

Молекулярные механизмы влияния N-этилмалеимида и 1,4-дитиоэритритола на регуляцию апоптоза опухолевых клеток линии P19 при гипоксии

Носарева О.Л., Орлов Д.С., Шахристова Е.В., Степовая Е.А.

Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ)
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

РЕЗЮМЕ

Актуальность. Нарушение регуляции апоптоза в эпителиальных опухолевых клетках линии P19 сопряжено с формированием окислительного стресса. В условиях гипоксии происходит изменение функционирования митохондрий, что может выступать дополнительным фактором, усугубляющим окислительный стресс в опухолевой клетке.

Цель – оценить влияние N-этилмалеимида и 1,4-дитиоэритритола на реализацию и регуляцию апоптоза опухолевых клеток линии P19 при гипоксии *in vitro*.

Материалы и методы. Материалом для исследования служили культивированные в условиях гипоксии опухолевые клетки линии P19 (тератокарцинома мыши). Для модуляции редокс-статуса использовали N-этилмалеимид в концентрации 5 мМ и протектор SH-групп – 1,4-дитиоэритритол в конечной концентрации 5 мМ. Методом проточной цитофлуориметрии определяли внутриклеточное содержание ионов кальция, трансмембранный потенциал митохондрий, количество аннексин V-, CD95- и CD120-положительных клеток. Концентрацию восстановленного, окисленного и белково-связанного глутатиона, SH-групп протеинов, гидроксильного радикала и карбонильных производных белков измеряли методом спектрофотометрии.

Результаты. В условиях гипоксии изменение редокс-статуса системы глутатиона, сопровождающееся окислительной модификацией белков (глутатионилирование и карбонилирование), оказывает влияние на метаболизм опухолевой клетки в целом и, при применении протектора SH-групп белков – 1,4-дитиоэритритола, способствует формированию дополнительных механизмов ускользания от клеточной гибели, а в случае применения блокатора SH-групп протеинов – N-этилмалеимида – активации апоптоза.

Заключение. В условиях гипоксии изменение редокс-гомеостаза опухолевой клетки и модуляция окислительной модификации белков (глутатионилирование и карбонилирование) являются одним из перспективных подходов таргетной регуляции клеточной гибели.

Ключевые слова: редокс-статус, опухолевый рост, окислительный стресс, система глутатиона, апоптоз, гипоксия.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии финансирования.

Для цитирования: Носарева О.Л., Орлов Д.С., Шахристова Е.В., Степовая Е.А. Молекулярные механизмы влияния N-этилмалеимида и 1,4-дитиоэритритола на регуляцию апоптоза опухолевых клеток линии P19 при гипоксии. *Бюллетень сибирской медицины*. 2020; 19 (2): 72–77. <https://doi.org/ 10.20538/1682-0363-2020-2-72–77>.

Molecular mechanisms of the effects of N-ethylmaleimide and 1,4-dithioerythritol on regulation of apoptosis in P19 cells under hypoxia

Nosareva O.L., Orlov D.S., Shakhristova E.V., Stepovaya E.A.

Siberian State Medical University
2, Moscow Trakt, Tomsk, 634050, Russian Federation

ABSTRACT

Relevance. Impairment of apoptosis regulation in P19 cells is correlated with generation of oxidative stress. Under hypoxia, changes in mitochondrial functions occur, which may exacerbate oxidative stress in the tumor cell.

The aim of the study was to evaluate the effects of N-ethylmaleimide and 1,4-dithioerythritol on implementation and regulation of apoptosis in P19 cells under hypoxia *in vitro*.

Materials and methods. P19 cells (mouse teratocarcinoma) cultured under hypoxia served as the material for the study. For redox status modulation, 5mM N-ethylmaleimide and 1,4-dithioerythritol in the final concentrations of 5 mM were used. The intracellular concentration of calcium ions, the transmembrane potential and the number of Annexin V, CD95 and CD120 positive cells were determined by flow cytometry. The levels of reduced, oxidized and protein-bound glutathione, protein SH groups, hydroxyl radical and protein carbonyl derivatives were measured by spectrophotometry.

