

УДК [57.088.6+57.085.23::612.112.94:[577.121.7+57.083.37::547.874]

ОЦЕНКА ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ 2-(ХЛОРДИНИТРОМЕТИЛ)-4-МЕТОКСИ-6-(4-МЕТИЛПИПЕРАЗИН-1-ИЛ)-1,3,5-ТРИАЗИНА ПО ДЫХАТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ЛИМФОЦИТОВ

© 2023 г. П. В. Ильясов^а, Л. В. Лимарева^а, А. И. Сизова^{а, *},
В. А. Заломленков^б, А. П. Курицына^а

^аСамарский государственный медицинский университет Минздрава России,
г. Самара, 443099 Россия

^бСамарский государственный технический университет,
г. Самара, 443100 Россия

*e-mail: a.i.sizova@samsmu.ru

Поступила в редакцию 20.04.2023 г.

После доработки 18.05.2023 г.

Принята к публикации 19.05.2023 г.

Метод оценки метаболических характеристик интактных клеток на основе регистрации их дыхательной активности использовали для отслеживания реакции лимфоцитов на потенциальный фармакологический агент 2-(хлординитрометил)-4-метокси-6-(4-метилпиперазин-1-ил)-1,3,5-триазин. Использованный метод обеспечил выполнение анализа цитотоксического действия тестируемого соединения, что позволило определить его пороговые токсические концентрации для лимфоцитов человека. Показано, что полученные результаты согласуются с данными эталонного метода — МТТ-теста цитотоксичности.

Ключевые слова: цитотоксичность, дыхательная активность, лимфоциты, противоопухолевый агент, электрод Кларка, триазин

DOI: 10.31857/S0233475523050055, **EDN:** OETRRZ

ВВЕДЕНИЕ

Общеизвестно, что клетки живых организмов характеризуются широким разнообразием метаболических путей и ферментов, которые их и осуществляют. Активность этих ферментов обеспечивает жизнеспособность клеток и опосредует все происходящие в них процессы. Особенности этих процессов отражают состояние клеток и могут использоваться в целях диагностики и прогнозирования этого состояния при воздействии различных факторов (в том числе токсических соединений), что находит применение в различных областях биологии и медицины [1].

Почти любой процесс окисления и утилизации органических веществ в живых клетках в конечном итоге замыкается на компонентах электрон-транспортной дыхательной цепи. Это приводит к поглощению кислорода клетками из окружающей среды. При этом уровень такого поглощения кислорода пропорционален метаболической активности клеток и зависит как от используемого субстрата, так и от состояния клеток и наличия в них тех или иных ферментов [2]. Очевидно, что клетки различных организмов или тканей, а так-

же клетки, подвергавшиеся или не подвергавшиеся какому-либо значимому воздействию, будут характеризоваться качественными и количественными различиями активности в отношении набора определенных субстратов. Следовательно, поглощение кислорода при разложении и трансформации субстратов клетками также можно использовать для оценки биохимических особенностей этих клеток и их состояния в целом.

Электрод Кларка широко используется для измерения концентрации кислорода в физиологических жидкостях, а также для разработки ферментных и клеточных биосенсоров — устройств на биологической основе для измерения концентрации определенных веществ в среде. При формировании таких биосенсоров биологический материал (фермент или клетки), способный окислять анализируемое вещество с потреблением кислорода, располагают в непосредственной близости от рабочей зоны электрода Кларка. При наличии анализируемого вещества в среде оно контактирует с этим ферментом или клетками, окисляется ими, при этом концентрация кислорода снижается пропорционально интенсивности такого окисления, что и регистрирует электрод [3, 4].

Однако, как следует из вышеизложенного, подобные устройства можно использовать не только для химического анализа компонентов среды, но и для оценки состояния или гибели клеток.

Первые работы, в которых описаны аналоги такого подхода, относятся к 60-м годам прошлого века. В то время ряд авторов измеряли поглощение кислорода в выделенных митохондриях и лизатах клеток для определения активности некоторых ферментов [5–8]. Этот подход был близок к методике, использованной в данной работе, однако авторы всех этих работ выполняли анализ в клеточном лизате или выделенных органеллах, а не в живых клетках. В дальнейшем исследователи стали использовать в этих целях другие методы — спектрофотометрию, масс-спектрометрию, хроматографию и т.д., а основной областью применения исследований дыхательной активности клеток стала разработка биосенсоров и биотопливных ячеек [9–12]. В настоящее время использование электрохимической регистрации кислорода в биохимии сводится к частным аспектам, связанным с дыхательной активностью клеток [13–17]. При этом авторы, как правило, считают регистрируемую активность следствием процессов, происходящих только в митохондриях, и не связывают ее с активностью клетки в целом [18–22]. Вместе с тем, сфера применения такого подхода может быть существенно расширена с учетом того, что 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.

