

Применение электроаналитических методов для характеристики клеток человека

Д.В. Сайфуллина, И.И. Шахмаева, О.В. Бондарь, Т.И. Абдуллин
Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань
ООО «Биомедтех КФУ», Казань

Application of electroanalytical techniques for assessment of human cells

D.V. Saifullina, I.I. Shakhmaeva, T.I. Abdullin
Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan
«Biomedtech KFU» Ltd, Kazan

Бурное развитие клеточных технологий обуславливает востребованность информативных и экспрессных методов оценки жизнеспособности и физиологической активности клеток человека. В работе исследованы возможности новых инструментов для комплексного анализа биоэлектрохимических свойств клеток: поверхностного заряда клеточной мембраны и окислительно-восстановительной активности метаболитов. С применением анализатора динамического светорассеяния Malvern Zetasizer (Malvern Instruments) предложен подход к характеристике дзета-потенциала клеток человека и выявления на их поверхности фосфатидилсерина — раннего маркера апоптоза. На основе модифицированных электродов разработаны сенсоры, обладающие высокой чувствительностью к электроактивным метаболитам клеток: антиоксидантам и макроэргическим молекулам. Сенсоры применены для оценки метаболической активности/энергетического статуса клеток человека. Электрохимический сигнал адениновых нуклеотидов клеток на поверхности сенсора коррелирует с внутриклеточным содержанием АТФ по данным люциферазного метода и более чувствителен к изменению жизнеспособности клеток, чем метаболический MTS-тест. Разработан прототип портативного анализатора на основе печатного электрода, предназначенный для экспресс-оценки состояния клеток в суспензии, в том числе, различных донорских клеток, в объеме пробы менее 5 мкл. Предложенные инструменты и методы актуальны для трансплантации клеток, фундаментальных исследований и медицинской диагностики.

Ключевые слова: клетки человека, электрохимические свойства, апоптоз, метаболическая активность, АТФ, трансплантология, медицинская диагностика.

Трансплантация клеток является одним из наиболее эффективных подходов в лечении широкого спектра наследственных и приобретенных заболеваний, включая травмы и дегенеративно-дистрофические процессы различной этиологии [1]. Пересадку клеток костного мозга, а также переливание тромбоцитарной массы рутинно проводят в клинической практике для восстановления кроветворной функции после химиотерапии при лейкомии [2, 3].

Выраженным регенеративным потенциалом в отношении различных тканей организма обладают как специализированные клетки (фибробласты, эпителиальные клетки, лимфоциты), так и мультипотентные мезенхимные стромальные и гемопоэтические стволовые клетки. С использованием подобных клеток к настоящему времени предложено и продолжает разрабатываться множество протоколов для терапии нейродегенеративных [4], сердечно-сосудистых

Rapid development of cell technologies stipulates the need for informative and express methods for the analysis of viability and physiological activity of human cells. We studied analytical possibilities of novel tools for comprehensive characterization of bioelectrochemical properties of living cells, e.g. surface charge of cellular membrane and redox activity of metabolites. Using Malvern Zetasizer dynamic light scattering analyzer we proposed an approach to assessment of zeta potential of human cells and detection of phosphatidylserine on their surface as an early apoptotic marker. On the basis of modified electrodes we designed sensors exhibiting high sensitivity towards electroactive cellular metabolites including antioxidants and macroergic molecules. The sensors were applied for assessment of metabolic activity/energetic status of human cells (blood cells and cell cultures). Electrochemical signal of adenine nucleotides of cells on sensor surface correlated with intracellular level of ATP according to luciferase assay and was found to be more sensitive to alteration in cell viability than conventional MTS test. On the basis of disposable screen-printed electrodes we fabricated a prototype of portable analyzer for rapid analysis of cell health (e.g. for donor cells) in less than 5 μ l volume of cell sample. Proposed tools and methods are of interest in cell transplantology, basic research and cell-based medical diagnostics.

Key words: human cells, electrochemical properties, apoptosis, metabolic activity, ATP, transplantology, medical diagnostics.

заболеваний [5–7], сахарного диабета [8], патологий печени [9, 10], повреждений кожных покровов и др. заболеваний [11, 12].

