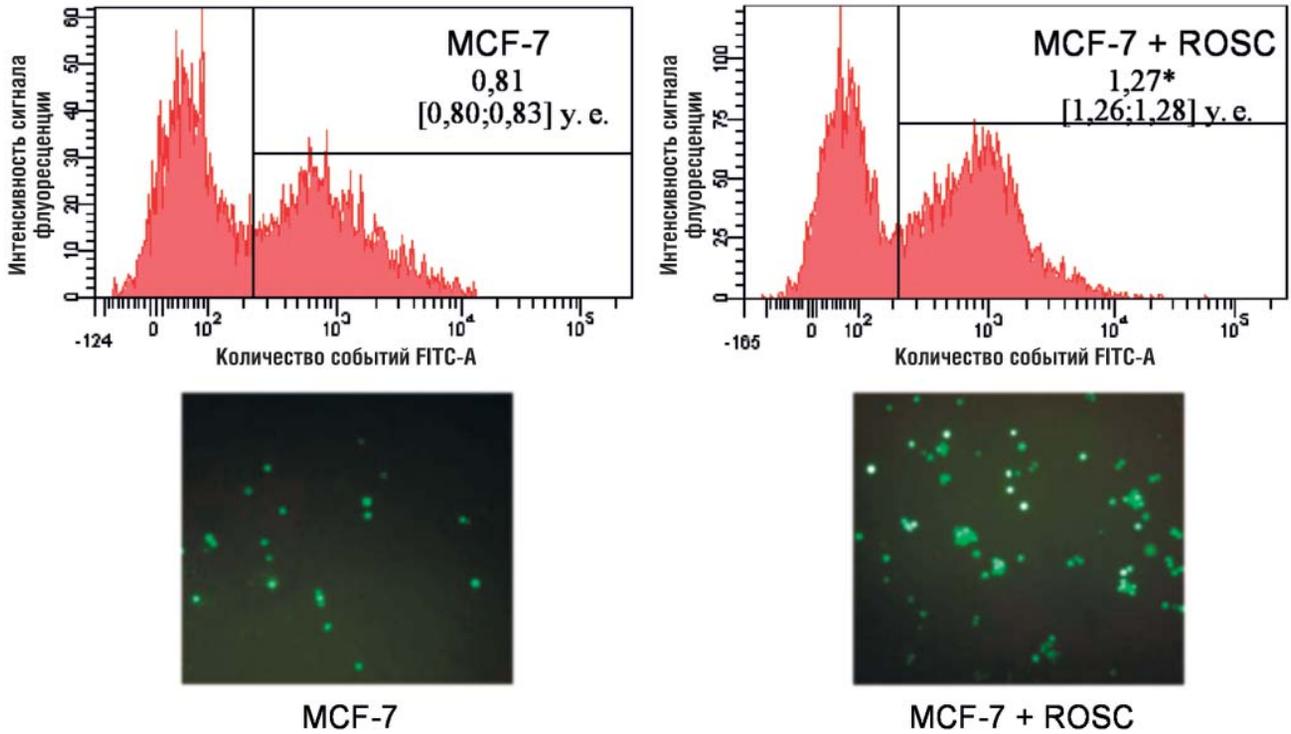


Рис. 2. Интенсивность флуоресценции клеток аденокарциномы молочной железы при действии ингибитора циклинзависимых протеинкиназ росковитина (ROSC), регистрируемая на проточном лазерном цитометре BD FaCSCanto II (Becton Dickinson, США) (верхняя часть рисунка) и визуализация флуоресценции на микроскопе Axiostar plus (Carl Zeiss, Германия) при суммарном увеличении в 100 раз (нижняя часть рисунка)

Обсуждение основного результата исследования

Полученные нами результаты действия ROSC на пролиферацию клеток линии MCF-7, а именно остановка клеточного цикла в G₂/M фазах и снижение содержания циклинзависимой киназы 2 и циклина E за счет конкурентного взаимодействия ингибитора с АТФ-связывающими участками этих белков, согласуется с существующими представлениями действия блокаторов клеточного цикла [10, 11]. В то же время нами установлено, что ROSC способствует индукции окислительного стресса в клетках аденокарциномы молочной железы, выражающейся увеличением продукции АФК и уменьшением величины отношения GSH/GSSG. Ведущую роль в защите клеток от окислительного стресса и поддержании редокс-гомеостаза играет система глутатиона, включающая глутатион, глутатионредуктазу и глутатионпероксидазу [4, 9, 16]. Поскольку АФК способны повреждать макромолекулы клеток, в том числе белки-регуляторы пролиферации, в опухолевых клетках нами зарегистрировано снижение концентрации GSH, который может использоваться в качестве кофермента в ферментативных реакциях взаимодействия с гидро- и липопероксидами. Многие белки являются редокс-регулируемыми за счет наличия свободных SH-групп аминокислотных остатков цистеина. Установленное нами снижение концентрации свободных SH-групп белков свидетельствует об активации процессов обратимой окислительной модификации протеинов — глутатионилировании (рис. 3), что подтверждается увеличением внутриклеточного содержания белковосвязанного глутатиона в клетках аденокарциномы молочной железы при действии ROSC. Так как глутатионилирование протеинов при действии ROSC способно приводить к конформационным изменениям

структуры белковых молекул, в том числе циклинзависимых протеинкиназ, то это может привести к нарушению выполняемых ими функций, остановке пролиферации клеток линии MCF-7 и запуску запрограммированной клеточной гибели.

