

УДК 615.9 616.36-092.9 577.121

КЛЕТОЧНАЯ ЛИНИЯ IAR-2 HyPer ДЛЯ ОЦЕНКИ РАННЕГО ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА НА ТОКСИКАНТЫ

Каримов Д.О.^{1,2}, Якупова Т.Г.¹, Рябова Ю.В.¹, Репина Э.Ф.¹, Кудояров Э.Р.¹,
Каримов Д.Д.¹, Гарипова З.Р.³

¹ ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека», Уфа, Россия

² ФГБНУ «Национальный НИИ общественного здоровья имени Н.А. Семашко»,
Москва, Россия

³ ФГКОУ ВО УЮИ МВД России, Уфа, Россия

Ранние изменения окислительно-восстановительного состояния клеток печени часто предшествуют выраженному цитотоксическому эффекту. Для их анализа необходимы модели, позволяющие регистрировать изменение внутриклеточной перекиси водорода в режиме реального времени.

Цель исследования - оценить возможности стабильной клеточной модели IAR-2 HyPer, полученной в рамках работы путем введения в клетки IAR-2 плазмиды рHyPer-cyto, для регистрации раннего H₂O₂-зависимого ответа при воздействии тетрахлорметана, парацетамола и этанола, а также при добавлении оксиметилурацила.

Материалы и методы. Использовали стабильную клеточную модель IAR-2 HyPer, полученную на основе исходной эпителиальной линии печени крысы IAR-2 и коммерческой плазмиды рHyPer-cyto производства Evrogen, кодирующей цитозольный сенсор HyPer. Клетки культивировали в среде DMEM/F-12 с 10 % фетальной бычьей сывороткой при 37 °С и 5 % CO₂. Стабильные клоны отбирали после трансфекции и селекции G-418 по равномерности цитозольной флуоресценции и фотостабильности сигнала. Динамику HyPer-сигнала регистрировали при ратиометрическом возбуждении 405 и 488 нм после внесения токсикантов и оксиметилурацила.

Результаты. Тетрахлорметан в концентрациях 50 и 100 мМ вызывал раннее увеличение HyPer-сигнала, тогда как при 200 мМ дополнительного роста не наблюдали. На фоне оксиметилурацила сигнал в сериях с тетрахлорметаном возрастал, что может отражать сохранение функционально активной части клеточной популяции и изменение радикального потока. Парацетамол 30 и 60 мМ приводил к отрицательному изменению нормированного сигнала относительно исходного уровня. Этот результат рассматривали как проявление рН-зависимых и

цитотоксических ограничений сенсора, а не как снижение образования H_2O_2 . Этанол 2,5-10 % формировал дозозависимый положительный HyPer-ответ, а действие оксиметилурацила в этой модели имело двухфазный характер.

Заключение. IAR-2 HyPer пригодна для сравнительной регистрации раннего ответа клеток печени на токсиканты различной природы. Интерпретация данных требует учета рН-чувствительности HyPer, состояния монослоя и независимой оценки жизнеспособности. Оксиметилурацил может рассматриваться как потенциальный модификатор раннего окислительно-восстановительного ответа, однако выводы о гепатопротекторном действии должны подтверждаться дополнительными биохимическими и цитологическими показателями.

Ключевые слова. IAR-2 HyPer, перекись водорода, активные формы кислорода, токсическое поражение печени, тетрахлорметан, парацетамол, этанол, оксиметилурацил

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа проведена за счет средств субсидии на выполнение государственного задания в рамках отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора «Научное обоснование национальной системы обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия, управления рисками здоровью и повышения качества жизни населения России» на 2021-2025 гг. Пункт 6.1.8. Номер государственной регистрации 121062100058-8.

Для цитирования: Каримов Д.О., Якупова Т.Г., Рябова Ю.В., Репина Э.Ф., Кудояров Э.Р., Каримов Д.Д., Гарипова З.Р. Клеточная линия IAR-2 HyPer для оценки раннего окислительно-восстановительного ответа на токсиканты. Медицина труда и экология человека. 2026; 3:270-286.

doi: <http://dx.doi.org/10.24412/2411-3794-2026-10314>

Для корреспонденции: Татьяна Георгиевна Якупова, e-mail tanya.kutlina.92@mail.ru,

IAR-2 HyPer CELL LINE FOR ASSESSMENT OF EARLY REDOX RESPONSES TO TOXICANTS

Karimov D.O.^{1,2}, Yakupova T.G.¹, Ryabova Yu.V.¹, Repina E.F.¹, Kudoyarov E.R.¹,
Karimov D.D.¹, Garipova Z.R.³

¹ Ufa Research Institute of Occupational Health and Human Ecology, Ufa, Russia

² N.A. Semashko National Research Institute of Public Health, Moscow, Russia

³ Ufa Law Institute of the Ministry of Internal Affairs of Russia, Ufa, Russia

Early changes in the redox state of liver cells often precede overt cytotoxic injury. Experimental models that allow real-time monitoring of intracellular hydrogen peroxide are therefore needed for toxicological studies.

Objective. To assess the applicability of the stable IAR-2 HyPer cell model generated in this work by introducing the Evrogen pHyPer-cyto plasmid into IAR-2 cells for recording early H₂O₂-dependent responses to carbon tetrachloride, acetaminophen and ethanol, including experiments with oxymethyluracil.

