

процесс, протекающий в течение нескольких минут. Соответственно, кинетика окисления HyPer в течение первых 10–15 мин после индукции стресса отражает не скорость транспорта пероксида, а установившуюся внутриклеточную концентрацию  $H_2O_2$  и функциональную активность ферментативных систем, восстанавливающих биосенсор.

Использование HyPer позволило нам одновременно количественно оценить два основных параметра: цитоплазматическую концентрацию  $H_2O_2$ , устанавливающуюся после добавления к клеткам K-562 экзогенной перекиси, и константу скорости восстановления HyPer. Такой подход дал возможность в едином экспериментальном формате оценить эффективность пероксидазной активности и Trx-зависимую дисульфидредуктазную активность, а также проследить, как эти параметры изменяются при подавлении Trx. Наши данные показали, что при слабом внешнем  $H_2O_2$ -индуцированном стрессе клетки K-562 с нокдауном *TXN1* накапливали существенно больше  $H_2O_2$ , чем контрольные клетки. При этом, по мере увеличения внешней концентрации перекиси разница между установившимися концентрациями внутриклеточной  $H_2O_2$  в обработанных siRNA и контрольных клетках уменьшалась, и при интенсивном стрессе уровни  $H_2O_2$  в клетках с нормальной и пониженной активностью Trx оказались практически одинаковыми. Эти результаты указывают на то, что при слабых внешних окислительных нагрузках Trx играет важную роль в поддержании низкого внутриклеточного содержания перекиси, тогда как при интенсивном окислительном стрессе его вклад практически исчезает.

В условиях нокдауна Trx мы также наблюдали устойчивое снижение константы восстановления HyPer — вне зависимости от интенсивности стресса. Это подтверждает, что цитоплазматический HyPer, аналогично Prx, восстанавливается преимущественно с участием системы Trx/TrxR, и альтернативные пути восстановления не могут полностью скомпенсировать дефицит Trx. Снижение активности Trx приводит к однозначному падению дисульфидредуктазной емкости клетки независимо от уровня внешней  $H_2O_2$ , указывая на прямую зависимость процесса

восстановления белковых дисульфидов от наличия Trx. В частности, Prx часто называют тиоредоксин-пероксидазами именно потому, что их окисленные дисульфидные формы эффективно восстанавливаются только при помощи Trx.

Полученные нами данные хорошо согласуются с ранее предложенной моделью утилизации перекиси (Tomalin et al., 2016), которая позволяет объяснить, почему при интенсивном  $H_2O_2$ -индуцированном окислительном стрессе исчезают различия в эффективности антиоксидантной защиты между клетками с нормальной экспрессией и с нокдауном *TXN1*. Согласно упомянутой модели, проиллюстрированной с помощью дрожжевых клеток (Tomalin et al., 2016), основную роль при слабом окислительном стрессе играет весь тиол-содержащий Trx-зависимый протеом клетки, который функционирует как буферный тиоловый «резервуар». В этих условиях многочисленные белковые тиолы, восстанавливаемые Trx, способны эффективно «перехватывать» и связывать  $H_2O_2$  за счет массового образования дисульфидных связей. Prx, по всей видимости, являются лишь частью этого буферного белкового пула. Trx-зависимая система поддерживает этот пул в восстановленном состоянии, обеспечивая высокую пероксидазную емкость цитозоля в условиях слабого окислительного стресса. По мере увеличения интенсивности окислительного стресса этот редокс-активный пул белков постепенно окисляется и истощается, и Trx-зависимая дисульфидредуктазная активность перестает играть основную роль. В условиях интенсивного стресса может увеличиваться значение GSH/GR системы, что объясняет выравнивание уровней  $H_2O_2$  в клетках с нормальной и сниженной активностью Trx.

Таким образом, наши результаты указывают, что Trx, являясь частью системы Trx/TrxR, обеспечивает первичную линию антиоксидантной защиты цитоплазмы клеток K-562 при слабом  $H_2O_2$ -индуцированном стрессе. При высоких внешних концентрациях перекиси ее вклад ослабевает вследствие истощения восстановленного редокс-активного пула белков.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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)
2. Belousov V., Fradkov A., Lukyanov K., Staroverov D., Shakhbazov K., Tersikh A. V., Lukyanov S. 2006. Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide. Nat. Methods. V. 3. P. 281. <https://doi.org/10.1038/nmeth866>
3. Bienert G., Chaumont F. 2013. Aquaporin-facilitated transmembrane diffusion of hydrogen peroxide. Biochim. Biophys. Acta. V. 1840. P. 1596. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.09.017>
4. Bilan D., Belousov V. 2016. HyPer family probes: state of the art. Antioxid. Redox Signal. V. 24. P. 731. <https://doi.org/10.1089/ars.2015.6586>
5. Bilan D., Pase L., Joosen L., Gorokhovatsky A., Ermakova Y., Gadella T., Grabher C., Schultz C., Lukyanov S., Belousov 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>

6. *Brigelius-Floe R., Maiorino M.* 2012. Glutathione peroxidases. *Biochim. Biophys. Acta.* V. 1830. P. 3289.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.11.020>
7. *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>
8. *Kalinina E. V., Chernov N. N., Saprin A. N.* 2008. Participation of thio-, peroxi-, and glutaredoxins in cellular redox-dependent processes. *Biochemistry (Moscow).* V. 73. No. 13. P. 1493–1510.  
<https://doi.org/10.1134/S0006297908130099>
9. *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>
10. *Lu J., Holmgren A.* 2014. The thioredoxin antioxidant system. *Free Rad. Biol. Med.* V. 66. P. 75.  
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.036>
11. *Meyer A., Dick T.* 2010. Fluorescent protein-based redox probes. *Antioxid. Redox Signal.* V. 13. P. 621.  
<https://doi.org/10.1089/ars.2009.2948>
12. *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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gradients? *Antioxid. Redox Signal.* V. 31. P. 664.  
<https://doi.org/10.1089/ars.2018.7697>
13. *Netto L., Antunes F.* 2016. The roles of peroxiredoxin and thioredoxin in hydrogen peroxide sensing and signal transduction. *Mol Cells.* 2016. V. 39 P. 65.  
<https://doi.org/10.14348/molcells.2016.2349>
14. *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>
15. *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>
16. *Tomalin L. et al.* 2016. Increasing extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produces a bi-phasic response in intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, with peroxiredoxin hyperoxidation only triggered once the cellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-buffering capacity is overwhelmed. *Free Rad. Biol. Med.* V. 95. P. 333.  
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiom.333-486.02.035>
17. *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>
18. *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>