

DOI: 10.21294/1814-4861-2016-15-4-50-55

УДК: 577.112+576.32/.36+616-092.4

СИСТЕМА ТИОРЕДОКСИНА В РЕГУЛЯЦИИ ПРОЛИФЕРАЦИИ КЛЕТОК ЛИНИИ MCF-7 ПРИ МОДУЛЯЦИИ РЕДОКС-СТАТУСА

Е.А. Степовая¹, Е.В. Шахристова¹, Н.В. Рязанцева^{2,3}, О.Л. Носарева¹,
Р.И. Чильчигашев¹, М.Ю. Егорова¹

ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Томск¹

ФГАОА ВО «Сибирский федеральный университет», г. Красноярск²

ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Красноярск³
634050, г. Томск, ул. Московский тракт, 2, e-mail: shaxristova@yandex.ru¹

Аннотация

Введение. Несмотря на имеющиеся данные о функционировании опухолевых клеток в условиях свободнорадикального окисления, остается открытым вопрос о механизмах редокс-регуляции, управления пролиферацией клеток и «ускользания» от апоптотической гибели. **Цель исследования** – выявить участие системы тиоредоксина в регуляции пролиферации клеток аденокарциномы молочной железы линии MCF-7 при модуляции редокс-статуса блокатором SH-групп белков и пептидов N-этилмалеимидом и протектором тиоловых групп – 1,4-дителиозитритолом. **Материал и методы.** Исследования были выполнены с использованием опухолевой клеточной линии MCF-7, культивируемой адгезионным методом. Редокс-статус клеток модулировали с помощью 5 мМ N-этилмалеимида, блокатора SH-групп белков и пептидов, и 5 мМ 1,4-дителиозитритола, протектора тиоловых групп. Оценку содержания активных форм кислорода и клеточного цикла проводили методом проточной цитофлуориметрии. Концентрацию восстановленного окисленного глутатиона и активность тиоредоксинредуктазы определяли спектрофотометрическим методом. Внутриклеточное содержание тиоредоксина, циклина E и циклинзависимой киназы 2 определяли методом вестерн-блоттинга. **Результаты.** Показана важная роль системы тиоредоксина в регуляции пролиферации клеток линии MCF-7. Остановка клеточного цикла в S фазе при действии N-этилмалеимида и в G₀/G₁ фазе при действии 1,4-дителиозитритола связана с изменениями активности редокс-чувствительных белковых комплексов, регулирующих пролиферацию (циклинов и циклинзависимых киназ). **Заключение.** Редокс-зависимая модуляция функционирования внутриклеточных белков, регулирующих пролиферацию, осуществляется при участии системы тиоредоксина. Данное направление исследований представляется перспективным для поиска молекулярных мишеней опухолевой трансформации клеток молочной железы.

Ключевые слова: окислительный стресс; редокс-статус клеток; тиоредоксин; аденокарцинома молочной железы; пролиферация.

Исследование механизмов опухолевой прогрессии остается актуальной задачей трансляционной медицины, патофизиологии и онкологии. Большое внимание уделяется механизмам дисрегуляции и повреждения клеточных систем при иммортализации клеток, что связано с развитием окислительного стресса, сопровождающегося изменением редокс-статуса и дисрегуляцией пролиферации и апоптоза [1–4]. Опухоли молочной железы занимают первое место в структуре онкологической заболеваемости и смертности среди женщин во всем мире, в том числе и в России. Активация свободно-радикального окисления с продукцией активных форм кислорода (АФК) в опухолевых клетках молочной железы приводит к повреждению макромолекул, в частности

белков, участвующих в регуляции пролиферации и программированной клеточной гибели [1–6]. В поддержании внутриклеточного редокс-гомеостаза важную роль играют системы глутатиона, тиоредоксина, глутаредоксина и другие, функционирование которых приводит к снижению уровня АФК, изменению активности факторов транскрипции и экспрессии ряда генов при адаптивных реакциях клеток на изменяющиеся условия [1, 6, 7]. При свободнорадикальном окислении глутатион посредством глутатионилирования защищает SH-группы белков, в том числе транскрипционных факторов (NF-κB, p53, Nrf2 и AP-1), под контролем которых находятся участки генов, кодирующие ключевые белки-регуляторы апоптотической гибели клеток [8].

