

УДК 576.08:57.044:577.3

## УРОВЕНЬ $H_2O_2$ В ЯДРЕ И ЦИТОПЛАЗМЕ КЛЕТОК К-562 В УСЛОВИЯХ ВНЕШНЕГО $H_2O_2$ -ИНДУЦИРОВАННОГО ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА

© 2025 г. Н. А. Гурьев, Ю. С. Иванова, О. Г. Люблинская\*

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064, Россия*

*\*E-mail: o.lyublinskaya@mail.ru*

Поступила в редакцию 18.06.2025

После доработки 30.06.2025

Принята к публикации 01.07.2025

**Обоснование и цель.** Повышение окислительной нагрузки на клетки, индуцированное избыточным накоплением внеклеточной перекиси водорода ( $H_2O_2$ ) — это стрессовая ситуация, с которой клетки в организме человека могут сталкиваться при развитии различных патологий, а также под влиянием внешних неблагоприятных факторов (табачный дым, ксенобиотики, радиация). Известно, что в условиях стресса внутриклеточная концентрация  $H_2O_2$  оказывается существенно ниже внеклеточной, благодаря активности пероксидаз, локализованных в различных компартментах клеток. В нашей работе мы поставили цель определить, насколько системы антиоксидантной защиты клеток человека способны предотвращать избыточное накопление  $H_2O_2$  в разных клеточных компартментах — цитоплазме и ядре — в условиях внешнего  $H_2O_2$ -индуцированного стресса разной интенсивности. **Методы.** Использовали линию клеток К-562, экспрессирующую в ядре или в цитоплазме НуРег — генетически кодируемый биосенсор  $H_2O_2$ . Кинетику окисления НуРег в ядре или цитоплазме клеток оценивали с помощью проточной цитометрии. Сравнивали уровень  $H_2O_2$ , устанавливающийся в клеточном ядре и цитоплазме после индукции стресса, а также дисульфидредуктазную активность тиоредоксин (Тгх)-зависимой ферментативной системы ядра и цитоплазмы. **Результаты** свидетельствуют о том, что в условиях внешнего, как токсичного, так и нетоксичного для клеток К-562, окислительного стресса внутриядерная концентрация  $H_2O_2$  повышается, и близка к цитоплазматической. Тгх-зависимая дисульфидредуктазная активность в ядре и цитоплазме также оказались сравнимы. **Заключение.** Ядерный аппарат клеток К-562 защищён от избыточного накопления  $H_2O_2$  не более, чем цитоплазматические структуры.

**Ключевые слова:** перекись водорода, антиоксидантная защита, пероксидазная активность, дисульфидредуктазная активность, цитоплазма, ядро, генетически кодируемые биосенсоры, НуРег

**Принятые сокращения:** ДТТ — дитиотреитол; ОхD — доля окисленного биосенсора (oxidation degree); Тгх — тиоредоксин.

DOI: 10.7868/S3034606125030033

В организме человека перекись водорода ( $H_2O_2$ ) образуется в клетках и накапливается во внеклеточном пространстве, благодаря многочисленным реакциям аэробного метаболизма (Sies, 2021). При развитии патологических состояний, сопровождающихся воспалением и (или) нарушением тканевого редокс-гомеостаза, а также под действием ксенобиотиков и негативных факторов окружающей среды, экстраклеточный уровень  $H_2O_2$  может повышаться, приводя к увеличению окислительной нагрузки на клетки — индукции внешнего окислительного стресса (Sies et al., 2017). Внутриклеточные системы антиоксидантной за-

щиты, центральными игроками которой являются высокопроизводительные ферменты пероксидазы (пероксиредоксины, глутатионпероксидазы, каталаза), позволяют клеткам справляться со стрессом. Концентрация  $H_2O_2$ , устанавливающаяся внутри клетки при повышении внешней окислительной нагрузки, оказывается меньше внеклеточной, благодаря конечной скорости транспорта  $H_2O_2$  через плазматическую мембрану и эффективной внутриклеточной элиминации  $H_2O_2$  пероксидазами (Antunes, Cadenas, 2000). Эти ферменты, локализованные в разных клеточных компартментах, уничтожают избыточную перекись намного быстрее,

чем она туда проникает, и устанавливающийся внутриклеточный уровень  $H_2O_2$ , который зависит от конкуренции этих двух процессов, может быть намного ниже экстраклеточного.

Из опубликованных работ известно, что в условиях внешнего  $H_2O_2$ -индуцированного стресса уровень перекиси водорода в цитоплазме клеток человека в десятки и сотни раз отличается от внеклеточной концентрации пероксида (Sies, 2017; Zenin et al., 2022). Однако какая концентрация  $H_2O_2$  устанавливается при этом в разных органеллах, и насколько она отличается от цитоплазматической, пока точно неизвестно. Согласно существующим представлениям, скорость транспортировки пероксида через внутренние мембраны клетки, а также активность редокс-ферментов могут существенно различаться в клеточных органеллах — внутриклеточный редокс-гомеостаз в значительной степени компартиментализован (Go, Jones, 2008). Соответственно, в условиях внешнего окислительного стресса разные компартменты клетки могут быть в разной мере защищены от повышения концентрации  $H_2O_2$ . Особенно важен вопрос о способности клеток поддерживать на низком уровне содержание  $H_2O_2$  в клеточном ядре, поскольку именно  $H_2O_2$ -индуцированное повреждение ДНК является одним из наиболее тяжелых последствий окислительного стресса, приводя в итоге к клеточному старению или гибели (Pole et al., 2016).

Мы поставили цель разобраться, насколько системы антиоксидантной защиты клетки способны предотвращать избыточное накопление  $H_2O_2$  в ядерном компартменте и отличается ли уровень  $H_2O_2$  в цитоплазме и ядре клеток в условиях внешнего  $H_2O_2$ -индуцированного стресса. Для ответа на эти вопросы мы используем генетически-кодируемый биосенсор перекиси водорода HyPer.