Results. The alteration in the redox status of the glutathione system under hypoxia, accompanied by oxidative modification of proteins (glutathionylation and carbonylation), influences the metabolism in the tumor cell on the whole. Under the effects of 1,4-dithioerythritol, an SH group protector, this alteration promotes formation of additional mechanisms to escape apoptosis, whereas under the effects of N-ethylmaleimide, an SH group blocker, it, on the contrary, promotes apoptosis activation.

Conclusions. The changes in the redox homeostasis of the tumor cell and modulation of oxidative modification of proteins (glutathionylation and carbonylation) under hypoxia are one of the promising approaches to targeted regulation of cell death.

Key words: redox status, tumor growth, oxidative stress, glutathione system, apoptosis, hypoxia.

Conflict of interest. The authors declare no obvious or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The authors state that there was no funding for the study.

For citation: Nosareva O.L., Orlov D.S., Shakhristova E.V., Stepovaya E.A. Molecular mechanisms of the effects of N-ethylmaleimide and 1,4-dithioerythritol on regulation of apoptosis in P19 cells under hypoxia. *Bulletin of Siberian Medicine*.2020; 19 (2): 72–77. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-2-72-77>.

ВВЕДЕНИЕ

Неуклонный рост и высокая смертность от онкологических заболеваний ставят перед теоретической и практической медициной задачу поиска молекулярных мишеней активации гибели опухолевых клеток. Весомый вклад в изменение редокс-статуса клетки вносит функционирование митохондрий как основного источника генерации активных форм кислорода [1, 2]. Известно, что уровень продукции активных форм кислорода напрямую зависит от напряжения кислорода внутри клетки и деятельности ферментов цепи переноса электронов. В настоящее время активные формы кислорода рассматриваются важными сигнальными молекулами, которые могут

вызывать окисление нуклеиновых кислот, липидов и функциональных доменов белков [3]. Окислительная модификация этих макромолекул способствует возникновению нестабильности генома, неконтролируемой пролиферации, нарушению регуляции апоптоза, активации ангиогенеза, изменению направленности внутриклеточных метаболических путей опухолевых клеток [4–7]. Накопление окислительно-модифицированных белков в опухолевых клетках является одним из аспектов активации протеасом и наработки белков теплового шока, принимающих участие в регуляции клеточной гибели [8–10]. Особый интерес вызывает изучение триггерных механизмов апоптотической гибели опухолевых

клеток в условиях гипоксии, так как при этом опухолевая клетка приобретает не только дополнительную устойчивость к апоптотической гибели, но и к проводимой химиотерапии [11, 12].

С нашей точки зрения, глутатионилирование и карбонилирование белков являются одними из перспективных молекулярных механизмов для редокс-регулируемого внутриклеточного сигналинга и процесса гибели опухолевых клеток в условиях гипоксии. Потенциальными внутриклеточными мишенями обратимой и необратимой модификации протеинов могут выступать ключевые белки-регуляторы клеточного цикла, ион-транспортирующие системы, факторы транскрипции [3, 13].

Цель исследования – оценить влияние N-этилмалеимида и 1,4-дителиозитрита на реализацию и регуляцию апоптоза опухолевых клеток линии P19 при гипоксии *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве материала исследования были выбраны опухолевые клетки линии P19 (тератокарцинома мыши C3H/He) из банка клеточных культур Института цитологии РАН (г. Санкт-Петербург, Россия). Клетки культивировали монослойным способом в CO₂-инкубаторе (Sanyo, Япония) при температуре 37 °C в атмосфере 5%-го CO₂. Условия культивирования: питательная среда αMEM (БиолоТ, Россия), сыворотка эмбриональная бычья 10%-я (БиолоТ, Россия), L-глутамин 0,3 мг/мл (БиолоТ, Россия) и гентамицин 100 мкг/мл (Микроген, Россия). Жизнеспособность клеток оценивали с помощью 0,5%-го раствора трипанового синего (Serva, США). Для проведения эксперимента использовали культуру клеток, имеющей не более 5% погибших клеток.

