УДК 576.08:57.033:57.037
DOI: 10.7868/S3034606126020054

РОЛЬ ТИОРЕДОКСИНА В ОБЕСПЕЧЕНИИ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ КЛЕТОК K-562 В УСЛОВИЯХ ВНЕШНЕГО H_2O_2-ИНДУЦИРОВАННОГО ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА

Н. А. Гурьев*, Ю. С. Иванова, О. Г. Люблинская

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064, Российская Федерация

** E-mail: guriev.nik.and@gmail.com*

Аннотация. **Обоснование и цель.** Избыточное накопление перекиси водорода во внеклеточном пространстве, возникающее под действием внешних неблагоприятных факторов, индуцирует в клетке окислительный стресс. В клетке H_2O_2 утилизируется тиол-содержащими пероксидазами: пероксиредоксинами и глутатионпероксидазами, работоспособность которых поддерживается благодаря дисульфидредуктазной активности тиоредоксин-зависимого (Trx/TrxR) и глутатион-зависимого ферментативного пути. Цель настоящей работы — определить вклад дисульфидредуктазы Trx в обеспечение антиоксидантной защиты клеток при воздействии внешнего H_2O_2-индуцированного окислительного стресса разной интенсивности. **Материал и методика.** Использовали линию клеток K-562, экспрессирующих в цитоплазме HyPer — генетически кодируемый биосенсор H_2O_2. Уровень Trx снижали с помощью siRNA-опосредованного нокдауна гена *TXN1*. **Результаты.** Проведенный анализ продемонстрировал, что пероксидазная активность в клетках с нормальной экспрессией выше, чем в клетках со нокдауном *TXN1* только при слабых окислительных нагрузках, при этом дисульфидредуктазная активность выше в клетках контрольной группы при всех испытанных окислительных нагрузках. **Вывод.** Тиоредоксин опосредует высокоэффективную антиоксидантную защиту в цитоплазме клеток только в условиях слабого внешнего окислительного стресса.

Ключевые слова: перекись водорода, Trx-зависимый ферментативный путь, антиоксидантная защита, пероксидазная активность, генетически кодируемые биосенсоры, HyPer

Принятые сокращения: GPx — глутатионпероксидаза, Prx — пероксиредоксин, Trx и Trx1 — соответственно тиоредоксин и его цитоплазматическая форма, TrxR — тиоредоксинредуктаза.

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

Соблюдение этических стандартов. В экспериментах животные и люди не участвовали.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности. Авторы благодарны ЦКП (Коллекция культур клеток позвоночных, Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия), а также объекту инфраструктуры «Центр клеточных технологий ИНЦ РАН» (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия), оборудование которых было использовано в работе.

Ссылка для цитирования. Гурьев Н. А., Иванова Ю. С., Люблинская О. Г. Роль тиоредоксина в обеспечении антиоксидантной защиты клеток K-562 в условиях внешнего H_2O_2-индуцированного окислительного стресса. *Цитология / Cell and Tissue Biology*. 2026. Т. 68. № 2. С. 157—166. https://doi.org/10.7868/S3034606126020054

Поступила в редакцию 02.12.2025
После доработки 09.12.2025
Принята к публикации 10.12.2025

© Гурьев Н. А., Иванова Ю. С., Люблинская О. Г., 2026

ЦИТОЛОГИЯ / CELL AND TISSUE BIOLOGY, 2026, том 68, № 2, с. 157—166

DOI: 10.7868/S3034606126020054

The Role of Thioredoxin in Antioxidant Defense of K-562 Cells Under Exogenous H_2O_2-Induced Oxidative Stress

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

Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194064, Russian Federation

** E-mail: guriev.nik.and@gmail.com*

Abstract. **Objective:** Excessive accumulation of hydrogen peroxide in the extracellular space, arising under adverse external conditions, induces oxidative stress in cells. Intracellular H_2O_2 is detoxified by thiol-containing peroxidases — peroxiredoxins and glutathione peroxidases — whose activity is sustained by the disulfide reductase function of the thioredoxin-dependent (Trx/TrxR) and glutathione-dependent enzymatic pathways. The aim of this study was to determine the contribution of the disulfide reductase Trx to antioxidant defense in cells exposed to exogenous H_2O_2-induced oxidative stress of varying intensity. **Material and methods:** The K-562 cell line expressing the genetically encoded H_2O_2 biosensor HyPer in the cytoplasm was used. Trx levels were reduced by siRNA-mediated knockdown of the *TXN1* gene**. Results:** The analysis demonstrated that peroxidase activity in cells with normal Trx expression was higher than in *TXN1* knockdown cells only under mild oxidative stress, whereas disulfide reductase activity was higher in control cells under all tested oxidative stress conditions. **Conclusions:** Thioredoxin mediates highly efficient antioxidant protection in the cytoplasm only under conditions of mild external oxidative stress.

Keywords: hydrogen peroxide, Trx-dependent enzymatic pathway, antioxidant defense, peroxidase activity, genetically encoded biosensors, HyPer

Funding. This work was supported by the Russian Scientific Foundation (project ID: no. 21-74-20178-П).

