

DOI: <https://doi.org/10.23868/gc375310>

Оценка физиолого-биохимических характеристик клеток на основе регистрации их респираторной активности при воздействии субстратов и токсических веществ

П.В. Ильясов, О.С. Гусева, А.П. Курицына, Л.В. Лимарева

Самарский государственный медицинский университет, Самара, Российская Федерация

АННОТАЦИЯ

Обоснование. Важным аспектом методологических подходов к изучению внутриклеточного метаболизма является оценка метаболического профиля клеток. Один из показателей, которые можно использовать для получения такого профиля, — интенсивность поглощения кислорода при разложении и трансформации субстратов клетками.

Цель исследования — разработка метода оценки физиолого-биохимических характеристик клеток, основанного на регистрации их респираторной активности и формировании метаболического профиля, а также анализ применения этого метода для оценки угнетения и восстановления клеток паренхимы печени в результате воздействия различных веществ.

Материалы и методы. Разработанный метод включал применение кислородного электрода Кларка с исследуемыми клетками, локализованными в области его рабочей зоны, для измерения концентрации растворённого кислорода в непосредственном окружении живых интактных клеток, что обеспечивает оценку их метаболического профиля и физиологического состояния. Эксперименты выполняли на фрагментах среза паренхимы печени крыс линии Wistar. Было поставлено 3 серии экспериментов: в первой (серии А) получали метаболический профиль паренхимы печени; во второй (серии Б) определяли стабильность сигнала паренхимы на цитрат натрия в зависимости от времени; в третьей (серии В) регистрировали и оценивали воздействие гепатотоксических соединений на ткань печени в режиме реального времени. В качестве субстратов для определения оптимального метаболического профиля ткани печени использовали растворы глюкозы, фруктозы, сахарозы, цитрата натрия, пирувата натрия, L-глутамина, этанола и гидрохинона, в качестве токсических агентов — растворы метанола и кларитромицина.

Результаты. Продемонстрированы формирование метаболического профиля ткани на примере паренхимы печени и возможность отслеживания изменений состояния клеток при токсическом воздействии в режиме реального времени.

Заключение. Разработанный метод оценки физиолого-биохимических характеристик клеток может использоваться для отслеживания метаболической активности, угнетения и восстановления клеток паренхимы печени при воздействии субстратов и токсических соединений.

Ключевые слова: физиология и биохимия клеток; метаболический профиль; респираторная активность; токсичность.

Для цитирования:

Ильясов П.В., Гусева О.С., Курицына А.П., Лимарева Л.В. Оценка физиолого-биохимических характеристик клеток на основе регистрации их респираторной активности при воздействии субстратов и токсических веществ // Гены и клетки. 2022. Т. 17, № 4. С. 115–124. DOI: <https://doi.org/10.23868/gc375310>

DOI: <https://doi.org/10.23868/gc375310>

An assessment of physiological and biochemical characteristics of cells based on the respiratory activity under substrates and toxic substances impact

Pavel V. Iliasov, Olga S. Guseva, Anna P. Kuricyna, Larisa V. Limareva

Samara State Medical University, Samara, Russian Federation

ABSTRACT

BACKGROUND: Metabolic profiling of cells is an essential aspect of studies of intracellular metabolism. One of the parameters which can be used for this purpose is a rate of oxygen consumption during degradation or transformation of substrates by cells.

AIM: This study was aimed at the development of a method for assessment of cell physiology and biochemistry based on the metabolic profiling via registration of the cell respiratory activity, and use of this method for evaluation of inhibition and recovery of liver parenchyma cells affected by different compounds.

MATERIALS AND METHODS: The method used a Clark-type oxygen electrode with the cells located at its working area, in order to measure dissolved oxygen concentration in the immediate surrounding of living intact cells thereby ensuring their metabolic profiling and physiological status assessment. The experiments were performed using Wistar rat liver parenchyma fragments. Three experimental series were performed: first (series A) was aimed at metabolic profiling of the liver parenchyma; the second (series B) determined the stability of parenchyma's response to sodium citrate over time; and the third (series C) ensured real-time recording and assessment of the effect of hepatotoxicants on the liver tissue. Solutions of glucose, fructose, sucrose, sodium citrate, sodium pyruvate, L-glutamine, ethanol and hydroquinone were used as the substrates for liver tissue metabolic profiling, and solutions of methanol and clarithromycin as the toxic agents.

RESULTS: During the experiments, a metabolic profiling of tissue and real-time monitoring of toxicity effect on liver parenchyma cells have been demonstrated.

CONCLUSION: The developed method for assessing the physiological and biochemical characteristics of cells can be used to track the metabolic activity, inhibition and restoration of liver parenchyma cells when exposed to substrates and toxic compounds.

Keywords: cell biochemistry and physiology; metabolic profile; respiratory activity; toxicity.

To cite this article:

Iliasov PV, Guseva OS, Kuricyna AP, Limareva LV. An assessment of physiological and biochemical characteristics of cells based on the respiratory activity under substrates and toxic substances impact. *Genes & cells*. 2022;17(4):115–124. DOI: <https://doi.org/10.23868/gc375310>

Received: 27.09.2022

Accepted: 12.12.2022

Published: 13.05.2023

ВВЕДЕНИЕ

При исследовании регенерации клеток и тканей используют различные подходы к оценке состояния клеток-мишеней в зависимости от оказываемого на них воздействия. Общеизвестно, что живые клетки и ткани любых организмов характеризуются разнообразием метаболических путей за счёт синтезируемых ими ферментов, активность которых обеспечивает жизнеспособность клеток и опосредует все происходящие в них процессы. Количественные характеристики таких процессов отражают физиолого-биохимическое состояние клеток и имеют определённую ценность с точки зрения диагностики и прогнозирования дальнейшего хода метаболических внутриклеточных реакций. Информация об этих характеристиках может применяться в медицине, биотехнологии, клеточных технологиях, а также в биомедицинских фундаментальных и прикладных исследованиях [1].