Несмотря на имеющиеся данные о функционировании опухолевых клеток в условиях свободно-радикального окисления [1–6], остается открытым вопрос о механизмах редокс-регуляции, управления пролиферацией клеток и «ускользания» от апоптотической гибели. Тиоредоксин способен взаимодействовать с АФК, восстанавливать окисленный глутатион, пероксиредоксины, выступать кофактором рибонуклеотид- и метионинсульфоксидредуктаз, участвуя в репарации ДНК, сохранять дитиол/дисульфидную структуру белков [7], способствуя редокс-модуляции функционирования внутриклеточных протеинов, что дает возможность предположить его важную роль в регуляции прогрессии фаз клеточного цикла.

Цель исследования – выявить участие системы тиоредоксина в регуляции пролиферации клеток аденокарциномы молочной железы линии MCF-7 при модуляции редокс-статуса блокатором SH-групп белков и пептидов N-этилмалеимидом и протектором тиоловых групп – 1,4-дителиоэритритолом.

Материал и методы

Исследование выполнено с использованием опухолевой клеточной линии MCF-7 (эпителиоподобная аденокарцинома молочной железы человека), полученной из Российской коллекции клеточных культур Института цитологии Российской академии наук (г. Санкт-Петербург). Опухолевые клетки линии MCF-7 культивировали адгезионным методом 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). Жизнеспособность клеток оценивали микроскопическим методом с трипановым синим («Serva», США). Редокс-статус клеток аденокарциномы молочной железы модулировали с помощью N-этилмалеимида (NEM) («Sigma Aldrich», США), необратимо связывающего SH-группы белков и пептидов, в конечной концентрации 5 мМ [9] и 1,4-дителиоэритритола (DTE) («Sigma Aldrich», США), протектора тиоловых групп протеинов и пептидов, в конечной концентрации 5 мМ [10].

Оценку содержания АФК проводили методом проточной цитофлуориметрии на проточном лазерном цитометре «FaCSCanto II» («Becton Dickinson», США), клетки предварительно инкубировали с 2,7-дихлорфлуоресцеиндиацетатом. В основе метода лежит способность 2,7-дихлорфлуоресцеиндиацетата проникать в цитоплазму клеток и приобретать способность флуоресцировать после взаимодействия с гидро- и липопероксидами. Концентрацию восстановленного (GSH) и окисленного (GSSG) глутатиона в клетках линии MCF-7 определяли методом, предложенным М.Е. Anderson [11] в мо-

дификации I. Rahman et al. [12]. Принцип метода основан на способности GSH взаимодействовать с 5,5-дителио-2-нитробензойной кислотой с образованием тионитрофенольного аниона, имеющего характерный максимум поглощения при длине волны 412 нм. При этом образуется GSSG, который восстанавливался специфически глутатионредуктазой, и восстановленная форма трипептида вновь взаимодействовала с 5,5-дителио-2-нитробензойной кислотой. Скорость образования окрашенного продукта пропорциональна содержанию общего глутатиона. Для определения GSSG пробы предварительно инкубировали с блокатором SH-групп – 2-винилпиридином («Wako», Япония), который необратимо связывал в пробе восстановленный глутатион, и поэтому в данном случае скорость образования окрашенного продукта была пропорциональна содержанию GSSG. Активность тиоредоксинредуктазы (КФ 1.8.1.9) определяли спектрофотометрическим методом, основанным на способности фермента катализировать НАДФН-зависимое восстановление дисульфидных связей субстратов, реагирующих с 5,5-дителио-2-нитробензойной кислотой, образуя тио-2-нитробензойную кислоту, раствор которой имеет максимум поглощения при длине волны 412 нм [13]. Содержание белка в клетках определяли по взаимодействию красителя Кумасси голубого G-250 с остатками аргинина и лизина белковых молекул [10]. Внутриклеточное содержание тиоредоксина, циклина Е и циклинзависимой киназы 2 определяли методом вестерн-блоттинга с использованием моноклональных антител («Thermo Scientific», США; «Abcam», США; «Sigma Aldrich», США соответственно) по протоколу фирмы производителя. Расчет содержания исследуемых белков проводили относительно концентрации референсного протеина β-актина. Оценку распределения клеток линии MCF-7 по фазам клеточного цикла проводили методом проточной цитофлуориметрии по протоколу Cycle Test Plus («Becton Dickinson», США). Статистическую обработку полученных результатов проводили при помощи программы SPSS 11.0. Проверка на соответствие выборок нормальному закону распределения проводилась по критерию Шапиро – Уилка. В связи с отсутствием согласия данных с нормальным распределением на уровне значимости $p < 0,01$ и $p < 0,05$ вычисляли средневыборочные характеристики: медиана (Me), первый и третий квартили (Q_1 – Q_3). Достоверность различий независимых выборок оценивали с помощью непараметрических критериев Краскала – Уолиса и Манна – Уитни для малых групп.