С целью дополнительной продукции активных форм кислорода опухолевыми клетками проводили моделирование гипоксии в культуре опухолевых клеток линии P19 в инкубационной камере Hypoxia Incubator Chamber (STEMCELL, Канада), используя газовую смесь: 5% O₂, 5% CO₂, 90% N₂. Формирование условий гипоксии контролировали путем измерения концентрации растворенного кислорода, используя оксиметр Dissolved Oxygen Meter (HANNA HI 9146, Италия).

В качестве модуляторов редокс-статуса использовали блокатор SH-групп – N-этилмалеимид (NEM) (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 5 мМ [14] и протектор SH-групп – 1,4-дителиозитритол (DTE) (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 5 мМ [15].

После инкубации опухолевые клетки отмывали от питательной среды и лизировали путем ресуспендирования в фосфатно-солевом буфере (pH = 7,4)

с добавлением 1%-го тритона X-100 (Sigma-Aldrich, США) и охлаждения на льду с сохранением стандартной концентрации клеток для определения концентрации гидроксильного радикала и карбонильных производных белков. Содержание гидроксильного радикала оценивали по его способности (после предварительной опсонизации клеток зимозаном (Sigma-Aldrich, США)) разрушать модельный субстрат – 2-дезоксид-рибозу (Sigma-Aldrich, США) с образованием продукта реакции с максимумом поглощения при 532 нм [16]. Концентрацию карбонильных производных белков определяли по их реакции взаимодействия с 2,4-динитрофенилгидразином, продукт которой имеет максимум поглощения при длине волны 363 нм [17]. Результаты содержания гидроксильного радикала и карбонильных производных белков выражали в нмоль/мг белка.

Для определения содержания восстановленного, окисленного, белково-связанного глутатиона и SH-групп белков лизат клеток депротеинизировали с помощью 5%-го раствора сульфосалициловой кислоты. Концентрацию общего, окисленного (GSSG) и восстановленного (GSH) глутатиона определяли методом, предложенным M.E. Anderson в модификации I. Rahman и соавт. [18]. Рассчитывали величину отношения GSH/GSSG как показатель изменения редокс-статуса клетки. Содержание SH-групп белков, а также белково-связанного глутатиона после предварительного его высвобождения из связи с белками с помощью 1%-го раствора боргидрида натрия, учитывали по реакции с 5,5-дителио-бис(2-нитробензойной) кислотой [19]. Результаты содержания фракций глутатиона, SH-групп белков и белково-связанного глутатиона выражали в нмоль/мг белка.

Содержание белка в клетках определяли по методу Бредфорда, основанном на взаимодействии аминокислотных остатков лизина и аргинина с красителем Кумасси голубым G-250 [20].

Учет экстинкции результатов проводили с помощью спектрофотометра СФ-2000 (ОКБ-Спектр, Россия).

Оценку апоптотически измененных клеток проводили с помощью проточной цитометрии с использованием аннексина-V-FITC и пропидий йодида согласно инструкции фирмы-производителя (eBioscience, США). Подсчет количества аннексин-положительных клеток осуществляли к общему числу изучаемых клеток и выражали в процентах.

Количество CD95- и CD120-положительных клеток определяли с помощью набора моноклональных антител к соответствующим антигенам согласно протоколу производителя (R&D Systems, США). Результат выражали в условных единицах.

Оценку митохондриального мембранного потенциала ($\Delta\psi_m$) клеток проводили с помощью набора Flow Cytometry Mitochondrial Membrane Potential Detection Kit (BD, США) по снижению спектрального свечения, используя 5,5',6,6'-тетрахлоро-1,1',3,3'-тетраэтилбензимидазолкарбоцианина иодид, который при деполяризации мембраны митохондрий неспособен проникать внутрь органелл и образовывать флуоресцирующие агрегаты. Количество клеток со сниженной флуоресценцией выражали в процентах.

Определение концентрации ионов кальция в цитоплазме клеток проводили с помощью метода, основанном на их связывании липофильным зондом Fluo 3 AM с максимумом флуоресценции при 526 нм (Sigma-Aldrich, США) [21]. Результаты выражали в условных единицах, отражающих уровень свечения зонда на клетку.

