

УДК 618.19-006.66:576.35:577.112

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2018-4-180-186>

Для цитирования: Шахристова Е.В., Степовая Е.А., Носарева О.Л., Литвинова Л.С., Скуратовская Д.А., Рудиков Е.В., Садыкова А.А., Новицкий В.В. Комплексное исследование роли системы тиоредоксина в пролиферации клеток аденокарциномы молочной железы. *Бюллетень сибирской медицины*. 2018; 17 (4): 180–186.

## Комплексное исследование роли системы тиоредоксина в пролиферации клеток аденокарциномы молочной железы

Шахристова Е.В.<sup>1</sup>, Степовая Е.А.<sup>1</sup>, Носарева О.Л.<sup>1</sup>, Литвинова Л.С.<sup>2</sup>, Скуратовская Д.А.<sup>2</sup>, Рудиков Е.В.<sup>1</sup>, Садыкова А.А.<sup>1</sup>, Новицкий В.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ)  
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

<sup>2</sup> Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта (БФУ им. И. Канта)  
Россия, 236016, г. Калининград, ул. А. Невского, 14

### РЕЗЮМЕ

**Актуальность.** Редокс-белки (тиоредоксин, глутаредоксин) являются ключевыми макромолекулами, способными осуществлять модуляцию внутриклеточных процессов, что определяет выбор направления исследования в области редокс-зависимого управления пролиферацией клеток. Изучение молекулярных механизмов возникновения, развития и прогрессии злокачественных новообразований лежит в основе поиска опухоль-ассоциированных маркеров и потенциальных мишеней для противоопухолевой персонализированной терапии.

**Цель исследования** – установление роли системы «тиоредоксин – тиоредоксинредуктаза» в нарушении пролиферации клеток аденокарциномы молочной железы при действии блокатора циклинзависимых протеинкиназ росковитина.

**Материалы и методы.** Исследование проведено с использованием культуры клеток аденокарциномы молочной железы линии MCF-7, инкубируемых в присутствии и отсутствии росковитина в конечной концентрации 20 мкмоль/л в течение 18 ч. Определяли внутриклеточное содержание тиоредоксина и белков-регуляторов пролиферации (циклина E и циклинзависимой протеинкиназы 2) методом вестерн-блоттинга, уровень экспрессии мРНК тиоредоксина – методом полимеразно-цепной реакции в реальном времени и активность тиоредоксинредуктазы – спектрофотометрическим методом.

**Результаты.** Установлено, что снижение пролиферативной активности опухолевых клеток линии MCF-7, инкубированных в присутствии росковитина, сопровождалось уменьшением содержания циклина E и циклинзависимой киназы на фоне снижения уровня экспрессии мРНК тиоредоксина и увеличения активности тиоредоксинредуктазы.

**Выводы.** При действии блокатора циклинзависимых протеинкиназ росковитина было выявлено участие компонентов системы тиоредоксина (тиоредоксин, тиоредоксинредуктаза) в нарушении пролиферации опухолевых клеток линии MCF-7.

**Ключевые слова:** тиоредоксин, аденокарцинома молочной железы, редокс-регуляция, пролиферация.

✉ Шахристова Евгения Викторовна, e-mail: shaxristova@yandex.ru.

## ВВЕДЕНИЕ

Редокс-белки (тиоредоксин, глутаредоксин) являются ключевыми макромолекулами, способными осуществлять модуляцию внутриклеточных процессов [1, 2], что определяет выбор направления исследования в области редокс-зависимого управления пролиферацией клеток. Изучение молекулярных механизмов возникновения, развития и прогрессии злокачественных новообразований лежит в основе поиска опухоль-ассоциированных маркеров и потенциальных мишеней для противоопухолевой персонализированной терапии.