Результаты и обсуждение

Важную роль в поддержании внутриклеточного редокс-гомеостаза играют тиоредоксин- и глутаредоксинзависимые системы, включающие в себя тиоредоксин, НАДФН-зависимую тиоредоксин-

Таблица

Редокс-статус опухолевых клеток линии MCF-7, содержание циклина E и циклинзависимой киназы 2 при действии блокатора SH-групп белков N-этилмалеимида (NEM) и протектора тиоловых групп – 1,4-дителиозеритритола (DTE), Me (Q₁-Q₃)

Показатели	Группы		
	Интактные MCF-7 (n=6)	MCF-7 + NEM (n=6)	MCF-7 + DTE (n=6)
Активные формы кислорода, условные единицы	0,81 (0,80–0,83)	2,35 (2,25–2,50) p=0,009	1,16 (0,81–1,17)
Восстановленный глутатион (GSH), нмоль/мг белка	3,67 (3,60–3,72)	1,87 (1,61–1,92) p=0,009	4,73 (4,58–4,87) P=0,009
Окисленный глутатион (GSSG), нмоль/мг белка	0,38 (0,37–0,43)	0,44 (0,43–0,49)	0,41 (0,39–0,43)
Величина отношения GSH/GSSG	9,71 (9,55–9,73)	4,45 (3,66–4,47) p=0,009	10,65 (10,26–12,48) p=0,016
Тиоредоксин, условные единицы	1,73 (1,71–1,74)	1,86 (1,83–1,87) p=0,001	1,80 (1,79–1,81) p=0,001
Тиоредоксинредуктаза, нмоль НАДФН/мин×мг белка	3,23 (3,17–3,26)	2,62 (2,57–2,88) p=0,011	3,03 (2,43–3,52)
Циклин E, условные единицы	1,18 (1,14–1,21)	0,97 (0,93–1,01)	0,59 (0,56–0,64) p=0,001
Циклинзависимая киназа 2, условные единицы	0,96 (0,94–1,12)	0,85 (0,80–0,91)	0,66 (0,55–0,71) p=0,001

Примечание: p – уровень значимости различий по сравнению с интактными клетками MCF-7.

редуктазу, глутатион, глутатионредуктазу и глутатионпероксидазу [1, 6, 7]. Обе эти системы вносят существенный вклад в антиоксидантную защиту клеток от деструктивного воздействия окислительного стресса (ОС), вызывающего образование внутри- и межмолекулярных дисульфидных связей в белках, окисление функциональных SH-групп с последующей протеосомальной деградацией протеинов [1, 7, 8].

Нами установлено, что NEM в клетках линии MCF-7 вызывает развитие ОС, сопровождающееся увеличением внутриклеточной продукции АФК в 2,9 раза (p=0,009), снижением концентрации GSH в 2,0 раза (p=0,009) и уменьшением величины отношения GSH/GSSG в 2,2 раза (p=0,009)

по сравнению с интактной культурой (таблица). Помимо системы глутатиона, редокс-гомеостаз клеток поддерживает тиоредоксинзависимая система, однако функционирование этой системы и ее редокс-потенциал в конечном итоге тесно связаны с работой системы глутатиона и величиной отношения GSH/GSSG [7]. Так, нами было установлено, что при действии NEM активность тиоредоксинредуктазы в клетках линии MCF-7 снижалась в 1,2 раза (p=0,011) по сравнению с интактной культурой (таблица), что может быть связано с недостатком НАДФН вследствие его интенсивного расхода в реакциях, катализируемых редуктазами, или уменьшением продукции в пентозофосфатном пути. Смещение редокс-статуса в