Materials and methods. The stable IAR-2 HyPer cell model generated from the parental rat liver epithelial IAR-2 line using pHyPer-cyto plasmid encoding the cytosolic HyPer sensor was used. Cells were cultured in DMEM/F-12 supplemented with 10 % fetal bovine serum at 37 °C and 5 % CO₂. Stable clones were selected after transfection and G-418 selection according to uniform cytosolic fluorescence and signal photostability. HyPer signal dynamics were recorded under ratiometric excitation at 405 and 488 nm after exposure to toxicants and oxymethyluracil.

Results. Carbon tetrachloride at 50 and 100 mM induced an early increase in the HyPer signal, whereas 200 mM did not further increase the response. In the presence of oxymethyluracil, the signal increased in carbon tetrachloride experiments, which may reflect preservation of a functionally active cell fraction and changes in radical flux. Acetaminophen at 30 and 60 mM caused a negative change in the normalized signal relative to baseline. This finding was interpreted as a manifestation of pH-dependent and cytotoxic limitations of the sensor rather than as decreased H₂O₂ generation. Ethanol at 2.5-10 % produced a dose-dependent positive HyPer response, while the effect of oxymethyluracil in this model was biphasic.

Conclusion. The IAR-2 HyPer line is suitable for comparative recording of early liver cell responses to toxicants of different nature. Data interpretation requires consideration of HyPer pH sensitivity, monolayer condition and independent viability assessment. Oxymethyluracil may be considered a potential modifier of early redox responses, but

conclusions regarding hepatoprotection should be confirmed by additional biochemical and cytological markers.

Keywords. IAR-2 HyPer, hydrogen peroxide, reactive oxygen species, toxic liver injury, carbon tetrachloride, acetaminophen, ethanol, oxymethyluracil

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. This study was supported by a subsidy for the state assignment within the sectoral research program of Rospotrebnadzor «Scientific substantiation of the national system for ensuring sanitary and epidemiological well-being, health risk management and improving quality of life in Russia» for 2021-2025. Item 6.1.8. State registration number 121062100058-8.

For citation: Karimov D.O., Yakupova T.G., Ryabova Yu.V., Repina E.F., Kudoyarov E.R., Karimov D.D., Garipova Z.R. IAR-2 HyPer cell line for assessment of early redox responses to toxicants. *Occupational Health and Human Ecology*. 2026; 3:270-286.

doi: <http://dx.doi.org/10.24412/2411-3794-2026-10314>

For correspondence: Tatiana G. Yakupova, e-mail: tanya.kutlina.92@mail.ru

Активные формы кислорода участвуют в нормальной внутриклеточной сигнализации, однако при избыточном образовании становятся одним из ключевых факторов токсического поражения печени. Среди них особое место занимает перекись водорода, поскольку она сравнительно стабильна, проходит через мембраны и способна передавать окислительно-восстановительный сигнал между клеточными компартментами. Для печени, выполняющей основную часть биотрансформации ксенобиотиков, ранний баланс между образованием H_2O_2 и работой антиоксидантных систем во многом определяет последующее развитие клеточного повреждения.

Тетрахлорметан, парацетамол и этанол вызывают повреждение печени через разные первичные механизмы. Тетрахлорметан метаболизируется с образованием радикальных интермедиатов, запускающих перекисное окисление липидов. Парацетамол при передозировке образует реактивный метаболит N-ацетил-p-бензохинонимин, что сопровождается истощением глутатиона, нарушением функции митохондрий и ранними изменениями внутриклеточного pH. Этанол увеличивает нагрузку на микросомальную этанол-окисляющую систему и CYP2E1, что связано с усилением образования активных форм кислорода.

Сывороточные трансаминазы, продукты перекисного окисления липидов и морфологические признаки повреждения дают преимущественно отсроченную и суммарную оценку токсического эффекта. Они плохо отражают ранние изменения внутриклеточного H_2O_2 , особенно в первые минуты после контакта с токсикантом. Флуоресцентные красители на основе дихлорофлуоресцеина также имеют ограничения, включая недостаточную специфичность к H_2O_2 , фотогенерацию активных форм кислорода и трудности точной внутриклеточной локализации.

Генетически кодируемые сенсоры HyPer позволяют регистрировать изменения H_2O_2 в живых клетках с временным разрешением, достаточным для анализа раннего токсического ответа. HyPer представляет собой химерный белок на основе флуоресцентного домена YFP и регуляторного домена OxyR из *Escherichia coli*. При окислении чувствительных цистеиновых остатков изменяются спектральные свойства сенсора, что делает возможной ратиометрическую регистрацию сигнала. Важным ограничением исходных вариантов HyPer является чувствительность YFP-домена к pH, поэтому снижение ратиометрического сигнала при ацидозе не может автоматически трактоваться как уменьшение содержания H_2O_2 .

Целью исследования была оценка стабильной клеточной модели IAR-2 HyPer, полученной в рамках работы путем введения в клетки IAR-2 плазмиды rHyPer-cyto производства Evrogen, как инструмента для регистрации раннего H_2O_2 -зависимого ответа клеток печени при воздействии тетрахлорметана, парацетамола и этанола, а также при добавлении оксиметилурацила как потенциального модификатора окислительно-восстановительного ответа.

Материалы и методы. В работе использовали стабильную клеточную модель IAR-2 HyPer, полученную авторами на основе исходной эпителиальной линии печени крысы IAR-2. Для введения цитозольного генетически кодируемого сенсора HyPer применяли коммерческую плазмиду rHyPer-cyto (Evrogen, Россия). Полученная линия сохраняла морфологию однослойного кубического эпителия и активность ключевых изоформ CYP450, что позволяет применять ее как модель клеток печени для сравнительной оценки действия ксенобиотиков.

