



© Т. В. Пархоменко, О. В. Галибин, В. В. Томсон, 2023

УДК 611-018.1 : 001.891.7

DOI: 10.24884/1607-4181-2022-30-2-88-97

Т. В. Пархоменко, О. В. Галибин, В. В. Томсон*

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

НЕИНВАЗИВНЫЙ МЕТОД МОНИТОРИНГА ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ЖИВЫХ КЛЕТОК

Поступила в редакцию 23.06.2023 г.; принята к печати 13.09.2023 г.

Резюме

Статья посвящена обобщению сведений об использовании потенциал-чувствительных зондов (ПЧЗ) для оценки жизнеспособности и функционального состояния целой клетки. Применение синтетических зондов, чувствительных к мембранному потенциалу, имеет большое значение для мониторинга жизнеспособности и оценки функционального состояния донорских клеток и их структурных компонентов (митохондрий, ядер, цитоплазматических мембран, ионных каналов) до трансплантации, в ходе их хранения и при культивировании. Потенциальное преимущество такого подхода состоит в сохранении целостности донорских клеток. ПЧЗ позволяют оценивать состояние клеточной биоэнергетики, т. е. — баланс между продукцией и потреблением энергии в живых клетках. Продукция энергии в структурах митохондрий обеспечивает жизнеспособность клеток, а ее нарушения ведут к развитию различных заболеваний и старению. В клинической медицине этот метод может быть использован для оценки состояния донорских клеток перед их трансплантацией прежде всего в онкогематологии, лечении больных с тяжелыми ишемическими поражениями миокарда.

Цель — изучение результатов исследования применения потенциал-чувствительных зондов для оценки энергетического потенциала и жизнеспособности клеток.

Ключевые слова: энергетический статус, мембранный потенциал, транспорт электронов, митохондрии, жизнеспособность клеток, потенциал-чувствительные зонды

Для цитирования: Пархоменко Т. В., Галибин О. В., Томсон В. В. Неинвазивный метод мониторинга функционального состояния живых клеток. *Ученые записки СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова*. 2023;30(2):88–97. DOI: 10.24884/1607-4181-2023-30-2-88-97.

* **Автор для связи:** Владимир Викторович Томсон, ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И. П. Павлова Минздрава России, 197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6-8. E-mail: nic.spb@mail.ru.

Tatyana V. Parkhomenko, Oleg V. Galibin, Vladimir V. Tomson*

Pavlov University, Saint Petersburg, Russia

NONINVASIVE METHOD OF MONITORING THE FUNCTIONAL STATE OF LIVING CELLS

Received 23.06.2023; accepted 13.09.2023

Summary

The article is devoted to the generalization of information on the use of potential-sensitive probes (PSP) to assess the viability and functional state of an entire cell. Usage of membrane PSP is of great importance for assessing both the viability and functional integrity of the cells and their structural components (mitochondria, nuclei, cytoplasmic membranes, ion channels). Potential advantage of this approach includes studies of native viable cells in order to assess functional state of donor hematopoietic cells before transplantation as well as upon their storage and cultivation. These staining tools allow to assess the state of cellular bioenergetics, i.e., the balance between production and consumption of energy in living cells. The production of energy in mitochondrial structures ensures the cell viability, whereas its impairment leads to the development of different disorders and aging. In clinical medicine, this method can be used to assess the condition of donor cells before their transplantation, primarily in oncohematology, the treatment of patients with severe ischemic myocardial lesions.

The purpose of the work: to study the results of the research of the use of PSP to assess the energy potential and viability of cells.

Keywords: energy status, membrane potential, electron transport, mitochondria, cell viability, potential-sensitive probes

For citation: Parkhomenko T. V., Galibin O. V., Tomson V. V. Noninvasive method of monitoring the functional state of living cells. *The Scientific Notes of Pavlov University*. 2023;30(2):88–97. (In Russ.). DOI: 10.24884/1607-4181-2023-30-2-88-97.

* **Corresponding author:** Vladimir V. Tomson, Pavlov University, 6-8 L'va Tolstogo str., Saint Petersburg, 197022, Russia. E-mail: nic.spb@mail.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Митохондрии (МХ) являются основным источником энергии в клетках, обеспечивая их жизнедеятельность и регуляцию клеточных функций [1, 2]. Одним из важных показателей функционального состояния МХ является трансмембранный потенциал, благодаря которому, согласно теории Питера Митчелла, осуществляется связь между процессами окисления субстратов и аккумуляции энергии в АТФ [3, 4]. Трансмембранный потенциал обнаружен не только в мембранах митохондрий, но и в мембранах хлоропластов, фотосинтезирующих бактерий и аэробных гетеротрофных бактерий, в мембранах эритроцитов и саркоплазматического ретикула мышца. Мембранный потенциал является универсальным продуктом систем энергетического сопряжения [5]. Нарушение функционального состояния МХ может привести к нарушению обмена веществ в клетках [6, 7]. Таким образом, поддержание мембранного потенциала служит показателем энергетического баланса МХ и уровня метаболической активности клеток [8, 9].

ТРАНСПОРТ ЭЛЕКТРОНОВ И ИОННЫЕ КАНАЛЫ

В числе мембранных структур клетки отдельно рассматривают поверхностную плазматическую мембрану, отделяющую цитоплазму клетки от окружающей среды, и мембраны внутриклеточных органелл (ядра, эндоплазматического ретикула — ЭПР, аппарата Гольджи, МХ, везикул и др.) [10, 11]. Трансмембранный транспорт электронов в биологических системах исследуется уже на протяжении многих лет [12]. Перенос электронов через внутреннюю мембрану митохондрий происходит при формировании протон-движущей силы, необходимой для синтеза АТФ. Наряду с исследованиями митохондриального потенциала активно изучаются механизмы трансмембранного транспорта электронов через **поверхностную плазматическую мембрану** клеток [13]. С начала 1970-х гг. описаны ферменты, выделенные из плазматических мембран клеток млекопитающих, которые, используя НАДН в качестве внутриклеточного донора электронов, способны восстанавливать феррицианид. Было выдвинуто множество гипотез о роли таких окислительно-восстановительных ферментов: регуляция клеточной сигнализации, работы протонных помп, ионных каналов, апоптоза. Выполнение этих функций может быть результатом работы внутримембранных окислительно-восстановительных ферментов. За все время исследований в этой области было **установлено**, что многие **оксидоредуктазы присутствуют в плазматических мембранах от простейших до человека** [14]. В настоящее время также описаны электронтранспортные цепи плазматической мембраны, осуществляющие транспорт электронов от цитоплазматического НАДН к молекулярному

кислороду или дисульфидам [15]. В транспорте электронов через плазматическую мембрану участвуют несколько мембранных ферментов, наблюдается стимуляция активности электронтранспортной цепи в клетках при действии гормонов и факторов роста [16]. Вероятно, это связано с участием электрон-транспортной цепи в процессе регуляции роста клеток. Повышенная активность данной системы наблюдается также в клетках с **поврежденными митохондриями**. Так, в клетках лимфоцитарной линии rho 0 процессы окислительного фосфорилирования не протекают, а энергетические потребности клеток обеспечиваются в результате процессов гликолиза [17]. Во всех биологических мембранах работают **электрические помпы**, важной особенностью которых является наличие молекулярных протонных и ионных каналов [18, 19]. Проницающие мембрану трансмембранные белки образуют структуры, обеспечивающие движение ионов через мембрану — переносчики ионов и ионные каналы. К настоящему времени установлено, что ионные каналы — это большое семейство белков, более чем 40 молекул, кодирующихся 1–2 % генома человека. Ионные каналы клетки представляют собой сложные белковые структуры с молекулярными системами открытия, закрытия, селективности, инактивации и регуляции. Особое значение ионные каналы имеют в возбудимых клетках [20]. Ионные каналы обеспечивают основные свойства возбудимых клеток: формирование мембранного потенциала покоя, потенциала действия (ПД), межклеточную сигнализацию, регуляцию освобождения медиатора, генерацию постсинаптических потенциалов, активную и пассивную деполяризацию, генерацию рецепторных потенциалов в рецепторных клетках и др. [21]. С помощью методов молекулярной генетики и электрофизиологии показано, что многие нервные и мышечные расстройства, включая миопатии и периодические параличи, вызваны дисфункциями ионных каналов в мембране. В исследовании, опубликованном в 2022 г., продемонстрирована важная роль канала (SoCs), связанного с несколькими физиологическими ролями в эндотелиальной дисфункции и пролиферации гладкой мускулатуры сосудов, которые способствуют прогрессированию сердечно-сосудистых заболеваний [22], болезней системы крови [23]. При нарушении функционирования ионных каналов наблюдается не только дисфункция возбудимых клеток, но и нарушение ионного транспорта в невозбудимых тканях [24, 25].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ФУНКЦИЙ ИОННЫХ КАНАЛОВ