Важный аспект методологических подходов к изучению внутриклеточного метаболизма — оценка метаболического профиля клеток. Наиболее всеобъемлющие варианты такой оценки лежат в области метаболомики — направления клеточной биохимии и физиологии, занимающегося исследованием всей совокупности метаболитов и биохимических путей, присутствующих в клетке. В наиболее распространённом варианте метаболомные исследования сводятся к высвобождению клеточного содержимого, хроматографическому разделению компонентов и их идентификации посредством масс-спектрометрии, спектрометрии в инфракрасном спектре (ИК-спектрометрии) и ядерного магнитного резонанса [2]. Хотя этот подход — трудоёмкий и дорогостоящий, он позволяет получить исчерпывающую информацию о биохимических особенностях клеток. Вместе с тем интенсивное развитие метаболомики не исключает применения других подходов к определению метаболической активности клеток. Так, ряд вторичных метаболитов, образующихся при разложении специфических субстратов в клетках, представляют собой рН-активные соединения, что даёт возможность их обнаружения с помощью рН-индикаторов [3, 4] или электрохимическим методом (например, с помощью рН-электрода) [5]. Кроме того, многие ферменты, вовлечённые в катаболизм, относятся к классу оксидоредуктаз, т.е. осуществляют окислительно-восстановительные реакции, сопровождающиеся переносом электронов. Такие реакции можно отслеживать с помощью субстратов, образующихся при окислении или восстановлении окрашенного продукта (что, например, характерно для пероксидазы хрена, широко применяемой в качестве ферментной метки в иммуноферментном анализе), а также за счёт электрохимических электродов, содержащих медиаторы переноса электронов — вещества, способные служить акцептором электронов для таких ферментов с последующим

электрохимическим окислением на электроде. Электрохимическая реакция приводит к возникновению электродвижущей силы в цепи электрода, пропорциональной концентрации субстрата [6, 7]. Этот же подход в ряде случаев применим не только по отношению к выделённым ферментам, но и к целым клеткам, если целевой фермент располагается в клеточной стенке и (или) мембране либо если клеточная стенка проницаема для медиатора.

Ключевая особенность аэробного метаболизма живых клеток состоит в том, что практически любой катаболический процесс, связанный с получением энергии из химических соединений, в конечном итоге замыкается на компонентах электрон-транспортной дыхательной цепи, и это приводит к поглощению кислорода клетками из окружающей среды. При интенсивных метаболических процессах поглощение кислорода способно приводить к существенному снижению его концентрации в среде, что может влиять на рост клеток. Этот факт, например, учитывается в области микробиологии и биотехнологии, в особенности при культивировании различных клеток в жидких средах, когда во избежание нарушений процессов ферментации приходится контролировать уровень кислорода, интенсивно перемешивая культуральную среду. При этом уровень поглощения кислорода пропорционален метаболической активности клеток и зависит, с одной стороны, от природы субстрата, а с другой — от ферментативного аппарата клетки и его состояния. Следовательно, поглощение кислорода при разложении и трансформации субстратов также можно использовать для метаболического профилирования и получения уникальных характеристик клеток.

Таким образом, разработка метода оценки физиолого-биохимического состояния клеток на основе электрохимической регистрации их метаболической активности — перспективное направление. Настоящая работа посвящена разработке и экспериментальному применению такого методического подхода.

Цель исследования — разработка метода оценки физиолого-биохимических характеристик клеток, основанного на регистрации их респираторной активности и формировании метаболического профиля, а также анализ применения этого метода для оценки угнетения и восстановления клеток паренхимы печени в результате воздействия различных веществ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе изучали возможности использования подхода, основанного на применении кислородного электрода Кларка с исследуемыми клетками, локализованными в области его рабочей зоны. Такое устройство может измерять концентрацию растворённого кислорода в непосредственном окружении живых интактных клеток,

что даёт возможность оценить их метаболический профиль и физиологическое состояние.

Исследование выполнено на базе ФГБОУ ВО Самарского государственного медицинского университета Минздрава России в Научно-исследовательском институте экспериментальной медицины и генетических технологий (лаборатория биохимии). Все эксперименты с использованием лабораторных животных проводили с соблюдением правил надлежащей лабораторной практики, утверждённых Приказом МЗ РФ от 01.04.2016 г. № 199-Н, а также других международных и российских принципов и норм биоэтики.

В рамках настоящей работы выполнили 3 серии экспериментов: первая (серия А) посвящена получению метаболического профиля паренхимы печени; во второй (серии Б) определяли стабильность сигнала паренхимы на цитрат натрия в зависимости от времени; в третьей (серии В) регистрировали и оценивали воздействие гепатотоксических соединений на ткань печени в режиме реального времени. В каждой серии экспериментов использовали по 6 крыс линии Wistar в возрасте 3 мес, таким образом, каждая точка численных данных на графиках зависимости от времени представляет собой среднее значение \pm стандартное отклонение по шести повторностям.

Животных умерщвляли путём декапитации с последующим вскрытием брюшной полости и извлечением печени. Фрагмент среза паренхимы печени крысы массой ~15 мг и размером ~3,0×3,0×0,5 мм локализовали в области рабочей зоны кислородного электрода Кларка и механически фиксировали с помощью капроновой сетки с плотностью 30 ячеек/см² и прижимного кольца. Электрод с клетками помещали в кювету, содержащую 2 мл рабочей среды (физиологический раствор с фосфатным буфером, pH=7,6), ставили на магнитную мешалку и тщательно промывали, несколько раз меняя раствор до установления стабильной концентрации растворённого кислорода в окружении клеток (5–6 мг/л). В качестве субстратов для определения оптимального метаболического профиля ткани печени использовали растворы глюкозы, фруктозы, сахарозы, цитрата натрия, пирувата натрия, L-глутамина, этанола и гидрохинона (ч.д.а., ООО АО «РЕАХИМ», Россия), конечная концентрация субстратов в кювете составляла 50 мМ. Регистрацию и обработку сигналов осуществляли на ПК с использованием программного обеспечения «Эксперт-00х» (ООО «Эко-никс-Эксперт», Россия) в течение примерно 5–10 мин. В качестве измеряемого параметра сигнала и условного показателя активности клеток ткани в данной системе применяли максимальную скорость изменения концентрации растворённого кислорода после внесения субстрата (мг·О₂/л·с), рассчитанную с помощью программного обеспечения «Эксперт-00х». После регистрации каждого сигнала электрод вместе с фрагментом ткани промывали путём многократной смены рабочей среды

до восстановления исходного равновесного уровня кислорода в кювете (~5–15 мин). Данный подход обеспечивал многократное использование фрагмента ткани без его замены, что в экспериментах серии А позволило получать метаболический профиль, включавший 8 вышеуказанных субстратов, в трех повторностях для одного и того же фрагмента ткани. Для удобства сравнения данных и нивелирования погрешностей, вызванных различиями в количестве взятой ткани и метаболической активности печени у разных животных, сигналы на субстраты в составе профиля приводили в процентах от сигнала на цитрат натрия.