HyPer представляет собой химерный белок, состоящий из двух частей: пермутированной формы желтого флуоресцентного белка (сpYFP) и регуляторного домена бактериального транскрипционного фактора OxyR — природного сенсора  $H_2O_2$ , регулирующего в *Escherichia coli* экспрессию генов антиоксидантной защиты при повышении внутриклеточного уровня пероксида (Belousov et al., 2006). Под действием перекиси водорода в  $H_2O_2$ -чувствительном домене HyPer образуется дисульфидная связь, домен претерпевает конформационные изменения, которые влияют на про-

тонирование аминокислотных остатков сpYFP, что, в свою очередь, приводит к изменению его флуоресцентных свойств и даёт возможность использовать HyPer как высоко-чувствительный и специфичный биосенсор  $H_2O_2$  (Bilan, Belousov, 2016).

Экспрессия HyPer в культивируемых клетках позволяет проводить как качественные, так и количественные оценки внутриклеточного уровня  $H_2O_2$  (Huang, Sikes, 2014). Недавно, используя это преимущество HyPer, мы разработали метод количественного определения концентрации  $H_2O_2$  в отдельных компартментах клеток, находящихся в условиях  $H_2O_2$ -индуцированного стресса (Lyublinskaya, Antunes, 2019; Zenin et al., 2022).

Метод основан на анализе кинетики окисления HyPer в живых клетках после добавления экзогенной  $H_2O_2$  в клеточную среду, его принцип описывается на качественном уровне простой закономерностью: чем быстрее окисляется биосенсор, тем выше концентрация  $H_2O_2$  в том клеточном компартменте, где он локализован. Важно отметить, что метод дает возможность в рамках одного эксперимента определить не только уровень  $H_2O_2$  в компартменте, но и константу восстановления биосенсора в условиях внешнего окислительного стресса. В случае цитоплазматической или ядерной локализации HyPer, эта константа зависит от активности системы тиоредоксина (Trx) и позволяет, таким образом, охарактеризовать Trx-зависимую дисульфидредуктазную активность цитоплазмы или ядра (Zhuravlev et al., 2024).

В рамках разработанного нами ранее (Zenin et al., 2022) протокола кинетические кривые измеряют с помощью проточной цитометрии, а для получения количественных оценок уровня  $H_2O_2$  и константы восстановления биосенсора используют уравнения химической кинетики, выведенные Брито и Антюнесом в 2014 г. для описания  $H_2O_2$ -индуцированного окисления внутриклеточных белков (Brito, Antunes, 2014).

Мы использовали названный протокол, чтобы сравнить уровни  $H_2O_2$ , а также эффективность Trx-зависимой системы тиол-дисульфидного обмена в ядре и цитоплазме клеток человека и оценить таким образом защищённость ядерного аппарата клетки от повреждающего действия  $H_2O_2$  в условиях внешнего  $H_2O_2$ -индуцированного стресса.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Клеточные культуры.** Клетки эритробластоидной лейкемии человека К-562 (ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных», Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия) были ранее трансдуцированы лентивирусными векторами (ООО «Евроген», Москва, Россия), кодирующими цитоплазматический или ядерный вариант *NuPer* (Lyublinskaya et al., 2018; Zhuravlev et al., 2024). Клетки культивировали в среде RPMI, содержащей 10 % эмбриональной бычьей сыворотки, 1 % L-глутамин и 1 % пенициллина-стрептомицина. Культуры поддерживали в стандартных ростовых условиях (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) и пересевали дважды в неделю в соотношении 1:5.

**Индукция окислительного стресса.** В работе использовали как краткосрочное, так и долгосрочное присутствие H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в среде клеток К-562. Клетки высевали в флаконы T25 за 24–72 ч до эксперимента (50 000 клеток на 1 мл среды). За 30 мин до эксперимента клетки считали, ресуспендировали в свежей среде (25 000 клеток на 1 мл среды) и аликвотировали суспензию в 24-лучный планшет по 1 мл на лунку, планшет убирали в инкубатор.

Клетки подвергали длительному (1-суточно-му) действию H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> для определения пороговых цитотоксических концентраций экзогенного пероксида. В этом случае H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> добавляли в лунки планшета с клеточной суспензией в концентрациях от 2 до 100 мкМ (соответствующие дозы H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.08–4 пмоль/кл.) и культивировали в течение 24 ч. После этого оценивали жизнеспособность клеток с помощью проточной цитометрии.

Для оценки эффективности систем антиоксидантной защиты клеток использовали кратковременную экспозицию H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. В этих экспериментах, перед индукцией стресса, 800 мкл клеточной суспензии переносили из планшета в пробирку для проточной цитометрии, после чего добавляли в пробирку H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в концентрации от 2 до 100 мкМ. Далее, для мониторинга кинетики окисления *NuPer*, немедленно анализировали флуоресцентные сигналы клеток с помощью проточного цитофлуориметра. В других экспериментах для оценки

стационарного уровня окисления *NuPer*, устанавливаемого после индукции стресса, клеточную суспензию культивировали в присутствии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в течение 10 мин в обычных ростовых условиях, после чего анализировали с помощью проточной цитометрии.

**Определение стационарного уровня окисления *NuPer*.** Уровень окисления *NuPer*, устанавливаемый в ядре или цитоплазме клеток через 10 мин после индукции окислительного стресса, определяли с помощью проточного цитофлуориметра CytoFLEX (Beckman Coulter, США), оценивая параметр *NuPer ratio*. С этой целью измеряли флуоресцентные сигналы клеток (*I*) в полосе 525 нм, при возбуждении голубым (488 нм) и фиолетовым (405 нм) лазером (*I*<sub>488</sub> и *I*<sub>405</sub> соответственно), а также рациометрический сигнал  $NuPer\ ratio = I_{488} \times 100 / I_{405}$ .