В ряде работ для оценки токсического действия различных факторов на клетки используются так называемые сенсоры токсичности — биосенсорные устройства, в которых применяют клетки, гибнущие или снижающие свою активность при контакте с исследуемым веществом. Описано, например, использование таких сенсоров на основе бактериальных клеток для тестирования эффективности антибиотиков и генотоксичных веществ [23, 24]. Сенсоры токсичности могут быть основаны как на оценке дыхательной активности (в том числе посредством электрода Кларка) [25], так и на других принципах, например, измерении биолюминесценции [26]. Следует отметить, что сенсоры токсичности применяют не только для тестирования лекарственных препаратов, но и при выявлении неблагоприятных факторов в экосистемах в природоохранных целях [27].

Исходя из вышесказанного, можно сделать вывод, что дыхательную активность клеток можно рассматривать как показатель интегральной активности их аэробных ферментных систем при

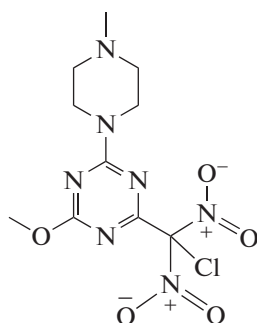
введении различных субстратов, в том числе токсических соединений и, в частности, потенциальных противоопухолевых агентов. Снижение метаболической активности при воздействии токсического фактора в таком случае будет являться показателем степени и интенсивности гибели или повреждения клеток. Подобный подход, основанный на измерении потребления кислорода и выделения кислых продуктов, использован компанией Agilent в анализаторе Seahorse XF для исследования различных аспектов функционирования клеток, в том числе для тестирования потенциальных лекарственных препаратов [28]. Кроме того, реализация этого подхода для оценки цитотоксичности кларитромицина и метанола для срезов печени описана авторами в статье [29].

В данной работе предпринято исследование возможности использования подхода, основанного на применении кислородного электрода Кларка с иммобилизованными лимфоцитами человека, для оценки цитотоксичности потенциального противоопухолевого препарата 2-(хлординитрометил)-4-метокси-6-(4-метилпиперазин-1-ил)-1,3,5-триазина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа была выполнена на базе лаборатории неинфекционной иммунологии Научно-образовательного профессионального центра генетических и лабораторных технологий (НОПЦ ГЛТ) ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России.

В качестве тестируемого цитотоксического соединения использовали потенциальный противоопухолевый агент 2-(хлординитрометил)-4-метокси-6-(4-метилпиперазин-1-ил)-1,3,5-триазин (2-ХММТ), синтезированный в Самарском государственном техническом университете (рис. 1). Его близкие аналоги известны как пролекарства, которые для проявления своей противоопухолевой активности должны пройти ряд метаболических превращений в организме, в результате которых образуются алкилирующие агенты [30]. Последние, вступая в реакцию с нуклеотидами и внедряясь в ДНК и РНК опухолевой клетки, блокируют ее деление и экспрессию генов, что считается основным, но не единственным цитотоксическим эффектом подобных соединений. Примером триазина, используемого для лечения злокачественных заболеваний, является алтретамин, который применяют в схемах лечения рака яичников. Согласно результатам QSAR-моделирования на веб-ресурсе PASS Online (<http://www.way2drug.com/passonline/index.php>), 2-ХММТ является потенциальным алкилирующим агентом, ингибитором лейकोпоэза, взаимодействует с рядом цитокинов, выделяемых лейкоцитами, и обладает терапевтическим потенциалом при лечении глиомы, рака яичников и рака костей.



2-(хлординитрометил)-4-метокси-6-(4-метил-пиперазин-1-ил)-1,3,5-триазин (2-ХММТ)

Рис. 1. Структурная формула протестированного потенциального противоопухолевого агента.

С учетом этого, в качестве клеток-мишеней нами были выбраны лимфоциты (моноклеары периферической крови) условно здоровых добровольцев. Выбор данных клеток обусловлен доступностью биоматериала, простотой выделения, ведущей ролью в поддержании иммунного гомеостаза организма, особенно при проведении химиотерапии, а также достаточно высокой чувствительностью к действию цитотоксических препаратов.

Исследование выполняли на образцах цельной периферической венозной крови, которую забирали путем венепункции в вакутейнеры с EDTA K2. Все пробы периферической крови доставляли в лабораторию с соблюдением температурного режима и подвергали исследованию не позже 2 ч после взятия.

Лимфоциты, выделенные центрифугированием на градиенте плотности фикола $\rho = 1.077 \text{ г/см}^3$ (ООО “БиолоГ”, Россия), непосредственно после выделения нанесли на хроматографическую стекlobумагу GF/A (Whatman, Великобритания) из расчета порядка 2–3 миллионов клеток на одно нанесение. Такое количество клеток занимало на носителе площадь порядка $3 \times 3 \text{ мм}$. Этот фрагмент стекlobумаги с клетками помещали в рабочую зону кислородного электрода Кларка ДКТП-02.4, подключенного к анализатору “Эксперт-001” (ООО “Эконикс-Эксперт”, Россия), 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) и размещенную на магнитной мешалке, и тщательно промывали, несколько раз меняя раствор, до установления стабильной концентрации растворенного кислорода в окружении клеток, после чего в кювету вносили субстрат и регистрировали изменение концентрации растворенного кислорода.