Для исследования ионных каналов применяют различные методы: электрофизиологические, биохимические, фармакологические и др. При использовании электрофизиологических методов

регистрируются потенциалы и токи ионов с помощью металлических электродов или стеклянных микропипеток. Этот метод позволяет судить о функции каналов только косвенно, по изменению формы ПД [26]. Применять метод микроэлектродной регистрации не всегда возможно, поскольку происходят серьезные повреждения клетки и ее гибель.

Изменения мембранного потенциала (МП) и, следовательно, активность ионных каналов можно регистрировать с помощью потенциал-чувствительных красителей, спектральные характеристики которых изменяются при изменении величины потенциалов. Широко используются красители: di-4-ANEPs [27], di-8-ANEPs [28], RH237 [29], созданные на основе аминафталиэтил пиридинума (ANEP), ANNINE-6plus [30]. Согласно существующей в настоящее время концепции, функциональное состояние живых клеток тесно связано с количеством активных митохондрий в цитоплазме, суммарным трансмембранным потенциалом на плазматических и митохондриальных мембранах, за изменениями которых можно следить с помощью потенциал-чувствительных флуоресцентных зондов [31, 32]. При оценке митохондриального энергетического обмена обычно исследуют **изолированные** МХ, выделенные из тканей, что может привести к необратимому образованию агрегатов и повреждению МХ в процессе их выделения [33]. При работе с интактными клетками, несмотря на то, что МХ остаются неповрежденными, внутри клеток клеточная мембрана может быть **непроницаема** для ряда веществ, необходимых в оценке митохондриальных функций. Мембранный потенциал МХ можно оценить при помощи проникающих через мембраны катионных флуоресцентных или фосфоресцентных красителей, которые распределяются в МХ по уравнению Нернста и позволяют выявить деполяризацию мембран МХ [34]. Часто используются флуоресцентные красители: сафранин О [35], родамин [36]; цианины DiOC2(3) [37], DiSC2 (3) [38].

Все упомянутые выше потенциал-чувствительные красители являются **токсичными** и сами влияют на энергетическое состояние живых клеток, что ограничивает их использование как витальных красителей. Использование флуоресцентных зондов, нековалентно взаимодействующих с мембранными системами, позволяет исследовать состояние биологических мембран в любых живых клетках, в том числе в митохондриях [39].

ВЫБОР ЗОНДА ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО СТАТУСА КЛЕТОК

Зонд должен быть катионом, проникать в живые клетки, накапливаться в энергизированных структурах, флуоресцировать в них, не обладать токсическим действием и, по возможности, обладать полихромазией (создавать флуоресценцию

различного цвета в разных компонентах клетки). Примерами таких зондов являются иодид 2-[п-(диметиамино)стирил]-1-метилпиридиния (2-Di-1-ASP или DASPMI) и 4-(п-диметиламино-стирил)-1-метилпиридиния (ДСМ). Оба эти зонда (2-Di-1-ASP и ДСМ) являются витальными и полихроматическими, позволяющими регистрировать митохондрии в разных энергетических состояниях, цитоплазматическую мембрану и ядро. При одной и той же длине волны возбуждения флуоресценция в разных субклеточных структурах различна по цвету и интенсивности. Впервые для исследования состояния митохондрий в культуре клеток сердца голубя зонд DASPMI был использован Берейтер-Ханом в 1976 г. [39]. Далее было установлено, что поглощение и интенсивность флуоресценции DASPMI в митохондриях является динамическим показателем мембранного потенциала, и влияние локального электрического поля на переходный дипольный момент зонда дает информацию об изменении энергетического статуса митохондрий в живых клетках [40]. В 1981 г. DASPMI был предложен в качестве зонда для оценки митохондриального потенциала [41]. При наблюдениях за изменениями в клетках HeLa, стимулированных индукторами апоптоза, были протестированы 3 флуоресцентных красителя: иодид 2-[п-(диметиамино)стирил]-1-метилпиридиния, родамин 123 и бромид этидия. Полученные результаты продемонстрировали преимущество катионных красителей для изучения мембранного транспорта [42].

В 1981 г. было исследовано родственное 2-Di-1-ASP соединение 4-(п-диметиламиностирил)-1-метилпиридиния (ДСМ), синтезированное в Институте органического синтеза АН Латвийской ССР, Рига [43]. С помощью зонда ДСМ была определена величина свободной энергии его аккумуляции в МХ лимфоцитов и величина трансмембранного и митохондриального потенциалов в интактных лимфоцитах без предварительного выделения из них МХ, описана методика определения величины трансмембранного и митохондриального потенциалов в интактных лимфоцитах с применением уравнения Нернста [44]. На образцах донорской крови был разработан метод оценки энергетического статуса лимфоцитов и нейтрофилов с помощью зонда ДСМ [45]. Особая важность и ценность этих исследований состоит в том, что в них наглядно продемонстрирована возможность работы с живыми клетками и МХ в их нативном состоянии. [46]. Соединения этого семейства были также исследованы на предмет связывания с двунитевыми структурами ДНК [47]. Исследования последних лет показывают, что снижение мембранного потенциала митохондрий Т-лимфоцитов ведет к их гибели и, возможно, к нарушению противоопухолевого иммунитета с повышенным риском развития опухолей [48].

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА РАЗЛИЧНЫЕ КЛЕТКИ

Применение флуоресцентных методов позволяет исследовать первичную реакцию клеток в нативном состоянии (Т-лимфоцитов и нейтрофилов) и после воздействия на них различных физико-химических факторов [49–51]. Красители на базе родаминовых производных позволяют оценить состояние митохондриальных функций и редокс-потенциала клеток [52]. Экспериментальные исследования с использованием флуоресцентных зондов позволили получить информацию о функциональной активности различных клеток, в том числе эритроцитов [53], миокардиоцитов [54], клеток иммунной системы [55], гладкомышечных клеток [56].

Нами было установлено, что эритропоэтин (ЭПО) оказывает активирующее воздействие на Т-лимфоциты (ТЛЦ), сопровождающееся увеличением количества флуоресцирующих митохондрий в клетке ($n_{m/c}$), и увеличением суммарного трансмембранного потенциала на плазматической ($\Delta\psi$) и митохондриальных мембранах ($\Delta\psi_m$) [50].