Детекцию результатов проточной цитометрии проводили с помощью прибора FACSCanto II (BD, США) и с использованием программного обеспечения FACSDiva Version 6.1.3.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием программы SPSS 17.0. Проверка нормальности распределения количественных показателей осуществлялась с использованием критерия Шапиро – Уилка. Достоверность различий оценивалась с помощью непараметрических критериев Краскела – Уоллиса и Манна – Уитни. Данные представляли в виде медианы верхнего и нижнего квартилей $Me (Q_1-Q_3)$. Статистически значимыми различия считали при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Нарушение регуляции апоптотической гибели опухолевых клеток на фоне снижения внутриклеточного напряжения кислорода сопряжено с изменением их редокс-статуса. В условиях гипоксии избыточная генерация активных форм кислорода связана с потерей электронов из дыхательной цепи митохондрий ввиду отсутствия конечного акцептора электронов и снижения активности IV комплекса – цитохромоксидазы. В связи с этим основной причиной формирования окислительного стресса в клетке является нарушение функционирования этих органелл [22]. Наиболее токсичной активной формой кислорода для макромолекул клетки является гидроксильный радикал. По мнению ряда авторов, именно $OH\cdot$ -радикал выступает самым мощным агентом, способствующим окислительной модификации белков [23, 24]. В ранее проведенном исследовании влияния гипоксии на метаболизм опухолевых клеток линии P19 нами было показано формирование окислительного стресса, сопряженное с изменением состояния систе-

мы глутатиона и активацией реализации апоптоза по сравнению опухолевыми клетками, культивированными при нормальной концентрации кислорода [25].

В условиях гипоксии при дополнительном внесении протектора SH-групп белков (DTE) в среду культивирования опухолевых клеток линии P19 нами было получено снижение концентрации $OH\cdot$ -радикала в 2,5 раза ($p < 0,05$), а также числа клеток со сниженным митохондриальным потенциалом в 5,2 раза ($p < 0,05$) по сравнению с результатами, зарегистрированными в клетках при гипоксии (таблица). Наряду с этим в условиях гипоксии действие DTE сопровождалось значимым увеличением содержания GSH в 1,3 раза ($p < 0,05$) и концентрации свободных SH-групп белков в 1,5 раза ($p < 0,05$), снижением содержания белково-связанного глутатиона в 1,4 раза ($p < 0,05$) на фоне сопоставимого значения концентрации карбонильных производных белков, GSSG и величины соотношения GSH/GSSG по сравнению с клетками, культивированными при гипоксии. При изучении реализации и регуляции апоптоза в условиях гипоксии и дополнительного добавления в среду культивирования опухолевых клеток линии P19 протектора SH-групп белков нами было получено значимое снижение числа аннексин-V-положительных клеток 2,0 раза ($p < 0,05$) и внутриклеточного содержания ионов Ca^{2+} в 1,1 раза ($p < 0,05$) на фоне сопоставимых значений количества CD95- и CD120-положительных клеток по сравнению с гипоксией (см. таблицу). Таким образом, примененный нами 1,4-дитиозэритритол способствовал формированию дополнительной устойчивости опухолевых клеток линии P19 к триггерным механизмам запуска апоптоза в условиях гипоксии.

При модуляции редокс-статуса опухолевых клеток линии P19 с помощью блокатора SH-групп белков (NEM) в условиях гипоксии нами было получено значимое увеличение числа аннексин-V-положительных клеток в 9,1 раза ($p < 0,05$), CD95-положительных клеток – в 15,5 ($p < 0,05$) и CD120-положительных клеток – в 2,9 раза ($p < 0,05$), а также клеток со сниженным митохондриальным потенциалом в 8,8 раза ($p < 0,05$) и внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} в 3,0 раза ($p < 0,05$) на фоне сопоставимого значения содержания $OH\cdot$ -радикала по сравнению с результатами, зарегистрированными в клетках при гипоксии (см. таблицу). Действие NEM в опухолевых клетках линии P19 при гипоксии сопровождалось значимым снижением концентрации GSH в 3,4 раза ($p < 0,05$) и увеличением концентрации GSSG в 1,6 раза ($p < 0,05$), что привело к значимому снижению величины соотношения GSH/GSSG в 5,4 раза ($p < 0,05$) по сравнению с гипоксией.