Ethics approval and consent to participate. This work does not contain any studies involving human and animal subjects.

Conflict of interests. The authors of this work declare that they have no conflicts of interest.

For citation: Guriev N. A., Ivanova Ju.S., Lyublinskaya O. G. The role of thioredoxin in antioxidant defense of K-562 cells under exogenous H_2O_2-induced oxidative stress. *Tsitologiya / Cell and Tissue Biology*. 2026. Vol. 68. No. 2. P. 157—166. https://doi.org/10.7868/S3034606126020054

Received December 2, 2025
Revised December 9, 2025
Accepted December 10, 2025

© Guriev N. A., Ivanova Ju. S., Lyublinskaya O. G., 2026

Перекись водорода (H_2O_2) относится к семейству активных форм кислорода (АФК), которые образуются в клетках человека как побочный продукт множества аэробных реакций, а также благодаря активности специализированных ферментов — NADPH-оксидаз. H_2O_2 обладает наибольшим временем жизни в сравнении с другими разновидностями АФК и, соответственно, считается наиболее физиологически значимым представителем этого семейства (Sies et al., 2017). Благодаря нейтральности и небольшой полярности H_2O_2 свободно диффундирует через мембраны, в том числе по специальным каналам — пероксипоринам (изоформам аквапоринов) (Bienert, Chaumont, 2013). Повышение концентрации H_2O_2 в клетках и тканях организма сопровождает хроническое воспаление и способствует канцерогенезу. Под воздействием внешних стрессовых факторов (химиотерапевтических препаратов, ионизирующего излучения, табачного дыма) уровень внеклеточной H_2O_2 возрастает, создавая избыточную окислительную нагрузку на клетки и вызывая окислительный стресс (Sies, 2021). Несмотря на свободную диффузию, внутриклеточная концентрация H_2O_2 обычно существенно ниже внеклеточной за счет ограниченной скорости транспорта пероксида через плазматическую мембрану и эффективной его нейтрализации пероксидазами (Antunes, Cadenas, 2000). Иными словами, антиоксидантная система клетки активно препятствует накоплению H_2O_2 внутри клетки и смягчает ее потенциально повреждающее действие.

Антиоксидантная система клетки включает в себя различные ферментативные и не ферментативные компоненты, которые совместно обеспечивают поддержание редокс-гомеостаза клетки и защиту клеточных биомолекул от окислительного повреждения. К не ферментативным компонентам относятся низкомолекулярные антиоксиданты, такие как восстановленный глутатион, аскорбат, токоферолы и каротиноиды. К ферментативным компонентам антиоксидантной системы клетки относятся супероксиддисмутазы, катализирующие дисмутацию супероксидного анион-радикала до H_2O_2; каталаза, разлагающая перекись водорода до воды и кислорода, а также два критически важных для клетки тиол-дисульфидных ферментативных пути: тиоредоксин- и глутатион-зависимый, которые используют NADPH в качестве источника восстановительного эквивалента (Kalinina et al., 2009).

Главную роль в ограничении уровня H_2O_2 играют специализированные антиоксидантные ферменты — пероксидазы. К ним относятся пероксиредоксины (Prx), глутатионпероксидазы (GPx) и каталаза, обладающие высокой реакционностью в отношении перекиси. В частности, пероксиредоксины присутствуют в клетке в большом количестве и обладают исключительной реакционной способностью по отношению к H_2O_2 (константы скорости реакции ~ 10^6—10^8 $M^{-1}\cdot c^{-1}$), благодаря чему «перехватывают» перекись прежде, чем она успевает окислить другие клеточные мишени (Netto, Antunes, 2016). При взаимодействии с H_2O_2 активный тиол Prx окисляется до сульфеновой кислоты, а затем образует дисульфидный мостик между двумя молекулами Prx, образующих димер. Для поддержания пероксидазной активности окисленный Prx необходимо вернуть в восстановленное состояние, и здесь в игру вступает система Trx/TrxR. Trx (тиоредоксин), небольшой тиол-содержащий белок, разрывает образовавшийся дисульфид, восстанавливая Prx и одновременно окисляясь сам. Далее Trx восстанавливается тиоредоксинредуктазой (TrxR) за счет своего кофактора NADPH, что завершает цикл и позволяет Prx вновь нейтрализовать H_2O_2 (Netto, Antunes, 2016).

Таким образом, система Trx/TrxR функционально связана с Prx, постоянно восстанавливая фермент и поддерживая высокую эффективность антиоксидантной защиты клетки. Важно подчеркнуть, что Trx необходим не только для восстановления пероксидаз, поскольку определяет скорость восстановления и других тиол-содержащих белков клетки после их окисления перекисью (Lu, Holmgren, 2014). При окислительном стрессе избыток перекиси может приводить к окислению многочисленных сигнальных белков (факторов транскрипции, фосфатаз, киназ), и насколько быстро эти белки возвратятся в активное состояние, зависит, в том числе, от Trx-зависимой дисульфидредуктазной активности. Известно, что при окислительном стрессе, вызванном внутриклеточной генерацией H_2O_2 в различных компартментах, ключевой вклад в ее утилизацию вносит именно система Trx/TrxR (Mishina et al., 2019). В то же время какие антиоксидантные пути преимущественно определяют ответ клетки при стрессе, индуцированном внешней H_2O_2, и зависит ли этот вклад от окислительной нагрузки, остается неясно. Именно эти вопросы и стали предметом наших исследований.