Введению в организм реципиента донорских клеток, как правило, предшествует целый ряд манипуляций с ними, в том числе криоконсервация, хранение, культивирование, которые могут существенно влиять на состояние клеток и их биологические свойства [13]. Весьма актуальной проблемой клеточной трансплантологии является применение информативных и удобных методов анализа качества клеток человека, включая уровень их жизнеспособности и функциональной активности. Подобный скрининг призван обеспечить максимальный терапевтический эффект и уменьшить риск побочных эффектов при пересадке клеток [14, 15].

В настоящее время для исследования клеток человека широко применяют оптическую микроскопию

e-mail: tabdulli@gmail.com

и проточную цитометрию, которые в сочетании с различными флуоресцентными зондами позволяют проводить качественный и количественный анализ жизнеспособности, апоптоза, выявлять биомаркеры клеток [13, 14, 16, 17]. Несмотря на несомненную значимость, отмеченные методы являются достаточно дорогостоящими, длительными и чувствительными к условиям анализа. Бурное развитие клеточных технологий обуславливает необходимость и в более удобных и экспрессных аналитических инструментах для выявления ранних изменений физиологической активности клеток.

Для решения данной задачи целесообразно использовать электрохимические методы, позволяющие изучать фундаментальные процессы переноса заряда с участием клеток и их компонентов [18, 19]. Ключевыми электрохимическими параметрами живых клеток являются поверхностный заряд, а также окислительно-восстановительная активность клеточных компонентов. На примере тромбоцитов показано, что заряд, оцениваемый по величине их электрокинетического потенциала, напрямую зависит от состава и свойств плазмалеммы и служит важным диагностическим показателем [20]. Будучи электрохимически активными, многие биомолекулы способны окисляться/восстанавливаться на электродах при характерном потенциале [19]. Благодаря этому можно проводить электрохимическое определение важнейших клеточных метаболитов, содержание которых отражает физиологическую активность и «здоровье» клеток [21].

В настоящей работе нами исследованы возможности двух современных инструментов для электроанализа клеток человека: анализатора динамического рассеяния света Malvern Zetasizer (Malvern Instruments) и разработанных нами ранее электрохимических сенсоров на основе электродов, модифицированных углеродными нанотрубками [22–25]. С помощью этих инструментов предложены эффективные методы анализа цитоплазматической мембраны и метаболического профиля, которые представляют интерес для экспресс-диагностики состояния донорских клеток и для фундаментальных исследований.

Материал и методы

Культивирование клеток. Реагенты для работы с культурами клеток произведены НПП ПанЭко. Клетки эндотелия матки (HeLa) и фибробласты кожи человека культивировали в среде DMEM с добавлением 10% телячьей эмбриональной сыворотки, 2 mM L-глутамина, 100 мкг/мл стрептомицина и 100 ед./мл пенициллина. Клетки выращивали в полистироловых флаконах и после образования монослоя промывали раствором Хэнкса и диссоциировали обработкой 0,05% трипсином-ЭДТА. Концентрацию клеток в суспензии в ФСБ определяли на гемоцитометре; количество жизнеспособных оценивали путем избирательного окрашивания мертвых клеток трипановым синим, а также смесью акридинового оранжевого — этидия бромида (5 μ g/мл) на флуоресцентном микроскопе Axio Vision (Carl Zeiss). Для уменьшения жизнеспособности клетки подвергали тепловому шоку путем прогревания суспензии при 45°C в течение 15 и 30 мин.

Выделение клеток из крови человека. Эритроциты и мононуклеары выделяли из периферической

крови здоровых доноров, стабилизированной 0,27% ЭДТА в качестве антикоагулянта. Кровь отстаивали в пробирке в течение 60 мин. для осаждения эритроцитов. Содержащую лейкоциты плазму разделяли в градиенте плотности (1,077 г/мл) фиколл-пака при $\times 400g$ в течение 40 мин [26]. Содержащий мононуклеары слой отбирали, промывали центрифугированием и суспендировали в ФСБ.