Система тиоредоксина, включая в себя два белка-фермента – тиоредоксин (КФ 1.8.4.8) и НАДФН-зависимую тиоредоксинредуктазу (КФ 1.8.1.9), осуществляет защиту клеток от свободно-радикального повреждения макромолекул, выступая в роли ловушки гидроксильного анион-радикала. Она способствует реализации каталитической активности ряда ферментов (пероксиредоксинов, рибонуклеотидредуктазы, метионинсульфоксидредуктазы), регулирует активность редокс-зависимых факторов транскрипции (p53, NF-κB, AP-1, Nrf2), связанных с процессами пролиферации клеток, способствует фолдингу белков [1, 2]. Поскольку многие транскрипционные факторы имеют аминокислотные остатки цистеина в ДНК-связывающих доменах, которые могут подвергаться окислению, большое значение имеет восстановительный потенциал системы тиоредоксина, необходимый для поддержания функционального состояния белковых молекул. Большинство исследований свидетельствует о том, что редокс-зависимая регуляция при участии тиоредоксина происходит в цитоплазме, где осуществляются ключевые процессы внутриклеточных сигнальных механизмов [1]. В то же время высказано предположение, что тиоредоксин может обеспечивать регуляцию транскрипции определенных генов в ядре [3].

Таким образом, можно предположить, что система тиоредоксина может влиять на функционирование белков-регуляторов пролиферации опухолевых клеток, что обусловило проведение настоящего исследования.

Цель исследования – установление роли системы «тиоредоксин – тиоредоксинредуктаза» в нарушении пролиферации клеток аденокарциномы молочной железы при действии блокатора циклинзависимых протеинкиназ росковитина.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании была использована культура клеток линии MCF-7 (эпителиоподобная адено-

карцинома молочной железы человека), полученная из Российской коллекции клеточных культур Института цитологии Российской академии наук (г. Санкт-Петербург). Использовались клетки, жизнеспособность которых в тесте с трипановым синим (Serva, США) составляла не менее 85%. Культивирование клеток линии MCF-7 осуществлялось при 37 °C и 5%-м растворе двуокиси углерода адгезионным методом в полной питательной среде, содержащей ЕМЕМ (НПП «ПанЭко», Россия) и эмбриональную телячью сыворотку (Invitrogen, США) в соотношении 9 : 1, а также 1% заменимых аминокислот (НПП «ПанЭко», Россия), 10 мкг/мл бычьего инсулина (НПП «ПанЭко», Россия), 0,3 мг/мл L-глутамин (НПП «ПанЭко», Россия) и 100 мкг/мл гентамицина (ICN, США). Полученную клеточную культуру снимали с поверхности культурального флакона смесью трипсин-версена и стандартизовали до  $4,0 \times 10^6$  клеток/мл, разбавляя полной питательной средой. Модуляция пролиферативной активности клеток аденокарциномы молочной железы достигалась путем добавления в культуральную среду 20 мкмоль/л росковитина (Sigma Aldrich, США), ингибитора циклинзависимых протеинкиназ [4]. Культивирование опухолевых клеток в присутствии и отсутствии росковитина проводили в течение 18 ч в 48-луночных планшетах, после чего клеточный материал использовали для количественного определения показателей состояния системы тиоредоксина и пролиферации клеток.

Для характеристики состояния системы тиоредоксина в клетках линии MCF-7 определяли экспрессию мРНК и содержание тиоредоксина, активность тиоредоксинредуктазы. Для количественного определения экспрессии мРНК тиоредоксина предварительно проводили выделение мРНК фенол-хлороформным методом из образцов клеток, хранившихся при температуре –80 °C в растворе RNA later Stabilization Reagent (QIAGEN, Германия), с использованием набора реагентов ExtractRNA (ЗАО «Евроген», Россия) и очищали от примесей геномной ДНК с помощью ДНКазы I 1 U/μg (Sigma-Aldrich, США). Концентрацию и чистоту выделенной РНК оценивали с использованием спектрофотометра NanoVue Plus (General Electric Healthcare, Великобритания). Полученную тотальную РНК использовали для синтеза кДНК в реакции обратной транскрипции с помощью набора реагентов MMLV RT kit (ЗАО «Евроген», Россия).

Для изучения экспрессии мРНК тиоредоксина в опухолевых клетках проводили ПЦР в режиме реального времени с использованием специфиче-

ских праймеров и набора реагентов qPCRmix-HS SYBR (ЗАО «Евроген», Россия) на амплификаторе BioRad CFX96 Real-Time System (Bio-Rad, США). Нуклеотидные последовательности, соответствующие гену *TXN1* и его первичному транскрипту, извлекали из базы данных Primer-BLAST NCBI (National Center for Biotechnological Information

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucscore>). В качестве нормировочного гена использовали *B2M* ( $\beta$ 2-микроглобулин), в относительно равной степени экспрессирующийся в исследуемых клетках [5]. Праймеры конструировали с помощью программ Primer.3 и Oligo Analyzer, нуклеотидные последовательности которых представлены в табл. 1.