Для ответа на вопрос, какой именно мембранный потенциал реагирует на воздействие ЭПО: $\Delta\psi_m$, или (и) $\Delta\psi$, мы использовали специфические ингибиторы реакций фосфорилирования в дыхательной цепи: динитрофенол (ДНФ) — ингибитор дыхательной цепи и разобщитель окислительного фосфорилирования; пентахлорфенол (ПХФ) — разобщитель окислительного фосфорилирования; дициклогексилкарбодиимид (ДЦКД) — ингибитор мембрансвязанной части АТФ-азы митохондриальной мембраны, с помощью потенциал-чувствительного витального флуоресцентного зонда катиона 4-(π -диметиламиностирил)-1-метилпиридиния (ДСМ). В экспериментах с ТЛЦ из разных тимусов было зарегистрировано снижение $n_{m/c}$ и флуоресценции (\bar{F}) после инкубации со всеми использованными ингибиторами, причем степень и скорость снижения этих параметров зависела от типа ингибитора и длительности инкубации. Максимальное воздействие на ТЛЦ оказывал ДНФ. ЭПО не восстанавливает энергетику после воздействия ДНФ; максимальный восстанавливающий эффект ЭПО на тимоциты наблюдается после воздействия ДЦКД. ЭПО частично восстанавливает поляризацию мембран МХ после воздействия ДЦКД, при этом выявляется до 42 % светящихся МХ и 38 % \bar{F} от контрольного уровня. Эти данные могут свидетельствовать о том, что ЭПО влияет на метаболизм тимоцитов, связанный с энергетической активностью митохондрий [57]. Было также исследовано влияние ЭПО *in vitro* в препаратах нативной крови крыс на трансмембранные потенциалы гранулоцитов, которые являются одним из основных компонентов неспецифической фазы

иммунитета. В пробах крови, окрашенных зондом ДСМ, измерялась интенсивность свечения зонда до и после инкубации с ЭПО. Полученные нами данные позволяют предположить, что ЭПО, активируя физиологическую активность гранулоцитов, опосредованно воздействует на клетки иммунного ответа [58].

ИССЛЕДОВАНИЕ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА С ПОМОЩЬЮ ЗОНДА 2-Di-1-ASP

В 2013 г. мы разработали и предложили метод с использованием витального флуоресцентного зонда 2-Di-1-ASP для оценки состояния клеток костного мозга (ККМ). Найдены оптимальные условия работы с зондом: температура, время инкубации, концентрация зонда. Экспериментально подтверждено, что тесты с 2-Di-1-ASP регистрируют изменения энергетического потенциала ККМ при воздействии на них различных факторов: криоконсервации с диметилсульфоксидом, размораживания, суспендирования в физиологическом растворе, среде Хенкса, среде стандартного стабилизатора, длительности хранения [59].

По разработанной методике была проведена оценка состояния трансплантатов ККМ по их энергетической активности для определения качества трансплантата и его сохранности. Объектом исследования служил костный мозг 20 здоровых доноров, взятый для аллогенной трансплантации. Получение суспензии ККМ проводили по стандартной методике [60].

Всего было исследовано 9130 клеток в 500 препаратах. В результате проведенных исследований было установлено, что во всех образцах ККМ через 3–3,5 часа хранения при комнатной температуре регистрировался рост интенсивности свечения зонда (\bar{F}) [61]. В публикации немецких авторов [62] обсуждался вопрос жизнеспособности трансплантатов ККМ и стволовых клеток, выделенных из периферической крови (ПСК) при различных температурных режимах. Жизнеспособность клеток оценивали по активности маркерного фермента АДГ (альдегиддегидрогеназа). По данным этих авторов, число способных к делению клеток в трансплантатах ККМ оставалось неизменным в течение 72 часов при комнатной температуре, что согласуется с нашими данными. В опубликованных одновременно с нашими исследованиями были представлены сходные данные об энергетической активации клеток на начальной стадии митоза в суспензионных клеточных культурах Т-лимфобластоидных линий МТ 4 и СЕМ. Обнаруженные эффекты усиления свечения 2-Di-1-ASP на гемопоэтических клетках (через 3–3,5 часа) и ДСМ на лимфобластоидных клетках головного мозга хорька (через 6–12 часов) могут свидетельствовать о сходных процессах, происходящих в ядрах этих клеток, а именно — об их метаболической активации и пролиферации [63].

МИКРОФЛУОРИМЕТРИЧЕСКИЕ И АВТОМАТИЗИРОВАННЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ЖИВЫХ КЛЕТОК

Зонд DSM (4-(п-диметиламиностирил)-1-метилпиридиний) применяли для исследования лимфоцитов и нейтрофилов в цельной нативной крови микрофлуориметрическим методом. К гепаринизированной донорской крови добавляли водный раствор DSM в диапазоне концентраций от 0,2 до 20,0 мкМ, инкубировали при 37 °С, в течение 30 мин и исследовали на люминесцентном микроскопе «Люам — Р8» (ЛОМО, Россия). Флуоресценцию зонда возбуждали ртутной лампой с длиной волны 405–436 нм. Для регистрации флуоресценции использовали фотометрическую насадку ФМЭЛ-1 и интерференционный фильтр с максимумом пропускания 585 нм. Максимум возбуждения и поглощения составлял 485 нм и 450 нм соответственно, при максимуме флуоресценции 590 нм. Оптимальными условиями окрашивания были следующие: для нейтрофилов — 1 мкМ DSM; для лимфоцитов — 10 мкМ зонда с последующей инкубацией в течение 30 мин при 37 °С. Нативные свойства мембран лимфоцитов и нейтрофилов и высокий энергетический статус МХ в них сохраняются при адекватном состоянии плазмы крови, при слабой фоновой флуоресценции красителя [45].

Эффективность флуоресцентного зонда 2-Di-1-ASP (йодид 2-[п-(диметиламино)стирил]-1-этилпиридиния) проверяли на образцах клеток костного мозга (ККМ), хранящихся в стандартном стабилизирующем растворе при концентрации $2-3 \cdot 10^6$ клеток/мл при комнатной температуре (20–22 °С). Валикоты клеток (30 мкл) добавляли 2-Di-1-ASP до конечной концентрации 40 мкМ и инкубировали при 37 °С в течение 60 мин. Флуоресценцию измеряли на люминесцентном микроскопе «Люам — Р8» (ЛОМО, Россия) с фотометрической насадкой ФМЭЛ-1 и интерференционным фильтром с максимумом пропускания 585 нм. Максимум возбуждения и поглощения составлял 470 нм и 560 нм соответственно. Вручную тестировали от 70 до 100 клеток в каждом образце, и рассчитывали среднюю интенсивность флуоресценции (F, усл. ед.). Фотографические снимки окрашенных клеток выполняли камерой ТСА-5.0 с использованием программного обеспечения «Micro-Analysis View» (Микросистемы ООО «ЛОМО», Россия) [61].

Зонд RH237 применяли в экспериментах с мышинными плюрипотентными стволовыми клетками (ИПСК), индуцированными для дифференцировки, трансплантированными мышам с экспериментальным инфарктом миокарда. В предварительных тестах электрофизиологическая активность кластеризованных клеток биения, полученных из iPS, регистрировалась с помощью оптического картирования по системе, использующей чувствительный к напряжению краситель RH237

[29]. Кластеры клеток из 3–4-недельных культур инкубировали с красителем RH237 (1 мкМ) в течение 5 мин. Оптический сигнал возбуждался с помощью изготовленного на заказ светодиода и записывался с помощью высокочастотной ССД-камеры (710 кадров/с). Данные были обработаны с помощью алгоритма на платформе Matlab, и были построены фазовые карты. Эти результаты сравнивались с записями потенциалов действия целых клеток с использованием методики режима фиксации тока с помощью микропипеток усилителя Axon multiclamp 700 А и программного обеспечения patchclamp 10.0 от Molecular Devices, Калифорния, США.

Родамин-123 (Rh-123), хорошо известный краситель, был использован индийскими исследователями для определения токсического воздействия дихлорфена на лейкоциты крови крыс [36]. Выделенные из крови лейкоциты тестировали с помощью окрашивания йодидом пропидия для оценки распределения по клеточному циклу. Основанная на этом оценка мембранного потенциала митохондрий (Jm) была проведена с целью определения энергетического состояния клеток методом проточной цитометрии. Jm в отдельных клетках в результате изменений митохондрий после 60-минутной инкубации клеток с красителем родамином-123 (Rh-123) с использованием канала FITC на проточном цитометре FACS ARIA II. (Бектон Дикинсон, США). Лейкоциты были идентифицированы по характеристикам прямого и бокового рассеяния.