Наряду с системой глутатиона важную роль в тиол-дисульфидном обмене играет глутаредоксинзависимая система [4, 8, 17]. Нами установлено увеличение содержания глутаредоксина в клетках линии MCF-7 при действии ROSC в ответ на индукцию окислительного стресса. Глутаредоксин, катализируя процесс деглута-

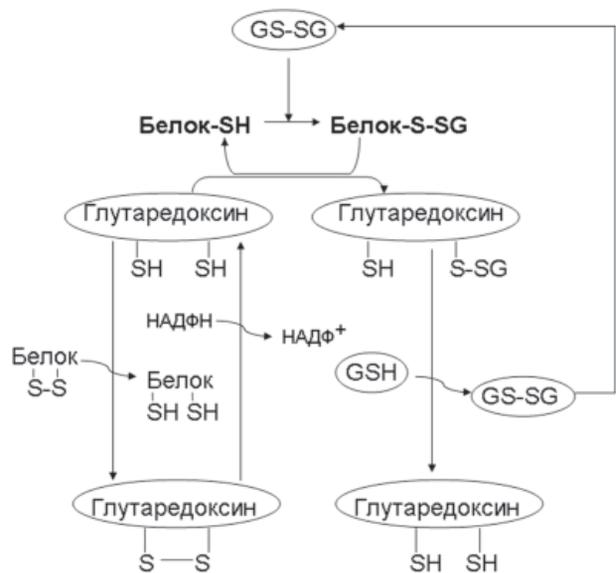


Рис. 3. Участие глутатиона и глутаредоксина в глутатионилировании белков

тионирования, модулирует активность транскрипционных факторов NF- κ B, Nrf2 и AP-1 [4, 8], под контролем которых находятся участки генов, кодирующих ключевые белки антиоксидантной системы, в том числе ферменты синтеза и метаболизма глутатиона. Таким образом, системы глутатиона и глутаредоксина функционально взаимосвязаны и способствуют поддержанию редокс-баланса, функционированию и выживанию опухолевых клеток линии MCF-7 в условиях окислительного стресса.

Заключение

Пролиферация клеток аденокарциномы молочной железы при действии росковитина снижается не только вследствие уменьшения содержания циклинов и активности циклинзависимых протеинкиназ, но и в результате изменения соотношения про- и антиоксидантов внутри клетки. Глутатион и глутаредоксин, участвуя в реакциях глутатионирования/деглутатионирования белков в клетках линии MCF-7 при индуцированном росковити-

ном окислительном стрессе, способствовали модуляции функциональных свойств протеинов, что привело к нарушению прогрессии фаз клеточного цикла, указывая на возможность редокс-регуляции пролиферации.

Источник финансирования

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (отделение гуманитарных и общественных наук) в рамках научного проекта № 17-36-01029.

Конфликт интересов

Представленный в статье материал является частью диссертационной работы Шахристовой Е.В. (предполагаемый срок защиты — 2017 г.).