Корректная количественная оценка эффективности антиоксидантной защиты клеток является сложной методической задачей. Традиционные подходы, такие как измерение интегрального окислительно-восстановительного статуса (соотношения восстановленных и окисленных форм глутатиона, NADPH/$NADP^+$ и др.) или определение уровня АФК с помощью неспецифических флуоресцентных красителей (например, H2DCF-DA), лишь косвенно отражают клеточный ответ на окислительный стресс и не позволяют надежно отслеживать динамику редокс-процессов. Так, широко применяемый краситель H2DCF-DA в клетке окисляется комплексно различными окислителями и фактически отражает суммарные изменения окислительного статуса, а не прямое содержание H_2O_2. Практически единственный способ напрямую оценить эффективную пероксидазную «мощность» клетки — определить внутриклеточную концентрацию H_2O_2, которая устанавливается в различных компартментах клеток при окислительном стрессе. Однако прямое измерение уровня H_2O_2 в живых клетках долгое время было затруднено из-за высокой реакционной способности перекиси и ограничений большинства химических индикаторов.

В этом контексте генетически кодируемые биосенсоры предоставляют принципиальное преимущество: они позволяют регистрировать изменения окислительного статуса в реальном времени в живых клетках и, при необходимости, в заданных компартментах. Одним из самых распространенных сенсоров H_2O_2 является генетически кодируемый биосенсор HyPer, состоящий из пермутированного желтого флуоресцентного белка (YFP), сшитого с регуляторным доменом бактериального транскрипционного фактора OxyR — природного сенсора перекиси водорода (Belousov et al., 2006). При окислении пероксидом в структуре HyPer образуется дисульфид, вызывающий обратимые изменения спектральных характеристик биосенсора. Впоследствии этот дисульфид восстанавливается дисульфидредуктазной системой клетки, и HyPer снова может окисляться. Благодаря своему строению, HyPer обладает высокой чувствительностью и специфичностью к H_2O_2, что позволяет отслеживать колебания ее уровня внутри клетки. Используя эти свойства HyPer, недавно нами был разработан метод количественного определения внутриклеточной концентрации H_2O_2 в клетках, находящихся в условиях H_2O_2-индуцированного стресса (Zenin et al., 2022).

Разработанный метод основан на анализе кинетики окисления HyPer в живых клетках после индукции стресса. Такой кинетический подход позволяет в рамках одного эксперимента одновременно получить два взаимодополняющих параметра, количественно описывающих эффективность антиоксидантной системы клеток. С одной стороны, метод позволяет определить установившуюся внутриклеточную концентрацию H_2O_2, измеряя константу скорости реакции окисления биосенсора, а с другой — одновременно оценить функциональную активность дисульфидредуктазных систем клетки, измеряя константу восстановления HyPer. Недавно мы доказали, что в цитоплазме клеток восстановление HyPer опосредуется преимущественно тиоредоксином, следовательно, константа восстановления сенсора определяется активностью системы Trx/TrxR и выступает количественным показателем Trx-зависимой дисульфидредуктазной активности (Zhuravlev et al., 2024).

Разработанный нами протокол (Zenin et al., 2022) подразумевает измерение кинетических кривых при помощи проточной цитометрии, а вычисление внутриклеточных концентраций H_2O_2 и константы восстановления HyPer требует применения уравнений химической кинетики, выведенных для описания H_2O_2-индуцированного окисления внутриклеточных белков (Brito, Antunes, 2014).

В настоящей работе мы применили разработанную нами методику, чтобы оценить вклад одного из центральных участников антиоксидантной системы — тиоредоксина — в обеспечение антиоксидантной защиты клеток K-562 при разных окислительных нагрузках на клетки. Для этого мы определили и сравнили установившиеся внутриклеточные концентрации H_2O_2 в норме и после siRNA-опосредованного нокдауна *TXN1* (ген, кодирующий цитоплазматическую версию тиоредоксина) в условиях внешнего H_2O_2-индуцированного окислительного стресса разной интенсивности. Окислительные нагрузки в диапазоне внеклеточных концентраций перекиси 2.5—8 мкМ считали слабым окислительным стрессом, 20 мкМ — интенсивным окислительным стрессом.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клеточные культуры. Клетки эритробластоидной лейкемии человека K-562 (Коллекция культур клеток позвоночных, Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия) были ранее трансдуцированы лентивирусными векторами («Евроген», Москва, Россия), кодирующими цитоплазматический вариант HyPer (Zenin et al., 2022). Клетки культивировали в среде RPMI, содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 1% L-глутамина и 1% смеси пенициллин-стрептомицин. Культуры поддерживали в стандартных ростовых условиях (37 °C, 5% CO_2) и пересевали дважды в неделю в соотношении 1:5 («Биолот», Россия).