В экспериментах серии Б по определению стабильности сигнала фрагмент паренхимы печени находился на электроде в течение 46 ч, и на протяжении этого времени периодически регистрировали сигнал клеток. В качестве рабочего субстрата в этих экспериментах, а также в экспериментах серии В выбрали цитрат натрия в связи с максимальной активностью клеток паренхимы печени в его отношении по сравнению с другими соединениями, оцениваемыми в составе метаболического профиля в данной работе. Это позволяло рассчитывать, что в случае выраженного токсического действия тестируемых соединений на ткань применение цитрата натрия обеспечит высокую информативность оценки остаточной метаболической активности по сравнению с остальными субстратами.

Для оценки воздействия гепатотоксических соединений на паренхиму печени выполнили эксперименты серии В с использованием фрагментов ткани одного и того же животного и двух токсических агентов — метанола и кларитромицина. Непосредственно перед регистрацией гепатотоксического воздействия провели контрольное измерение метаболической активности клеток в присутствии цитрата натрия в трёх повторностях. Затем, после отмытки, в кювету добавляли раствор метанола (Sigma-Aldrich, США) в конечной концентрации 9,6% (об./об.) или насыщенную (100 мг/мл в пересчёте на действующее вещество) суспензию кларитромицина (Клацид®, «ЭббВи С.р.Л.», Италия) и инкубировали в течение 20 мин, регистрируя снижение фоновой респираторной активности в результате угнетения клеток (которое отображалось в режиме реального времени как постепенное повышение уровня кислорода в растворе). Затем ткань отмывали до установления стабильной концентрации растворённого кислорода в окружении клеток (5–6 мг/л) и для оценки процесса восстановления метаболизма вносили цитрат натрия с интервалом 30 мин, измеряя скорость потребления кислорода клетками. Общее время эксперимента составило 150 мин.

Статистический анализ. Статистическую обработку результатов проводили с использованием программ Microsoft Office Excel 2016 и IBM SPSS Statistics 25, США (лицензия № 5725-A54).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Метаболический профиль паренхимы печени крысы, полученный с использованием одного образца ткани, представлен на рис. 1.

Как следует из данных, полученных в экспериментах серии А, клетки паренхимы печени характеризуются высокой активностью метаболизма цитрата и пирувата натрия — солей органических кислот, являющихся непосредственными продуктами аэробного метаболизма углеводов. Вместе с тем аэробный метаболизм моносахаридов (глюкозы, фруктозы) и сахарозы в данной ткани осуществляется на следовом уровне или отсутствует. Кроме того, имеет место заметная активность ферментов, участвующих в метаболизме этанола (возможно, алкогольдегидрогеназы) и глутамина, и слабая активность, связанная с окислением ароматических соединений, на примере гидрохинона (вероятно, за счёт цитохрома

P450). Данный метаболический профиль стабильно воспроизводился в паренхиме печени шести животных ($p < 0,05$). Коэффициент вариации для всех субстратов не превышал 25%, что указывает на высокую воспроизводимость профиля как в пределах одного фрагмента ткани, так и для тканей, полученных от различных животных, а также на то, что данный профиль адекватно отражает метаболическую активность паренхимы печени крысы (рис. 2).

Результаты оценки динамики изменений сигнала паренхимы печени в зависимости от времени (серия экспериментов Б) демонстрируют градуальное снижение активности клеток вследствие их постепенной гибели, однако в течение первых 6 ч скорость этого снижения не превышала 1% исходной активности в 1 ч, что было сопоставимо с погрешностью, полученной при оценке воспроизводимости в ходе экспериментов и приведённой в виде показателей разброса на рис. 1 и 2. Таким

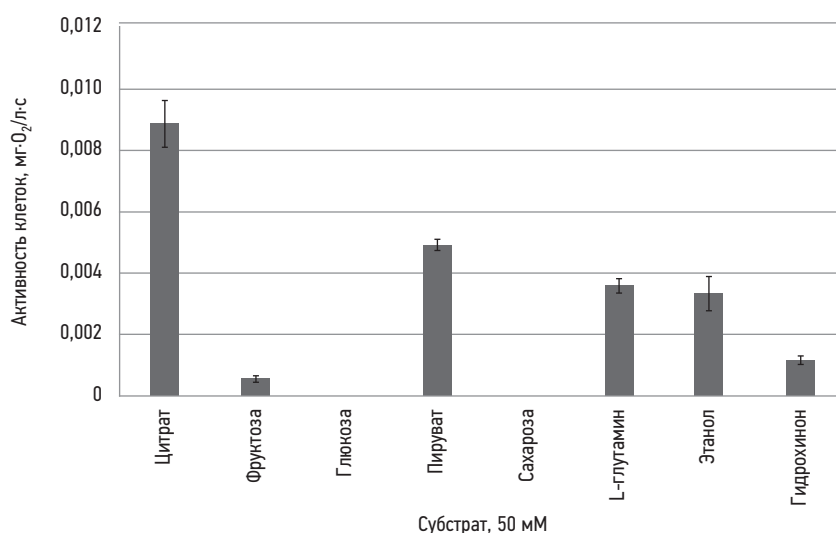


Рис. 1. Метаболический профиль паренхимы печени крысы (данные получены с использованием одного образца ткани).