Влияние N-этилмалеимида и 1,4-дитиозеритрита на реализацию апоптоза, показатели системы глутатиона, содержание гидроксильного радикала и карбонильных производных белков в опухолевых клетках линии P19 в условиях гипоксии, Me (Q_1-Q_3)			
Показатель	Гипоксия	Гипоксия + NEM	Гипоксия + DTE
Аннексин V-FITC+, %	10,75 (4,50–10,90)	98,05 (97,70–98,40) [#]	5,50 (4,70–6,70)
CD95, у.е.	1,0 (0,9–1,1)	15,5 (12,8–15,7) [#]	0,9 (0,8–1,2)
CD120, у.е.	1,4 (1,3–1,5)	4,1 (4,0–4,5) [#]	1,1 (1,0–1,2)
Клетки со сниженным ΔΨm, %	10,4 (10,4–10,6)	91,2 (90,8–92,0) [#]	2,0 (2,0–2,1) [#]
Концентрация гидроксильного радикала, нмоль/мг белка	27,21 (23,56–29,93)	29,94 (29,42–32,20)	10,70 (8,93–11,32) [#]
Содержание Ca ²⁺ в клетке, у.е.	10,24 (10,10–10,36)	30,23 (29,47–30,39) [#]	9,48 (9,43–9,49) [#]
GSH, нмоль/мг белка	4,47 (4,40–4,58)	1,30 (0,67–1,88) [#]	6,00 (5,97–6,32) [#]
GSSG, нмоль/мг белка	0,43 (0,39–0,45)	0,69 (0,50–0,72) [#]	0,72 (0,34–0,81)
GSH/GSSG	10,19 (9,88–11,35)	1,89 (0,93–4,22) [#]	8,37 (7,93–17,27)
Белково-связанный глутатион, нмоль/мг белка	2,08 (1,95–2,19)	2,96 (2,08–3,26)	1,48 (1,43–1,51) [#]
SH-группы белков, нмоль/мг белка	8,76 (7,83–10,55)	9,62 (9,40–10,28)	12,98 (12,75–13,36) [#]
Карбонильные производные белков, нмоль/мг белка	10,17 (8,92–10,39)	14,34 (14,27–17,63) [#]	7,54 (6,64–8,32)

Примечание. GSH – восстановленный глутатион, GSSG – окисленный глутатион, NEM – N-этилмалеимид, DTE – 1,4-дитиозеритритол.

[#] достоверные различия ($p < 0,05$) по сравнению с группой «гипоксия».

При этом действие блокатора SH-групп белков в опухолевых клетках линии P19 в условиях гипоксии сопровождалось значимым увеличением концентрации карбонильных производных протеинов в 1,4 раза ($p < 0,05$) на фоне сопоставимых значений содержания свободных SH-групп белков и белково-связанного глутатиона по сравнению со значениями, полученными в опухолевых клетках при гипоксии (см. таблицу). Применение N-этилмалеимида оказывало влияние на метаболизм опухолевых клеток, в том числе на функционирование митохондрий, изменение содержания ионов Ca²⁺ и карбонилированных белков, что сопровождалось активацией запуска апоптотической гибели в условиях гипоксии.

Результаты проведенного исследования позволяют утверждать о влиянии редокс-статуса клетки, окислительной модификации белков в обеспечении функционирования опухолевых клеток, в том числе их митохондрий, при сниженном напряжении кислорода.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изменение редокс-статуса системы глутатиона, глутатионирование и карбонилирование протеинов влияют на метаболизм опухолевой клетки. Действие протектора SH-групп белков – 1,4-дитиозеритрита, способствует формированию дополнительных механизмов ускользания от клеточной гибели, а применение блокатора SH-групп протеинов – N-этилмалеимида, сопровождается активацией апоптоза опухолевых клеток линии P19. Принимая во внимание ведущую роль окислительно-восстановительного гомеостаза клетки в запуске апоптоза, проведенное нами исследование подтверждает необ-