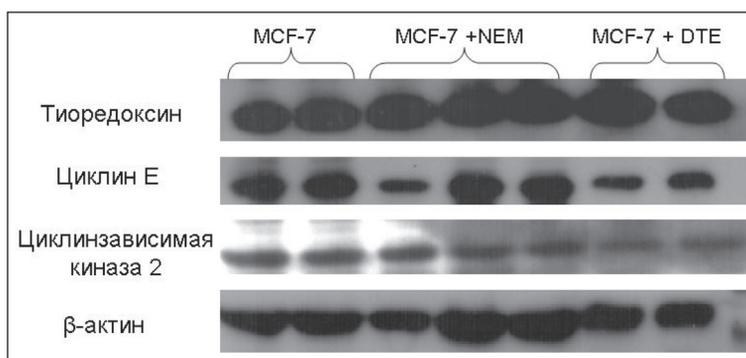


Рис. 1. Фотографии вестерн-блотта белков тиоредоксина, циклина E и циклинзависимой киназы 2 в клетках линии MCF-7 при действии блокатора SH-групп белков N-этилмалеимида (NEM) и протектора тиоловых групп – 1,4-дителиозеритритола (DTE)

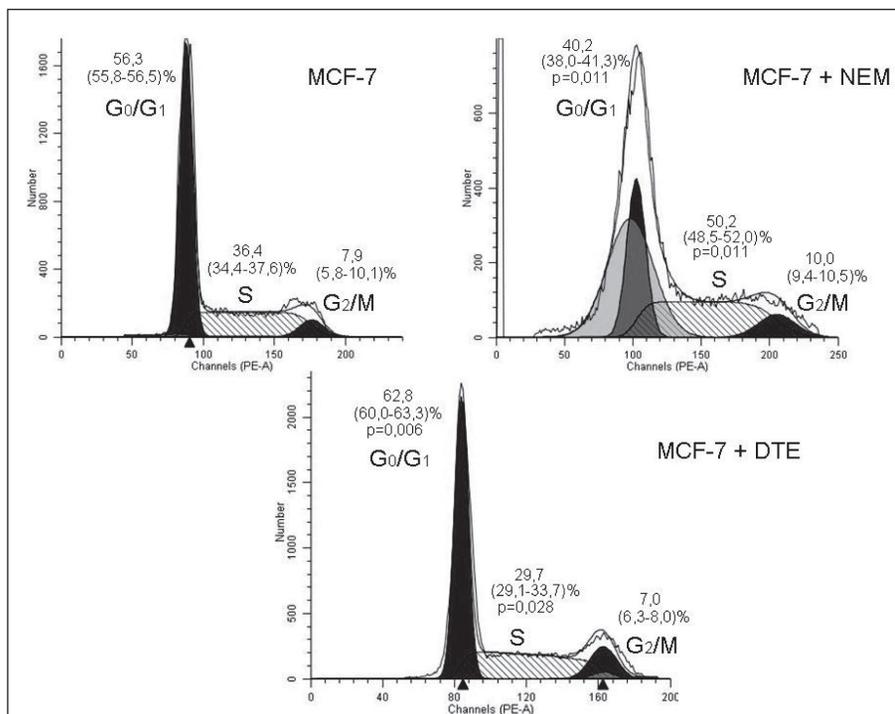


Рис. 2. Распределение клеток аденокарциномы молочной железы по фазам клеточного цикла при действии блокатора SH-групп белков N-этилмалеимида (NEM) и протектора тиоловых групп – 1,4-дителиозеритрита (DTE); p – уровень значимости различий по сравнению с интактными клетками MCF-7

клетках линии MCF-7 под действием NEM в сторону окисления приводило к увеличению содержания тиоредоксина (p=0,001) по сравнению с интактной культурой (рис. 1), что отражало высокую потребность опухолевых клеток в антиоксидантах, необходимых для защиты макромолекул от АФК и выживания, и сопровождалось нарушением в прохождении клеток аденокарциномы молочной железы по фазам клеточного цикла: их увеличение в S фазе в 1,4 раза (p=0,011) и снижение в G₀/G₁ фазах в 1,3 раза (p=0,011) по сравнению с интактной культурой (рис. 2).