**Мониторинг кинетики окисления *NuPer*.** Окисление *NuPer* в ядре или цитоплазме клеток наблюдали с помощью проточного цитофлуориметра CytoFLEX (Beckman Coulter, США). Анализ длился 10–15 мин непосредственно после добавления к клеткам H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. В пробирку с клетками подавали теплую (37 °C) смесь воздуха и CO<sub>2</sub> (5 %) для поддержания физиологических условий и величины pH в клеточной среде. Детектировали флуоресцентные сигналы *I*<sub>488</sub> и *I*<sub>405</sub>. Увеличение сигнала *I*<sub>488</sub> отражало накопление окисленной формы биосенсора в ядре или цитоплазме клеток, а снижение сигнала *I*<sub>405</sub> — убыль восстановленной формы. Детектировали также рациометрический сигнал  $NuPer\ ratio = I_{488} \times 100 / I_{405}$ .

Для получения кинетических кривых (графиков, отображающих долю восстановленного/окисленного биосенсора в зависимости от времени, прошедшего после добавления к клеткам H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), данные проточного цитометра обрабатывали с использованием приложения Microsoft Excel. Долю окисленного биосенсора (OxD), т. е. отношение количества окисленных молекул *NuPer* к его общему количеству в рассматриваемом компартменте (ядре или цитоплазме), для каждой проанализированной клетки вычисляли по формуле (Meuer, Dick, 2010):

$$OxD = \frac{I_{488} \times I_{405\text{DTT}} - I_{488\text{DTT}} \times I_{405}}{I_{488} \times I_{405\text{DTT}} - I_{488} \times I_{405\text{H}_2\text{O}_2} + I_{488\text{H}_2\text{O}_2} \times I_{405} - I_{488\text{DTT}} \times I_{405}}, \quad (1)$$

где  $I_{488}$  и  $I_{405}$  — флуоресцентные сигналы НуPer, а  $I_{ДТТ}$  и  $I_{H_2O_2}$  — сигналы НуPer, измеренные в образцах клеток при инкубации с высокими дозами дитиотреитола (ДТТ, 30 мМ, 10 мин) и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.5 мМ, 5 мин), которые приводили к полному восстановлению и окислению НуPer соответственно. Флуоресцентные сигналы НуPer в клетках, обработанных высокими дозами ДТТ и перекиси, измеряли в экспериментах, проводимых параллельно с кинетическими. Обработку клеток проводили в стандартных ростовых условиях (37 °С и 5 % CO<sub>2</sub>) в пробирках для проточной цитометрии непосредственно перед измерениями.

**Определение концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и константы скорости реакции восстановления НуPer внутри компартмента.** Концентрацию H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в заданном компартменте клеток (ядре или цитоплазме) и константу реакции восстановления биосенсора в этом компартменте определяли, используя двухпараметровую аппроксимацию кинетических кривых следующим уравнением (Brito, Antunes, 2014):

$$1 - \text{OxD} = \frac{k_{\text{ox}}}{k_{\text{rd}} + k_{\text{ox}}} \times \left(1 - e^{-(k_{\text{ox}} + k_{\text{rd}})t}\right). \quad (2)$$

В этом уравнении  $1 - \text{OxD}$  — это доля восстановленного биосенсора в заданном компартменте клетки в момент  $t$ , а  $k_{\text{ox}}$  и  $k_{\text{rd}}$  — константы псевдопервого порядка окисления и восстановления биосенсора соответственно. Константа  $k_{\text{rd}}$  зависит от активности Тгх-зависимой ферментативной системы Тгх/ТгхR, восстанавливающей НуPer в цитоплазме или ядре клеток (Zhuravlev et al., 2024);  $k_{\text{ox}}$  зависит от уровня H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в компартменте и определяется следующим образом (Brito, Antunes, 2014):

$$k_{\text{ox}} = k_{\text{НуPer} + H_2O_2} \times [H_2O_2]_{\text{in}}, \quad (3)$$

где  $[H_2O_2]_{\text{in}}$  — концентрация H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, усредненная по сайтам локализации сенсора, а  $k_{\text{НуPer} + H_2O_2}$  — константа реакции второго порядка между НуPer и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Двухпараметровая нелинейная аппроксимация кинетических кривых уравнением (2) с использованием метода наименьших квадратов позволяла определить  $k_{\text{ox}}$  и  $k_{\text{rd}}$ . Параметр  $k_{\text{rd}}$  рассматривали как количественный показатель, характеризующий дисульфидредуктазную активность системы Тгх/ТгхR в ядре или цитоплазме клеток. Параметр

$k_{\text{ox}}$  может быть использован для вычисления с помощью уравнения (3)  $[H_2O_2]_{\text{in}}$  — содержания H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> внутри компартмента. Однако в настоящее время константа  $k_{\text{НуPer} + H_2O_2}$  доподлинно неизвестна, и точно оценить  $[H_2O_2]_{\text{in}}$ , зная  $k_{\text{ox}}$ , из уравнения (3) невозможно. Для примерных оценок можно использовать константу реакции второго порядка  $k_{\text{OxyR} + H_2O_2} = 5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , которая характерна для OxyR, природного бактериального сенсора H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, регуляторный домен которого является основой НуPer (Bilan et al., 2013). Однако в настоящей работе мы использовали другой подход — оценивали  $[H_2O_2]_{\text{in}}$  в ядре и цитоплазме клеток в относительных единицах, нормируя значение  $k_{\text{ox}}$ , характерное для ядра, на значение  $k_{\text{ox}}$ , характерное для цитоплазмы клеток К-562. При такой оценке мы сможем сравнить концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, установившиеся в обоих компартментах в условиях стресса, не зная точного значения  $k_{\text{НуPer} + H_2O_2}$ .

**Оценка жизнеспособности клеток.** Жизнеспособность клеток определяли через 24 ч после индукции окислительного стресса методом проточной цитометрии (проточный цитометр CytoFLEX, Beckman Coulter, США; лазер 488 нм) при окрашивании клеток витальным красителем йодистым пропидием (50 мкг/мл).