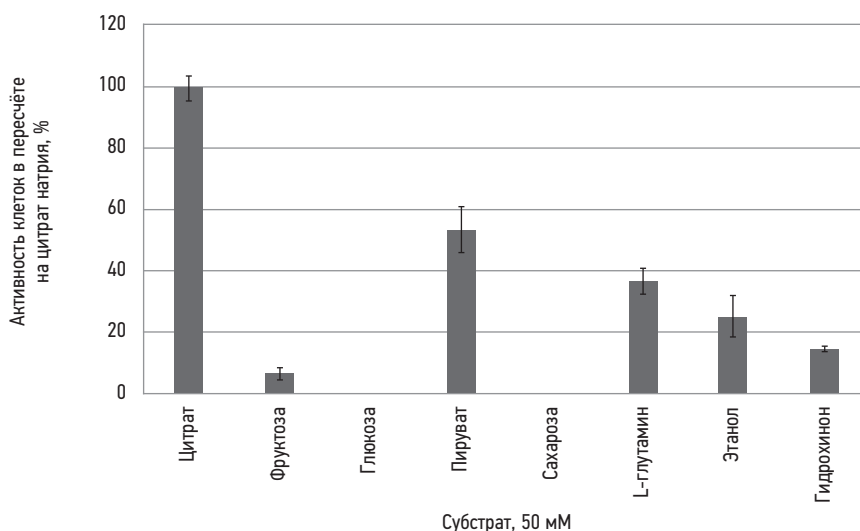


Рис. 2. Метаболический профиль паренхимы печени (объединённые данные для 6 животных). Сигналы нормированы по сигналу на цитрат натрия.

образом, на протяжении нескольких часов (например, рабочего дня) резкие изменения величины сигнала, которые могли бы помешать регистрации токсического или стимулирующего воздействия, отсутствовали. Следовательно, используемую схему эксперимента можно было применять для поставленной задачи (рис. 3).

Сигналы, отражающие реакцию паренхимы печени на гепатотоксические соединения (серия экспериментов В), представлены на рис. 4. Для сравнения приведён сигнал на цитрат натрия до введения гепатотоксического агента.

При введении цитрата натрия происходило снижение концентрации растворённого кислорода ввиду усиления его потребления дыхательной цепью клеток при активизации их метаболизма, причём это снижение продолжалось до достижения нового равновесного уровня (определяемого по достижению значения скорости изменения сигнала не более $0,0001 \pm 0,000009$ мг·О₂/л·с; рис. 4, б).

При введении метанола, напротив, имело место увеличение концентрации растворённого кислорода в рабочей кювете из-за угнетения фоновой активности клеток. В случае с кларитромицином клетки вначале, по-видимому, воспринимали его как субстрат (известно, что при фармакологическом применении кларитромицин метаболизируется в печени до N-десметилкларитромицина и 14-(R)-гидроксикларитромицина) и активизировали потребление кислорода, но через 8–10 мин этот эффект сменялся нарастающим угнетением метаболизма, сопоставимым по величине с угнетением при введении метанола ($0,0011 \pm 0,00008$ и $0,0009 \pm 0,00009$ мг·О₂/л·с соответственно), что можно было наблюдать в режиме реального времени (рис. 4, а). Затем электрод с фрагментом ткани промывали и с целью демонстрации восстановления метаболической активности клеток повторно регистрировали ответ на цитрат натрия каждые 30 мин четырёхкратно. Результаты представлены на рис. 5.

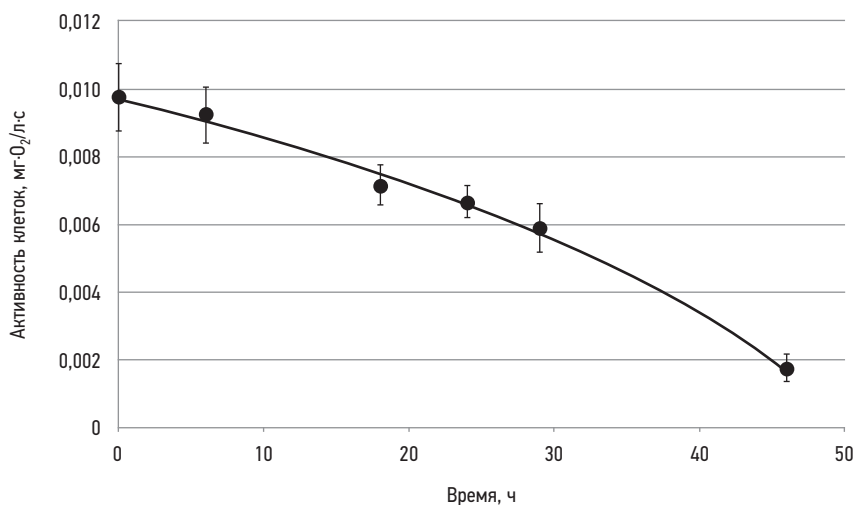


Рис. 3. Динамика изменений сигнала паренхимы печени на цитрат натрия в зависимости от времени эксперимента.

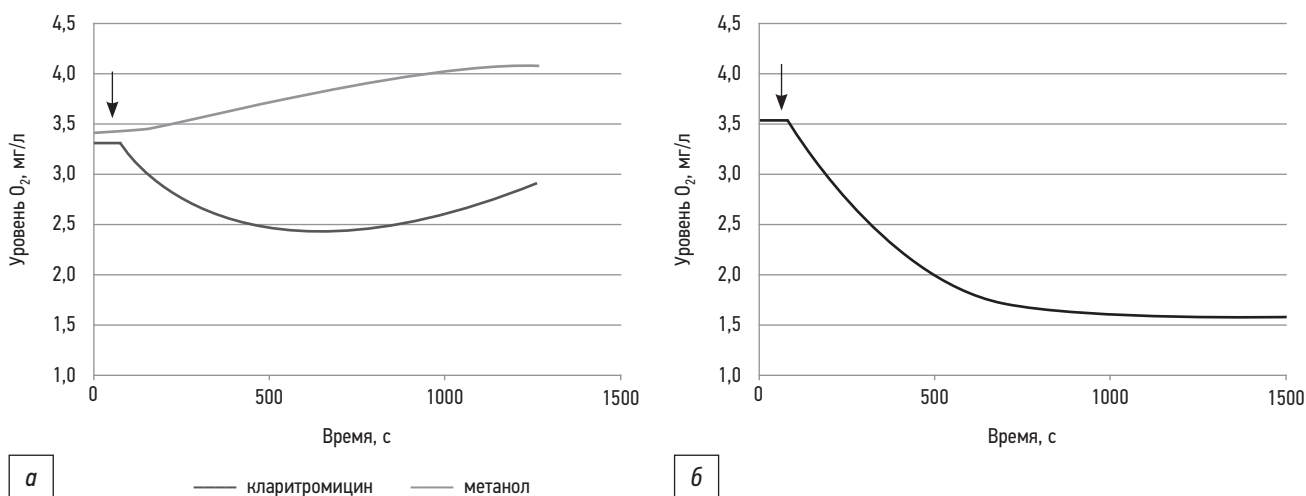


Рис. 4. Типичная реакция паренхимы печени на гепатотоксические агенты (а) и цитрат натрия (б). Стрелками на графиках отмечен момент ввода соединения в кювету.