Т а б л и ц а 1  
Table 1

Нуклеотидные последовательности использованных праймеров Nucleotide sequences of used primers		
Ген Gen	Последовательность нуклеотидов в прямом (F) и обратном (R) праймерах The sequence of nucleotides in the forward (F) and reverse (R) primers	Размер ампликона, пар нуклеотидов Amplicon size, nucleotide pairs
<i>TXN1</i>	F: 5'-GGA-GAG-AGC-AAG-CAG-CGA-GTC-3'	80
	R: 5'-CTG-ACG-AGC-GGC-TGT-AAG-GA-3'	
<i>B2M</i>	F: 5'-CCT-GCC-GTG-TGA-ACC-ATG-TG-3'	70
	R: 5'-GCT-GCT-TAC-ATG-TCT-CGA-TCC-CA-3'	

Полимеразно-цепную реакцию в режиме реального времени проводили в 25 мкл смеси, содержащей 5 мкл смеси qPCRmix-HS SYBR (ЗАО «Евроген», Россия), 4 мкл кДНК, 2 мкл праймеров (F и R) 10 пмоль/л, 14 мкл деионизированной воды, свободной от РНКаз. Программа амплификации включала один цикл – предварительная денатурация (95 °С, 3 мин); 43 цикла – денатурация (95 °С, 15 с), отжиг праймеров (59–63 °С, 20 с), элонгация – (72 °С, 13 с). В программе строилась кривая плавления, где фиксировалось нагревание амплификационной смеси с 60 до 95 °С с шагом 5 °С, сопровождающееся съемом флуоресцентного сигнала. Количественное выражение результатов проводилось с помощью расчета разницы экспрессии исследуемого гена относительно нормировочного гена в виде  $E - \Delta\Delta Ct$  [6].

Внутриклеточное содержание тиоредоксина и белков-регуляторов пролиферации определяли методом вестерн-блоттинга с помощью электрофореза белков в 10%-м полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия и последующим переносом на нитроцеллюлозную мембрану (BioRad, США). Далее проводили гибридизацию с первичными моноклональными антителами к тиоредоксину (Thermo Scientific, США), циклину E (Abscam, США) и циклинзависимой протеинкиназе 2 (Sigma Aldrich, США) по протоколу фирмы-производителя. После инкубации с антителами нитроцеллюлозные мембраны отмывали и подвергали иммуноблоттингу со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена в конечной концентрации 0,2 мкг/мл. Детекцию разделенных белков проводили путем добавления хе-

миллюминесцентного субстрата пероксидазы хрена (Invitrogen, США). Содержание тиоредоксина, циклина E и циклинзависимой протеинкиназы 2 в опухолевых клетках определяли по изменению отношения величины свечения бэнда исследуемых белков к величине свечения протеина цитоскелета  $\beta$ -актина (Sigma-Aldrich, США) [7], используя программное обеспечение ImageJ2x 2.1.4.7.

Активность тиоредоксинредуктазы (КФ 1.8.1.9) определяли методом, основанным на способности фермента катализировать НАДФН-зависимое восстановление дисульфидных связей субстратов, реагирующих с 5,5-дителибис-2-нитробензойной кислотой, образуя тио-2-нитробензойной кислоту, раствор которой имеет максимум поглощения при длине волны 412 нм [8]. Содержание белка в клетках определяли по взаимодействию красителя Кумасси голубого G-250 с аминокислотными остатками аргинина и лизина белковых молекул [9].