**Статистическая обработка результатов.** Все эксперименты повторяли не менее трех раз. Данные представлены как средние значения и их стандартные отклонения. Статистическую значимость при парных сравнениях оценивали с помощью  $t$ -критерия Стьюдента, порог значимости определяли при  $P < 0.05$ . Представлены наиболее репрезентативные гистограммы проточной цитометрии и изображения клеток, полученные с помощью конфокальной микроскопии.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

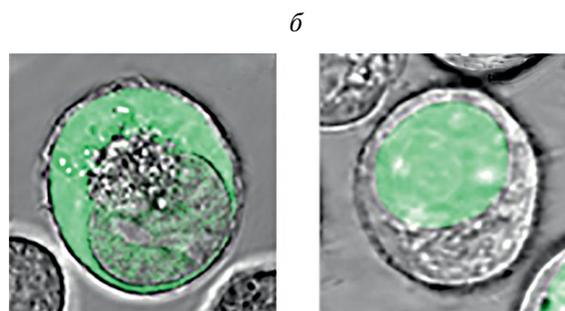
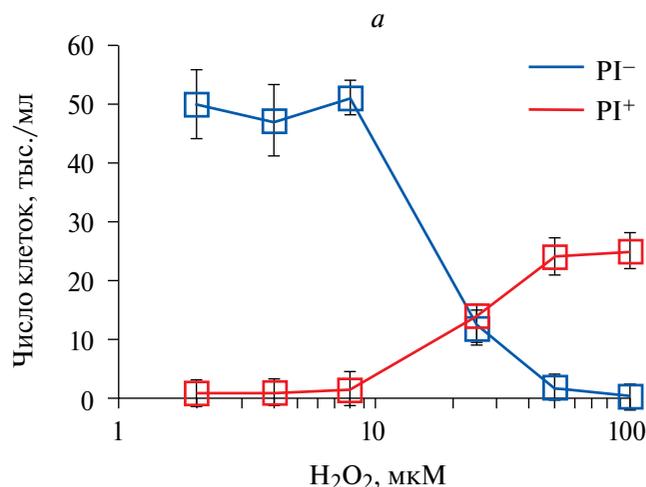
В настоящей работе использовали культивируемые клетки эритробластоидной лейкемии человека К-562. Эта клеточная линия является суспензионной и, следовательно, представляет собой наиболее адекватную модель для проведения проточно-цитометрических экспериментов, которые служили методической основой работы.

На первом этапе исследований определяли диапазон цитотоксических и не цитотоксических концентраций экзогенной H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> при её

добавлении в ростовую среду клеток. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью витального красителя йодистого пропидия через 1 сут после воздействия  $H_2O_2$ , считая живые и погибшие клетки на проточном цитометре. Экзогенная  $H_2O_2$  в концентрации ниже 10 мкМ не вызывала ни гибели клеток, ни нарушений клеточной пролиферации (см. рис. 1а), в то время как в концентрации, превышающей 20 мкМ, приводила к ярко выраженным цитотоксическим эффектам. Проведенные эксперименты позволили выбрать для дальнейших исследований две концентрации  $H_2O_2$ , индуцирующие слабый, не цитотоксический, окислительный стресс (4 и 8 мкМ), и две концентрации, вызывающие интенсивный цитотоксический стресс (20 и 30 мкМ).

Определив порог токсичности  $H_2O_2$ , мы приступили к экспериментам с клеточными линиями К-562, экспрессирующими генетически кодируемый биосенсор НуPer в клеточной цитоплазме или ядре. Локализация биосенсора в соответствующих клеточных компартментах была подтверждена с использованием конфокальной микроскопии (рис. 1б).

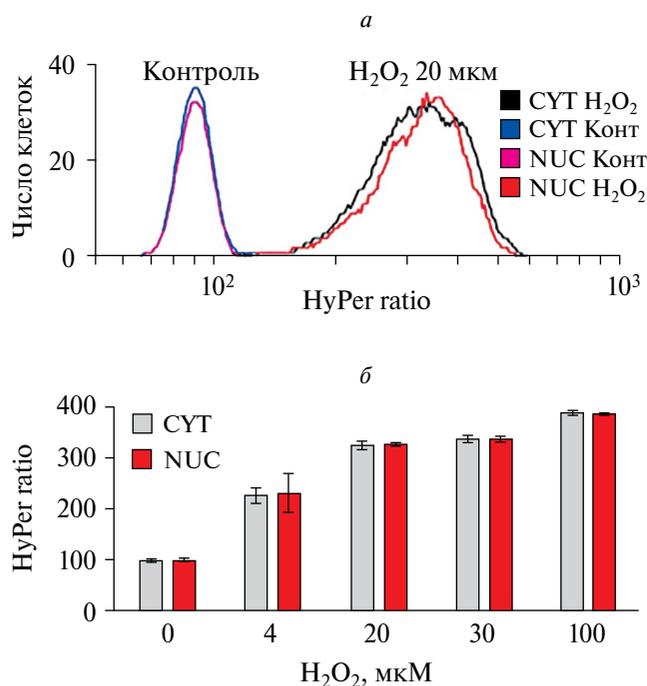
Для начала мы сравнили флуоресцентные сигналы НуPer в обоих компартментах в отсутствие и в присутствии экзогенного пероксида в ростовой среде клеток. Известно, что НуPer флуоресцирует в зелёном спектральном диапазоне и что в спектре возбуждения его флуоресценции наблюдаются два пика — в фиолетовой и голубой области (при 420 и 500 нм соответственно) (Bilan, Velousov, 2016). Пик при 420 нм соответствует восстановленной, а при 500 нм — окисленной форме биосенсора. В нормальных физиологических условиях НуPer в цитоплазме и ядре клеток человека полностью восстановлен (Zenin et al., 2022). При увеличении внутриклеточного содержания  $H_2O_2$  в клетках начинает расти доля окисленного НуPer и в спектре возбуждения флуоресценции НуPer-экспрессирующих клеток соответственно происходит пропорциональное увеличение амплитуды пика при 500 нм и уменьшение амплитуды пика при 420 нм. Таким образом, измерение ратиометрического сигнала НуPer ratio — отношения интенсивностей флуоресценции при двух разных длинах волн возбуждения — позволяет зафиксировать с высокой степенью чувствительности подъём уровня