Анализ жизнеспособности клеток. Клетки, обработанные siRNA, через 96 ч после трансфекции окрашивали йодистым пропидием (50 мг/мл) и дале анализировали с помощью проточной цитометрии (лазер 561 нм, CytoFLEX, Beckman Coulter, США).

Индукция окислительного стресса. Клетки высевали в 24-луночные планшеты за 72 ч до эксперимента (50 000 клеток на 1 лунку). За 3—5 ч до эксперимента клетки считали, ресуспендировали в свежей среде (30 000 клеток на 1 мл среды), аликвотировали в 24-лучный планшет по 1 мл суспензии на лунку и культивировали в CO_2-инкубаторе.

Для оценки эффективности систем антиоксидантной защиты клеток использовали кратковременное действие H_2O_2. Для этого 800 мкл клеточной суспензии переносили из планшета в пробирку для проточной цитометрии и добавляли H_2O_2 в конечной концентрации от 2.5 до 20 мкМ. Далее для мониторинга кинетики окисления HyPer немедленно анализировали флуоресцентные сигналы клеток с помощью проточного цитофлуориметра. В других экспериментах для оценки стационарного уровня окисления HyPer, устанавливающегося после индукции стресса, клеточную суспензию инкубировали с H_2O_2 в течение 10 мин в обычных ростовых условиях, после чего проводили проточно-цитометрический анализ.

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

Мониторинг кинетики окисления HyPer. Окисление HyPer в цитоплазме клеток наблюдали с помощью

проточного цитофлуориметра CytoFLEX (Beckman Coulter, США). Анализ длился 10—15 мин непосредственно после добавления к клеткам H_2O_2. В пробирку с клетками подавали теплую (37 ºС) смесь воздуха и CO_2 (5 %) для поддержания физиологических условий и pH в клеточной среде. Детектировали флуоресцентные сигналы I_{488} и I_{405}. Увеличение сигнала I_{488} отражало накопление окисленной формы биосенсора в ядре или цитоплазме клеток, а снижение сигнала I_{405} — убыль восстановленной формы. Детектировался также рациометрический сигнал $HyPer\ ratio = I_{488} \times 100 / I_{405}$.

Для получения кинетических кривых (графиков, отображающих долю восстановленного/окисленного биосенсора в зависимости от времени, прошедшего после добавления к клеткам H_2O_2), данные с проточного цитометра обрабатывали с использованием приложения Microsoft Excel. Долю окисленного биосенсора в цитоплазме каждой проанализированной клетки вычисляли по формуле (Meyer, Dick, 2010):

$$OxD = \frac{I_{488} \times I_{405\,DTT} - I_{488\,DTT} \times I_{405}}{I_{488} \times I_{405\,DTT} - I_{488} \times I_{405\,H2O2} + I_{488\,H_2O_2} \times I_{405} - I_{488\,DTT} \times I_{405}}, \quad (1)$$

где OxD — отношение количества окисленных молекул HyPer к его общему количеству в заданном компартменте, I_{488} и I_{405} — флуоресцентные сигналы HyPer, а I_{DTT} и $I_{H_2O_2}$ — сигналы HyPer, измеренные в клетках при добавлении высоких доз дитиотреитола (DTT, 30 мМ, 10 мин) и H_2O_2 (0.5 мМ, 5 мин), которые приводили соответственно к полному восстановлению и полному окислению HyPer. Флуоресцентные сигналы HyPer в клетках, обработанных высокими дозами DTT и перекиси, измеряли в экспериментах, проводимых параллельно с кинетическими. Обработку клеток проводили в стандартных ростовых условиях (37 °С и 5 % CO_2) в пробирках для проточной цитометрии непосредственно перед измерениями.

Определение цитоплазматической концентрации H_2O_2 и константы скорости реакции восстановления HyPer. Концентрацию H_2O_2 в цитоплазме клеток и константу реакции восстановления биосенсора в этом компартменте определяли, используя двухпараметровую аппроксимацию кинетических кривых следующим уравнением (Brito, Antunes, 2014):

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

В этом уравнении 1 − OxD — доля восстановленного биосенсора в заданном компартменте клетки в момент времени t, а k_{ox} и k_{rd} — константы псевдопервого порядка окисления и восстановления биосенсора соответственно. k_{rd} зависит от активности тиоредоксин-зависимой ферментативной системы Trx/TrxR, восстанавливающей HyPer в цитоплазме клеток (Zhuravlev et al., 2024). k_{ox} зависит от цитоплазматического уровня H_2O_2 и определяется следующим образом (Brito, Antunes, 2014):

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

где $[H_2O_2]_{in}$ — концентрация H_2O_2, усредненная по сайтам локализации сенсора, а $k_{HyPer + H_2O_2}$ — константа реакции второго порядка между HyPer и H_2O_2.