В качестве потенциальных индикаторных субстратов, ответ на которые можно было бы считать показателем метаболической активности лимфоцитов, использовали растворы глюкозы, глицина, лизина, орнитина, глицерофосфата натрия, цитрата натрия и тартрата натрия (ООО “АО РЕА-ХИМ”, Россия), конечная концентрация субстратов в кювете составляла 50 мМ. Целью данного этапа являлся поиск оптимального субстрата, вызывающего выраженную дыхательную активность клеток и заведомо не оказывающего токсического влияния. Выбор соединений основывался на их принадлежности к субстратам центрального метаболизма или близким производным, способным проходить через клеточные мембраны и опосредованно вовлекаемым в процесс окислительного фосфорилирования (как известно, сопровождающегося потреблением кислорода) через NAD-зависимые дегидрогеназы (глюкоза, глицерофосфат, цитрат, тартрат), либо к аминокислотам, которые участвуют во многих биохимических процессах в клетке и также могут использоваться в реакциях центрального метаболизма после дез- или трансаминирования.

Регистрацию и обработку сигналов осуществляли на персональном компьютере с использованием программного обеспечения Эксперт-00х (ООО “Эконикс-Эксперт”) в течение ~5–10 мин, после чего электрод вместе с клетками промывали путем многократной смены рабочей среды до восстановления исходного равновесного уровня кислорода в кювете (~5–15 мин). Данный подход обеспечивал многократное использование клеток без их замены. В качестве измеряемой величины сигнала и условного показателя активности клеток в данной системе использовали максимальную скорость изменения концентрации растворенного кислорода после внесения субстрата (мг O₂/л с), рассчитанную в программном обеспечении Эксперт-00х. В дальнейшем для этого параметра использовали термин “ответ” клеток на исследуемый субстрат. Каждое измерение в ходе экспериментов выполняли в трех повторях.

В экспериментах по оценке токсического воздействия 2-ХММТ вначале (т.е. до введения тестируемого соединения) регистрировали ответ лимфоцитов на глицерофосфат натрия, который принимали за 100% по отношению к ответам на данный субстрат, регистрируемым далее в ходе эксперимента после воздействия 2-ХММТ. После этого выполняли промывку кюветы рабочей средой до установления стабильной концентрации растворенного кислорода в окружении клеток, и по ее окончании в кювету добавляли раствор 2-ХММТ и измеряли потребление кислорода в течение 30 мин. Затем вновь выполняли промывку рабочей средой и повторно измеряли ответ на глицерофосфат натрия для оценки остаточной метаболической активности клеток. Такой

цикл, за исключением регистрации начального ответа на глицерофосфат, выполняли для каждой протестированной концентрации 2-ХММТ, причем учитываемыми параметрами являлись как непосредственный ответ клеток на токсический субстрат, так и их остаточная активность после его воздействия.

В качестве эталонного метода для оценки цитотоксичности 2-ХММТ использовали МТТ-тест, основанный на применении тетразолиевого красителя, свободно проникающего через мембраны клеток и преобразуемого ферментами митохондрий живых клеток в окрашенное соединение — формазан. В погибших клетках эти ферменты не действуют и такого преобразования не происходит, поэтому интенсивность полученного окрашивания прямо пропорциональна количеству живых (т.е. выживших после действия препарата) клеток в лунке [31].

Для проведения МТТ-теста выделенные на градиенте плотности фикола лимфоциты культивировали в стерильных условиях в полной питательной среде, содержащей или не содержащей различные концентрации 2-ХММТ. Полная питательная среда состояла из среды 199 с *L*-глутамином и 10% сыворотки эмбрионов крупного рогатого скота (ООО “БиолоТ”, Россия). Лимфоциты инкубировали в полистироловых 96-луночных планшетах (АО “Фирма Медполимер”, Россия) из расчета 300 тысяч клеток на лунку при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение 72 ч. Для оценки ингибиторного эффекта 2-ХММТ в лунки вносили водные растворы препарата в концентрациях 50, 10 и 5 мкМ.

По истечении 70 ч инкубирования планшет доставали из CO₂-инкубатора, переносили в ламинарный бокс и в каждую лунку планшета добавляли по 10 мкл раствора МТТ в концентрации (8 мг/мл), перемешивали покачиванием и дополнительно инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение 2 ч. По истечении этого времени планшет центрифугировали в течение 10 мин при 400 g, а затем с помощью автоматического лабораторного дозатора удаляли культуральную среду, не затрагивая осевшие клетки, после чего добавляли диметилсульфоксид в объеме 200 мкл для сольubilизации формазана.

Оптическую плотность во всех лунках планшета измеряли при длине волны 570 нм на многофункциональном планшетном ридере Tecan Infinity 200 Pro (Tecan Instruments, Австрия). По полученным данным рассчитывали процент жизнеспособности клеток в каждой лунке относительно контроля с построением графиков зависимости процента жизнеспособных клеток от концентрации 2-ХММТ с последующим определением пороговой токсической концентрации и концентрации полумаксимального ингибирования IC₅₀.