**Рис. 1.** Токсичность экзогенной  $H_2O_2$  для клеток К-562, а также локализация НуPer, (биосенсора  $H_2O_2$ ) в цитоплазме и ядре клеток К-562. а — Число живых (PI<sup>-</sup>) и погибших (PI<sup>+</sup>) клеток в суспензии через 24 ч после добавления к клеточным культурам  $H_2O_2$  в разных концентрациях. б — Изображения клеток, экспрессирующих НуPer в цитоплазме (слева) и ядре (справа), полученные с помощью флуоресцентной лазерной сканирующей конфокальной микроскопии. PI — йодистый пропидий.

$H_2O_2$  в НуPer-экспрессирующих клетках. Соответственно, для качественной оценки доли окисленного биосенсора в клеточном ядре и цитоплазме мы измеряли ратиометрический сигнал биосенсора НуPer ratio (в протоколе измерений этот параметр определяли как отношение интенсивности сигнала, измеренного при возбуждении на длине волны 488 нм ( $I_{488} = EX_{488}FL_{525}$ ) к интенсивности сигнала при возбуждении на длине волны 405 нм ( $I_{405} = EX_{405}FL_{525}$ ).

В отсутствие экзогенной  $H_2O_2$  интенсивности ратиометрического сигнала НуPer в обоих компартментах совпадали (рис. 2а), что может объясняться поддержанием биосенсора в восстановленном состоянии в клетках, находящихся



**Рис. 2.** Окисление HyPer в ядре (NUC) и цитоплазме (CYT) клеток К-562 в условиях внешнего H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-индуцированного стресса. *a* — Гистограммы проточной цитометрии, отражающие распределение клеток по интенсивности радиометрического сигнала HyPer ratio в базальных условиях и спустя 10 мин после добавления 20 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> к клеткам, экспрессирующим CYT- или NUC-вариант HyPer; *b* — радиометрический сигнал HyPer ratio спустя 10 мин после добавления H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в различных концентрациях к клеткам, экспрессирующим CYT- или NUC-вариант HyPer.  $\text{HyPer ratio} = I_{488} \times 100 / I_{405}$ .

в нормальных физиологических условиях (Zenin et al., 2022). Добавление экзогенной H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> как в не цитотоксических, так и в цитотоксических концентрациях, приводило через 10 мин к дозозависимому увеличению HyPer ratio в обоих внутриклеточных компартментах (рис. 2*a, б*), что свидетельствовало о повышении уровня H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, однако разницы в радиометрических сигналах биосенсора в ядре и цитоплазме клеток, обработанных пероксидом, не наблюдали.

На следующем этапе работы были проведены кинетические эксперименты. Их цель — построить кинетические кривые (графики, отражающие долю восстановленного HyPer в клеточном ядре или цитоплазме в зависимости от времени, прошедшего после добавления к клеткам H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) и далее из анализа этих кривых определить концентрацию H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, установившуюся в ядре или цитоплазме после индукции стресса, а также

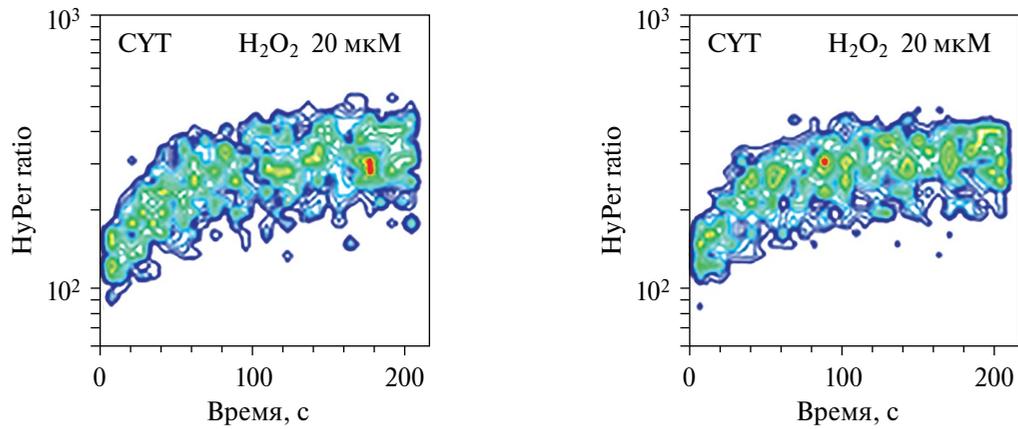
константу скорости реакции восстановления HyPer. В клетках, экспрессирующих биосенсор в цитоплазме или ядре, этот параметр характеризует T<sub>1/2</sub>-зависимую дисульфидредуктазную активность этих компартментов (Zhuravlev et al., 2024).

Для получения кинетических кривых непосредственно после добавления H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в ростовую среду клеток измеряли флуоресцентные сигналы HyPer в течение 10 мин ( $I_{488}$ ,  $I_{405}$  и HyPer ratio). Наблюдали постепенное увеличение сигнала  $I_{488}$  и уменьшение  $I_{405}$ , что свидетельствовало о постепенном окислении биосенсора, соответственно, радиометрический сигнал HyPer ratio также увеличивался (рис. 3*a*). После калибровки сигналов с использованием насыщающих концентраций DTT и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, приводящих соответственно к полному восстановлению и окислению биосенсора, для каждой проанализированной клетки вычисляли долю окисленного/восстановленного биосенсора (уравнение (1) в разд. «Материал и методика»). В результате были получены кинетические кривые, отражающие зависимость от времени доли восстановленного HyPer в клеточном ядре или цитоплазме (рис. 3*б*).