Двухпараметровая нелинейная аппроксимация кинетических кривых уравнением (2) с использованием метода наименьших квадратов позволяла определить k_{ox} и k_{rd}. Параметр k_{rd} рассматривали как количественный показатель, характеризующий дисульфидредуктазную активность системы Trx/TrxR в цитоплазме клеток. Параметр k_{ox} может быть использован для вычисления с помощью уравнения (3) цитоплазматического содержания H_2O_2 ($[H_2O_2]_{in}$). Но в настоящее время константа $k_{HyPer + H_2O_2}$ доподлинно неизвестна, и точно оценить $[H_2O_2]_{in}$, зная k_{ox} из уравнения (3) невозможно. Для примерных оценок можно использовать константу реакции второго порядка $k_{HyPer + H_2O_2} = 5 \times 10^5\ M^{-1}s^{-1}$, которая характерна для OxyR, природного бактериального сенсора H_2O_2, регуляторный домен которого является основой HyPer (Bilan et al., 2013). Однако в нашей работе мы использовали другой подход — оценивали $[H_2O_2]_{in}$ в цитоплазме клеток K-562 в относительных единицах, нормируя значениеk_{ox}, характерное для клеток с нокдауном Trx, на значение k_{ox}, характерное для клеток контрольной группы. При такой оценке мы сможем сравнить установившиеся концентрации H_2O_2 в условиях стресса, не зная точного значения $k_{HyPer + H_2O_2}$.

Индукция РНК-интерференции. Для siRNA-опосредованного нокдауна использовали смесь малых интерферирующих РНК против *TXN1* (Santa Cruz Biotechnology, Калифорния, США) в концентрации 40 нм. Клетки K-562 трансфицировали в 24-луночных планшетах в плотности 50 000 клеток на лунку с использованием липофектамина RNAiMAX (Invitrogen, Калифорния, США) в бессывороточной среде OPTI-MEM (Thermo Fisher Scientific, США). Спустя 72 ч после трансфекции оценивали эффективность нокдауна и проводили функциональные эксперименты.

Количественный ПЦР-анализ. Суммарную РНК выделяли с использованием набора для выделения RNA Solo («Евроген», Москва, Россия) в соответствии с протоколом производителя. Концентрацию РНК количественно определяли с использованием спектрофотометра NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies Inc, Уилмингтон, Делавэр, США). кДНК получали путем обратной транскрипции РНК с использованием набора для синтеза кДНК MMLV RT kit («Евроген», Москва, Россия) в соответствии с прилагаемой инструкцией. Амплификацию кДНК

проводили в объеме 20 мкл со специфическими праймерами, используя готовую смесь для кПЦР 5×qPCRmix-HS SYBR («Евроген», Москва, Россия) в системе реального времени BioRad CFX-96 (BioRad, Калифорния, США), при следующем температурном режиме: начальная денатурация при 95 °C в течение 5 мин; 40 циклов 95 °C — 20 с; 60 °C — 20 с; 72 °C — 30 с; финальная элонгация при 72 °C в течение 3 мин. Экспрессию генов рассчитывали по ΔΔCq с использованием программного обеспечения для анализа ПЦР в реальном времени (BioRad, Калифорния, США). Экспрессию генов-мишеней нормировали на экспрессию гена домашнего хозяйства *GAPDH*. Все реакции амплификации проводили в четырехкратной повторности.

Статистическая обработка результатов. Все эксперименты повторяли не менее трех раз. Данные представлены в виде средних значений и их стандартных отклонений. Статистическую значимость при парных сравнениях оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента, порог значимости определяли при $P < 0.05$. Проточно-цитометрические гистограммы и изображения клеток, полученные с помощью конфокальной микроскопии, представленные в статье, соответствуют наиболее репрезентативным экспериментам.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Мы использовали клетки эритробластоидной лейкемии K-562 как удобную модель суспензионных клеток человека, оптимальную для проточно-цитометрических измерений, на которых базировалась основная часть работы. В первую очередь, мы проверили эффективность siRNA-опосредованного нокдауна гена *TXN1*, кодирующего цитоплазматическую форму тиоредоксина (Trx1) при помощи количественной ПЦР, а также убедились, что процедура трансфекции не вызывает цитотоксического эффекта и каких-либо побочных транскрипционных изменений, включая компенсаторное увеличение экспрессии остальных генов, вовлеченных в Trx-зависимый антиоксидантный путь. Процедура трансфекции, включающая siRNA-опосредованный нокдаун *TXN1*, не вызывала гибели клеток через 96 ч после трансфекции (см. рис. 1*а*). Данные количественной ПЦР продемонстрировали снижение экспрессии *TXN1* на 80 %, и при этом мы не обнаружили влияния нокдауна *TXN1* на транскрипционную активность генов, кодирующих цитоплазматические изоформы остальных белков Trx-зависимого пути — Prx1, Prx2 и TrxR1 (гены *PRDX1*, *PRDX2* и *TXNRD1* соответственно) (рис. 1*б*).