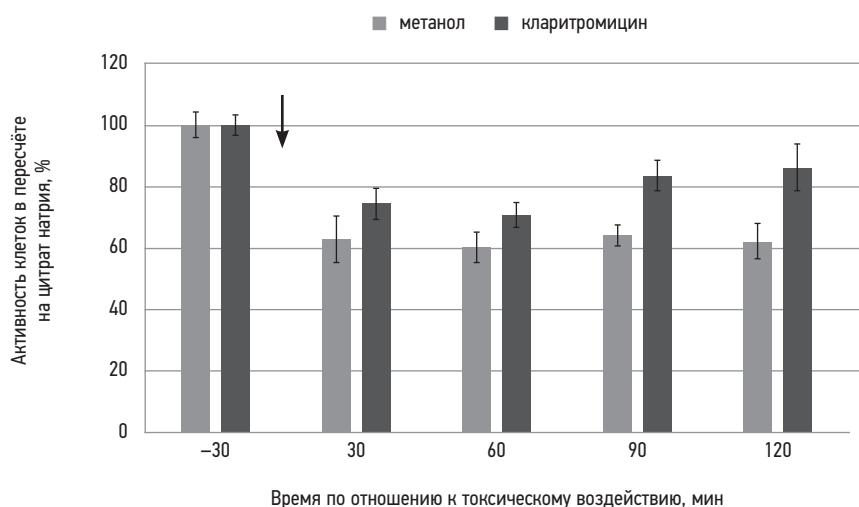


Рис. 5. Сигналы клеток на цитрат натрия до и после введения гепатотоксического агента. Стрелкой обозначено введение токсического агента (момент времени, соответствующий 0 мин).

В первые 30 мин после воздействия метанола и кларитромицина метаболическая активность клеток паренхимы печени крысы в ответ на добавление цитрата натрия снижалась на 37 и 25% от исходного уровня соответственно ($p < 0,05$). При этом активность клеток, подвергшихся воздействию метанола, оставалась на этом уровне и при повторном добавлении цитрата натрия в течение следующих 2 ч (рис. 5, оранжевые столбики). По-видимому, изменения, вызванные метанолом в ткани паренхимы печени, были необратимыми. В случае с кларитромицином наблюдалось некоторое постепенное восстановление активности клеток, хотя и не достигавшее исходного уровня за указанный период (рис. 5, зеленые столбики).

Таким образом, полученные данные продемонстрировали возможность отслеживания угнетения ткани печени в результате токсического воздействия и её частичного восстановления в случае, если это воздействие не являлось необратимым.

ОБСУЖДЕНИЕ

Первые работы, в которых описаны аналоги данного метода оценки физиолого-биохимического состояния клеток, относятся к периоду начального этапа изучения окислительного фосфорилирования. В то время ряд авторов использовали электрохимическое измерение растворённого кислорода в выделенных митохондриях, микросомах и лизатах клеток с целью анализа характеристик метаболических путей, вовлечённых в энергетический метаболизм, а также ферментов-оксидаз [8–11]. Такие методы позволяли, например, оценивать связь респираторной активности и синтеза аденозинтрифосфата и определять относительную активность ферментов цикла Кребса по потреблению кислорода при введении соответствующих субстратов [8], а также изучать кинетику уриказы [12] или моноаминоксидазы

[13] и влияние различных соединений на процессы окислительного фосфорилирования [14, 15]. Этот подход был близок к методике, использованной в данной работе, однако принципиально отличался от неё тем, что измерения выполняли в лизате или выделенных органеллах, а не в интактных клетках или тканях, и это резко ограничивало диапазон возможных вариантов его применения. В дальнейшем исследователи перешли к более чувствительным и селективным, хотя и более дорогостоящим и требовательным к пробоподготовке и квалификации работника методам, используемым и в настоящее время: хроматографии, спектрофотометрии, масс-спектрометрии, ядерному магнитному резонансу и т.д., а основной областью применения подхода на основе регистрации респираторной активности клеток стала разработка ферментных, микробных и тканевых биосенсоров, а также биотопливных ячеек [16–19]. В настоящее время использование электрохимических детекторов кислорода в биохимии сводится к частным аспектам, связанным с дыхательной активностью клеток, например к анализу потребления кислорода тканями без привязки к конкретным метаболическим процессам [20–24], оценке корреляции скорости потребления кислорода и метаболизма глюкозы [25], регистрации различий в эффективности окислительного фосфорилирования в митохондриях мышей различных линий [26], а также к дифференциации окислительного и гликолитического метаболизма кардиомиоцитов [27]. При этом авторы в основном интерпретируют регистрируемую респираторную активность как отражение окислительного фосфорилирования или других процессов, происходящих исключительно в митохондриях, и не связывают её с активностью клетки в целом и катаболическим профилем [28–32]. Ещё один подход, лежащий в основе таких исследований, связан с регистрацией активных форм кислорода в целях оценки антиоксидантной активности.

Так, S.T. Rajendran с соавт. [17] использовали в этих целях клетки кишечника, содержащие каталазу, что позволило сравнить антиоксидантные свойства нескольких лекарственных средств для перорального введения. Вместе с тем сфера применения описанного метода может быть существенно расширена, поскольку он предоставляет возможность количественного измерения процессов, происходящих в живых интактных клетках, в режиме реального времени, что невозможно для большинства других методов, входящих в арсенал современной биохимии. Полученные нами результаты продемонстрировали способность описанного в настоящей работе устройства на основе электрода Кларка с иммобилизованными фрагментами ткани регистрировать активность ферментных систем клеток при введении различных субстратов с возможностью составления метаболических профилей. Полученные профили, представляющие соотношение величин респираторной активности клеток в присутствии различных тестовых субстратов, можно использовать для оценки их состояния при воздействиях различной природы. Например, сопоставление полученного в условиях эксперимента и эталонного профилей позволит выявить различия между ними, сделать выводы о процессах, изменения в которых обуславливают эти различия, и, следовательно, о характере изменений в ходе исследуемого воздействия. Последовательное введение субстрата индуцируемого фермента или метаболического пути с регистрацией получаемого сигнала даст возможность судить о скорости и степени индукции этих ферментов в режиме реального времени. Аналогичным образом введение ингибитора соответствующего фермента может обеспечить отслеживание степени ингибирования и возможного последующего восстановления активности фермента. Резкое количественное снижение