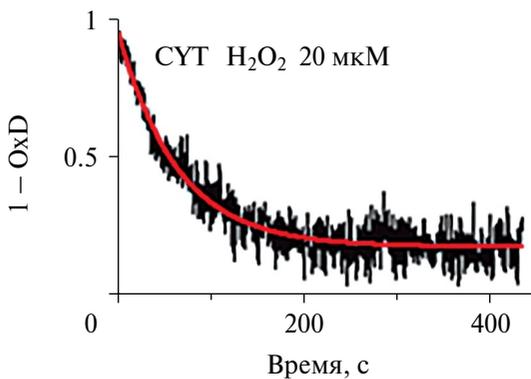
При проведении повторяющихся независимых экспериментов мы заметили, что кинетические кривые, измеренные при одной и той же окислительной нагрузке, но в разные дни после посева клеток, могли отличаться, как в случае экспрессии HyPer в ядре, так и в случае цитоплазматической версии биосенсора, однако кинетика окисления HyPer в ядре и цитоплазме клеток, измеренная одновременно в параллельных экспериментах, всегда оказывалась схожей (рис. 3*б*).

После получения кинетических кривых, с использованием алгоритма, описанного в разделе «Материалы и методика», были определены относительные значения концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в ядре и цитоплазме клеток, а также константы скорости реакции восстановления HyPer в этих компартментах. Оба параметра, определенные в параллельных экспериментах, оказались близкими для клеток, экспрессирующих HyPer в ядре и цитоплазме, что указывало на схожую антиоксидантную активность в этих компартментах при индукции внешнего окислительного стресса (рис. 3*в*).

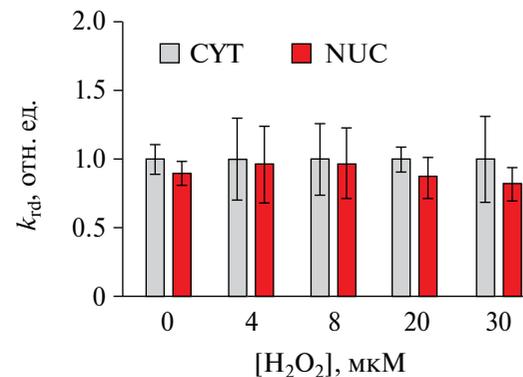
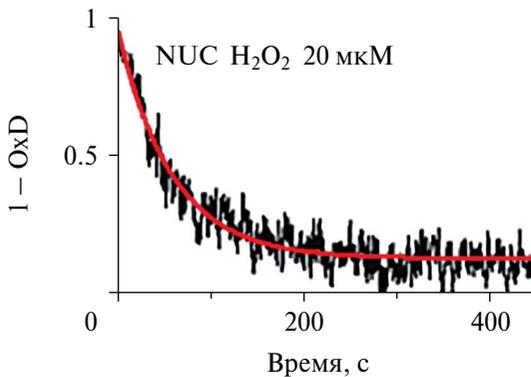
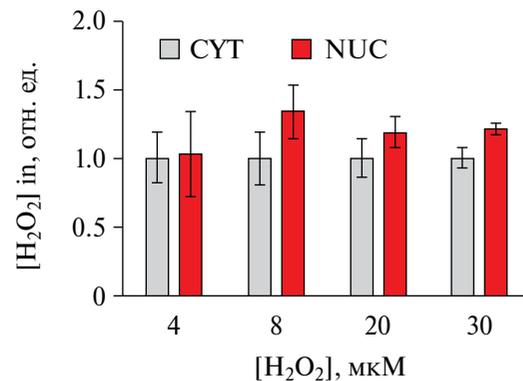
а



б



в



**Рис. 3.** Кинетика окисления NuPer в ядре (NUC) и цитоплазме (CYT) клеток К-562 в условиях внешнего  $\text{H}_2\text{O}_2$ -индуцированного стресса. а — Гистограммы проточной цитометрии, отражающие изменение интенсивности радиометрического сигнала NuPer ratio в зависимости от времени, прошедшего после добавления 20 мкМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  к клеткам, экспрессирующим CYT- или NUC-вариант NuPer. б — Доля восстановленного NuPer в CYT и NUC клеток в зависимости от времени, прошедшего после добавления 20 мкМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  в клеточную суспензию (черная кривая), а также аппроксимация (красная кривая) экспериментальных данных уравнением (2) (см. разд. «Материалы и методика»). в — CYT- и NUC-концентрация  $\text{H}_2\text{O}_2$  (верхняя панель), а также константа  $k_{\text{rd}}$  скорости реакции Tgх-зависимого восстановления NuPer (нижняя панель) в CYT и NUC клеток в условиях  $\text{H}_2\text{O}_2$ -индуцированного стресса разной интенсивности. Данные нормированы на значения, полученные для клеток, экспрессирующих NuPer в цитоплазме. *Обозначения:* (1 — OxD) — доля восстановленного NuPer в клеточном ядре или цитоплазме;  $\text{NuPer ratio} = I_{488} \times 100 / I_{405}$ ;  $[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{in}}$  — концентрация  $\text{H}_2\text{O}_2$  внутри компартмента.

## ОБСУЖДЕНИЕ

В нашем исследовании для сравнения эффективности систем антиоксидантной защиты в ядре и цитоплазме клеток К-562 в условиях токсичного и нетоксичного внешнего  $H_2O_2$ -индуцированного стресса, мы использовали разработанный недавно (Lyublinskaya, Antunes, 2019; Zenin et al., 2022) метод характеристики антиоксидантной активности клеток, основанный на использовании генетически кодируемого биосенсора *HuPer*. Основа этого метода — анализ кинетики окисления *HuPer* при повышении внутриклеточного содержания  $H_2O_2$  после добавления к клеткам экзогенной перекиси.