Статистическую обработку результатов исследования осуществляли с применением пакета программ SPSS Statistica 11.0 и программы Microsoft Excel. Для проверки гипотезы и соответствия выборочных данных нормальному закону распределения использовали тест Шапиро – Уилка. Поскольку исследуемые параметры в группах не подчинялись нормальному закону распределения, результаты представляли в виде медианы и интерквартильного размаха  $Me (Q_1 - Q_3)$ . Достоверность различий выборок с небольшим объемом устанавливали с использованием непараметрического критерия Манна – Уитни для попарно несвязанных выборок.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Т а б л и ц а 2

T a b l e 2

Состояние системы тиоредоксина и содержание белков-регуляторов пролиферации клеток линии MCF-7 при действии ингибитора циклинзависимых протеинкиназ росковитина,  $Me(Q_1-Q_3)$

The state of the thioredoxin system and the content of protein regulators of cell proliferation of the MCF-7 line under the action of the inhibitor cyclin-dependent protein kinases of roscovitin,  $Me(Q_1-Q_3)$

Показатель Characteristic	Группа Group	
	Интактные MCF-7 Intact MCF-7	MCF-7 + росковитин MCF-7 + roscovitin
мРНК <i>TXN1</i> , усл. ед. мРНК <i>TXN1</i> , с.у.	14,22 (11,39–14,52)	12,64 (11,24–13,27) $p = 0,009$
Тиоредоксин, усл. ед. Thioredoxin, с.у.	1,73 (1,71–1,74)	1,86 (1,84–1,88) $p = 0,268$
Тиоредоксинредуктаза, нмоль/л НАДФН/мин × мг белка Thioredoxin reductase, nmol/l NADP/min × mg protein	3,23 (3,17–3,26)	3,47 (3,36–3,57) $p = 0,006$
Циклин E*, усл. ед. Cyclin E*, с.у.	1,18 (1,14–1,21)	0,73 (0,58–0,78) $p = 0,007$
Циклинзависимая протеинкиназа 2*, усл. ед. Cyclin-dependent pro- tein kinases 2*, с.у.	0,96 (0,94–1,12)	0,69 (0,62–0,79) $p = 0,015$

П р и м е ч а н и е:  $p$  – уровень значимости различий по сравнению с интактными клетками MCF-7.

\* использованы данные из предыдущей работы авторов [10].  
N o t e:  $p$  is the level of significance of differences compared with intact MCF-7 cells.

\* used data from previous work of the authors [10].

Управление пролиферацией клеток осуществляется на молекулярном уровне, в котором ключевая роль принадлежит циклинам и циклинзависимым протеинкиназам, своевременный синтез и деградация которых способствуют продвижению клетки по фазам клеточного цикла. Ранее нами было установлено, что использование росковитина приводило к остановке клеточного цикла в фазах  $G_2/M$  [10], что объяснялось сходством химического строения ингибитора и молекул АТФ, способствующим конкурентному вытеснению макроэргического соединения из АТФ-связывающих участков циклинзависимых протеинкиназ со снижением их каталитической активности [11]. Кроме того, нами обнаружено, что росковитин, действуя на клетки аденокарциномы молочной железы, способствовал снижению прогрессии фаз клеточного цикла, что выражалось в уменьшении содержания циклинзависимой протеинкиназы 2 и циклина E [10].

Циклин E и циклинзависимая протеинкиназа 2 являются комплексом второй половины фазы  $G_1$ . Высокое содержание и экспрессия мРНК этих белков необходимы для преодоления клеткой точки рестрикции и вступления в фазу S клеточного цикла. Поскольку белки-регуляторы клеточного цикла нуждаются в защите от повреждающего действия активных форм кислорода для сохранения своей структуры и функциональных свойств, нами было выдвинуто предположение о возможном участии системы тиоредоксина в регуляции пролиферации опухолевых клеток и их способности к выживанию. Протеасомальная деградация циклинов осуществляется с помощью системы «убиквитин – убиквитинлигаза», способствующей убиквитинилированию белков-регуляторов пролиферации. Снижение содержания циклина E при действии росковитина в клетках линии MCF-7 может быть связано с увеличением деградации белка в протеасомах с участием убиквитина. В то же время регуляция функционирования системы «убиквитин – убиквитинлигаза» может осуществляться редокс-зависимыми механизмами с участием редокс-белков, в том числе тиоредоксина.

Нами установлено снижение экспрессии мРНК тиоредоксина (табл. 2) на фоне отсутствия статистически значимых различий в содержании исследуемого редокс-белка в клетках линии MCF-7, культивируемой в присутствии росковитина, по сравнению со значениями аналогичных показателей в интактной культуре.