ходимость изучения механизмов клеточной гибели и развития устойчивости опухолевых клеток к воздействию противоопухолевых препаратов, действие которых основано на изменении редокс-статуса клетки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sinha K., Das J., Pal P.B., Sil P.C. Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. *Archives of Toxicology*. 2013; 87 (7): 1157–1180. DOI: 10.1007/s00204-013-1034-4.
2. Redza-Dutordoir M., Averill-Bates D.A. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochim. Biophys. Acta*. 2016; 1863 (12): 2977–2992. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2016.09.012.
3. Moldogazieva N.T., Mokhosoev I.M., Feldman N.B., Lutsenko S.V. ROS and RNS signalling: adaptive redox switches through oxidative/nitrosative protein modifications. *Free Radical Research*. 2018; 52 (5): 507–543. DOI: 10.1080/10715762.2018.1457217.
4. Tew K.D., Manevich Y., Grek C., Xiong Y., Uys J., Townsend D.M. The role of glutathione S-transferase P in signaling pathways and S-glutathionylation in cancer. *Free Radical Biology and Medicine*. 2011; 51 (2): 299–313. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.04.013.
5. Степовая Е.А., Рязанцева Н.В., Носарева О.Л., Закирова Е.В., Наумова А.И., Веснина О.Н., Орлов Д.С., Шахристова Е.В., Иванов В.В., Новицкий В.В. Роль окислительной модификации белков в редокс-зависимой регуляции апоптоза опухолевых клеток. *Молекулярная медицина*. 2015; 4: 60–64.
6. Patwardhan R.S., Sharma D., Checker R., Thoh M., Sandur S.K. Spatio-temporal changes in glutathione and thioredoxin redox couples during ionizing radiation-induced oxidative stress regulate tumor radio-resistance. *Free Radical Research*. 2015; 49 (10): 1218–1232. DOI: 10.3109/10715762.2015.1056180.
7. Shakhristova E.V., Stepovaya E.A., Ryazantseva N.V., Nosareva O.L., Yakushina V.D., Ivanov V.V., Novitskii V.V.