Известно, что после увеличения внеклеточной концентрации пероксида, внутриклеточная концентрация  $H_2O_2$  устанавливается очень быстро, спустя несколько миллисекунд (Lim et al., 2016), однако окисление тиол-содержащих белков, включая *HuPer*, — более медленный процесс. Кинетику окисления биосенсора можно наблюдать в течение 10—15 мин после добавления  $H_2O_2$  к клеткам, и зависит она, прежде всего, от концентрации  $H_2O_2$  в том компартменте, где локализован биосенсор. Соответственно, анализ кинетики окисления *HuPer* дает возможность определить уровень  $H_2O_2$ , устанавливающийся в сайтах локализации биосенсора после индукции окислительного стресса (Zenin et al., 2022). Именно в этом и заключалась первая задача нашей работы: анализируя кинетику окисления *HuPer*, сравнить концентрации  $H_2O_2$ , установившиеся в условиях внешнего окислительного стресса в ядре и цитоплазме клеток К-562.

Согласно существующим представлениям, при повышении окислительной нагрузки на клетку концентрация  $H_2O_2$  в различных клеточных компартментах может отличаться от цитоплазматической, поскольку зависит и от скорости транспортировки  $H_2O_2$  через внутриклеточные мембраны, и от пероксидазной активности в компартменте (Sies, 2021). Более того, последние данные показывают, что в условиях внутреннего окислительного стресса, индуцированного внутриклеточными источниками  $H_2O_2$ , даже концентрация пероксида в разных областях цитоплазмы может отличаться, уменьшаясь по мере удаления от источника стресса (Mishina et al., 2019).

В отношении ядерного компартмента известно, что редокс-состояние ядра существенно отличается от цитоплазматического, по крайней мере

в условиях физиологической нормы. В ядре поддерживается окислительно-восстановительный баланс, необходимый для регуляции активности транскрипционных факторов, ДНК-связывающие области которых часто содержат редокс-зависимые домены, так называемые цинковые пальцы (Go, Jones, 2008). Однако в наших экспериментах, в условиях внешнего  $H_2O_2$ -индуцированного стресса, не было обнаружено различий между цитоплазматическим и ядерным уровнем  $H_2O_2$ . Это наблюдение может означать, что скорость проникновения  $H_2O_2$  из цитоплазмы в ядро клетки значительно превышает скорость элиминации пероксида в ядерном компартменте (Marinho et al., 2013). По всей видимости, клеточное ядро не является сайтом активной элиминации  $H_2O_2$ , и/или ядерная мембрана не является серьезным барьером для  $H_2O_2$ . Вкупе или по отдельности эти обстоятельства могут приводить к выравниванию внутриядерной и цитоплазматической концентрации пероксида, которое наблюдалось в наших экспериментах с клетками К-562.

Помимо уровня  $H_2O_2$  внутри компартмента кинетика окисления *HuPer* после индукции окислительного стресса в клетках зависит от активности ферментативных систем тиол-дисульфидного обмена, восстанавливающих биосенсор (Lyublinskaya, Antunes, 2019). При локализации *HuPer* в цитоплазме или ядре клеток основным партнером, восстанавливающим биосенсор, является *Tx*. Соответственно, определяя из кинетических экспериментов константу скорости реакции восстановления *HuPer*, можно охарактеризовать *Tx*-зависимую дисульфидредуктазную активность в сайтах локализации биосенсора (Zhuravlev et al., 2024). В результате проведенных кинетических экспериментов нам удалось сравнить константы скорости реакции восстановления *HuPer* в ядре и цитоплазме клеток К-562, которые оказались очень близкими по своим значениям в условиях внешней окислительной нагрузки на клетки. Таким образом, проведенные исследования обнаружили схожую *Tx*-зависимую дисульфидредуктазную активность в ядре и цитоплазме клеток К-562.

Суммируя полученные результаты, мы заключаем, что при индукции внешнего окислительного стресса ядерный аппарат клеток К-562 защищён от избыточного накопления  $H_2O_2$  не более, чем цитоплазматические структуры. Внутриядерная концентрация  $H_2O_2$  близка к цитоплазматической. *Tx*-зависимая дисульфидредуктазная активность

в ядре и цитоплазме также сравнимы — по крайней мере в течение первых 10 мин после индукции стресса.

В целом вывод из этой работы таков: активная детоксификация  $H_2O_2$  в цитоплазматическом компартменте вносит основной вклад в экранирование клеточного ядра от повреждающего действия  $H_2O_2$  при резком повышении окислительной нагрузки на клетки. Насколько можно распространить этот вывод на клетки других фенотипов и на клетки других организмов, покажут будущие эксперименты.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают признательность д-ру Фернандо Антунесу (Dr. Fernando Antunes, Лиссабонский университет, Португалия) за разработку алгоритма для количественного определения внутриклеточной концентрации перекиси водорода с помощью HyPer. Эксперименты проводили с использованием оборудования центра коллективного пользования «Коллекция культур клеток позвоночных» (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия), а также объекта инфраструктуры «Центр клеточных технологий ИНЦ РАН» (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия).

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-74-20178-П).

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В работе не участвовали люди или животные в качестве объектов исследования.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

*Antunes F., Cadenas E.* 2000. Estimation of  $H_2O_2$  gradients across biomembranes. *FEBS Lett.* V. 475. P. 121. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(00\)01638-0](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(00)01638-0)

*Belousov V. V., Fradkov A. F., Lukyanov K. A., Staroverov D. B., Shakhbazov K. S., Terskikh A. V., Lukyanov S. A.* 2006. Genetically encoded fluorescent indi-

cator for intracellular hydrogen peroxide. *Nat. Methods.* V. 3. P. 281. <https://doi.org/10.1038/nmeth866>

*Bilan D. S., Belousov V. V.* 2016. HyPer family probes: state of the art. *Antiox. Redox Signal.* V. 24. P. 731. <https://doi.org/10.1089/ars.2015.6586>

*Bilan D. S., Pase L., Joosen L., Gorokhovatsky A. Y., Ermakova Y. G., Gadella T. W., Grabher C., Schultz C., Lukyanov S., Belousov V. V.* 2013. HyPer-3: a genetically encoded  $H_2O_2$  probe with improved performance for ratiometric and fluorescence lifetime imaging. *ACS Chem. Biol.* V. 8. P. 535. <https://doi.org/10.1021/cb300625g>