Клетки культивировали в среде DMEM/F-12 (1 к 1) (ПанЭко, Россия), дополненной 10 % фетальной бычьей сывороткой (Biosera, Франция), 2 mM L-глутамином, пенициллином 100 Ед·мл⁻¹ и стрептомицином 100 мкг·мл⁻¹. Инкубацию проводили при 37 °C, 5 % CO₂ и относительной влажности не менее 95 % в инкубаторе Tri-gas (HealForce, КНР). Каждые 72 ч при достижении 80 % конфлюэнтности клетки

отделяли 0,25 % трипсином-EDTA, пересевали в соотношении 1 к 5 и оценивали жизнеспособность автоматическим счетчиком LUNA II (Logos Biosystems, Республика Корея). В экспериментах использовали пассажи 10-15.

Для получения стабильной линии IAR-2 HyPer использовали плазмиду pHyPer-cyto (5,4 т.п.н., Evrogen, Россия), содержащую кассету CMV-HyPer-SV40 pA и ген устойчивости к гентицину нео^R. Данная плазмида являлась готовой генетической конструкцией для экспрессии цитозольного сенсора HyPer, тогда как получение стабильной линии IAR-2 HyPer на ее основе, отбор клонов и последующая адаптация модели к токсикологическому протоколу были выполнены в рамках настоящей работы. Плазмидная карта pHyPer-cyto с кассетой цитозольной экспрессии HyPer и основными регуляторными элементами представлена на рисунке 1.

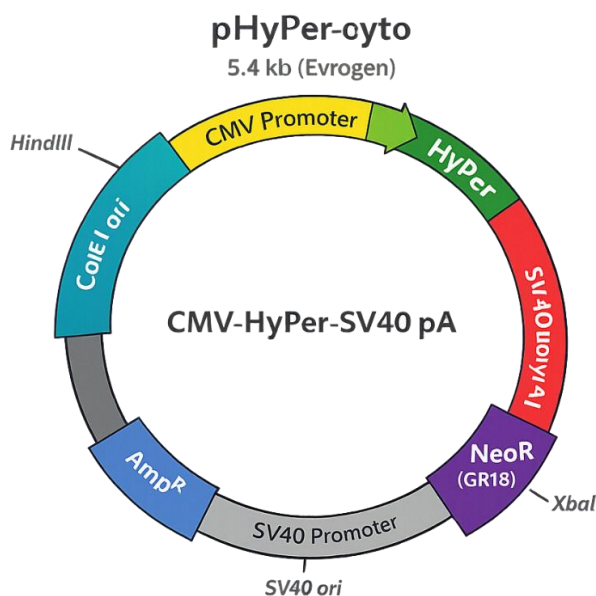


Рисунок 1. Плазмидная карта pHyPer-cyto с кассетой цитозольной экспрессии HyPer и основными регуляторными элементами

Figure 1. Plasmid map of pHyPer-cyto with the cytosolic HyPer expression cassette and main regulatory elements

На 60 % монослой (2×10^5 клеток, флакон T-25) наносили липосомальный комплекс на основе Lipofectamine 3000. Использовали 4 мкг плазмидной ДНК и 6 мкл реагента P3000, разведенные в 250 мкл DMEM. Соотношение P3000 и ДНК составляло 1,5 мкл/мкг и было выбрано как вариант, оптимизированный для IAR-

2. Комплексообразование проводили 20 мин при 25 °С. Через 5 ч трансфекционную смесь заменяли свежей средой, через 48 ч добавляли G-418 в концентрации 600 мкг·мл⁻¹. После формирования колоний концентрацию G-418 снижали до 300 мкг·мл⁻¹. Клоны с равномерным цитозольным свечением, без агрегации и с падением амплитуды менее 15 % за 5 мин непрерывного облучения отбирали под микроскопом Selenia X (20×/0,55 NA).

Для экспериментов клетки высевали в 96-луночные планшеты с прозрачным дном по $3,0 \times 10^4$ клеток на лунку в 100 мкл среды DMEM/F-12. Крайние лунки заполняли фосфатно-солевым буфером для уменьшения испарения и краевого эффекта. Через 48-72 ч инкубации, при конфлюэнтности 60-80 %, планшеты переносили на стол микроскопа Selenia X с объективом 20×/0,55 NA. Температуру поддерживали на уровне 37 °С, газообмен обеспечивали крышкой с газообменной мембраной.

До внесения токсикантов регистрировали базовую флуоресценцию в течение 10 мин при возбуждении 405 ± 10 нм и 488 ± 10 нм с регистрацией эмиссии 520-550 нм. Сигнал фиксировали каждые 30 с из центральной зоны монослоя. Одновременно регистрировали фоновую область без клеток для последующего вычитания.

Воздействия выполняли методом добавления половинного объема. В каждую лунку вносили 100 мкл 2× раствора токсиканта и оксиметилурацила (ОМУ), приготовленного на свежей среде, с получением заданных конечных концентраций. Для этанола использовали прямое разведение в среде. Для парацетамола (ПРЦ, АРАР) использовали водный или средовой раствор. Для тетрахлорметана (ТХМ, CCl₄) применяли раствор в диметилсульфоксиде, при этом конечное содержание носителя не превышало 0,1 % об./об. Для H₂O₂ и дитиотреитола (ДТТ) использовали стерильно фильтрованные водные растворы.

Планшет включал отрицательные контроли с соответствующим носителем, положительный контроль H₂O₂ 1 мМ, редуцирующий контроль ДТТ 0,025× для нижней калибровочной точки НуРег и группу ОМУ без токсикантов. Каждая серия учитывала фактор наличия ОМУ 210 мкМ. На группу приходилось 6 независимых лунок. Раскладку условий рандомизировали блочно, чтобы исключить систематическое смещение по строкам и столбцам планшета.