- Role of glutathione system redox potential in apoptosis dysregulation in MCF-7 breast adenocarcinoma. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2016; 160 (3): 364–367. DOI: 10.1007/s10517-016-3172-1.
8. Shashova E.E., Astakhova T.M., Plekhanova A.S., Bogomyagkova Y.V., Lyupina Y.V., Sumedi I.R., Slonimskaya E.M., Er-okhov P.A., Abramova E.B., Rodoman G.V., Kuznetsov N.A., Kondakova I.V., Sharova N.P., Choinzonov E.L. Changes in proteasome chymotrypsin-like activity during the development of human mammary and thyroid carcinomas. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2013; 156 (2): 242–244.
 9. Kondakova I.V., Spirina L.V., Koval V.D., Shashova E.E., Choinzonov E.L., Ivanova E.V., Kolomiets L.A., Chernyshova A.L., Slonimskaya E.M., Usynin E.A., Afanasev S.G. Chymotrypsin-like activity and subunit composition of proteasomes in human cancers. *Molecular Biology*. 2014; 48 (3): 384–389.
 10. Ryazantseva N.V., Stepovaya E.A., Nosareva O.L., Konovalova E.V., Orlov D.S., Naumova A.I., Didenko S.A., Vesnina O.N., Shakhristova E.V., Zima A.P., Novitskii V.V. Role of heat shock protein 27 in regulation of glutathione system and apoptosis of Jurkat tumor cells and blood lymphocytes. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2015; 158 (3): 377–379. DOI: 10.1007/s10517-015-2766-3.
 11. Marengo B., Nitti M., Furfaro A.L., Colla R., Ciucis C.D., Marinari U.M., Pronzato M.A., Traverso N., Domenicotti C. Redox homeostasis and cellular antioxidant systems: crucial players in cancer growth and therapy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016; 2016: 6235641. DOI: 10.1155/2016/6235641.
 12. Zhang T., Suo C., Zheng C., Zhang H. Hypoxia and metabolism in metastasis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2019; 1136: 87–95. DOI: 10.1007/978-3-030-12734-3_6.
 13. Степовая Е.А., Шахристов Е.В., Рязанцева Н.В., Носарева О.Л., Чильчигашев Р.И., Егорова М.Ю. Система тиоредоксина в регуляции пролиферации клеток линии MCF-7 при модуляции редокс-статуса. *Сибирский онкологический журнал*. 2016; 15 (4): 50–55. DOI: 10.21294/1814-4861-2016-15-4-50-55.
 14. Sahaf B., Heydari K., Herzenberg L.A. Lymphocyte surface thiol levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003; 100 (7): 4001–4005. DOI: 10.1073/pnas.2628032100
 15. Brunelli L., Crow J.P., Beckman J.S. The comparative toxicity of nitric oxide and peroxynitrite to *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1995; 316 (1): 327–334. DOI: 10.1006/abbi.1995.1044
 16. Thom S.R., Elbuku M.E. Oxygen-dependent antagonism of lipid peroxidation. *Free Radical Biology and Medicine*. 1991; 10 (6): 413–426. DOI: 10.1016/0891-5849(91)90050-d
 17. Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной защиты организма. СПб.: Фолиант, 2000: 103.
 18. Kojima S., Nakayama K., Ishida H. Low dose gamma-rays activate immune functions via induction of glutathione and delay tumor growth. *Journal of Radiation Research*. 2004; 45 (1): 33–39. DOI: 10.1269/jrr.45.33.
 19. Burchill B.R., Oliver J.M., Pearson C.B., Leinbach E.D., Berlin R.D. Microtubule dynamics and glutathione metabolism in phagocytizing human polymorphonuclear leukocytes. *Journal of Cell Biology*. 1978; 76 (2): 439–447. DOI: 10.1083/jcb.76.2.439.
 20. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976; 72: 248–254. DOI: 10.1006/abio.1976.9999.
 21. Merritt J.E., McCarthy S.A., Davies M.P., Moores K.E. Use of fluo-3 to measure cytosolic Ca²⁺ in platelets and neutrophils. Loading cells with the dye, calibration of traces, measurements in the presence of plasma, and buffering of cytosolic Ca²⁺. *The Biochemical Journal*. 1990; 269 (2): 513–519. DOI: 10.1042/bj2690513.
 22. Munro D., Treberg J.R. A radical shift in perspective: mitochondria as regulators of reactive oxygen species. *The Journal of Experimental Biology*. 2017; 220 (Pt 7): 1170–1180. DOI: 10.1242/jeb.132142.
 23. Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б., Ткачев В.О. Некоторые принципы и механизмы редокс-регуляции. *Кислород и антиоксиданты*. 2009; 1: 3–64.
 24. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З., Бондарь И.А., Труфакин В.А. Окислительный стресс. Патологические состояния и заболевания. Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2017: 284.
 25. Орлов Д.С., Рязанцева Н.В., Степовая Е.А., Носарева О.Л., Шахристов Е.В., Иванов В.В. Редокс-зависимые механизмы дисрегуляции апоптоза опухолевых клеток при гипоксии. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2017; 37 (1): 21–26.

Сведения об авторах

Носарева Ольга Леонидовна, д-р мед. наук, доцент, кафедра биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики, СибГМУ, г. Томск. ORCID 0000-0002-7441-5554.

Орлов Дмитрий Сергеевич, ассистент, кафедра биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики, СибГМУ, г. Томск. ORCID 0000-0001-7525-0176.

Шахристов Евгений Викторовна, канд. мед. наук, доцент, кафедра биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики, СибГМУ, г. Томск. ORCID 0000-0003-2938-1137.

Степовая Елена Алексеевна, д-р мед. наук, профессор, кафедра биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики, СибГМУ, г. Томск. ORCID 0000-0001-9339-6304.

✉ **Носарева Ольга Леонидовна**, e-mail: olnosareva@yandex.ru

Поступила в редакцию 07.08.2019

Подписана в печать 25.12.2019