Содержание циклинзависимой киназы 2 (CDK2) и циклина E в клетках линии MCF-7, культивируемых с NEM, достоверно не отличалось от интактных клеток. Можно предположить, что остановка клеточного цикла в S фазе при действии NEM является результатом изменения активности белковых комплексов, регулирующих пролиферацию: циклина A/CDK2 и циклина D/CDK4, либо изменений концентрации и структуры этих протеинов в отдельности.

При культивировании клеток линии MCF-7 с DTE увеличивались концентрации GSH в 1,3 раза (p=0,009), тиоредоксина – в 1,1 раза (p=0,001) и величины отношения GSH/GSSG – в 1,1 раза (p=0,016) (таблица). Тиоредоксин является необходимым компонентом для поддержания редокс-гомеостаза клеток и репликации молекул ДНК. В клетках линии MCF-7, культивируемых в присутствии DTE и имеющих более высокое соотношение GSH/GSSG, нами выявлено уменьшение

концентрации CDK2 в 1,5 раза (p=0,001) и циклина E в 2,0 раза (p=0,001) (по сравнению с интактной культурой (рис. 1)), необходимых для инициации репликации молекул ДНК, что приводило к снижению пролиферативной активности опухолевой линии MCF-7 (рис. 2): количество клеток в G₀/G₁ фазе увеличилось в 1,1 раза (p=0,006), а в S фазе – снизилось в 1,2 раза (p=0,028).

Заключение

Редоксзависимая модуляция функционирования внутриклеточных белков, регулирующих пролиферацию, осуществляется при участии системы тиоредоксина. Таким образом, наши исследования показали важную роль редокс-белков, в частности компонентов системы тиоредоксина, в регуляции пролиферации клеток линии MCF-7. Можно предположить, что остановка клеточного цикла в S фазе при действии NEM и в G₀/G₁ фазе при действии DTE связана с изменениями активности редокс-чувствительных белковых комплексов, регулирующих пролиферацию (циклинов и циклинзависимых киназ). Данное направление исследований представляется перспективным для поиска молекулярных мишеней опухолевой трансформации клеток молочной железы.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского гуманитарного научного фонда в рамках научного проекта «Тиоредоксин и глутаредоксин – как молекулярные маркеры возникновения и развития опухолей молочной железы». № 15-36-01289.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З., Бондарь И.А., Труфакин В.А.* Окислительный стресс: Патологические состояния и заболевания. Новосибирск; 2008. 284 с.
2. *Murphy M.P., Holmgren A., Larsson N.G., Halliwell B., Chang C.J., Kalyanaraman B., Rhee S.G., Thornalley P.J., Partridge L., Gems D., Nyström T., Belousov V., Schumacker P.T., Winterbourn C.C.* Unraveling the biological roles of reactive oxygen species. *Cell Metab.* 2011; 13 (4): 361–366. doi: 10.1016/j.cmet.2011.03.010.
3. *Ryazantseva N.V., Stepovaya E.A., Nosareva O.L., Konovalova E.V., Orlov D.S., Naumova A.L., 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. *Bull Exp Biol Med.* 2015; 158 (3): 377–379. doi: 10.1007/s10517-015-2766-3.
4. *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. *Bull Exp Biol Med.* 2016; 160 (3): 364–367. doi: 10.1007/s10517-016-3172-1.
5. *Дубинина Е.Е.* Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, создание и разрушение): физиологические и клинико-биохимические аспекты. СПб., 2006. 397 с.
6. *Калинина Е.В., Чернов Н.Н., Алеид Р., Новичкова М.Д., Саприн А.Н., Березов Т.Т.* Современные представления об антиоксидантной роли глутатиона и глутатионзависимых ферментов. *Вестник Российской академии медицинских наук.* 2010; 3: 46–54.
7. *Калинина Е.В., Чернов Н.Н., Саприн А.Н.* Участие тио-, перокси- и глутаредоксинов в клеточных редокс-зависимых процессах. *Успехи биологической химии.* 2008; 48: 319–358.
8. *Ray P.D., Huang B.W., 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.
9. *Sahaf B., Heydari K., Herzenberg L.A.* Lymphocyte surface thiol levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003; 100 (7): 4001–4005.
10. *Bradford M.M.* A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 1976; 7 (1, 2): 248–254.
11. *Anderson M.E.* Determination of glutathione and glutathione sulfide in biological samples. *Methods Enzymol.* 1985; 113: 548–555.
12. *Rahman I., Kode A., Biswas S.K.* Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat. Protoc.* 2006; 1 (6): 3159–3165.
13. *Tamura T., Stadman T.C.* A new selenoprotein from human lung adenocarcinoma cells: purification, properties, and thioredoxin reductase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996; 93: 1006–1011.