После внесения растворов кинетику НуРег регистрировали в течение 60 мин с тем же шагом съемки. Затем планшеты возвращали в инкубатор до 24-часовой точки для оценки жизнеспособности по ресазурину. Ресазурин применяли в конечной концентрации 10 мкМ, инкубация составляла 30 мин, чтение проводили при 560 и

590 нм с учетом бланка среды и нормировкой на среднее значение отрицательного контроля.

Для этанола использовали концентрации 2,5 %, 5 % и 10 %. Для парацетамола использовали 30 и 60 мМ. Для тетрахлорметана использовали 50, 100 и 200 мМ. Эти концентрации рассматривали как кратковременную провокационную нагрузку для анализа предельных режимов HuPer -ответа, а не как прямой эквивалент уровней экспозиции *in vivo*. Основную интерпретацию связывали с ранней кинетикой сигнала и последующей оценкой жизнеспособности.

Обработку изображений выполняли по схеме ратиометрической микроскопии. Из каждого канала вычитали средний сигнал фоновой области, затем рассчитывали отношение $R = F_{488}/F_{405}$ для каждого кадра. Сигнал нормировали на среднее значение базового окна R_0 , рассчитанного по последним 3 мин до воздействия. Отклик выражали как $\Delta R/R_0 \times 100 \%$ и дополнительно оценивали относительно разброса базовой линии.

Для количественного сравнения вычисляли пиковую амплитуду $(\Delta R/R_0)_{\text{max}}$, время достижения пика, площадь под кривой AUC_{0-30} минут по трапецеидальному правилу и максимальную скорость нарастания на участке 0-15 минут. Размерность AUC указывали как произведение единиц сигнала и времени. Для рядов в условных единицах использовали усл.ед.×мин, для нормированных рядов использовали %×мин. Качество серии оценивали по Z' -фактору с H_2O_2 как положительным контролем и ДТТ как отрицательным контролем. Приемлемым считали $Z' \geq 0,5$, серии с $Z' < 0,3$ повторяли.

Визуальный контроль морфологии и плотности монослоя проводили до и после экспозиции. Лунки с отслоением более 10 % площади, агрегатами, дефектами покрытия или выраженной неравномерностью освещенности исключали до начала анализа. Все временные ряды проходили коррекцию фона, проверку фотодеградаци по базовой фазе и нормировку R/R_0 .

Статистическую обработку выполняли в среде Python с использованием NumPy, pandas, SciPy, statsmodels и pingouin. Для групповых сравнений применяли однофакторный дисперсионный анализ с апостериорным тестом Тьюки. Для повторных временных рядов использовали линейные смешанные модели со случайным эффектом лунки или серии. Для AUC и отдельных непараметрических оценок рассчитывали перцентильные 95 % доверительные интервалы методом Bootstrap с 10 000 репликаций. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. В 30-минутном окне наблюдения отрицательный контроль с ДТТ обеспечивал стабильную базовую линию флуоресценции ($(10,0 \pm 1,9) \times 10^3$ усл. ед.) без выраженного дрейфа. ОМУ 210 мкМ вызывал умеренное повышение сигнала на 17 % относительно контроля. Площадь под кривой AUC_{0-30} увеличивалась до $2,70 \times 10^5$ усл. ед. $\times$ мин, 95 % ДИ $2,18-3,20 \times 10^5$. Коэффициент фиксированного эффекта в смешанной модели составлял $+3\,654 \pm 1\,066$ усл. ед., $p = 0,0006$.

Тетрахлорметан вызывал выраженный ранний HyPer-ответ. При 50 мМ максимум флуоресценции достигал примерно 22 000 усл. ед. к 12-й минуте, а AUC_{0-30} увеличивалась до $4,14 \times 10^5$ усл. ед. $\times$ мин, $p = 0,025$. При 100 мМ AUC_{0-30} возрастала до $5,14 \times 10^5$ усл. ед. $\times$ мин, $p = 3,6 \times 10^{-4}$, а коэффициент β увеличивался до $+8\,994 \pm 2\,523$ усл. ед. Временной градиент был статистически значимым, $\beta = +40,9 \pm 7,8$ усл. ед. $\times$ мин $^{-1}$, $p < 10^{-7}$, но его вклад в общую дисперсию не превышал 6 %. Это указывает на преимущественно ранний характер изменения сигнала.

При 200 мМ ТХМ дополнительного увеличения HyPer-сигнала не наблюдали. Прирост β составил $+2\,679 \pm 2\,523$ усл. ед., $p = 0,288$, а AUC_{0-30} оставалась в пределах доверительного интервала контроля. Такой результат может быть связан с насыщением радикал-образующей ветви, ранним нарушением метаболической активности или потерей функционально активной части клеточной популяции в пределах наблюдаемого окна.

Добавление ОМУ сопровождалось увеличением HyPer-сигнала во всех сериях с ТХМ. При 50 мМ ТХМ β возрастал до $+13\,140 \pm 2\,523$ усл. ед., при 100 мМ до $+16\,210 \pm 2\,523$ усл. ед., а при 200 мМ до $+13\,850 \pm 2\,523$ усл. ед. AUC_{0-30} для комбинации 200 мМ ТХМ и ОМУ составляла $6,61 \times 10^5$ усл. ед. $\times$ мин и была сопоставима с показателем для 100 мМ ТХМ без ОМУ. Апостериорный тест Тьюки подтвердил превышение сигнала в сочетаниях ТХМ и ОМУ над соответствующими дозами ТХМ без ОМУ, минимальное $p = 0,0003$. Положительный контроль H_2O_2 1 мМ существенно отличался от всех остальных групп, $p < 0,001$.