Молекулы тиоредоксина, содержащие в своем активном центре аминокислотные остатки цистеина, защищают белки от свободнорадикального повреждения, поддерживают их дитиол-дисульфидную структуру, восстанавливают окисленный глутатион и выступают в роли ловушки гидроксильного радикала, что способствует выживанию опухолевых клеток в условиях окислительного стресса [1, 2].

Тиоредоксинредуктаза способна катализировать процесс восстановления большого количества различных субстратов, среди которых окисленный тиоредоксин, пероксид водорода, гидропероксиды липидов [12]. Эта способность тиоредоксинредуктазы связана с возможностью конформационных перестроек в ее активном

центре в процессе окисления, что защищает фермент от действия протеаз [13, 14]. Нами установлено, что при действии росковитина в клетках аденокарциномы молочной железы отмечается увеличение активности тиоредоксинредуктазы (см. табл. 2) по сравнению со значениями аналогичного показателя в интактной культуре.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Система тиоредоксина является не только важным компонентом редокс-регулирующих механизмов внутриклеточных процессов, но и способна принимать участие в регуляции пролиферации опухолевых клеток молочной железы, возможно, воздействуя на структуру белков-регуляторов клеточного цикла и изменяя продолжительность их жизни.

Поиск подходов модуляции пролиферации клеток линии MCF-7 открывает широкие перспективы для внедрения в медицинскую практику персонифицированных молекулярных технологий, что позволит повысить эффективность существующих методов патогенетически обоснованной терапии опухолевых заболеваний молочной железы. В связи с этим компоненты системы тиоредоксина, позволяющие управлять белками-регуляторами клеточного цикла, можно рассматривать как потенциальные молекулярные мишени регуляции пролиферации при опухолевом росте.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

## ВКЛАД АВТОРОВ

Шахристова Е.В. – разработка концепции и дизайна, проверка критически важного интеллектуального содержания, проведение практической части исследования, анализ и интерпретация данных, написание рукописи статьи. Степовая Е.А. – анализ и интерпретация данных, написание рукописи статьи, окончательное утверждение для публикации рукописи. Носарева О.Л. – анализ и интерпретация данных, написание рукописи статьи. Литвинова А.С. – проведение практической части исследования, анализ и интерпретация данных. Скуратовская Д.А. – проведение практической части исследования, анализ и интерпретация данных. Рудиков Е.В. – проведение практической части исследования, анализ и интерпретация данных, написание рукописи статьи. Садыкова А.А. – анализ и интерпретация данных, написание рукописи статьи. Новицкий В.В. – разработка концепции и дизайна, окончательное утверждение для публикации рукописи.

## ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

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

## СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Одобрено локальным этическим комитетом ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России (протокол № 3555 от 23.12.2013).

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Lu J., Holmgren A. The thioredoxin antioxidant system. *Free Radic. Biol. Med.* 2014; 66: 75–87. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.036.
- Harris I.S., Treloar A.E., Inoue S., Sasaki M., Gorrini C., Lee K.C., Yung K.Y., Brenner D., Knobbe-Thomsen C.B., Cox M.A., Elia A., Berger T., Cescon D.W., Adeoye A., Brystle A., Molyneux S.D., Mason J.M., Li W.Y., Yamamoto K., Wakeham A., Berman H.K., Khokha R., Done S.J., Kavanagh T.J., Lam C.W., Mak T.W. Glutathione and thioredoxin antioxidant pathways synergize to drive cancer initiation and progression. *Cancer Cell.* 2015; 27 (2): 211–222. DOI: 10.1016/j.ccell.2014.11.019.
- Arner E.S.J., Holmgren A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur. J. Biochem.* 2000; 267 (20): 6102–6109. DOI: 10.1046/j.1432-1327.2000.01701.x.
- Rajnai Z., Méhn D., Beéry E., Okyar A., Jani M., Tyth G.K., Fülöp F., Lévi F., Krajcsi P. 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.
- Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A., Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002; 3 (7): research0034.
- Schmittgen T.D., Livak K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C (T) method. *Nat. Protoc.* 2008; 3 (6): 1101–1108. DOI: 10.1038/nprot.2008.73.
- Nelson A.W., Groen A.J., Miller J.L., Warren A.Y., Holmes K.A., Tarulli G.A., Tilley W.D., Katzenellenbogen B.S., Hawse J.R., Gnanapragasam V.J., Carroll J.S. Comprehensive assessment of estrogen receptor beta antibodies in cancer cell line models and tissue reveals critical limitations in reagent specificity. *Mol. Cell Endocrinol.* 2017; 440: 138–150. DOI: 10.1016/j.mce.2016.11.016.
- 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 (3): 1006–1011.
- 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.