метаболической активности при воздействии цитотоксического фактора служит показателем степени и интенсивности гибели или повреждения клеток, а последующее увеличение указанной активности при воздействии регенеративных стимулов, в том числе индуцируемых мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками, — показателем их восстановления. Таким образом, данный способ может обеспечить ускоренную и точную оценку физиолого-биохимического состояния клеток в режиме реального времени в различных условиях при минимальных затратах на оборудование и расходные материалы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе исследования разработан метод оценки физиолого-биохимических характеристик клеток, использованный для отслеживания метаболической активности, угнетения и восстановления клеток паренхимы печени при воздействии субстратов и токсических соединений.

ДОПОЛНИТЕЛЬНО

Источник финансирования. Исследование финансировалось из бюджетных источников в рамках Государственного задания № 122020100109-6.

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

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wang Z., Yip L.Y., Lee J.H.J., et al. Methionine is a metabolic dependency of tumor-initiating cells // *Nat Med.* 2019. Vol. 25, N 5. P. 825–837. doi: 10.1038/s41591-019-0423-5
2. Fenaille F., Barbier Saint-Hilaire P., Rousseau K., Junot C. Data acquisition workflows in liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry-based metabolomics: where do we stand? // *J Chromatogr A.* 2017. Vol. 1526. P. 1–12. doi: 10.1016/j.chroma.2017.10.043
3. Kumar M., Tanoj N., Saran S. A modified, efficient and sensitive pH indicator dye method for the screening of acid-producing acetobacter strains having potential application in bio-cellulose production // *Appl Biochem Biotechnol.* 2020. Vol. 191, N 2. P. 631–636. doi: 10.1007/s12010-019-03211-x
4. Mihooliya K.N., Nandal J., Swami L., et al. A new pH indicator dye-based method for rapid and efficient screening of l-asparaginase producing microorganisms // *Enzyme Microb Technol.* 2017. Vol. 107. P. 72–81. doi: 10.1016/j.enzmictec.2017.08.004
5. Schneider S., Ettenauer J., Pap I.J., et al. Main metabolites of pseudomonas aeruginosa: a study of electrochemical properties // *Sensors (Basel).* 2022. Vol. 22, N 13. P. 4694. doi: 10.3390/s22134694
6. Yu Y., Wang Y., Li M. Reliable method for the detection of horseradish peroxidase activity and enzyme kinetics // *Analyst.* 2019. Vol. 144, N 4. P. 1442–1447. doi: 10.1039/c8an02072h
7. Zhang J., Cui J., Liu Y., et al. A novel electrochemical method to determine α -amylase activity // *Analyst.* 2014. Vol. 139, N 13. P. 3429–3433. doi: 10.1039/c3an01839c
8. Ziegler F.D., Strickland E.H., Anthony A. Oxidative phosphorylation and respiratory regulation in rat liver homogenates measured with the oxygen electrode // *Rep US Army Med Res Lab.* 1962. P. 1–25.
9. Voss D.O., Cowles J.C., Bacila M. A new oxygen electrode model for the polarographic assay of cellular and mitochondrial respiration // *Anal Biochem.* 1963. Vol. 6. P. 211–222. doi: 10.1016/0003-2697(63)90128-3
10. Holtzman D., Moore C.L. A micro-method for the study of oxidative phosphorylation // *Biochim Biophys Acta.* 1971. Vol. 234, N 1. P. 1–8. doi: 10.1016/0005-2728(71)90122-8
11. Gaylor J.L., Miyake Y., Yamano T. Stoichiometry of 4-methyl

sterol oxidase of rat liver microsomes // *J Biol Chem.* 1975. Vol. 250, N 18. P. 7159–7167.

12. Pitts O.M., Priest D.G. A steady-state kinetic investigation of the uricase reaction mechanism // *Arch Biochem Biophys.* 1974. Vol. 163, N 1. P. 359–366. doi: 10.1016/0003-9861(74)90487-1

13. Weetman D.F., Sweetman A.J. Realistic estimations of kinetic constants for the oxidation of naturally occurring monoamines by monoamine oxidase // *Anal Biochem.* 1971. Vol. 41, N 2. P. 517–521. doi: 10.1016/0003-2697(71)90174-6

14. Clark J.B., Greenbaum A.L., Slater T.F. Effects of tetrazolium salts on oxidative phosphorylation in rat-liver mitochondria // *Biochem J.* 1965. Vol. 94, N 3. P. 651–654. doi: 10.1042/bj0940651

15. Haugaard N., Lee N.H., Kostrzewa R., et al. The role of sulfhydryl groups in oxidative phosphorylation and ion transport by rat liver mitochondria // *Biochim Biophys Acta.* 1969. Vol. 172, N 2. P. 198–204. doi: 10.1016/0005-2728(69)90063-2

16. Tedjo W., Chen T. An integrated biosensor system with a high-density microelectrode array for real-time electrochemical imaging // *IEEE Trans Biomed Circuits Syst.* 2020. Vol. 14, N 1. P. 20–35. doi: 10.1109/TBCAS.2019.2953579

17. Rajendran S.T., Huszno K., Debowski G., et al. Tissue-based biosensor for monitoring the antioxidant effect of orally administered drugs in the intestine // *Bioelectrochemistry.* 2021. Vol. 138. P. 107720. doi: 10.1016/j.bioelechem.2020.107720

18. Cai Y., Wang M., Xiao X., et al. A membraneless starch/O₂ biofuel cell based on bacterial surface regulable displayed sequential enzymes of glucoamylase and glucose dehydrogenase // *Biosens Bioelectron.* 2022. Vol. 207. P. 114197. doi: 10.1016/j.bios.2022.114197

19. Emelyanova E.V., Antipova T.V. Biosensor approach for electrochemical quantitative assessment and qualitative characterization of the effect of fusaric acid on a culture-receptor // *J Biotechnol.* 2022. Vol. 357. P. 1–8. doi: 10.1016/j.jbiotec.2022.08.004