Результаты по ТХМ согласуются с представлением о СYP-зависимом образовании радикальных интермедиатов и вторичном формировании H_2O_2 при перекисном окислении липидов. Усиление сигнала на фоне ОМУ не следует трактовать как прямое доказательство гепатопротекторного действия. Более корректно рассматривать его как признак изменения раннего окислительно-восстановительного ответа и возможного сохранения части функционально

активных клеток. Для проверки механизма необходимы прямые измерения перекисного окисления липидов, активности CYP2E1, состояния мембран и внутриклеточного pH.

Парацетамол формировал другой тип ответа. Вместо ожидаемого увеличения отношения F_{488}/F_{405} наблюдали выраженное отрицательное изменение нормированного сигнала относительно исходной линии. Через 12 мин после добавления 30 мМ ПРЦ Δ -сигнал составлял примерно $-1,1 \times 10^4$ усл. ед. При 60 мМ снижение достигало $-1,4 \times 10^4$ усл. ед. и углублялось до $-1,7 \times 10^4$ усл. ед. к 30-й минуте. Важно подчеркнуть, что отрицательным было изменение относительно R_0 , а не физическое значение самого ратиометрического отношения.

Введение ОМУ 210 мкМ не изменяло форму кривых в сериях с ПРЦ. Однофакторный дисперсионный анализ AUC выявил выраженный межгрупповой эффект, $F_{6,35} = 319,46$, $p = 4,8 \times 10^{-67}$, $\eta^2 = 0,884$. Апостериорный тест Тьюки не выявил значимых различий между 30 и 60 мМ ПРЦ, $p = 0,108$, а также между ПРЦ с ОМУ и без ОМУ, минимальное $p = 0,072$. В смешанной модели коэффициенты β для 30 и 60 мМ ПРЦ составили $-20\,736 \pm 1\,066$ и $-22\,991 \pm 1\,066$ усл. ед. соответственно, оба $p < 10^{-85}$. Ковариата времени не была статистически значимой, $\beta = -94 \pm 58$ усл. ед. $\times$ мин $^{-1}$, $p = 0,11$.

Снижение HyPer-сигнала в модели ПРЦ не следует интерпретировать как уменьшение образования H_2O_2 или как антиоксидантный эффект парацетамола. Вероятнее, оно отражает суммарный оптический ответ системы при тяжелом лекарственном стрессе. Возможными компонентами являются ацидоз цитозоля на фоне нарушения митохондриального метаболизма, pH-чувствительность YFP-домена HyPer, возможная модификация тиоловых групп сенсора и частичная потеря адгезии клеток. Поэтому данные по ПРЦ прежде всего демонстрируют ограничение модели HyPer при ацидозе и повреждении монослоя.

Отсутствие значимых различий между ПРЦ и ПРЦ с ОМУ в 30-минутном окне не доказывает отсутствия защитного действия ОМУ в целом. Корректнее заключить, что в условиях раннего ПРЦ-индуцированного стресса ОМУ не менял регистрируемую HyPer-кривую. Для оценки цитопротекторного действия в этой модели требуются независимые показатели pH, жизнеспособности, глутатионового статуса, митохондриального повреждения и морфологии монослоя.

Этанол, в отличие от ПРЦ, формировал положительный HyPer-ответ. Амплитуда сигнала постепенно возрастала при переходе от 2,5 % к 10 %. На всех уровнях

концентраций кривые располагались выше отрицательного контроля, однако не достигали уровня положительного контроля H_2O_2 1 мМ. Добавление ОМУ изменяло профиль ответа нелинейно. При 2,5 и 5 % этанола наблюдали ослабление сигнала, а при 10 % этанола регистрировали его усиление.

Средняя AUC_{0-30} в отрицательном контроле составила $2,25 \times 10^5$ усл. ед. $\times$ мин, перцентильный 95 % ДИ $1,72-2,75 \times 10^5$. При 2,5 % этанола AUC_{0-30} увеличивалась до $2,85 \times 10^5$ усл. ед. $\times$ мин, $\Delta +27\%$, $\beta = +5\,960 \pm 1\,084$ усл. ед., $z = 5,50$, $p = 3,8 \times 10^{-8}$. При 5 % этанола показатель возрастал до $3,10 \times 10^5$ усл. ед. $\times$ мин, $\beta = +8\,570 \pm 1\,084$ усл. ед., $p = 2,7 \times 10^{-15}$. При 10 % этанола AUC_{0-30} достигала $3,55 \times 10^5$ усл. ед. $\times$ мин, $\beta = +12\,960 \pm 1\,084$ усл. ед., $p < 10^{-32}$.

На фоне ОМУ AUC_{0-30} при 2,5 и 5 % этанола снижалась до $2,40 \times 10^5$ и $2,60 \times 10^5$ усл. ед. $\times$ мин соответственно. Это соответствовало уменьшению на 19 % и 16 % по сравнению с соответствующими этанольными группами. Для 2,5 % этанола эффект имел характер тенденции, $p = 0,158$, для 5 % был статистически значимым, $p = 0,0015$. При 10 % этанола ОМУ повышал AUC_{0-30} до $3,90 \times 10^5$ усл. ед. $\times$ мин, $\Delta +10\%$, $\beta = +16\,470 \pm 1\,084$ усл. ед., $p = 8,0 \times 10^{-53}$. Межгрупповой эффект по ANOVA был выраженным, $F_{7,42} = 147,3$, $p = 2,1 \times 10^{-57}$, $\eta^2 = 0,832$.