Зонд DSM применялся также для исследования суспензированных культур клеток Т-лимфобластоидных линий МТ4 и СЕМ на микрофлуориметре и на проточном цитофлуориметре Partec PAS (Германия). На проточном флуориметре данные получали в виде гистограмм распределения клеток одновременно по интенсивностям 3 типов флуоресценции зонда в последовательные моменты времени после добавления DSM к клеткам. Возбуждение флуоресценции в протоке проводили лазером при 488 нм. Разные спектральные области свечения в клетках выделяли с помощью разных интерференционных фильтров с максимумами пропускания 530 нм, 585 нм и 661 нм [64].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При исследованиях, проведенных с использованием потенциал-чувствительных зондов, показана возможность получать объективную информацию об энергетическом статусе живой клетки и ее функциональном состоянии. Особенно значимым это может быть при исследовании функционального состояния донорской клетки во время ее хранения, культивирования и перед трансплантацией, прежде всего в онкогематологии, кардиохирургии. Преимущество такого подхода состоит в сохранении целостности донорских клеток.

Конфликт интересов

Авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest

Соответствие нормам этики

Авторы подтверждают, что соблюдены права людей, принимавших участие в исследовании, включая получение информированного согласия в тех случаях, когда оно необходимо, и правила обращения с животными в случаях их использования в работе. Подробная информация содержится в Правилах для авторов.

Compliance with ethical principles

The authors confirm that they respect the rights of the people participated in the study, including obtaining informed consent when it is necessary, and the rules of treatment of animals when they are used in the study. Author Guidelines contains the detailed information.

ЛИТЕРАТУРА

1. Mitochondria and the heart. Developments in Cardiovascular Medicine / eds by J. Marin-Garcia. – New Jersey: Springer, 2005. – 400 p.
2. Filippi M. D., Ghaffari S. Mitochondria in the maintenance of hematopoietic stem cells: new perspectives and opportunities // *Blood*. – 2019. – Vol. 133, № 18. – P. 1943–1952. DOI: 10.1182/blood-2018-10-808873.
3. Mitchell P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by chemiosmotic type of mechanism // *Nature*. – 1961. – Vol. 191. – P. 144–148. DOI: 10.1038/191144a0.
4. Mitchell P., Moyle J. Estimation of membrane potential and pH difference across the cristae membrane of rat liver mitochondria // *Europ. J. Biochem.* – 1969. – Vol. 7, № 4. – P. 471–484. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1969.tb19633.x.
5. Skulachev V. P. Membrane-linked energy transductions. Bioenergetic functions of sodium: H⁺ is not unique as a coupling ion // *Eur J Biochem.* – 1985. – Vol. 151, № 2. – P. 199–208. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1985.tb09088.x.
6. Brand M. D., Nicholls D. G. Assessing mitochondrial dysfunction in cells // *Biochem J.* – 2011. – Vol. 435. – P. 297–312. DOI: 10.1042/BJ20110162.
7. Yin Y., Shen H. Common methods in mitochondrial research (Review) // *Int J Mol Med.* – 2022. – Vol. 50, № 4. – P. 1–29. DOI: 10.3892/ijmm.2022.5182.
8. Morse P. T., Wan J., Bell J., Lee I., Goebel D. J. et al. Sometimes less is more: inhibitory infrared light during early reperfusion calms hyperactive mitochondria and suppresses reperfusion injury // *Biochem Soc Trans.* – 2022. – Vol. 50, № 5. – P. 1377–1388. DOI: 10.1042/BST20220446.
9. Yoon Y., Lee H., Federico M., Sheu S.-S. Non-conventional mitochondrial permeability transition: Its regulation by mitochondrial dynamics // *Biochim Biophys Acta (Bioenergetics)*. – 2023. – Vol. 1864, № 1. – P. 148914. DOI: 10.1016/j.bbabi.2022.148914.
10. Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular and Medical Aspects / eds by G. J. Siegel, R. W. Albers, S. T. Brady, D. L. Price. 7th Ed. – Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2006. – 992 p.
11. Kandel E. R., Schwartz J. H., Jessel T. M. Principal of neural science. – New York: The McGraw-Hill Companies, 2002. – 1321 p.
12. Jin X., Zhang P., Zhang Y., Zhou M., Liu B. et al. Light-driven proton transmembrane transport enabled by bio-semiconductor 2D membrane: A general peptide-induced WS2 band shifting strategy // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2022. – Vol. 218. – P. 114741. DOI: 10.1016/j.bios.2022.114741.
13. Kennett E. C., Kuchel P. W. Redox reactions and electron transfer across the red cell membrane // *IUBMB Life*. – 2003. – Vol. 55, № 7. – P. 375–385. DOI: 10.1080/152165403100015928438.
14. Baker M. A., Lawen A. Plasma membrane NADH-oxido-reductase system. A critical review of the structural and functional data // *Antioxid. Redox. Signal.* – 2000. – Vol. 2, № 2. – P. 197–212. DOI: 10.1089/ars.2000.2.2-197.
15. Morre D. M., Lenaz G., Morre D. J. Surface oxidase and oxidative stress propagation in aging // *J. Exp. Biol.* – 2000. – Vol. 203, № 10. – P. 1513–1521. DOI: 10.1242/jeb.203.10.1513.
16. Freeman S. A., Grinstein S., Orlowski J. Determinants, maintenance, and function of organellar pH // *Physiol. Rev.* – 2023. – Vol. 103, № 1. – P. 515–606. DOI: 152/physrev.00009.2022.
17. Larm J. A., Vaillant F., Linnane A. W., Lawen A. Up-regulation of the plasma membrane oxidoreductase as a prerequisite for the viability of human Namalwa rho O cells // *J. Biol. Chem.* – 1994. – Vol. 269, № 48. – P. 30097–30100. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)43779-9.
18. Li B., Wang Y., Castro A., Ng C., Wang Z. et al. The roles of two extracellular loops in proton sensing and permeation in human Otop1 proton channel // *Communications Biology*. – 2022. – Vol. 5, № 1. – P. 1–13. DOI: 10.1038/s42003-022-04085-2.
19. Guidelli R. A historical biophysical dogma vs. an understanding of the structure and function of voltage-gated tetrameric ion channels. A review // *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*. – 2022. – Vol. 1864, № 12. – P. 184046. DOI: 10.1016/j.bbamem.2022.184046.
20. Abad-Rodriguez J., Brocca M. E., Higuero A. M. Glycans and carbohydrate-binding/transforming proteins in axon physiology // *Adv. Neurobiol.* – 2023. – Vol. 29. – P. 185–217. DOI: 07/978-3-031-12390-07.
21. Montnach J., Blomer L. A., Lopez L., Filipis L., Meudal H. et al. In vivo spatiotemporal control of voltage-gated ion channels by using photoactivatable peptidic toxins // *Nature Communications*. – 2022. – Vol. 13, № 1. – P. 1–13. DOI: 10.1038/s41467-022-27974-w.
22. Lu T., Zhang Y., Su Y., Zhou D., Xu Q. Role of store-operated Ca²⁺ entry in cardiovascular disease // *Cell Communication and Signaling*. – 2022. – Vol. 20, № 1. – P. 1–10. DOI: 10.1186/s12964-022-00829-z.
23. Zhu W., Guo S., Homilius M., Nsubuga C., Wright S. H. et al. PIEZO1 mediates a mechanothrombotic pathway in diabetes // *Science Translational Medicine*. – 2022. – Vol. 14, № 626. – P. 1707. DOI: 10.1126/scitranslmed.abk1707.
24. Zhu Y., Sheng Z.-F., Yao H., Li D.-P. Emerging mechanisms involving brain Kv7 channel in the pathogenesis of hypertension // *Biochemical Pharmacology*. – 2022. – Vol. 206. – P. 115318. DOI: 10.1016/j.bcp.2022.
25. Sasso E. M., Muraki K., Eaton-Fitch N., Smith P., Lesslar O. L. et al. Transient receptor potential melastatin 3 dysfunction in post COVID-19 condition and myalgic encephalomyelitis / chronic fatigue syndrome patients // *Molecular Medicine*. – 2022. – Vol. 28, № 1. – P. 1–14. DOI: 10.1186/s10020-022-00528-y.
26. Nichols J. G., Martin A. R., Bruce G., Wollace D. G., Fuchs P. A. From neuron to brain. – Sinauer Associates, 2003. – 671 p.
27. Furuta A., Miyoshi S., Itabashi Y., Shimizu T., Kira S. et al. Pulsatile cardiac tissue grafts using a novel three-dimensional cell sheet manipulation technique functionally integrates with the host heart, in vivo // *Circulation research*. – 2006. – Vol. 98, № 5. – P. 705–712.