20. Hiramoto K., Yasumi M., Ushio H., et al. Development of oxygen consumption analysis with an on-chip electrochemical device and simulation // *Anal Chem.* 2017. Vol. 89, N 19. P. 10303–10310. doi: 10.1021/acs.analchem.7b02074

21. Rejmstad P., Johansson J.D., Haj-Hosseini N., et al. A method for monitoring of oxygen saturation changes in brain tissue using diffuse reflectance spectroscopy // *J Biophotonics.* 2017. Vol. 10, N 3. P. 446–455. doi: 10.1002/jbio.201500334

22. Thews O., Vaupel P. Spatial oxygenation profiles in tumors during normo- and hyperbaric hyperoxia // *Strahlenther Onkol.* 2015. Vol. 191, N 11. P. 875–882. doi: 10.1007/s00066-015-0867-6

23. Lau J.C., Linsenmeier R.A. Oxygen consumption and distribution in the Long-Evans rat retina // *Exp Eye Res.* 2012. Vol. 102. P. 50–58. doi: 10.1016/j.exer.2012.07.004

24. Sakr Y. Techniques to assess tissue oxygenation in the clinical setting // *Transfus Apher Sci.* 2010. Vol. 43, N 1. P. 79–94. doi: 10.1016/j.transci.2010.05.012

25. Sekine K., Kagawa Y., Maeyama E., et al. Oxygen consumption of human heart cells in monolayer culture // *Biochem Biophys Res Commun.* 2014. Vol. 452, N 3. P. 834–839. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.09.018

26. McDonald J.M., Ramsey J.J., Miner J.L., et al. Differences in mitochondrial efficiency between lines of mice divergently selected for heat loss // *J Anim Sci.* 2009. Vol. 87, N 10. P. 3105–3113. doi: 10.2527/jas.2009-1935

27. Tanumihardja E., Slaats R.H., van der Meer A.D., et al. Measuring both pH and O₂ with a single on-chip sensor in cultures of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes to track induced changes in cellular metabolism // *ACS Sens.* 2021. Vol. 6, N 1. P. 267–274. doi: 10.1021/acssensors.0c02282

28. Godsman N., Kohlhaas M., Nickel A., et al. Metabolic alterations in a rat model of Takotsubo syndrome // *Cardiovasc Res.* 2022. Vol. 118, N 8. P. 1932–1946. doi: 10.1093/cvr/cvab081

29. Pandya J.D., Sullivan P.G., Leung L.Y., et al. Advanced and high-throughput method for mitochondrial bioenergetics evaluation in neurotrauma // *Methods Mol Biol.* 2016. Vol. 1462. P. 597–610. doi: 10.1007/978-1-4939-3816-2_32

30. Divakaruni A.S., Rogers G.W., Murphy A.N. Measuring mitochondrial function in permeabilized cells using the Seahorse XF analyzer or a Clark-type oxygen electrode // *Curr Protoc Toxicol.* 2014. Vol. 60. P. 25.2.1–25.2.16. doi: 10.1002/0471140856.tx2502s60

31. Vial G., Guigas B. Assessing mitochondrial bioenergetics by respirometry in cells or isolated organelles // *Methods Mol Biol.* 2018. Vol. 1732. P. 273–287. doi: 10.1007/978-1-4939-7598-3_18

32. Silva A.M., Oliveira P.J. Evaluation of respiration with Clark type electrode in isolated mitochondria and permeabilized animal cells // *Methods Mol Biol.* 2012. Vol. 810. P. 7–24. doi: 10.1007/978-1-61779-382-0_2

REFERENCES

1. Wang Z, Yip LY, Lee JHJ, et al. Methionine is a metabolic dependency of tumor-initiating cells. *Nat Med.* 2019;25(5):825–837. doi: 10.1038/s41591-019-0423-5

2. Fenaille F, Barbier Saint-Hilaire P, Rousseau K, et al. Data acquisition workflows in liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry-based metabolomics: where do we stand? *J Chromatogr A.* 2017;1526:1–12. doi: 10.1016/j.chroma.2017.10.043

3. Kumar M, Tanoj N, Saran S. A modified, efficient and sensitive pH indicator dye method for the screening of acid-producing acetobacter strains having potential application in bio-cellulose production. *Appl Biochem Biotechnol.* 2020;191(2):631–636. doi: 10.1007/s12010-019-03211-x

4. Mihooliya KN, Nandal J, Swami L, et al. A new pH indicator dye-based method for rapid and efficient screening of L-asparaginase producing microorganisms. *Enzyme Microb Technol.* 2017;107:72–81. doi: 10.1016/j.enzmictec.2017.08.004

5. Schneider S, Ettenauer J, Pap IJ, et al. Main metabolites of pseudomonas aeruginosa: a study of electrochemical properties. *Sensors (Basel).* 2022;22(13):4694. doi: 10.3390/s22134694

6. Yu Y, Wang Y, Li M. Reliable method for the detection of horseradish peroxidase activity and enzyme kinetics. *Analyst.* 2019; 144(4):1442–1447. doi: 10.1039/c8an02072h

7. Zhang J, Cui J, Liu Y, et al. A novel electrochemical method to determine α-amylase activity. *Analyst.* 2014;139(13):3429–3433. doi: 10.1039/c3an01839c

8. Ziegler FD, Strickland EH, Anthony A. Oxidative phosphorylation and respiratory regulation in rat liver homogenates measured with the oxygen electrode. *Rep US Army Med Res Lab.* 1962;1–25.