Наблюдаемый градиент при воздействии этанола может отражать активацию микросомальной этанол-окисляющей системы и повышение образования активных форм кислорода. При умеренной нагрузке ОМУ снижал интегральный HyPer-ответ, что согласуется с антиоксидантной модуляцией. При 10 % этанола увеличение сигнала на фоне ОМУ можно рассматривать как возможную транзиторную прооксидантную фазу при высокой радикальной нагрузке. Эта интерпретация требует осторожности, поскольку для подтверждения адаптивного ответа необходимы показатели Nrf2/ARE-сигналинга, глутатионового обмена и жизнеспособности.

В целом стабильная линия IAR-2 HyPer позволила сопоставить ранние ответы на три токсиканта с различными первичными механизмами действия. В модели ТХМ регистрировали быстрый положительный ответ с признаками насыщения при предельной нагрузке. В модели ПРЦ выявлено ограничение рН-чувствительного сенсора в условиях раннего лекарственного стресса. В модели этанола наблюдали более плавное дозозависимое увеличение сигнала и двухфазную модуляцию на фоне ОМУ. Эти различия подтверждают, что HyPer-сигнал должен оцениваться не изолированно, а в связи с морфологией монослоя, жизнеспособностью, рН и биохимическими маркерами повреждения.

Ограничения исследования. Основным ограничением работы является рН-чувствительность исходного HyPer-сенсора. Это особенно важно для модели парацетамола, где вероятный ацидоз и повреждение монослоя могут искажать прямую интерпретацию сигнала как показателя внутриклеточного H_2O_2 . Дополнительное ограничение связано с использованием высоких концентраций токсикантов как кратковременной провокационной нагрузки. Они позволяют выявить предельные режимы ответа, но не предназначены для прямой физиологической экстраполяции.

Дальнейшая валидация модели должна включать независимый контроль внутриклеточного рН, расширение диапазона более низких концентраций, прямые маркеры жизнеспособности, перекисного окисления липидов, глутатионового статуса, активности CYP2E1 и митохондриального повреждения.

Заключение. Стабильная клеточная линия IAR-2 HyPer пригодна для сравнительной регистрации раннего ратиометрического ответа клеток печени на токсиканты различной природы. В модели тетрахлорметана выявлен быстрый положительный HyPer-ответ с признаками насыщения при предельной токсической нагрузке. В модели парацетамола показано методологическое ограничение сенсора при вероятном ацидозе и повреждении монослоя. В модели этанола зафиксирована дозозависимая положительная динамика с двухфазной модуляцией на фоне ОМУ.

Оксиметилурацил может рассматриваться как потенциальный модификатор раннего окислительно-восстановительного ответа, однако выводы о его гепатопротекторном действии должны подтверждаться независимыми биохимическими и цитологическими маркерами. Наиболее корректная область применения IAR-2 HyPer в данной постановке - сравнительный анализ ранней кинетики H_2O_2 -зависимого сигнала и выявление условий, при которых необходимы дополнительные контрольные измерения.

Список литературы:

1. Sies H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress. *Oxidative eustress. Redox Biology*. 2017. Vol. 11. P. 613-619. DOI 10.1016/j.redox.2016.12.035.
2. Forman H.J., Maiorino M., Ursini F. Signaling functions of reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine*. 2010. Vol. 49. No. 11. P. 1630-1638.
3. Stone J.R., Yang S. Hydrogen peroxide. A signaling messenger. *Antioxidants and Redox Signaling*. 2006. Vol. 8. No. 3-4. P. 243-270.

4. Lennicke C., Rahn J., Lichtenfels R., Wessjohann L.A., Seliger B. Hydrogen peroxide - production, fate and role in redox signaling of tumor cells. *Cell Communication and Signaling*. 2015. Vol. 13. Article 39. DOI 10.1186/s12964-015-0118-6.
5. Begriche K., Massart J., Robin M.A., Borgne-Sanchez A., Fromenty B. Drug-induced toxicity on mitochondria and lipid metabolism, mechanistic diversity and deleterious consequences for the liver. *Journal of Hepatology*. 2011. Vol. 54. No. 4. P. 773-794. DOI 10.1016/j.jhep.2010.11.006.
6. Jaeschke H., McGill M.R., Ramachandran A. Oxidant stress, mitochondria and cell death mechanisms in drug-induced liver injury. Lessons learned from acetaminophen hepatotoxicity. *Drug Metabolism Reviews*. 2012. Vol. 44. No. 1. P. 88-106. DOI 10.3109/03602532.2011.602688.
7. Slater T.F., Cheeseman K.H., Ingold K.U. Carbon tetrachloride toxicity as a model for studying free-radical mediated liver injury. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. 1985. Vol. 311. No. 1152. P. 633-645. DOI 10.1098/rstb.1985.0169.
8. Poli G. et al. Separation and characterization of aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by carbon tetrachloride or ADP-iron in isolated rat hepatocytes and rat liver microsomal suspensions. *Biochemical Journal*. 1985. Vol. 227. No. 2. P. 629-638. DOI 10.1042/bj2270629.
9. Yan M., Huo Y., Yin S., Hu H. Mechanisms of acetaminophen-induced liver injury and its implications for therapeutic interventions. *Redox Biology*. 2018. Vol. 17. P. 274-283. DOI 10.1016/j.redox.2018.04.019.
10. Ramachandran A., Jaeschke H. Mechanisms of acetaminophen hepatotoxicity and their translation to human pathophysiology. *Journal of Clinical and Translational Research*. 2017.
11. Teschke R. Microsomal ethanol-oxidizing system. Success over 50 years and an encouraging future. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*. 2019. Vol. 43. P. 386-400. DOI 10.1111/acer.13961.
12. Lieber C.S. The discovery of the microsomal ethanol oxidizing system and its physiologic and pathologic role. *Drug Metabolism Reviews*. 2004.
13. Kalyanaraman B. et al. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes. Challenges and limitations. *Free Radical Biology and Medicine*. 2012. Vol. 52. No. 1. P. 1-6.
14. Belousov V.V. et al. Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide. *Nature Methods*. 2006. Vol. 3. No. 4. P. 281-286. DOI 10.1038/nmeth866.