28. Jewell S. A., Petrov P. G., Winlove C. P. The effect of oxidative stress on the membrane dipole potential of human red blood cells // *Biochim Biophys Acta*. – 2013. – Vol. 1828, № 4. – P. 1250–8. DOI: 10.1016/j.bbame.2012.12.019.
29. Wang H., Xi Y., Zheng Y., Wang X., Cooney A. J. Generation of electrophysiologically functional cardiomyocytes from mouse induced pluripotent stem cells // *Stem Cell Res.* – 2016. – Vol. 16, № 2. – P. 522–30. DOI: 10.1016/j.scr.2016.02.032.
30. Bu G., Adams H., Berbari E. J., Rubart M. Uniform action potential repolarization within the sarcolemma of in situ ventricular cardiomyocytes // *Biophys. J.* – 2009. – Vol. 96, № 6. – P. 25–32. DOI: 10.1016/j.bpj.2008.12.3896.
31. Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов. – М.: Наука, 1989. – 277 с.
32. Vida T. A., Emr S. D. A new vital stain visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast // *J. Cell. Biol.* – 1995. – Vol. 28, № 5. – P. 779–792. DOI: 10.1083/jcb.128.5.779.
33. Brand M. D., Nicholls D. G. Assessing mitochondrial dysfunction in cells // *Biochemical Journal*. – 2011. – Vol. 435. – P. 297–312. DOI: 10.1042/BJ20110162.
34. Lemasters J. J., Ramshesh V. K. Imaging of mitochondrial polarization and depolarization with cationic fluorophores // *Methods in cell biology*. – 2007. – Vol. 80. – P. 283–295. DOI: 10.1042/BJ20110162.
35. Figueira T. R., Melo D. R., Vercesi A. E., Castilho R. F. Safranin as a fluorescent probe for the evaluation of mitochondrial membrane potential in isolated organelles and permeabilized cells // *Methods Mol. Biol.* – 2012. – Vol. 810. – P. 103–17. DOI: 10.1007/978-1-61779-382-07.
36. Lone M. I., Nabi A., Dar N. J., Hussain A., Nazam N. et al. Toxicogenetic evaluation of dichlorophene in peripheral blood and in the cells of the immune system using molecular and flow cytometric approaches // *Chemosphere*. – 2017. – Vol. 167. – P. 520–529. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2016.08.131.
37. Kataoka M., Fukura Y., Shinohara Y., Baba Y. Analysis of mitochondrial membrane potential in the cells by microchip flow cytometry // *Electrophoresis*. – 2005. – Vol. 26, № 15. – P. 3025–31. DOI: 10.1002/elps.200410402. PMID: 16078196.
38. Garcia G. Jr., Chakravarty N., Abu A. E., Jeyachandran A. V., Takano K. A. et al. Replication-deficient zika. Vector-based vaccine provides maternal and fetal protection in mouse model // *Microbiol. Spectr.* – 2022. – Vol. 10, № 5. – P. e0113722. DOI: 10.1128/spectrum.01137-22.
39. Bereiter-Hahn Y. Dimethylaminostyrylmethylpyridinium iodine (DASPMI) as a fluorescent probe for mitochondria in situ // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 1976. – Vol. 423, № 1. – P. 1–14. DOI: 10.1016/0005-2728(76)90096-7.
40. Ramadass R., Bereiter-Hahn J. How DASPMI reveals mitochondrial membrane potential: fluorescence decay kinetics and steady-state anisotropy in living cells // *Biophys. J.* – 2008. – Vol. 95, № 8. – P. 4068–4076. DOI: 10.1529/biophysj.108.135079.
41. Mewes H. L., Rafael J. The 2-(dimethylaminostyryl)-1-methylpyridinium cation as indicator of the mitochondrial membrane potential // *FEBS Lett.* – 1981. – Vol. 131, № 1. – P. 7–10. DOI: 10.1016/0014-5793(81)80875-7.
42. Gibbons B. A., Kharel P., Robinson L. C., Synowicki R. A., Model M. A. Volume measurements and fluorescent staining indicate an increase in permeability for organic cation transporter substrates during apoptosis // *Experimental cell research*. – 2016. – Vol. 344, № 1. – P. 112–119. DOI: 10.1016/j.yexcr.2016.03.018.
43. Морозова Г. И., Добрецов Г. Е., Дубур Г. Я., Дубуре Р. Р., Голицын В. М. и др. Флуоресценция 4-(п-диметиламиностирил)-1-метилпиридиния в живой клетке // *Цитология*. – 1981. – Т. 23, № 8. – С. 916–923. DOI: 10.1155/2022/7908357.
44. Добрецов Г. Е., Косников В. В., Морозова Г. И., Лихачева Л. М., Айдыралиев Р. К., Владимиров Ю. А. Измерение градиента концентрации флуоресцентного зонда-катиона ДСМ на плазматической и митохондриальной мембранах лимфоцита // *Биологические мембраны*. – 1986. – Т. 3, № 3. – С. 266–274.
45. Морозова Г. И., Онищенко Н. А., Оржеховская И. Г., Полосина О. В., Байжиева Ф. Х., Баукина О. В. Микрофлуориметрическая идентификация и оценка физиологического состояния лимфоцитов и нейтрофилов в цельной нативной крови с помощью флуоресцентного зонда-катиона DSM: клинические и экспериментальные данные // *Гематология и трансфузиология*. – 1997. – Т. 42, № 3. – С. 43–47.
46. Морозова Г. И., Корнилова Г. В., Гринкевич О. М., Аскарлова К. З., Лопатина О. А., Фирсова Е. Л. Трансмембранные потенциалы и митохондриальная активность онкоклеток культуры HELA в процессе разморозивания и при инфицировании аденовирусом // *Актуальные вопросы биологической физики и химии*. – 2021. – Т. 6, № 4. – С. 630–635.
47. Xie X., Zuffo M., Teulade-Fichou M. P., Granzhan A. Identification of optimal fluorescent probes for G-quadruplex nucleic acids through systematic exploration of mono- and distyryl dye libraries // *Beilstein J. Org. Chem.* – 2019. – Vol. 15. – P. 1872–1889. DOI: 10.3762/bjoc.15.183.
48. Zhang L., Zhang W., Li Z., Lin S., Zheng T. et al. Mitochondria dysfunction in CD8+ T cells as an important contributing factor for cancer development and a potential target for cancer treatment: a review // *J Exp Clin Cancer Res.* – 2022. – Vol. 41, № 1. – P. 227. DOI: 10.1186/s13046-022-02439-6.
49. Kosnikov V. V., Dobretsov G. E. Depolarizing action of allergens on passive sensitized lymphocytes // *Int. Arch. Allergy. Appl. Immunol.* – 1991. – Vol. 95, № 1. – P. 42–47. DOI: 10.1159/000235452.
50. Morozova G. I., Parkhomenko T. V., Klitsenko O. A., Tomson V. V. Stimulating effect of erythropoietin on thymocyte energetic established in vitro with a potential-sensitive fluorescent probe in the mitochondria // *Biochem. Suppl. Series A: Membr Cell Biology*. – 2007. – Vol. 1, № 4. – P. 325–330. DOI: 10.1134/S1990747807040083.
51. Deng X., Deng T., Ni Y., Zhan Y., Huang W. et al. Cytochrome c modulates the mitochondrial signaling pathway and polymorphonuclear neutrophil apoptosis in bile duct-ligated rats // *Exp Ther Med.* – 2016. – Vol. 12, № 1. – P. 333–342. DOI: 10.3892/etm.2016.3313.
52. Kaur A., Jankowska K., Pilgrim C., Fraser S. T., New E. J. Studies of Hematopoietic cell differentiation with a ratiometric and reversible sensor of mitochondrial reactive oxygen species // *Antioxid Redox Signal.* – 2016. – Vol. 24, № 13. – P. 667–679. DOI: 10.1089/ars.2015.6495.
53. Петров В. А., Добрецов Г. Е., Вундерлих З., Пликетт Ф., Гласс К. Обнаружение кластеров отрицательных зарядов на поверхности плазматических мембран эритроцитов с помощью флуоресцентных зондов // *Биофизика*. – 1983. – Т. 28, № 3. – С. 501–502.
54. Parkhomenko T. V., Klytsenko O. A., Tomson V. V. Erythropoietin stimulates aerobic and anaerobic processes in rat cardiomyocytes // *Focus uni-luebeck*. – 2012. – Suppl. – P. 37.
55. Artuhov V. G., Putintseva O. V., Bragina V. A., Pashkov M. V., Vasilenko D. V. Fluorescent methods in the research induced by UV radiation changes of structural and functional state of human blood lymphocytes // *Bull. Exp. Biol. Med.* – 2012. – Vol. 153, № 6. – P. 891–895. DOI: 10.1007/s10517-012-1856-8.
56. Wandelt B., Mielniczak A., Turkewitsch P., Darling G. D., Stranix B. R. Substituted 4-[4-dimethylamino)