Пороговой токсической концентрацией считали концентрацию 2-ХММТ, обеспечивавшую минимальный (пороговый) токсический эффект, статистически значимо отличающийся от показателя, наблюдаемого для образца, не содержащего тестируемого соединения.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием Microsoft Office Excel 2016 с надстройкой Attestat 12.5 (И.П. Гайдышев, Россия). Для оценки статистической значимости различия показателей использовали критерий Манна–Уитни. Статистически значимыми считали различия при уровне значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Применение кислородного электрода Кларка с нанесенными в область рабочей зоны лимфоцитами позволяло регистрировать потребление кислорода клетками в реальном времени. После промывки в окружении лимфоцитов устанавливалась постоянная концентрация кислорода, отражающая равновесие между фоновыми метаболическими процессами в клетках и поступлением кислорода в рабочую среду из атмосферы при перемешивании среды на мешалке. Это отображалось на графике регистрируемого сигнала в виде горизонтальной линии. После введения субстрата в кювету происходило его равномерное перемешивание, поглощение и утилизация клетками в ходе метаболических реакций. Это приводило к снижению концентрации кислорода в рабочей среде вследствие усиления окислительных процессов в клетках, сопровождающихся активизацией их дыхательной цепи. При введении токсических соединений, напротив, наблюдалось увеличение концентрации растворенного кислорода ввиду угнетения фонового окислительного метаболизма клеток, и такой ответ в дальнейшем называли “токсическим ответом” (рис. 2).

Скорость снижения концентрации кислорода была пропорциональна концентрации субстрата, однако отличалась для различных субстратов, вводимых в одинаковых концентрациях. На рис. 3 приведен набор ответов лимфоцитов на различные протестированные субстраты. Из данного графика видно, что интактные лимфоциты обладали наибольшей чувствительностью по отношению к органическим кислотам, в то время как их активность в отношении глюкозы и аминокислот была незначительной. Максимальная активность была продемонстрирована в отношении глицерофосфата натрия, ответ на который был принят при сравнении с остальными субстратами за 100%. Это соединение является одним из промежуточных продуктов липидного и углеводного обмена, предшественником пирувата и ацетил-КоА и, таким образом, вовлечено в широкий спектр метаболических реакций. Исходя из полу-

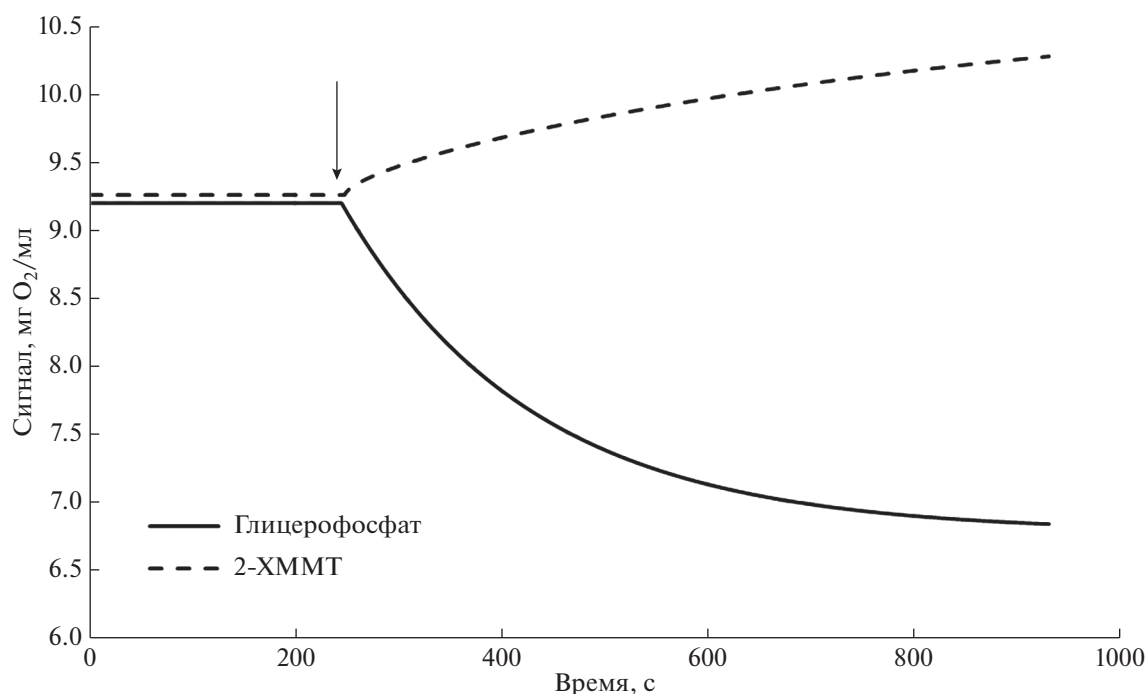


Рис. 2. Записи сигналов электрода с клетками при введении глицерофосфата и 2-ХММТ в кювету. Стрелкой отмечен момент ввода субстратов.