Цель основного блока экспериментов заключалась в получении кинетических кривых, отражающих изменение во времени доли восстановленного HyPer в цитоплазме клеток после кратковременного воздействия H_2O_2, чтобы на основе анализа этих кривых количественно оценить два параметра — установившуюся внутриклеточную концентрацию H_2O_2 и константу скорости восстановления HyPer. Последний параметр при цитоплазматической локализации биосенсора отражает Trx-зависимую дисульфидредуктазную активность (Zhuravlev et al., 2024), тогда как оценка концентрации H_2O_2 позволяет судить

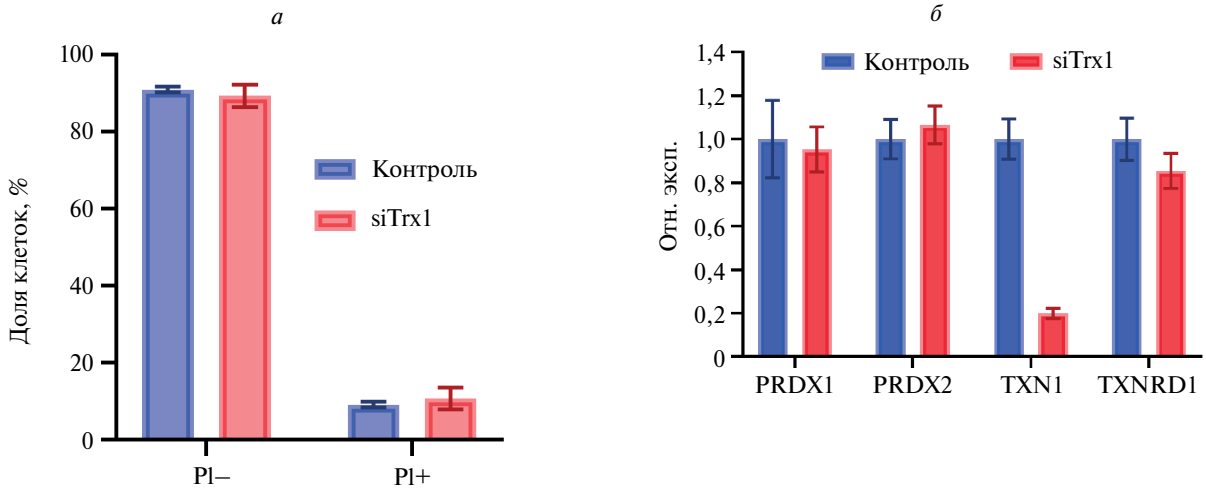


Рис. 1. Жизнеспособность клеток K-562 (*а*) и транскрипционная активность генов Trx-зависимого антиоксидантного пути в условиях siRNA-опосредованного нокдауна *TXN1* (*б*). *а* — Количество живых (PI–) и погибших (PI+) клеток в суспензии через 96 ч после проведения трансфекции; проточная цитометрия клеток с использованием окрашивания йодистым пропидием (PI). *б* — Относительная экспрессия генов Trx-зависимого пути в условиях siRNA-опосредованного нокдауна Trx1 через 72 ч после трансфекции. Уровни экспрессии нормализованы на значения экспрессии гена домашнего хозяйства *GAPDH* и представлены как среднее значение и его стандартное отклонение ($n = 4$). Контроль — контрольные клетки, siTrx1 — трансфицированные клетки

об эффективности пероксидазной активности антиоксидантной системы клеток.

Как известно, HyPer флуоресцирует в зеленом спектральном диапазоне, а его спектр возбуждения включает в себя два пика — 420 и 500 нм, характерные для восстановленной и окисленной форм сенсора соответственно (Bilan, Belousov, 2016). Цитоплазматический HyPer в физиологических условиях полностью восстановлен (Zenin et al., 2022). По мере увеличения внутриклеточной концентрации H_2O_2, а соответственно, и увеличения доли окисленного HyPer, в HyPer-экспрессирующих клетках происходит увеличение интенсивности флуоресценции, возбуждаемой лазером с длиной волны излучения 488 нм, и пропорциональное уменьшение интенсивности сигнала при возбуждении лазером 405 нм.

Для получения кинетических кривых сразу после добавления H_2O_2 начинали непрерывную регистрацию сигналов флуоресценции HyPer в обоих каналах в течение первых 10 мин. Типично динамика реакции биосенсора с перекисью включала увеличение сигнала окисленной фракции HyPer на фоне снижения сигнала восстановленной части биосенсора. Для перехода от «сырых» данных — флуоресцентных сигналов — к безразмерной метрике окисленно-восстановленного состояния сенсора выполняли калибровку, для которой регистрировали ответы клеток на насыщающие концентрации дитиотреитола (DTT) и H_2O_2, приводящие соответственно к полному восстановлению и полному окислению HyPer. В итоге для каждой клетки вычисляли долю восстановленного и окисленного биосенсора (см. уравнение (1) в разделе «Материал и методика»). В результате были получены кинетические кривые, отражающие изменение доли восстановленного HyPer в цитоплазме во времени (рис. 2).