styril]pyridinium salt as a fluorescent probe for cell microviscosity // *Biosensors Bioelectronics*. – 2003. – Vol. 18. – P. 465–471. DOI: 016/s0956-5663(02)00156-2.

57. Parkhomenko T. V., Tomson V. V., Galibin O. V. In vitro modifying effect of erythropoietin upon thymic lymphocytes: an inhibitor analysis // *Cell Therapy Transplant*. – 2018. – Vol. 7, № 4. – P. 83–88. DOI: 10.18620/ctt-1866-8836-2018-7-4-83-88.

58. Parkhomenko T. V., Morozova G. I., Klitsenko O. A., Tomson V. V. Erythropoietin (EPO) is the stimulus of non-specific immunity (experimental evaluation) // *Annals of Hematology*. – 2006. – Vol. 85, № 9. – P. 663.

59. Пархоменко Т. В., Михайлова Н. Б., Афанасьев Б. В., Галибин О. В., Томсон В. В. Оценка состояния клеток костного мозга по изменению интенсивности свечения флуоресцентного потенциал-чувствительного зонда иодид 2-[п-(диметиламино)стирил]-1-метилпиридиния // *Клинико-лабораторный консилуим*. – 2014. – Т. 48, № 1. – С. 88–93.

60. Lannert H., Able T., Becker S., Sommer M., Braun M. et al. Optimizing BM harvesting from normal adult donors // *Bone Marrow Transplantation*. – 2008. – Vol. 42. – P. 443–447.

61. Parkhomenko T. V., Galibin O. V., Verbitskaya E. V., Tomson V. V. Evaluation of energy potential of fresh and stored bone marrow cells using a fluorescent potential-sensitive probe // *Cell Therapy Transplant*. – 2016. – Vol. 5, № 2. – P. 60–65. DOI: 10.18620/1866-8836-2016-5-2-60-66.

62. Lioznov M. V., Freiburger P., Kroger N., Zander A. R., Fehse B. Aldehyde dehydrogenase activity as a marker for the quality of hematopoietic stem cell transplants // *Bone Marrow Transplantation*. – 2005. – Vol. 35, № 9. – P. 909–914. DOI: 10.1038/sj.bmt.1704928.

63. Морозова Г. И., Лопатина О. А., Михайлова Г. Р., Данлыбаева Г. А., Подчерняева Р. Я., Егорочкин Ю. В. Сравнительное исследование эффектов частотно-резонансных воздействий и голографической информации копии на модели клеток мозга хорька с применением потенциалчувствительного флуоресцентного зонда // *Биомедицинская радиоэлектроника*. – 2013. – № 5. – С. 28–35.

64. Морозова Г. И., Корнилаева Г. В., Подчерняева Р. Я., Кулинич Т. М., Боженко В. К. Исследование влияния КВЧ-излучения миллиметрового диапазона на мембранные структуры в культуре Т-лимфобластоидных клеток с помощью флуоресцентного зонда-катиона ДСМ // *Биомедицинская радиоэлектроника*. – 2014. – № 11. – С. 31–37.

REFERENCES

1. Mitochondria and the heart. Developments in Cardiovascular Medicine / eds by J. Marin-Garcia. New Jersey, Springer, 2005:400.

2. Filippi M. D., Ghaffari S. Mitochondria in the maintenance of hematopoietic stem cells: new perspectives and opportunities // *Blood*. 2019;133(18):1943–1952. DOI: 10.1182/blood-2018-10-808873.

3. Mitchell P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by chemiosmotic type of mechanism // *Nature*. 1961;191:144–148. DOI: 10.1038/191144a0.

4. Mitchell P., Moyle J. Estimation of membrane potential and pH difference across the cristae membrane of rat liver mitochondria // *Europ. J. Biochem*. 1969;7(4):471–484. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1969.tb19633.x.

5. Skulachev V. P. Membrane-linked energy transductions. Bioenergetic functions of sodium: H⁺ is not unique as a coupling ion // *Eur J Biochem*. 1985;151(2):199–208. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1985.tb09088.x.

6. Brand M. D., Nicholls D. G. Assessing mitochondrial dysfunction in cells // *Biochem J*. 2011;435:297–312. DOI: 10.1042/BJ20110162.

7. Yin Y., Shen H. Common methods in mitochondrial research (Review) // *Int J Mol Med*. 2022;50(4):1–29. DOI: 10.3892/ijmm.2022.5182.

8. Morse P. T., Wan J., Bell J., Lee I., Goebel D. J. et al. Sometimes less is more: inhibitory infrared light during early reperfusion calms hyperactive mitochondria and suppresses reperfusion injury // *Biochem Soc Trans*. 2022;50(5):1377–1388. DOI: 10.1042/BST20220446.

9. Yoon Y., Lee H., Federico M., Sheu S.-S. Non-conventional mitochondrial permeability transition: Its regulation by mitochondrial dynamics // *Biochim Biophys Acta (Bioenergetics)*. 2023;1864(1):148914. DOI: 10.1016/j.bba-bio.2022.148914.

10. Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular and Medical Aspects / eds by G. J. Siegel, R. W. Albers, S. T. Brady, D. L. Price. 7th Ed. Amsterdam, Elsevier Academic Press, 2006:992.

11. Kandel E. R., Schwartz J. H., Jessel T. M. Principal of neural science. New York, The McGraw-Hill Companies, 2002:1321.

12. Jin X., Zhang P., Zhang Y., Zhou M., Liu B. et al. Light-driven proton transmembrane transport enabled by bio-semiconductor 2D membrane: A general peptide-induced WS2 band shifting strategy // *Biosensors and Bioelectronics*. 2022;218:114741. DOI: 10.1016/j.bios.2022.114741.

13. Kennett E. C., Kuchel P. W. Redox reactions and electron transfer across the red cell membrane // *IUBMB Life*. 2003;55(7):375–385. DOI: 10.1080/152165403100015928438.