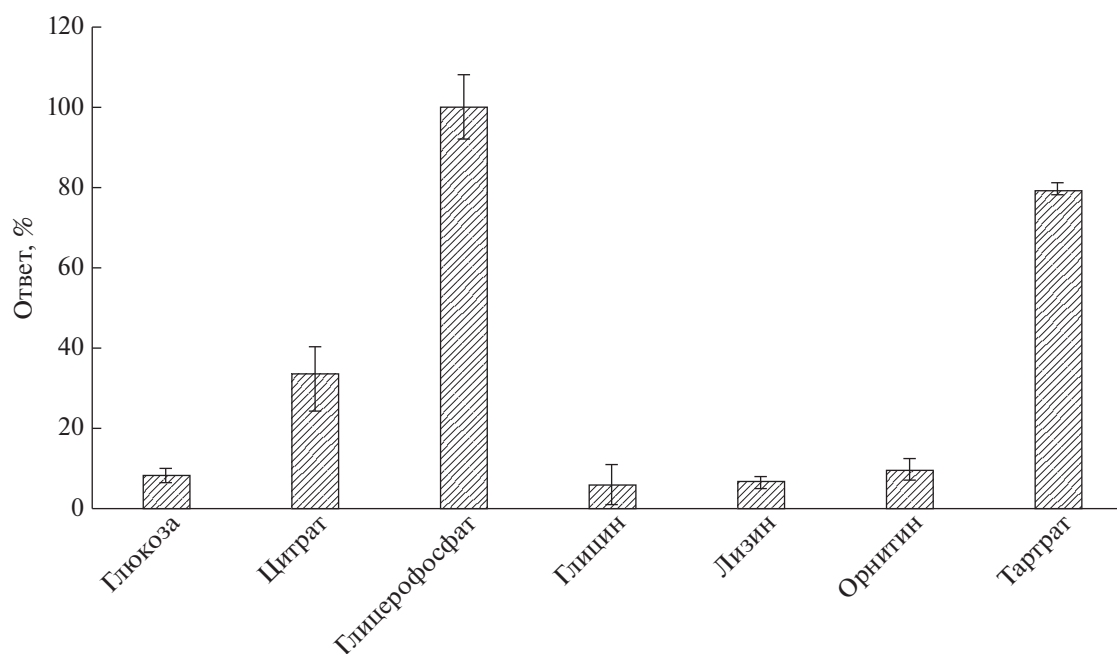


Рис. 3. Набор ответов лимфоцитов на 7 различных субстратов. Ответы клеток на субстраты приведены в процентах от ответа на глицерофосфат натрия, принятого за 100%. Концентрация всех субстратов составляла 50 мМ.

ченных данных, глицерофосфат натрия использовали в дальнейших экспериментах в качестве индикаторного субстрата для учета остаточной метаболической активности лимфоцитов, по-

скольку выраженный ответ клеток на него позволял рассчитывать на более высокую информативность оценки остаточной метаболической активности по сравнению с остальными субстратами в

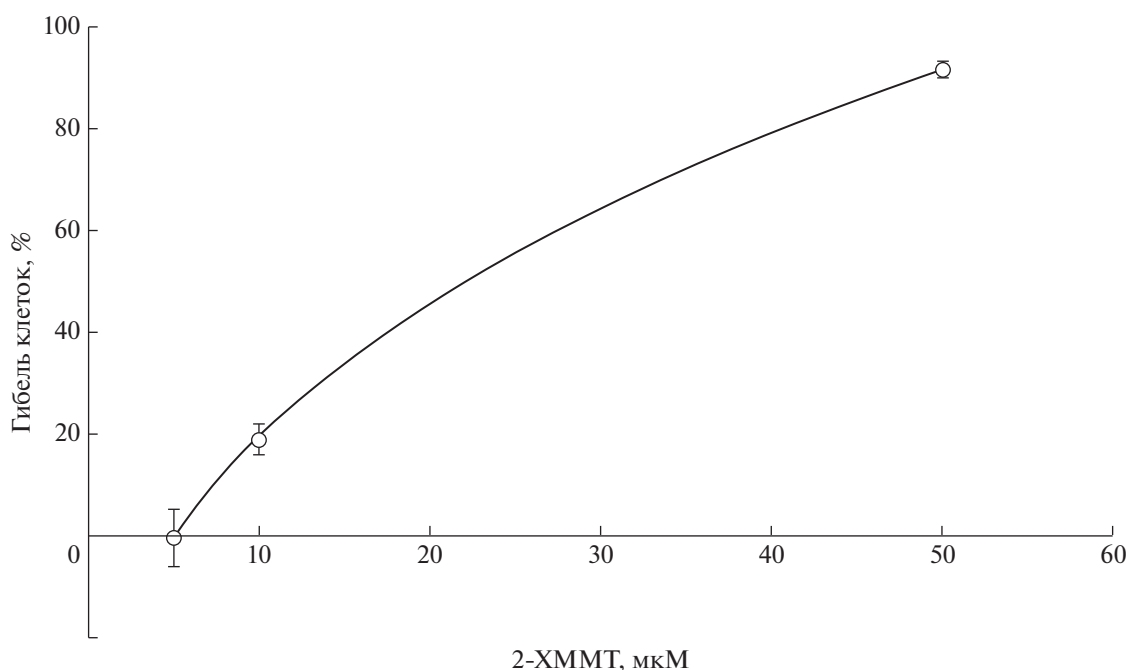


Рис. 4. Цитотоксическое действие 2-ХММТ на лимфоциты периферической крови согласно МТТ-тесту.

случае выраженного токсического действия тестируемого триазина на лимфоциты.