Используя описанный подход, мы исследовали вклад, вносимый Trx в обеспечение антиоксидантной защиты клеток K-562 в условиях внешнего окислительного стресса разной интенсивности. Для этого мы измерили кинетику окисления HyPer в клетках K-562 с нормальной экспрессией и с siRNA-опосредованным нокдауном *TXN1*. При анализе кинетики окисления HyPer в цитоплазме клеток K-562 после добавления H_2O_2 наблюдали

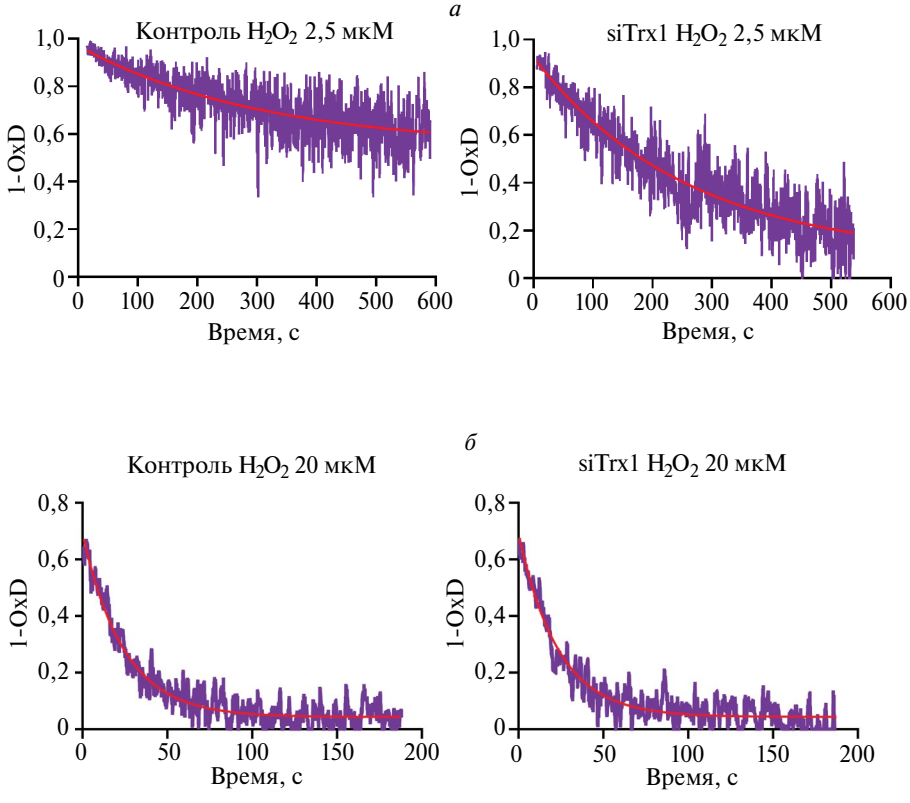


Рис. 2. Кинетика окисления HyPer в цитоплазме клеток K-562 в условиях H_2O_2-индуцированного стресса и siRNA-опосредованного нокдауна тиоредоксина Trx1. Показана доля восстановленного HyPer (1 — OxD) в цитоплазме клеток K-562 в зависимости от времени, прошедшего после добавления 2.5 (*а*) или 20 (*б*) мкМ H_2O_2 к клеткам с нормальной и уменьшенной экспрессией гена *TXN1* (фиолетовые кривые); красные кривые — аппроксимация экспериментальных данных уравнением (2) (см. раздел «Материал и методика»). Контроль — контрольные клетки, siTrx1 — трансфицированные клетки

постепенное снижение доли восстановленной формы биосенсора в течение первых 10 мин после индукции стресса. В условиях слабого стресса (2.5—8 мкМ внеклеточной H_2O_2) в клетках с нормальной экспрессией *TXN1* окисление HyPer происходило значительно медленнее, чем в клетках с siRNA-опосредованным нокдауном *TXN1*. При этом интенсивный окислительный стресс (20 мкМ внеклеточной H_2O_2) устранил какие-либо различия в кинетике окисления HyPer (рис. 2*б*).

Количественный анализ полученных кинетических данных позволил определить значения установившейся внутриклеточной концентрации H_2O_2. Наши эксперименты показали, что при добавлении 2.5 мкМ внеклеточной H_2O_2 в клетках, обработанных siRNA, установившаяся внутриклеточная концентрация перекиси превышает таковую в клетках контрольной группы практически в 2 раза. В дальнейшем, при поэтапном увеличении внеклеточной концентрации перекиси, добавляемой к клеткам, отношение между внутриклеточными концентрациям H_2O_2 в обработанных и контрольных клетках постепенно уменьшалось (см. рис. 3*а*). В итоге в условиях уже интенсивного окислительного стресса (20 мкМ) разница в значениях установившейся внутриклеточной концентрации H_2O_2 между клетками с нокдауном *TXN1* и контрольными клетками практически исчезала (см. рис. 3*б*).

В ходе анализа полученных кинетических кривых параллельно вычислялась константа скорости реакции восстановления HyPer в цитоплазме. Поскольку известно, что в цитоплазме клеток HyPer восстанавливается преимущественно при помощи Trx (Zhuravlev et al., 2024), константу восстановления рассматривали как количественный показатель, характеризующий дисульфидредуктазную активность цитоплазматической Trx-зависимой системы тиол-дисульфидного обмена. Нокдаун тиоредоксина ожидаемо снижал значение k_{rd} в клетках, однако примечательно, что относительное снижение константы восстановления не зависело от значения внешней концентрации перекиси и проявлялось как при слабом, так и при интенсивном окислительном стрессе (см. рис. 3*б*).