Авторы подтверждают отсутствие иных явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2015;65(2):87–108. doi: 10.3322/caac.21262.
2. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. *Злокачественные новообразования в России в 2015 году (заболеваемость и смертность)*. — М.: МНИОИ им. П.А. Герцена; 2017. — 250 с. [Kaprin AD, Starinskii VV, Petrova GV. *Zlokachestvennye novoobrazovaniya v Rossii v 2015 godu (zabolevaemost' i smertnost')*. Moscow: MNIOI im. P.A. Gertsena; 2017. 250 p. (In Russ).]
3. Дубинина Е.Е., Пустыгина А.В. Окислительная модификация протеинов, ее роль при патологических состояниях // *Украинский биохимический журнал*. — 2008. — Т.80. — №6 — С. 5–18. [Dubinina EE, Pustygina AV. Okislitel'naya modifikatsiya proteinov, ee rol' pri patologicheskikh sostoyaniyakh. *The Ukrainian Biochemical Journal*. 2008;80(6):5–18. (In Russ).]
4. Калинина Е.В., Чернов Н.Н., Алеид Р., и др. Современные представления об антиоксидантной роли глутатиона и глутатионзависимых ферментов // *Вестник Российской академии медицинских наук*. — 2010. — №3 — С. 46–54. [Kalinina EV, Chernov NN, Aleid R, Novichkova MD, Saprin AN, Berezov TT. Current views of antioxidative activity of glutathione and glutathione-depending enzymes. *Vestn Ross Akad Med Nauk*. 2010;(3):46–54. (In Russ).]
5. Степовая Е.А., Шахристова Е.В., Рязанцева Н.В., и др. Окислительная модификация белков и система глутатиона при модуляции редокс-статуса клеток эпителия молочной железы // *Биомедицинская химия*. — 2016. — Т.62. — №1 — С. 64–68. [Stepovaya EA, Shakhristova EV, Ryazantseva NV, et al. The role of oxidative protein modification and the glutathione system in modulation of the redox status of breast epithelial cells. *Biomed Khim*. 2016;62(1):64–68. (In Russ).] doi: 10.18097/PBMC20166201064.
6. Murphy MP, Holmgren A, Larsson NG, et al. Unraveling the biological roles of reactive oxygen species. *Cell Metab*. 2011;13(4):361–366. doi: 10.1016/j.cmet.2011.03.010.
7. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutr Rev.* 2012;70(5):257–265. doi: 10.1111/j.1753-4887.2012.00476.x.
8. Октябрьский О.Н., Смирнова Г.В. Редокс-регуляция клеточных функций // *Биохимия*. — 2007. — Т.72. — №2 — С. 158–175. [Oktyabrskiy ON, Smirnova GV. Redox regulation of cellular functions. *Biochemistry*. 2007;72(2):158–175. (In Russ).]
9. Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б., Ткачев В.О. Некоторые принципы и механизмы редокс-регуляции // *Кислород и антиоксиданты*. — 2009. — №1 — С. 3–64. [Zenkov NK, Men'shchikova EB, Tkachev VO. Nekotorye printsipy i mekhanizmy redoks-regulyatsii. *Kislород i antioksidanty*. 2009;(1):3–64. (In Russ).]
10. Rajnai Z, Mehn D, Beery E, et al. ATP-binding cassette B1 transports seliciclib (R-roscovitine), a cyclin-dependent kinase inhibitor. *Drug Metab Dispos.* 2010;38(11):2000–2006. doi: 10.1124/dmd.110.032805.
11. Cappellini A, Chiarini F, Ognibene A, et al. The cyclin-dependent kinase inhibitor roscovitine and the nucleoside analog sangivamycin induce apoptosis in caspase-3 deficient breast cancer cells independent of caspase mediated P-glycoprotein cleavage. *Cell Cycle*. 2009;8(9):1421–1425. doi: 10.4161/cc.8.9.8323.
12. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* 2004;142(2):231–255. doi: 10.1038/sj.bjp.0705776.
13. Rahman I, Kode A, Biswas SK. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat Protoc.* 2006;1(6):3159–3165. doi: 10.1038/nprot.2006.378.
14. Burchill BR, Oliver JM, Pearson CB, et al. Microtubule dynamics and glutathione metabolism in phagocytizing human polymorphonuclear leukocytes. *J Cell Biol.* 1978;76(2):439–447. doi: 10.1083/jcb.76.2.439.
15. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of

- protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248–254. doi: 10.1006/abio.1976.9999.
16. Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal.* 2012;24(5):981–990. doi: 10.1016/j.cellsig.2012.01.008.
17. Sengupta R, Holmgren A. Thioredoxin and glutaredoxin-mediated redox regulation of ribonucleotide reductase. *World J Biol Chem.* 2014;5(1):68–74. doi: 10.4331/wjbc.v5.i1.68.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Шахристова Евгения Викторовна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «СибГМУ» Минздрава России
Адрес: 634050, Томск, Московский тракт, д. 2, **тел.:** +7 (3822) 90-11-01 доб. 1853, **e-mail:** shaxristova@yandex.ru,
SPIN-код: 8125-6414, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-2938-1137>

Степовая Елена Алексеевна, доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «СибГМУ» Минздрава России
Адрес: 634050, Томск, Московский тракт, д. 2, **тел.:** +7 (3822) 90-11-01 доб. 1853, **e-mail:** muir@mail.ru,
SPIN-код: 5562-4522, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-9339-6304>

Носарева Ольга Леонидовна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «СибГМУ» Минздрава России
Адрес: 634050, Томск, Московский тракт, д. 2, **тел.:** +7 (3822) 90-11-01 доб. 1853, **e-mail:** olnosareva@yandex.ru,
SPIN-код: 5688-7566, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-7441-5554>

Рудиков Евгений Валерьевич, интерн кафедры биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «СибГМУ» Минздрава России
Адрес: 634050, Томск, Московский тракт, д. 2, **тел.:** +7 (3822) 90-11-01 доб. 1853, **e-mail:** korvin_w@mail.ru,
SPIN-код: 5559-4313, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-3283-3616>

Новицкий Вячеслав Викторович, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, заведующий кафедрой патофизиологии ФГБОУ ВО «СибГМУ» Минздрава России
Адрес: 634050, Томск, Московский тракт, д. 2, **тел.:** +7 (3822) 90-11-01 доб. 1740, **e-mail:** patfizssmu@yandex.ru,
SPIN-код: 7160-6881, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-9577-8370>