На рис. 4 приведены зависимости цитотоксического действия 2-ХММТ от его концентрации в ходе МТТ-теста. Продemonстрировано увеличение цитотоксического эффекта тестируемого соединения в зависимости от его концентрации, причем пороговая токсическая концентрация составила 8.1 ± 0.1 мкМ, а $IC_{50} - 22.1 \pm 2.0$ мкМ. Таким образом, 2-ХММТ оказывает выраженное цитотоксическое действие на лимфоциты, приводящее к их гибели.

На рис. 5 приведены измеренные с помощью электрода Кларка зависимости реакции лимфоцитов на 2-ХММТ от его концентрации: график величины непосредственного токсического ответа клеток на соединение (измеряемой в ходе регистрации сигнала в присутствии тестируемого триазина в кювете), показанный сплошной линией, и график величины остаточной активности клеток после действия соответствующей концентрации триазина, показанный пунктирной линией. За остаточную активность лимфоцитов, как указано выше, принимали величину ответа клеток на глицерофосфат натрия, вводимый после регистрации ответа на соответствующую концентрацию 2-ХММТ и промывки электрода с клетками, в процентах от ответа на глицерофосфат в начале эксперимента (до введения тестируемого соединения). Графики демонстрируют увеличение токсического ответа лимфоцитов, а также снижение остаточной активности в прямой зависимости от

концентрации 2-ХММТ, что указывало на подавление метаболической активности клеток, обусловленное токсическим действием этого соединения. С учетом данных МТТ-теста представляется возможным интерпретировать снижение остаточной активности как гибель клеток в результате цитотоксического эффекта.

На основании полученных зависимостей были определены пороговые концентрации триазина как в отношении непосредственной реакции клеток на воздействие соединений, так и в отношении остаточной активности клеток после такого воздействия. Под пороговой концентрацией, как и в случае МТТ-теста, подразумевали наименьшую концентрацию 2-ХММТ, при которой соответствующая реакция клеток (токсический ответ или остаточная активность) статистически значимо отличалась от исходной величины.

Минимальная концентрация 2-ХММТ, обеспечивавшая значимый токсический ответ лимфоцитов в данном методе, составила 4.0 ± 0.4 мкМ, а минимальная концентрация, после которой наблюдалось значимое снижение остаточной активности, — 22.9 ± 2.8 мкМ. Таким образом, использованный метод позволял регистрировать эффект концентраций тестируемого соединения, которые при кратковременном (менее 30 мин) воздействии еще не приводили к гибели клеток, вызывая лишь их метаболическую реакцию. Отметим, что пороговая концентрация, позволявшая регистрировать токсический ответ лимфоцитов с помощью электрода Кларка, была вдвое

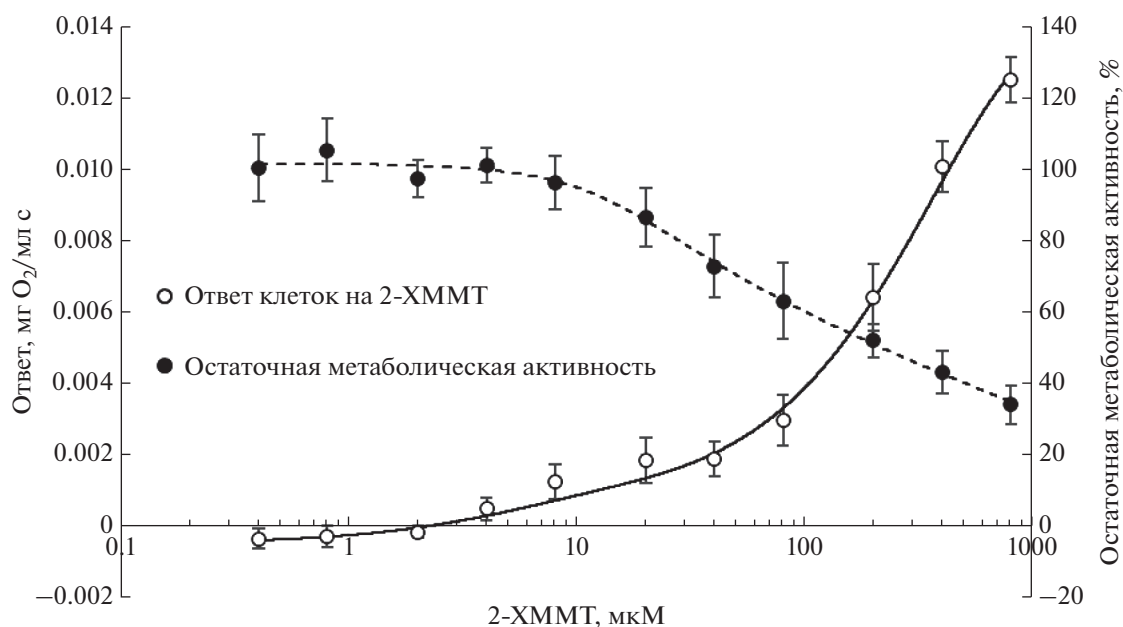


Рис. 5. Графики реакции лимфоцитов на 2-ХММТ в зависимости от его концентрации, регистрируемой с помощью электрода Кларка. Кривая, отображаемая белыми кружками и сплошной линией, относится к левой оси Y, кривая, отображаемая черными кружками и пунктирной линией, — к правой оси Y.