15. Bilan D.S. et al. HyPer-3. A genetically encoded H_2O_2 probe with improved performance for ratiometric and fluorescence lifetime imaging. *ACS Chemical Biology*. 2013. Vol. 8. No. 3. P. 535-542. DOI 10.1021/cb300625g.
16. Pak V.V. et al. Ultrasensitive genetically encoded indicator for hydrogen peroxide identifies roles for the oxidant in cell migration and mitochondrial function. *Cell Metabolism*. 2020. DOI 10.1016/j.cmet.2020.02.003.
17. Weller J., Kizina K.M., Can K., Bao G., Müller M. Response properties of the genetically encoded optical H_2O_2 sensor HyPer. *Free Radical Biology and Medicine*. 2014. Vol. 76. P. 227-241. DOI 10.1016/j.freeradbiomed.2014.07.045.
18. Wu D., Cederbaum A.I. Oxidative stress mediated toxicity exerted by ethanol-inducible CYP2E1. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2005. Vol. 207. No. 2. P. 70-76.
19. Бакиров А.Б., Репина Э.Ф., Каримов Д.О., Байгильдин С.С., Гимадиева А.Р., Якупова Т.Г., Тимашева Г.В., Хуснутдинова Н.Ю. Эффективность применения оксиметилурацила на модели острой алкогольной интоксикации. *Гигиена и санитария*. 2021. Т. 100. № 11. С. 1287-1291.
20. Murinov Yu.I. Pro- and antioxidant properties of uracil derivatives. *Russian Journal of General Chemistry*. 2019.

References:

1. Sies H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress. *Oxidative eustress*. *Redox Biology*. 2017. 11. 613-619. DOI 10.1016/j.redox.2016.12.035.
2. Forman H.J., Maorino M., Ursini F. Signaling functions of reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine*. 2010. 49(11). 1630-1638.
3. Stone J.R., Yang S. Hydrogen peroxide. A signaling messenger. *Antioxidants and Redox Signaling*. 2006. 8(3-4). 243-270.
4. Lennicke C., Rahn J., Lichtenfels R., Wessjohann L.A., Seliger B. Hydrogen peroxide - production, fate and role in redox signaling of tumor cells. *Cell Communication and Signaling*. 2015. 13. 39. DOI 10.1186/s12964-015-0118-6.
5. Begriche K., Massart J., Robin M.A., Borgne-Sanchez A., Fromenty B. Drug-induced toxicity on mitochondria and lipid metabolism, mechanistic diversity and deleterious consequences for the liver. *Journal of Hepatology*. 2011. 54(4). 773-794. DOI 10.1016/j.jhep.2010.11.006.
6. Jaeschke H., McGill M.R., Ramachandran A. Oxidant stress, mitochondria and cell death mechanisms in drug-induced liver injury. Lessons learned from acetaminophen hepatotoxicity. *Drug Metabolism Reviews*. 2012. 44(1). 88-106. DOI 10.3109/03602532.2011.602688.

7. Slater T.F., Cheeseman K.H., Ingold K.U. Carbon tetrachloride toxicity as a model for studying free-radical mediated liver injury. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. 1985. 311(1152). 633-645. DOI 10.1098/rstb.1985.0169.
8. Poli G. et al. Separation and characterization of aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by carbon tetrachloride or ADP-iron in isolated rat hepatocytes and rat liver microsomal suspensions. *Biochemical Journal*. 1985. 227(2). 629-638. DOI 10.1042/bj2270629.
9. Yan M., Huo Y., Yin S., Hu H. Mechanisms of acetaminophen-induced liver injury and its implications for therapeutic interventions. *Redox Biology*. 2018. 17. 274-283. DOI 10.1016/j.redox.2018.04.019.
10. Ramachandran A., Jaeschke H. Mechanisms of acetaminophen hepatotoxicity and their translation to human pathophysiology. *Journal of Clinical and Translational Research*. 2017.
11. Teschke R. Microsomal ethanol-oxidizing system. Success over 50 years and an encouraging future. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*. 2019. 43. 386-400. DOI 10.1111/acer.13961.
12. Lieber C.S. The discovery of the microsomal ethanol oxidizing system and its physiologic and pathologic role. *Drug Metabolism Reviews*. 2004.
13. Kalyanaraman B. et al. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes. Challenges and limitations. *Free Radical Biology and Medicine*. 2012. 52(1). 1-6.
14. Belousov V.V. et al. Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide. *Nature Methods*. 2006. 3(4). 281-286. DOI 10.1038/nmeth866.
15. Bilan D.S. et al. HyPer-3. A genetically encoded H₂O₂ probe with improved performance for ratiometric and fluorescence lifetime imaging. *ACS Chemical Biology*. 2013. 8(3). 535-542. DOI 10.1021/cb300625g.
16. Pak V.V. et al. Ultrasensitive genetically encoded indicator for hydrogen peroxide identifies roles for the oxidant in cell migration and mitochondrial function. *Cell Metabolism*. 2020. DOI 10.1016/j.cmet.2020.02.003.
17. Weller J., Kizina K.M., Can K., Bao G., Müller M. Response properties of the genetically encoded optical H₂O₂ sensor HyPer. *Free Radical Biology and Medicine*. 2014. 76. 227-241. DOI 10.1016/j.freeradbiomed.2014.07.045.
18. Wu D., Cederbaum A.I. Oxidative stress mediated toxicity exerted by ethanol-inducible CYP2E1. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2005. 207(2). 70-76.