9. Voss DO, Cowles JC, Bacila M. A new oxygen electrode model for the polarographic assay of cellular and mitochondrial respiration. *Anal Biochem.* 1963;6:211–222. doi: 10.1016/0003-2697(63)90128-3

10. Holtzman D, Moore CL. A micro-method for the study of oxida-

- tive phosphorylation. *Biochim Biophys Acta*. 1971;234(1):1–8. doi: 10.1016/0005-2728(71)90122-8
11. Gaylor JL, Miyake Y, Yamano T. Stoichiometry of 4-methyl sterol oxidase of rat liver microsomes. *J Biol Chem*. 1975;250(18):7159–7167.
12. Pitts OM, Priest DG. A steady-state kinetic investigation of the uricase reaction mechanism. *Arch Biochem Biophys*. 1974;163(1):359–366. doi: 10.1016/0003-9861(74)90487-1
13. Weetman DF, Sweetman AJ. Realistic estimations of kinetic constants for the oxidation of naturally occurring monoamines by monoamine oxidase. *Anal Biochem*. 1971;41(2):517–521. doi: 10.1016/0003-2697(71)90174-6
14. Clark JB, Greenbaum AL, Slater TF. Effects of Tetrazolium salts on oxidative phosphorylation in rat-liver mitochondria. *Biochem J*. 1965;94(3):651–654. doi: 10.1042/bj0940651
15. Haugaard N, Lee NH, Kostrzewa R, et al. The role of sulfhydryl groups in oxidative phosphorylation and ion transport by rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. 1969;172(2):198–204. doi: 10.1016/0005-2728(69)90063-2
16. Tedjo W, Chen T. An Integrated biosensor system with a high-density microelectrode array for real-time electrochemical imaging. *IEEE Trans Biomed Circuits Syst*. 2020;14(1):20–35. doi: 10.1109/TBCAS.2019.2953579
17. Rajendran ST, Huszno K, Debowski G, et al. Tissue-based biosensor for monitoring the antioxidant effect of orally administered drugs in the intestine. *Bioelectrochemistry*. 2021;138:107720. doi: 10.1016/j.bioelechem.2020.107720
18. Cai Y, Wang M, Xiao X, et al. A membraneless starch/O₂ biofuel cell based on bacterial surface regulable displayed sequential enzymes of glucoamylase and glucose dehydrogenase. *Biosens Bioelectron*. 2022;207:114197. doi: 10.1016/j.bios.2022.114197
19. Emelyanova EV, Antipova TV. Biosensor approach for electrochemical quantitative assessment and qualitative characterization of the effect of fusaric acid on a culture-receptor. *J Biotechnol*. 2022;357:1–8. doi: 10.1016/j.jbiotec.2022.08.004
20. Hiramoto K, Yasumi M, Ushio H, et al. Development of oxygen consumption analysis with an on-chip electrochemical device and simulation. *Anal Chem*. 2017;89(19):10303–10310. doi: 10.1021/acs.analchem.7b02074
21. Rejmstad P, Johansson JD, Haj-Hosseini N, et al. A method for monitoring of oxygen saturation changes in brain tissue using diffuse reflectance spectroscopy. *J Biophotonics*. 2017;10(3):446–455. doi: 10.1002/jbio.201500334
22. Thews O, Vaupel P. Spatial oxygenation profiles in tumors during normo- and hyperbaric hyperoxia. *Strahlenther Onkol*. 2015;191(11):875–882. doi: 10.1007/s00066-015-0867-6
23. Lau JC, Linsenmeier RA. Oxygen consumption and distribution in the Long-Evans rat retina. *Exp Eye Res*. 2012;102:50–58. doi: 10.1016/j.exer.2012.07.004
24. Sakr Y. Techniques to assess tissue oxygenation in the clinical setting. *Transfus Apher Sci*. 2010;43(1):79–94. doi: 10.1016/j.transci.2010.05.012
25. Sekine K, Kagawa Y, Maeyama E, et al. Oxygen consumption of human heart cells in monolayer culture. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;452(3):834–839. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.09.018
26. McDonald JM, Ramsey JJ, Miner JL, et al. Differences in mitochondrial efficiency between lines of mice divergently selected for heat loss. *J Anim Sci*. 2009;87(10):3105–3113. doi: 10.2527/jas.2009-1935
27. Tanumihardja E, Slaats RH, van der Meer AD, et al. Measuring both pH and O₂ with a single on-chip sensor in cultures of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes to track induced changes in cellular metabolism. *ACS Sens*. 2021;6(1):267–274. doi: 10.1021/acssensors.0c02282
28. Godsman N, Kohlhaas M, Nickel A, et al. Metabolic alterations in a rat model of Takotsubo syndrome. *Cardiovasc Res*. 2022;118(8):1932–1946. doi: 10.1093/cvr/cvab081
29. Pandya JD, Sullivan PG, Leung LY, et al. Advanced and high-throughput method for mitochondrial bioenergetics evaluation in neurotrauma. *Methods Mol Biol*. 2016;1462:597–610. doi: 10.1007/978-1-4939-3816-2_32
30. Divakaruni AS, Rogers GW, Murphy AN. Measuring mitochondrial function in permeabilized cells using the seahorse XF analyzer or a clark-type oxygen electrode. *Curr Protoc Toxicol*. 2014;60:25.2.1–25.2.16. doi: 10.1002/0471140856.tx2502s60
31. Vial G, Guigas B. Assessing mitochondrial bioenergetics by respirometry in cells or isolated organelles. *Methods Mol Biol*. 2018;1732:273–287. doi: 10.1007/978-1-4939-7598-3_18
32. Silva AM, Oliveira PJ. Evaluation of respiration with clark type electrode in isolated mitochondria and permeabilized animal cells. *Methods Mol Biol*. 2012;810:7–24. doi: 10.1007/978-1-61779-382-0_2

ОБ АВТОРАХ

* **Ильясов Павел Владимирович**, к.б.н.;
адрес: 443099, Россия, Самара, ул. Чапаевская, д. 89;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1532-0272>;
eLibrary SPIN: 8018-3913;
e-mail: p.v.ilyasov@samsmu.ru

Гусева Ольга Сергеевна, к.в.н.;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0499-4631>;
eLibrary SPIN: 6482-6552

Курицына Анна Павловна;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2799-7632>

Лимарева Лариса Владимировна, д.б.н., доцент;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4529-5896>;
eLibrary SPIN: 8741-4433

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

AUTHORS' INFO

* **Pavel V. Ilyasov**, Cand. Sci. (Biol.);
address: 89 Chapaevskaya street, 44309 Samara, Russia;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1532-0272>;
eLibrary SPIN: 8018-3913;
e-mail: p.v.ilyasov@samsmu.ru

Olga S. Guseva, Cand. Sci. (Vet.);
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0499-4631>;
eLibrary SPIN: 6482-6552

Anna P. Kuricyna;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2799-7632>

Larisa V. Limareva, Dr. Sci. (Biol.), Associate Professor;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4529-5896>;
eLibrary SPIN: 8741-4433