10. Шахристова Е.В., Степовая Е.А., Носарева О.Л., Рудиков Е.В., Новицкий В.В. Глутатион и глутаредоксин в росковитин-опосредованном ингибировании пролиферации клеток аденокарциномы молочной железы. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2017; 72 (4): 261–267. [Shakhristova E.V., Stepovaya E.A., Nosareva O.L., Rudikov E.V., Novitsky V.V. Glutathione and glutaredoxin in roscovitine-mediated inhibition of breast cancer cell proliferation. *Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk*. 2017; 72 (4): 261–267 (in Russ.)]. DOI: 10.15690/vramn849.
11. Cappellini A., Chiarini F., Ognibene A., McCubrey J.A., Martelli A.M. 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: implications for therapy of drug resistant breast cancers. *Cell Cycle*. 2009; 8 (9): 1421–1425. DOI: 10.4161/cc.8.9.8323.
12. Biaglow J.E., Miller R.A. The thioredoxin reductase/thioredoxin system: novel redox targets for cancer therapy. *Cancer Biol. Ther.* 2005; 4 (1): 6–13.
13. Zhong L., Arner E.S.J., Ljung J., Aslund F., Holmgren A. Rat and calf thioredoxin reductase are homologous to glutathione reductase with a carboxyl-terminal elongation containing a conserved catalytically active penultimate selenocysteine residue. *J. Biol. Chem.* 1998; 273 (15): 8581–8591.
14. Zhong L., Holmgren A. Essential role of selenium in the catalytic activities of mammalian thioredoxin reductase revealed by characterization of recombinant enzymes with selenocysteine mutations. *J. Biol. Chem.* 2000; 275 (24): 18121–18128. DOI: 10.1074/jbc.M000690200.

Поступила в редакцию 03.09.2018

Подписана в печать 09.11.2018

**Шахристова Евгения Викторовна**, канд. мед. наук, доцент, кафедра биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики, СибГМУ, г. Томск. ORCID iD 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 iD 0000-0001-9339-6304.

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

**Литвинова Лариса Сергеевна**, д-р мед. наук, зав. базовой лабораторией иммунологии и клеточных биотехнологий, БФУ им. Иммануила Канта, г. Калининград. ORCID iD 0000-0001-5231-6910.

**Скуратовская Дарья Александровна**, биолог, базовая лаборатория иммунологии и клеточных биотехнологий, БФУ им. Иммануила Канта, г. Калининград. ORCID iD 0000-0002-8679-1135.

**Рудиков Евгений Валерьевич**, соискатель, кафедра биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики, СибГМУ, г. Томск. ORCID iD 0000-0003-3283-3616.

**Садькова Анна Алексеевна**, канд. мед. наук, доцент, кафедра биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики, СибГМУ, г. Томск. ORCID iD 0000-0003-4093-4927.

**Новицкий Вячеслав Викторович**, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, кафедра патофизиологии, СибГМУ, г. Томск. ORCID iD 0000-0002-9577-8370.

✉ Шахристова Евгения Викторовна, e-mail: shaxristova@yandex.ru.

УДК 618.19-006.66:576.35:577.112

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2018-4-180-186>

For citation: Shakhristova E.V., Stepovaya E.A., Nosareva O.L., Litvinova L.S., Skuratovskaya D.A., Rudikov E.V., Sadykova A.A., Novitsky V.V. A multi-centre study on the role of the thioredoxin system in breast cancer cell proliferation. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2018; 17 (2): 180–186.