*Brito P. M., Antunes F.* 2014. Estimation of kinetic parameters related to biochemical interactions between hydrogen peroxide and signal transduction proteins. *Front. Chem.* V. 2. Art. ID: 82. <https://doi.org/10.3389/fchem.2014.00082>

*Go Y. M., Jones D. P.* 2008. Redox compartmentalization in eukaryotic cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 2008. V. 1780. P. 1273. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2008.01.011>

*Huang B. K., Sikes H. D.* 2014. Quantifying intracellular hydrogen peroxide perturbations in terms of concentration. *Redox Biol.* V. 2. P. 955. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.08.001>

*Lim J., Langford T., Huang B., Deen W., Sikes H.* 2016. A reaction-diffusion model of cytosolic hydrogen peroxide. *Free Rad. Biol. Med.* V. 90. P. 85. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.11.005>

*Lyublinskaya O. G., Antonov S. A., Gorokhovtsev S. G., Pugovkina N. A., Kornienko J. S., Ivanova J. S., Shatrova A. N., Aksenov N. D., Zenin V. V., Nikolsky N. N.* 2018. Flow cytometric HyPer-based assay for hydrogen peroxide. *Free Rad. Biol. Med.* V. 128. P. 40. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.05.091>

*Lyublinskaya O., Antunes F.* 2019. Measuring intracellular concentration of hydrogen peroxide with the use of genetically encoded  $H_2O_2$  biosensor HyPer. *Redox Biol.* V. 24. Art. ID: 101200. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101200>

*Marinho H. S., Cyrne L., Cadenas E., Antunes F.* 2013. The cellular steady-state of  $H_2O_2$ : latency concepts and gradients. *Methods Enzymol.* Vol. 527. P. 3. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405882-8.00001-5>

*Meyer A. J., Dick T. P.* 2010. Fluorescent protein-based redox probes. *Antiox. Redox Signal.* V. 13. P. 621. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2948>

*Mishina N., Bogdanova Y., Ermakova Y., Panova A., Kotova D., Bilan D., Steinhorn B., Arnér E., Michel T., Belousov V.* 2019. Which antioxidant system shapes intracellular  $H_2O_2$  gradients? *Antiox. Redox Signal.* V. 31. P. 664. <https://doi.org/10.1089/ars.2018.7697>

- Pole A., Manjari D., Goberdhan P. D.* 2016. Oxidative stress, cellular senescence and ageing. *AIMS Mol. Sci.* V. 3. Art. ID: 300.  
<https://doi.org/10.3934/molsci.2016.3.300>
- Sies H.* 2017. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: oxidative eustress. *Redox Biol.* V. 11 P. 613.  
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.035>
- Sies H.* 2021. Oxidative eustress: on constant alert for redox homeostasis. *Redox Biol.* V. 41. Art. ID: 101867.  
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.101867>
- Sies H., Berndt C., Jones D. P.* 2017. Oxidative stress. *Annu. Rev. Biochem.* V. 86. P. 715.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045037>
- Zenin V., Ivanova J., Pugovkina N., Shatrova A., Aksenov N., Tyuryaeva I., Kirpichnikova K., Kuneev I., Zhuravlev A., Osyayeva E., Lyublinskaya E., Gazizova I., Guriev N., Lyublinskaya O.* 2022. Resistance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in human cells of different phenotypes. *Redox Biol.* V. 50. Art. ID: 102245.  
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2022.102245>
- Zhuravlev A., Ezeriņa D., Ivanova J., Guriev N., Pugovkina N., Shatrova A., Aksenov N., Messens J., Lyublinskaya O.* 2024. HyPer as a tool to determine the reductive activity in cellular compartments. *Redox Biol.* V. 70. Art. ID: 103058.  
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2024.103058>

## H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> LEVEL IN THE NUCLEUS AND CYTOPLASM OF K-562 CELLS UNDER CONDITIONS OF EXTERNAL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-INDUCED OXIDATIVE STRESS

N. A. Guriev, Ju. S. Ivanova, O. G. Lyublinskaya\*

*Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194064, Russia*

\* e-mail: o.lyublinskaya@mail.ru

**Objective:** Disturbance of redox homeostasis in cells induced by excessive accumulation of extracellular hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) is a stressful situation that cells in the human body may encounter during the development of various pathologies, as well as under the influence of external adverse factors (tobacco smoke, xenobiotics, radiation). It is known that under stress conditions, the intracellular concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is significantly lower than the extracellular concentration, due to the activity of peroxidases localized in various cell compartments. In this study, we aimed to determine to what extent the cellular antioxidant defense systems are able to prevent excessive accumulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the nuclear compartment under conditions of external H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced stress of various intensity. **Methods:** The studies were performed using K-562 cell lines expressing HyPer, a genetically encoded H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> biosensor, in the nucleus or cytoplasm. The kinetics of HyPer oxidation in the cell nucleus or cytoplasm were assessed using flow cytometry. Analysis performed allowed us to compare the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> level established in the cell nucleus and cytoplasm 10 minutes after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> addition to cells. The disulfide reductase activity of the thioredoxin-dependent enzymatic system of the nucleus and cytoplasm was compared as well. **Results:** The data indicate that under conditions of external, toxic and non-toxic, oxidative stress, the nuclear concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in K-562 cells increases and is close to the cytoplasmic one. The thioredoxin-dependent disulfide reductase activity in the nucleus and cytoplasm also turned out to be comparable. Overall, we came to **the conclusion** that in case of abrupt increase in extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration, the nuclear apparatus of K-562 cells is protected from excessive accumulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no more than the cytoplasmic structures.

**Keywords:** hydrogen peroxide, antioxidant defense, peroxidase activity, disulfide reductase activity, cytoplasm, nucleus, genetically encoded biosensor, HyPer