19. Bakirov A.B., Repina E.F., Karimov D.O., Baigildin S.S., Gimadieva A.R., Yakupova T.G., Timasheva G.V., Khusnutdinova N.Yu. The effectiveness of oxymethyluracil in a model of acute alcohol intoxication. *Gigiena i Sanitariya*. 2021. 100(11). 1287-1291. In Russian.
20. Murinov Yu.I. Pro- and antioxidant properties of uracil derivatives. *Russian Journal of General Chemistry*. 2019.

Информация об авторах

Каримов Денис Олегович - кандидат медицинских наук, заведующий отделом токсикологии и генетики с экспериментальной клиникой лабораторных животных ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека», ведущий научный сотрудник отдела исследований общественного здоровья ФГБНУ «Национальный НИИ общественного здоровья имени Н.А. Семашко», e-mail karimovdo@gmail.com, ORCID iD 0000-0003-0039-6757.

Якупова Татьяна Георгиевна - научный сотрудник лаборатории генетики отдела токсикологии и генетики с экспериментальной клиникой лабораторных животных ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека», e-mail tanya.kutlina.92@mail.ru, ORCID iD 0000-0002-1236-8246.

Рябова Юлия Владимировна - кандидат медицинских наук, заведующая лабораторией токсикологии отдела токсикологии и генетики с экспериментальной клиникой лабораторных животных ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека», e-mail ryabovaiuvl@gmail.com, ORCID iD 0000-0003-2677-0479.

Репина Эльвира Фаридовна - кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории токсикологии отдела токсикологии и генетики с экспериментальной клиникой лабораторных животных ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека», e-mail e.f.repina@bk.ru, ORCID iD 0000-0001-8798-0846.

Кудояров Эльдар Ренатович - младший научный сотрудник отдела токсикологии и генетики с экспериментальной клиникой лабораторных животных ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека», e-mail e.kudoyarov@yandex.ru, ORCID iD 0000-0002-2092-1021.

Каримов Денис Дмитриевич - кандидат биологических наук, заведующий лабораторией генетики отдела токсикологии и генетики с экспериментальной клиникой лабораторных животных ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека», e-mail lich-tsar@mail.ru, ORCID iD 0000-0002-1962-2323.

Гарипова Зарина Ринатовна - преподаватель кафедры профессиональной подготовки ФГКОУ ВО УЮИ МВД России, e-mail gzh1990@mail.ru.

Author information

Karimov Denis Olegovich - Candidate of Medical Sciences, Head of the Department of Toxicology and Genetics with an Experimental Laboratory Animal Clinic, Ufa Research Institute of Occupational Health and Human Ecology, Leading Researcher, Department of Public Health Research, N.A. Semashko National Research Institute of Public Health, e-mail karimovdo@gmail.com, ORCID iD 0000-0003-0039-6757.

Yakupova Tatiana Georgievna - Researcher, Genetics Laboratory, Department of Toxicology and Genetics with an Experimental Laboratory Animal Clinic, Ufa Research Institute of Occupational Health and Human Ecology, e-mail tanya.kutlina.92@mail.ru, ORCID iD 0000-0002-1236-8246.

Ryabova Yulia Vladimirovna - Candidate of Medical Sciences, Head of the Toxicology Laboratory, Department of Toxicology and Genetics with an Experimental Laboratory Animal Clinic, Ufa Research Institute of Occupational Health and Human Ecology, e-mail ryabovaiuvl@gmail.com, ORCID iD 0000-0003-2677-0479.

Repina Elvira Faridovna - Candidate of Medical Sciences, Senior Researcher, Toxicology Laboratory, Department of Toxicology and Genetics with an Experimental Laboratory Animal Clinic, Ufa Research Institute of Occupational Health and Human Ecology, e-mail e.f.repina@bk.ru, ORCID iD 0000-0001-8798-0846.

Kudoyarov Eldar Renatovich - Junior Researcher, Department of Toxicology and Genetics with an Experimental Laboratory Animal Clinic, Ufa Research Institute of Occupational Health and Human Ecology, e-mail e.kudoyarov@yandex.ru, ORCID iD 0000-0002-2092-1021.

Karimov Denis Dmitrievich - Candidate of Biological Sciences, Head of the Genetics Laboratory, Department of Toxicology and Genetics with an Experimental Laboratory Animal Clinic, Ufa Research Institute of Occupational Health and Human Ecology, e-mail lich-tsar@mail.ru, ORCID iD 0000-0002-1962-2323.

Garipova Zarina Rinatovna - Lecturer, Department of Professional Training, Ufa Law Institute of the Ministry of Internal Affairs of Russia, e-mail gzh1990@mail.ru.

Поступила/Received: 29.05.2026

Принята в печать/Accepted: 11.09.2026