14. Baker M. A., Lawen A. Plasma membrane NADH-Oxidoreductase System. A critical review of the structural and functional data // *Antioxid. Redox. Signal*. 2000;2(2):197–212. DOI: 10.1089/ars.2000.2.2-197.

15. Morre D. M., Lenaz G., Morre D. J. Surface oxidase and oxidative stress propagation in aging // *J. Exp. Biol*. 2000;203(10):1513–1521. DOI: 10.1242/jeb.203.10.1513.

16. Freeman S. A., Grinstein S., Orłowski J. Determinants, maintenance, and function of organellar pH // *Physiol. Rev*. 2023;103(1):515–606. DOI: 10.1016/j.physrev.00009.2022.

17. Larm J. A., Vaillant F., Linnane A. W., Lawen A. Up-regulation of the plasma membrane oxidoreductase as a prerequisite for the viability of human Namalwa rho O cells // *J. Biol. Chem*. 1994;269(48):30097–30100. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)43779-9.

18. Li B., Wang Y., Castro A., Ng C., Wang Z. et al. The roles of two extracellular loops in proton sensing and permeation in human Otop1 proton channel // *Communications Biology*. 2022;5(1):1–13. DOI: 10.1038/s42003-022-04085-2.

19. Guidelli R. A historical biophysical dogma vs. an understanding of the structure and function of voltage-gated tetrameric ion channels. A review // *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*. 2022;1864(12):184046. DOI: 10.1016/j.bbamem.2022.184046.

20. Abad-Rodriguez J., Brocca M. E., Higuero A. M. Glycans and carbohydrate-binding/transforming proteins in axon physiology // *Adv. Neurobiol*. 2023;29:185–217. DOI: 10.1016/j.neuro.2023.03.012.

21. Montnach J., Blomer L. A., Lopez L., Filipis L., Meudal H. et al. In vivo spatiotemporal control of voltage-gated ion channels by using photoactivatable peptidic toxins // *Nature Communications*. 2022;13(1):1–13. DOI: 10.1038/s41467-022-27974-w.

22. Lu T., Zhang Y., Su Y., Zhou D., Xu Q. Role of store-operated Ca²⁺ entry in cardiovascular disease // *Cell Communication and Signaling*. 2022;20(1):1–10. DOI: 10.1186/s12964-022-00829-z.

23. Zhu W., Guo S., Homilius M., Nsubuga C., Wright S. H. et al. PIEZO1 mediates a mechanothrombotic pathway in di-

- abetes // *Science Translational Medicine*. 2022;14(626):1707. DOI: 10.1126/scitranslmed.abk1707.
24. Zhu Y., Sheng Z.-F., Yao H., Li D.-P. Emerging mechanisms involving brain Kv7 channel in the pathogenesis of hypertension // *Biochemical Pharmacology*. 2022;206:115318. DOI: 10.1016/j.bcp.2022.
25. Sasso E. M., Muraki K., Eaton-Fitch N., Smith P., Lesslar O. L. et al. Transient receptor potential melastatin 3 dysfunction in post COVID-19 condition and myalgic encephalomyelitis / chronic fatigue syndrome patients // *Molecular Medicine*. 2022;28(1):1–14. DOI: 10.1186/s10020-022-00528-y.
26. Nichols J. G., Martin A. R., Bruce G., Wollace D. G., Fuchs P. A. From neuron to brain. Sinauer Associates, 2003:671.
27. Furuta A., Miyoshi S., Itabashi Y., Shimizu T., Kira S. et al. Pulsatile cardiac tissue grafts using a novel three-dimensional cell sheet manipulation technique functionally integrates with the host heart, in vivo // *Circulation research*. 2006;98(5):705–712.
28. Jewell S. A., Petrov P. G., Winlove C. P. The effect of oxidative stress on the membrane dipole potential of human red blood cells // *Biochim Biophys Acta*. 2013;1828(4):1250–8. DOI: 10.1016/j.bbame.2012.12.019.
29. Wang H., Xi Y., Zheng Y., Wang X., Cooney A. J. Generation of electrophysiologically functional cardiomyocytes from mouse induced pluripotent stem cells // *Stem Cell Res*. 2016;16(2):522–30. DOI: 10.1016/j.scr.2016.02.032.
30. Bu G., Adams H., Barbary E. J., Rubart M. Uniform action potential repolarization within the sarcolemma of in situ ventricular cardiomyocytes // *Biophys. J*. 2009;96(6):25–32. DOI: 10.1016/j.bpj.2008.12.3896.
31. Dobretsov G. E. Fluorescent probes in the study of cells, membranes and lipoproteins. Moscow, Nauka, 1989: 277. (In Russ.).
32. Vida T. A., Emr S. D. A new vital stain visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast // *J. Cell. Biol*. 1995;28(5):779–792. DOI: 10.1083/jcb.128.5.779.
33. Brand M. D., Nicholls D. G. Assessing mitochondrial dysfunction in cells // *Biochemical Journal*. 2011;435:297–312. DOI: 10.1042/BJ20110162.
34. Lemasters J. J., Ramshesh V. K. Imaging of mitochondrial polarization and depolarization with cationic fluorophores // *Methods in cell biology*. 2007;80:283–295. DOI: 10.1042/BJ20110162.
35. Figueira T. R., Melo D. R., Vercesi A. E., Castilho R. F. Safranin as a fluorescent probe for the evaluation of mitochondrial membrane potential in isolated organelles and permeabilized cells // *Methods Mol. Biol*. 2012;810:103–17. DOI: 10.1007/978-1-61779-382-07.
36. Lone M. I., Nabi A., Dar N. J., Hussain A., Nazam N. et al. Toxicogenetic evaluation of dichlorophene in peripheral blood and in the cells of the immune system using molecular and flow cytometric approaches // *Chemosphere*. 2017;167:520–529. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2016.08.131.
37. Kataoka M., Fukura Y., Shinohara Y., Baba Y. Analysis of mitochondrial membrane potential in the cells by microchip flow cytometry // *Electrophoresis*. 2005;26(15):3025–31. DOI: 10.1002/elps.200410402. PMID: 16078196.
38. Garcia G. Jr., Chakravarty N., Abu A. E., Jeyachandran A. V., Takano K. A. et al. Vector-based vaccine provides maternal and fetal protection in mouse model // *Microbiol. Spectr*. 2022;10(5):e0113722. DOI: 10.1128/spectrum.01137-22.
39. Bereiter-Hahn Y. Dimethylaminostyrylmethylpyridinium iodine (DASPMI) as a fluorescent probe for mitochondria in situ // *Biochimica et Biophysica Acta*. 1976;423(1):1–14. DOI: 10.1016/0005-2728(76)90096-7.
40. Ramadass R., Bereiter-Hahn J. How DASPMI reveals mitochondrial membrane potential: fluorescence decay kinetics and steady-state anisotropy in living cells // *Biophys. J*. 2008;95(8):4068–4076. DOI: 10.1529/biophysj.108.135079.
41. Mewes H. L., Rafael. J. The 2-(dimethylaminostyryl)-1-methylpyridinium cation as indicator of the mitochondrial membrane potential // *FEBS Lett*. 1981;131(1):7–10. DOI: 10.1016/0014-5793(81)80875-7.
42. Gibbons B. A., Kharel P., Robinson L. C., Synowicki R. A., Model M. A. Volume measurements and fluorescent staining indicate an increase in permeability for organic cation transporter substrates during apoptosis // *Experimental cell research*. 2016;344(1):112–119. DOI: 10.1016/j.yexcr.2016.03.018.
43. Morozova G. I., Dobretsov G. E., Dubur G. Ya., Dubur R. R., Golitsin V. M. et al. Fluorescence of 4-(p-dimethylaminostyryl)-1-methylpyridinium in the live cell // *Cytology*. 1981;23(8):916–923. DOI: 10.1155/2022/7908357. (In Russ.).
44. Dobretsov G. E., Kosnikov V. V., Morozova G. I., Likhacheva L. M., Aidyraliev R. K., Vladimirov Yu. A. DSM fluorescent cation probe concentration gradient measurement across lymphocyte plasma and mitochondrial membranes // *Biological membranes*. 1986;3(3):266–274. (In Russ.).
45. Morozova G. I., Onishchenko N. A., Orzhekhovskaya I. G., Korobkova E. N., Polosina O. V. et al. Microfluorimetric method of identification and sensitization of the physiological state of lymphocytes and neutrophils in whole native blood using a fluorescent probe-the DSM cation (in an experiment and clinic) // *Hematology and transfusiology*. 1997;42(3):43–47. (In Russ.).
46. Morozova G. I., Kornilaeva G. V., Grinkevich O. M., Askarova K. Z., Lopatina O. A., Firsova E. L. Transmembrane potentials and mitochondrial activity of HeLa culture oncocytes during defrosting and during infection with adenovirus // *Topical issues of biological physics and chemistry*. 2021;6(4):630–635. (In Russ.).
47. Xie X., Zuffo M., Teulade-Fichou M. P., Granzhan A. Identification of optimal fluorescent probes for G-quadruplex nucleic acids through systematic exploration of mono- and distyryl dye libraries // *Beilstein J Org Chem*. 2019;15:1872–1889. DOI: 10.3762/bjoc.15.183.
48. Zhang L., Zhang W., Li Z., Lin S., Zheng T. et al. Mitochondria dysfunction in CD8+ T cells as an important contributing factor for cancer development and a potential target for cancer treatment: a review // *J Exp Clin Cancer Res*. 2022;41(1):227. DOI: 10.1186/s13046-022-02439-6.
49. Kosnikov V. V., Dobretsov G. E. Depolarizing action of allergens on passive sensitized lymphocytes // *Int. Arch. Allergy. Appl. Immunol*. 1991;95(1):42–47. DOI: 10.1159/000235452.
50. Morozova G. I., Parkhomenko T. V., Klitsenko O. A., Tomson V. V. Stimulating effect of erythropoietin on thymocyte energetic established in vitro with a potential-sensitive fluorescent probe in the mitochondria // *Biochem. Suppl. Series A: Membr Cell Biology*. 2007;1(4):325–330. DOI: 10.1134/S1990747807040083.
51. Deng X., Deng T., Ni Y., Zhan Y., Huang W. et al. Cytochrome c modulates the mitochondrial signaling pathway and polymorphonuclear neutrophil apoptosis in bile duct-ligated rats // *Exp Ther Med*. 2016;12(1):333–342. DOI: 10.3892/etm.2016.3313.
52. Kaur A., Jankowska K., Pilgrim C., Fraser S. T., New E. J. Studies of hematopoietic cell differentiation with a ratiometric and reversible sensor of mitochondrial reactive oxygen species // *Antioxid Redox Signal*. 2016;24(13):667–679. DOI: 10.1089/ars.2015.6495.
53. Petrov V. A., Dobretsov G. E., Wunderlich Z., Plikett F., Glass K. Detection of negative charge clusters on