Поступила 7.04.16

Принята в печать 14.05.16

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Степовая Елена Алексеевна, доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики, Сибирский государственный медицинский университет (г. Томск, Российская Федерация). E-mail: muir@mail.ru. SPIN-код: 5562-4522.

Шахристовая Евгения Викторовна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики, руководитель НОЦ молекулярной медицины, Сибирский государственный медицинский университет (г. Томск, Российская Федерация). E-mail: shaxristova@yandex.ru. SPIN-код: 8125-6414.

Рязанцева Наталья Владимировна, доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры биофизики Института фундаментальной биологии и биотехнологии, Сибирский федеральный университет; профессор кафедры биологической химии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого (г. Красноярск, Российская Федерация). SPIN-код: 9162-0832.

Носарева Ольга Леонидовна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики, Сибирский государственный медицинский университет (г. Томск, Российская Федерация). E-mail: olnosareva@yandex.ru. SPIN-код: 5688-7566.

Чильчигашев Роман Игоревич, студент 6-го курса медико-биологического факультета, Сибирский государственный медицинский университет (г. Томск, Российская Федерация). E-mail: gomchil@mail.ru. SPIN-код: 9129-5612.

Егорова Мария Юрьевна, студентка 2-го курса лечебного факультета, Сибирский государственный медицинский университет (г. Томск, Российская Федерация). E-mail: masha_dasha@mail.ru. SPIN-код: 4937-1342.

THE THIOREDOXIN SYSTEM IN REGULATING MCF-7 CELL PROLIFERATION UNDER REDOX STATUS MODULATION

E.A. Stepovaya¹, E.V. Shakhristova¹, N.V. Ryazantseva^{2,3}, O.L. Nosareva¹, R.I. Chil'chigashhev¹, M.Yu. Egorova¹

Siberian State Medical University, Tomsk¹

Siberian Federal University, Krasnoyarsk²

Krasnoyarsk State Medical University named after Professor V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk³

2, Moskovsky tract, 634050-Tomsk, Russia, e-mail: shaxristova@yandex.ru¹

Abstract

Introduction. Despite the available data on tumor cell functioning under the conditions of free radical-mediated oxidation, the mechanisms of redox regulation, cell proliferation management and apoptosis avoidance remain understudied. **The objective of the study** was to identify the role of the thioredoxin system in regulating MCF-7 breast cancer cell proliferation under redox status modulation with 1,4-dithioerythritol. **Material and methods.** The studies were conducted on the MCF-7 breast cancer cell line, grown in adherent cell culture. Cell redox status was modulated with 5 mM N-ethylmaleimide – an SH group and peptide inhibitor - and 5 mM 1,4-dithioerythritol – a thiol group protector. The cell cycle was evaluated by flow cytometry, the same

technique was used to measure the reactive oxygen species concentration. The levels of reduced and oxidized glutathione and the activity of thioredoxin reductase were identified by spectrophotometry. The intracellular concentrations of thioredoxin, cyclin E and cyclin-dependent kinase 2 were determined by Western blot analysis. **Results and discussion.** The essential role of the thioredoxin system in regulating MCF-7 breast cancer cell proliferation was exhibited. S-phase arrest under the effect of N-ethylmaleimide and G₀/G₁-phase arrest under the effect of 1.4-dithioerythritol are associated with the changes in the activity of redox-sensitive protein complexes (cyclins and cyclin-dependent kinases) that regulate cell proliferation. **Conclusion.** Redox-dependent modulation of proliferation regulating intracellular protein activity occurs due to the thioredoxin system. This is a promising research area for seeking molecular targets of breast cell malignization.