## A multi-centre study on the role of the thioredoxin system in breast cancer cell proliferation

Shakhristova E.V.<sup>1</sup>, Stepovaya E.A.<sup>1</sup>, Nosareva O.L.<sup>1</sup>, Litvinova L.S.<sup>2</sup>, Skuratovskaya D.A.<sup>2</sup>, Rudikov E.V.<sup>1</sup>, Sadykova A.A.<sup>1</sup>, Novitsky V.V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Siberian State Medical University (SSMU)  
2, Moscow Trakt, Tomsk, 634050, Russian Federation

<sup>2</sup> Immanuel Kant Baltic Federal University  
14, A. Nevskii Str., 236041, Kaliningrad, Russian Federation

**ABSTRACT**

Redox proteins (thioredoxin, glutaredoxin) are key macromolecules capable of modulating intracellular processes. This determines research choices in the field of redox-dependent cell proliferation management. The study of the molecular mechanisms of the onset, development and progression of malignant neoplasms underlies the search for tumor-associated markers and potential targets for personalized antitumor therapy.

**Purpose.** To establish the role of the “thioredoxin – thioredoxin-reductase” system in the impaired proliferation of mammary adenocarcinoma cells under the action of the cyclin-dependent protein kinase roskovitin blocker.

**Materials and methods.** The study was carried out using the culture of mammary adenocarcinoma cells of the MCF-7 line incubated in the presence and absence of roskovitin at a final concentration of 20  $\mu$ M for 18 h. The intracellular content of thioredoxin and protein regulators of proliferation (cyclin E and cyclin-dependent protein kinase 2) were determined by Western blotting technique, the expression level of thioredoxin mRNA was determined by real-time polymerase chain reaction and the activity of thioredoxin-reductase was measured by a spectrophotometric method.

**Results.** It was established that the decrease in proliferative activity of MCF-7 tumor cells incubated in the presence of roskovitin was accompanied by a decrease in the content of cyclin E and cyclin-dependent kinase on the background of a decrease in the expression level of thioredoxin mRNA and an increase in the activity of thioredoxin-reductase.

**Conclusion.** The involvement of the components of the thioredoxin system (thioredoxin, thioredoxin-reductase) in disrupting the proliferation of MCF-7 tumor cells was detected under the action of the cyclin-dependent protein kinases of roskovitin.

**Key words:** thioredoxin, breast adenocarcinoma, redox regulation, proliferation.

**CONFLICT OF INTEREST**

The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

**SOURCE OF FINANCING**

The study was carried out with the financial support of the Russian Foundation for Basic Research (Department

of Humanities) as part of the research project No. 17-36-01029.

**CONFORMITY WITH THE PRINCIPLES OF ETHICS**

The study was approved by the local ethics committee under the named after SSMU (Protocol No. 3555 of 23.12.2013).

Received 03.09.2018

Accepted 09.11.2018

**Shakhristova Evgeniya V.**, PhD, Associate Professor, Department for Biochemistry and Molecular Biology with the Curse of Clinical Laboratory Diagnostics, SSMU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-2938-1137.

**Stepovaya Elena A.**, DM, Professor, Department for Biochemistry and Molecular Biology with the Curse of Clinical Laboratory Diagnostics, SSMU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0001-9339-6304.

**Nosareva Olga L.**, DM, Associate Professor, Department for Biochemistry and Molecular Biology with the Curse of Clinical Laboratory Diagnostics, SSMU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-7441-5554.

**Litvinova Larisa S.**, DM, Head of the Base Laboratory of Immunology and Cellular Biotechnology, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation. ORCID iD 0000-0001-5231-6910.

**Skuratovskaya Darya A.**, Biologist, Base Laboratory of Immunology and Cellular Biotechnology, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-8679-1135.

**Rudikov Evgeniy V.**, Applicant, Department for Biochemistry and Molecular Biology with the Curse of Clinical Laboratory Diagnostics, SSMU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-3283-3616.

**Sadykova Anna A.**, PhD, Associate Professor, Department for Biochemistry and Molecular Biology with the Curse of Clinical Laboratory Diagnostics, SSMU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-4093-4927.

**Novitsky Vaycheslav V.**, DM, Professor, Academician of RAS, Department for Biochemistry and Molecular Biology with the Curse of Clinical Laboratory Diagnostics, SSMU, Tomsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-9577-8370.

(✉) **Shakhristova Evgeniya V.**, e-mail:shaxristova@yandex.ru.