Проведенный анализ влияния siRNA-опосредованного нокдауна *TXN1* позволил установить, что тиоредоксин, будучи критическим компонентом Trx-зависимой системы тиол-дисульфидного обмена, опосредует высокоэффективную пероксидазную активность в цитоплазме клеток K-562 только в условиях слабого H_2O_2-индуцированного внешнего окислительного стресса.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящем исследовании для оценки влияния Trx на эффективность антиоксидантной защиты клеток K-562 мы использовали подход, предложенный и апробированный в ряде недавних работ (Zenin et al., 2022). Метод основан на анализе кинетики окисления биосенсора перекиси водорода HyPer в клетках после добавления к ним перекиси водорода. Несмотря на крайне быстрый перенос H_2O_2 через плазматическую мембрану (Lim et al., 2016), окисление тиол-содержащих белков, включая HyPer, представляет собой значительно более медленный

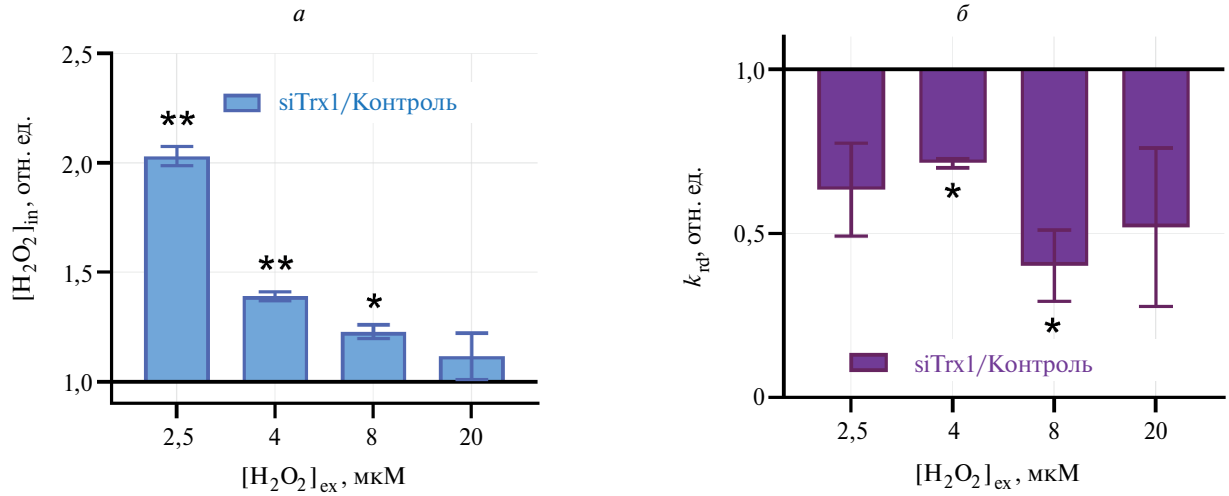


Рис. 3. Антиоксидантная активность в цитоплазме клеток K-562 в условиях внешнего H_2O_2-индуцированного стресса и siRNA: *а* — цитоплазматическая концентрация H_2O_2 в условиях H_2O_2-индуцированного стресса разной интенсивности; *б* — константа скорости реакции Trx-зависимого восстановления HyPer в цитоплазме клеток в условиях H_2O_2-индуцированного стресса разной интенсивности. Данные представлены как среднее значение и его стандартное отклонение (n = 3) относительных внутриклеточных концентраций H_2O_2 и k_{rd}, полученных нормировкой на соответствующие значения в клетках с нормальной экспрессией *TXN1*. Контроль — контрольные клетки, siTrx1 — трансфицированные клетки; k_{rd} — константа скорости реакции восстановления HyPer; $[H_2O_2]_{in}$ — внутриклеточная и $[H_2O_2]_{ex}$ — внеклеточная концентрация H_2O_2. Различия между клетками с siRNA-опосредованным нокдауном TXN1 и контрольными клетками при соответствующей внеклеточной концентрации перекиси достоверны при $P < 0.05$ (*) и $P < 0.01$ (**)

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 H2O2 gradients across biomembranes. FEBS Lett. V. 475. P. 121. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01638-0
2. *Belousov V., Fradkov A., Lukyanov K., Staroverov D., Shakhbazov K., Terskikh 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/101016/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/1010.1089/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 H2O2 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 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_2O_2 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_2O_2 produces a bi-phasic response in intracellular H_2O_2, with peroxiredoxin hyperoxidation only triggered once the cellular H_2O_2-buffering capacity is overwhelmed. Free Rad. Biol. Med. V. 95. P. 333. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiom333-486.02.035
17. *Zenin V., Ivanova J., Pugovkina N., Shatrova A., Aksenov N., Tyuryaeva I., Kirpichnikova K., Kuneev I., Zhuravlev A., Osyaeva E., Lyublinskaya E., Gazizova I., Guriev N., Lyublinskaya O.* 2022. Resistance to H_2O_2-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