Key words: oxidative stress; cell redox status; thioredoxin; breast adenocarcinoma cells; proliferation.

REFERENCES

1. *Menshchikova E.B., Zenkov N.K., Lankin V.Z., Bondar I.A., Trufakin V.A.* Oxidative stress: Pathological conditions and diseases. Novosibirsk, 2008. 284 p. [in Russian]
2. *Murphy M.P., Holmgren A., Larsson N.G., Halliwell B., Chang C.J., Kalyanaraman B., Rhee S.G., Thornalley P.J., Partridge L., Gems D., Nyström T., Belousov V., Schumacker P.T., Winterbourn C.C.* Unraveling the biological roles of reactive oxygen species. *Cell Metab.* 2011; 13 (4): 361–366. doi: 10.1016/j.cmet.2011.03.010.
3. *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. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2015; 158 (3): 377–379. doi: 10.1007/s10517-015-2766-3.
4. *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.
5. *Dubinina E.E.* Products of metabolism of oxygen in the functional activity of cells (life and death, creation and destruction). Physiological and clinical-biochemical aspects. SPb., 2006. 397 p. [in Russian]
6. *Kalinina E.V., Chernov N.N., Aleid R., Novichkova M.D., Saprin A.N., Berezov T.T.* Sovremennye predstavleniya ob antioksidantnoj roli glutathiona i glutathionzavisimyh fermentov. *Vestnik Rossijskoj AMN.* 2010; 3: 46–54. [in Russian]
7. *Kalinina E.V., Chernov N.N., Saprin A.N.* Uchastie tio-, peroksi- i glutaredoksinov v kletochnykh redoks-zavisimyykh protsessakh. *Uspekhi biologicheskoy khimii.* 2008; 48: 319–358. [in Russian]
8. *Ray P.D., Huang B.W., 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.
9. *Sahaf B., Heydari K., Herzenberg L.A.* Lymphocyte surface thiol levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003; 100 (7): 4001–4005.
10. *Bradford M.M.* A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 1976; 7 (1, 2): 248–254.
11. *Anderson M.E.* Determination of glutathione and glutathione sulfide in biological samples. *Methods Enzymol.* 1985; 113: 548–555.
12. *Rahman I., Kode A., Biswas S.K.* Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat. Protoc.* 2006; 1 (6): 3159–3165.
13. *Tamura T., Stadtman T.C.* A new selenoprotein from human lung adenocarcinoma cells: purification, properties, and thioredoxin reductase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996; 93: 1006–1011.

Received 7.04.16
Accepted 14.05.16

ABOUT THE AUTHORS

Stepovaya Elena A., MD, DSc, Professor, Department of Biochemistry and Molecular Biology with the Course of Clinical Laboratory Diagnostics, Siberian State Medical University (Tomsk, Russian Federation). E-mail: muir@mail.ru. SPIN-code: 5562-4522.

Shakhristova Evgeniya V., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Biochemistry and Molecular Biology with the Course of Clinical Laboratory Diagnostics, Head of the Laboratory of Molecular Medicine, Siberian State Medical University (Tomsk, Russian Federation). E-mail: shaxristova@yandex.ru. SPIN-code: 8125-6414.

Ryazantseva Natalya V., MD, DSc, Professor of the Department of Biophysics, Siberian Federal University (Krasnoyarsk), Professor of the Department of Biological Chemistry with Courses of Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, Krasnoyarsk State Medical University named after Professor V.F. Voyno-Yasenetsky (Krasnoyarsk, Russian Federation). SPIN-код: 9162-0832.

Nosareva Olga L., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Biochemistry and Molecular Biology with the Course of Clinical Laboratory Diagnostics, Siberian State Medical University (Tomsk, Russian Federation). E-mail: olnosareva@yandex.ru. SPIN-code: 5688-7566.

Chilchigashev Roman I., University undergraduate, Medical Biological Faculty, Siberian State Medical University (Tomsk, Russian Federation). E-mail: romchil@mail.ru. SPIN- code: 9129-5612.

Egorova Mariya Yu., 2-nd-year student of General Medicine Faculty, Siberian State Medical University (Tomsk, Russian Federation). E-mail: masha_dasha@mail.ru. SPIN code: 4937-1342.