the surface of plasma membranes of erythrocytes using fluorescent probes // Biophysics. 1983;28(3):501–502. (In Russ.).

54. Parkhomenko T. V., Klytsenko O. A., Tomson V. V. Erythropoietin stimulates aerobic and anaerobic processes in rat cardiomyocytes // Focus uni-luebeck. 2012;Suppl.:37.

55. Artuhov V. G., Putinzetva O. V., Bragina V. A., Pashkov M. V., Vasilenko D. V. Fluorescent methods in the research induced by UV radiation changes of structural and functional state of human blood lymphocytes // Bull. Exp. Biol. Med. 2012;153(6):891–895. DOI: 10.1007/s10517-012-1856-8.

56. Wandelt B., Mielniczak A., Turkewitsch P., Darling G. D., Stranix B. R. Substituted 4-[4-dimethylamino]styryl] pyridinium salt as a fluorescent probe for cell microviscosity // Biosensors Bioelectronics. 2003;18:465–471. DOI: 016/s0956-5663(02)00156-2.

57. Parkhomenko T. V., Tomson V. V., Galibin O. V. In vitro modifying effect of erythropoietin upon thymic lymphocytes: an inhibitor analysis // Cell Therapy Transplant. 2018;7(4):83–88. DOI: 10.18620/ctt-1866-8836-2018-7-4-83-88.

58. Parkhomenko T. V., Morozova G. I., Klitsenko O. A., Tomson V. V. Erythropoietin (EPO) is the stimulus of non-specific immunity (experimental evaluation) // Annals of Hematology. 2006;85(9):663.

59. Parkhomenko T. V., Mikhailova N. B., Afanasyev B. V., Galibin O. V., Thomson V. V. Assessment of the state of bone marrow cells by changing the intensity of the fluorescent potential-sensitive probe iodide 2-[p-(dimethyl-

amino)styryl]-1-methylpyridinium // Clinical and laboratory consultation. 2014;48(1):88–93. (In Russ.).

60. Lannert H., Able T., Becker S., Sommer M., Braun M. et al. Optimizing BM harvesting from normal adult donors // Bone Marrow Transplantation. 2008;42:443–447.

61. Parkhomenko T. V., Galibin O. V., Verbitskaya E. V., Tomson V. V. Evaluation of energy potential of fresh and stored bone marrow cells using a fluorescent potential-sensitive probe // Cell Therapy Transplant. 2016;5(2):60–65. DOI: 10.18620/1866-8836-2016-5-2-60-66.

62. Lioznov M. V., Freiburger P., Kroger N., Zander A. R., Fehse B. Aldehyde dehydrogenase activity as a marker for the quality of hematopoietic stem cell transplants // Bone Marrow Transplantation. 2005;35(9):909–914. DOI: 0.1038/sj.bmt.1704928.

63. Morozova G. I., Lopatina O. A., Mikhailova G. R., Danlybaeva G. A., Podchernyaeva R. Y., Egorochkin Y. V. Comparative study of the effects of frequency resonance effects and holographic information copy on ferret brain cell models using a potential-sensitive fluorescent probe // Bio-medical Radioelectronics. 2013;(5):28–35. (In Russ.).

64. Morozova G. I., Kornilaeva G. V., Podchernyaeva R. Ya., Kulinich T. M., Bozhenko V. K. Investigation of the effect of UHF radiation of the millimeter range on membrane structures in the culture of T-lymphoblastoid cells using a fluorescent probe-the DSM cation // Biomedical radio electronics. 2014;(11):31–37. (In Russ.).

Информация об авторах

Пархоменко Татьяна Васильевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник научной лаборатории патоморфологии Научно-клинического центра патоморфологии, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова (Санкт-Петербург, Россия); **Галибин Олег Всеволодович**, доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории генной и клеточной терапии отдела биотехнологий Научно-исследовательского института детской онкологии, гематологии и трансплантологии имени Р. М. Горбачёвой, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова (Санкт-Петербург, Россия); **Томсон Владимир Викторович**, доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры патологической анатомии с патологоанатомическим отделением, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова (Санкт-Петербург, Россия).

Information about authors

Parkhomenko Tatyana V., Dr. of Sci. (Biol.), Senior Research Fellow of the Scientific Laboratory of Pathomorphology, Scientific-Clinical Center of Pathomorphology, Pavlov University (Saint Petersburg, Russia); **Galibin Oleg V.**, Dr. of Sci. (Med.), Professor, Leading Research Fellow of the Laboratory of Gene and Cell Therapy of the Biotechnology Department, R.M. Gorbacheva Research Institute of Pediatric Oncology, Hematology and Transplantation, Pavlov University (Saint Petersburg, Russia); **Tomson Vladimir V.**, Dr. of Sci. (Med.), Professor, Professor of the Department of Pathological Anatomy with the Pathology Department, Pavlov University (Saint Petersburg, Russia).