меньше минимальной токсической концентрации, полученной с помощью МТТ-теста. Таким образом, представленные результаты указывают на сопоставимость данных, полученных с помощью метода регистрации дыхательной активности лимфоцитов и классического метода оценки цитотоксичности — МТТ-теста. При этом отсутствие необходимости длительного культивирования и возможность многократного использования клеток делают данный метод более предпочтительным по сравнению с МТТ-тестом и другими традиционными методами анализа цитотоксичности. Дополнительным преимуществом метода является возможность оценки действия тестируемых соединений в реальном времени, в том числе эффектов, подавляющих физиологические процессы в клетках, но не приводящих к их гибели. Метод на основе регистрации дыхательной активности клеток, использованный в данной работе, способен обеспечить методически простую, ускоренную и точную оценку состояния клеток в различных условиях в реальном времени при их многократном использовании. Таким образом, оценка состояния клеток на основе электрохимической регистрации их дыхательной активности является перспективным направлением и может составить основу метода доклинической оценки безопасности потенциальных фармакологических агентов.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов

интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источники финансирования. Работа выполнена за счет бюджетных средств в рамках Государственного задания регистрационный № 122020100109-6 в Самарском государственном медицинском университете Минздрава России.

Соответствие принципам этики. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Афанасьева А.Н., Сапарова В.Б., Сельменских Т.А., Макаренко И.Е. 2021. Выбор оптимального метода детекции жизнеспособности клеточных культур для тестов на пролиферативную активность и цитотоксичность. *Лабораторные животные для научных исследований*. **2**, 16–24.
- Bartholomew E.F., Martini F.H., Nath J.L. 2018. *Fundamentals of anatomy and physiology*. Global edition. Harlow: Pearson Education Limited. 1306 p.
- Azevedo A.M., Prazeres D.M.F., Cabral J.M.S., Fonseca L.P. 2005. Ethanol biosensors based on alcohol oxidase. *Biosens. Bioelectronics*. **21** (2), 235–247.
- Bachmann T.T., Bilitewski U., Schmid R.D. 1998. A microbial sensor based on pseudomonas putida for phenol, benzoic acid and their monochlorinated derivatives which can be used in water and *n*-hexane. *Analyt. Lett.* **31** (14), 2361–2373.

5. Ziegler F.D., Strickland E.H., Anthony A. 1962. Oxidative phosphorylation and respiratory regulation in rat liver homogenates measured with the oxygen electrode. *Rep. US Army Med. Res. Lab.* 1–25.
6. Voss D.O., Cowles J.C., Bacila M. 1963. A new oxygen electrode model for the polarographic assay of cellular and mitochondrial respiration. *Anal. Biochem.* **6**, 211–222.
7. Holtzman D., Moore C.L. 1971. A micro-method for the study of oxidative phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta.* **234** (1), 1–8.
8. Gaylor J.L., Miyake Y., Yamano T. 1975. Stoichiometry of 4-methyl sterol oxidase of rat liver microsomes. *J. Biol. Chem.* **250** (18), 7159–7167.
9. Tedjo W., Chen T. 2020. An integrated biosensor system with a high-density microelectrode array for real-time electrochemical imaging. *IEEE Trans. Biomed. Circuits Syst.* **14** (1), 20–35.
10. Rajendran S.T., Huszno K., Debowski G., Sotres J., Ruzgas T., Boisen A., Zor K. 2021. Tissue-based biosensor for monitoring the antioxidant effect of orally administered drugs in the intestine. *Bioelectrochemistry.* **138**, 107720.
11. Cai Y., Wang M., Xiao X., Liang B., Fan S., Zheng Z., Cosnier S., Liu A. 2022. A membraneless starch/O₂ biofuel cell based on bacterial surface regulable displayed sequential enzymes of glucoamylase and glucose dehydrogenase. *Biosens. Bioelectron.* **207**, 114197.
12. Emelyanova E.V., Antipova T.V. 2022. Biosensor approach for electrochemical quantitative assessment and qualitative characterization of the effect of fusaric acid on a culture-receptor. *J. Biotechnol.* **357**, 1–8.
13. Hiramoto K., Yasumi M., Ushio H., Shunori A., Ino K., Shiku H., Matsue T. 2017. Development of oxygen consumption analysis with an on-chip electrochemical device and simulation. *Anal. Chem.* **89** (19), 10303–10310.
14. Rejmstad P., Johansson J.D., Haj-Hosseini N., Wardell K. 2017. A method for monitoring of oxygen saturation changes in brain tissue using diffuse reflectance spectroscopy. *J. Biophotonics.* **10** (3), 446–455.
15. Thews O., Vaupel P. 2015. Spatial oxygenation profiles in tumors during normo- and hyperbaric hyperoxia. *Strahlenther Onkol.* **191** (11), 875–882.
16. Lau J.C., Linsenmeier R.A. 2012. Oxygen consumption and distribution in the long-evans rat retina. *Exp. Eye Res.* **102**, 50–58.
17. Sakr Y. 2010. Techniques to assess tissue oxygenation in the clinical setting. *Transfus. Apher. Sci.* **43** (1), 79–94.
18. Godsman N., Kohlhaas M., Nickel A., Cheyne L., Mingarelli M., Schweiger L., Hepburn C., Munts C., Welch A., Delibegovic M., Van Bilsen M., Maack C., Dawson D.K. 2022. Metabolic alterations in a rat model of Takotsubo syndrome. *Cardiovasc. Res.* **118** (8), 1932–1946.
19. Pandya J.D., Sullivan P.G., Leung L.Y., Tortella F.C., Shear D.A., Deng-Bryant Y. 2016. Advanced and high-throughput method for mitochondrial bioenergetics evaluation in neurotrauma. *Methods Mol. Biol.* **1462**, 597–610.
20. Divakaruni A.S., Rogers G.W., Murphy A.N. 2014. Measuring mitochondrial function in permeabilized cells using the Seahorse XF analyzer or a Clark-type oxygen electrode. *Curr. Protoc. Toxicol.* **60**, 25.2.1–25.2.16.
21. Vial G., Guigas B. 2018. Assessing mitochondrial bioenergetics by respirometry in cells or isolated organelles. *Methods Mol. Biol.* **1732**, 273–287.
22. Silva A.M., Oliveira P.J. 2012. Evaluation of respiration with clark type electrode in isolated mitochondria and permeabilized animal cells. *Methods Mol. Biol.* **810**, 7–24.
23. Mitchell R.J., Gu M.B. 2004. An escherichia coli biosensor capable of detecting both genotoxic and oxidative damage. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64** (1), 46–52.
24. Mungroo N.A., Neethirajan S. 2014. Biosensors for the detection of antibiotics in poultry industry-a review. *Biosensors (Basel).* **4** (4), 472–493.
25. Чепкова И.Ф., Ануфриев М.А., Понаморева О.Н., Алферов В.А., Решетилов А.Н., Щеглова В.А., Петрова С.Н. 2010. Применение биосенсора на основе иммобилизованных микроорганизмов для оценки токсичности продукции бытового назначения и товаров для детей. *Токсикол. вестник.* **1** (100), 34–40.
26. Polyak B., Marks R., Rode A., Rettberg P., Horneck G., Baumstark-Khan C. 2001. Comparison between two assay formats: Fiber optic Rec a lux sensor and SOS-lux assay in suspension and comparison between two reporter bacterial cells (*Escherichia coli* DPD1718 and *Salmonella typhimurium* TA1535). *BIOSET: Biosensors for Environmental Technology.* **8**, 13–18.
27. Ковтун С.В. 2009. Исследования выбросов от автотранспортных потоков методом биолюминесценции. *Горный информационно-аналитический бюллетень.* **S18**, 118–121.
28. Agilent Technologies Inc. How Agilent Seahorse XF analyzers work | Agilent. <https://www.agilent.com/en/products/cell-analysis/how-seahorse-xf-analyzers-work> [Электронный ресурс] (дата обращения: 23.03.2023).
29. Ильясов П.В., Гусева О.С., Курицына А.П., Лимарева Л.В. 2023. Оценка физиолого-биохимических характеристик клеток на основе регистрации их респираторной активности при воздействии субстратов и токсических веществ. *Гены и клетки.* (в печати).
30. Gidaspov A.A., Bakharev V.V., Kachanovskaya E.V., Kosareva E.A., Galkina M.V., Ekimova E.V., Yakunina N.G., Bulychev Y.N. 2004. Synthesis and cytotoxic activity of halogen-containing dinitromethyl-1,3,5-triazine derivatives. *Pharm. Chem. J.* **38** (8), 411–419.
31. Трещалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К., Андропова Н.В., Гарин А.М. 2005. Методические указания по изучению противоопухолевой активности фармакологических веществ. В кн.: *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ.* Ред. Хабриев Р.У. Москва: Медицина, с. 637–674.

Assessment of the Toxic Effect of 2-(Chlorodinitromethyl)-4-Methoxy-6-(4-Methylpiperazine-1-yl)-1,3,5-Triazine by Respiratory Activity of Lymphocytes

P. V. Iliasov¹, L. V. Limareva¹, A. I. Sizova^{1, *}, V. A. Zalomlenkov², A. P. Kuricyna¹

¹Samara State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Samara, 443099 Russia

²Samara State Technical University, Samara, 443100 Russia

*e-mail: a.i.sizova@samsmu.ru

A method for evaluation of metabolic characteristics of intact cells based on electrochemical registration of their respiratory activity was used to monitor a reaction of lymphocytes to a potential pharmacological agent, 2-(chlorodinitromethyl)-4-methoxy-6-(4-methylpiperazin-1-yl)-1,3,5-triazine. The method ensured an estimation of cytotoxicity of the test compound and made it possible to determine its minimum toxic concentrations for human lymphocytes. It was shown that the obtained results agree with the data of a reference method – MTT-based cell viability assay.

Keywords: cytotoxicity, respiratory activity, lymphocytes, antitumor agent, Clark-type electrode, triazines