Анализ дзета-потенциала клеток. Дзета-потенциал клеток в суспензии ($0,5 \times 10^6$ /мл) регистрировали методом электрофоретического светорассеяния на анализаторе Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments). Измерения проводили в U-образной кювете с позолоченными электродами при pH 7,0 и температуре 25°C. Результаты обрабатывали с помощью программного обеспечения Dispersion Technology Software 6.2 (Malvern Instruments).

Анализ жизнеспособности и АТФ клеток. Клетки помещали в 96-луночную планшету (2 тыс. клеток в лунке) и культивировали в течение 2 сут. в присутствии доксорубина в различных концентрациях в стандартных условиях. Количество жизнеспособных клеток определяли по поглощению продукта метаболического восстановления тетразолия MTS (Promega) при 490 нм на микропланшетном анализаторе Stat Fax 2100 (Awareness Technology).

АТФ в клетках определяли в реакции с люциферазой с помощью биолюминесцентного набора, согласно рекомендациям производителя (Люмтек, Россия). Для этого лизаты обработанных клеток смешивали со свежеприготовленным раствором люциферазы (2000 ед/мл) и далее регистрировали интенсивность люминесценции при 570 нм на хемилюминиметре Хемилюм-12 (Пушино, Россия).

Для проточной цитометрии клетки (1×10^6 /мл) обрабатывали смесью FITC-аннексина V и пропидиума йодида в связывающем буфере в соответствии с протоколом производителя (BD Biosciences). Анализ проводили на цитометре BD FACSCalibur (BD Biosciences); количество флуоресцентных событий составляло более 1000.

Электрохимические измерения. Для определения внутриклеточных метаболитов клетки лизировали путем гипосмотического шока в деионизованной воде. Для предотвращения деградации метаболитов лизаты замораживали до проведения анализа. В качестве сенсоров использовали стеклоуглеродные электроды (диаметр 1,5 мм), модифицированные многослойными углеродными нанотрубками. Ранее нами показано, что модифицированные сенсоры характеризуются пористой наноструктурированной поверхностью и воспроизводимыми электрохимическими свойствами [22–24].

Электрохимические измерения проводили в трех-электродной ячейке, состоящей из модифицированного сенсора в качестве рабочего электрода, хлоридсеребряного электрода сравнения (Ag/AgCl) и никелевого противозэлектрода. Аликвоту суспензии или лизата клеток (5 μ л) известной концентрации наносили на поверхность сенсора и выдерживали 5 мин. для адсорбции клеточных компонентов. Далее сенсор с адсорбтом переносили в фоновый электролит (0,1 M хлорид натрия + 0,01 M ацетат натрия, pH 5,0) и регистрировали сигнал окисления в режиме квадратно-волновой вольтамперометрии на потенциостате/гальваностате Autolab PGSTAT12 (EcoChemie) в отсутствие электроактивных компонентов в растворе.

Результаты и их обсуждение

Для анализа электрических свойств мембраны животных клеток широко применяют микроэлектрофорез и капиллярный электрофорез, с помощью которых подтверждают ряд заболеваний человека [27, 28], а также изучают процессы дифференцировки и взаимодействия клеток [29, 30]. Перспективной альтернативой является метод динамического светорассеяния (ДСР), основанный на зависимости частоты/фазы колебаний рассеиваемого света от подвижности диспергированных в растворе частиц и клеток [31].

Нами охарактеризованы электрические свойства различных клеток человека методом ДСР на анализаторе Malvern Zetasizer. На примере клеток эндотелия матки выяснено, что при pH 7,0 суспендированные клетки генерируют однородную кривую дзета-потенциала с максимумом при 19,4 мВ (рис. 1). Регистрируемый дзета-потенциал является мерой потенциала двойного электрического слоя на поверхности клетки [30], значение которого зависит от биохимического состава плазмалеммы. Фибробласты кожи и мононуклеары человека обладали сходными с клетками эндотелия матки значениями дзета-потенциала (-23,2 и -21,9 мВ соответственно), тогда как дзета-потенциал эритроцитов составил -31,8 мВ (табл.). Отрицательные значения потенциала клеток при физиологических pH, очевидно, являются следствием суммарного присутствия в плазмалемме фосфолипидов, белков и их конъюгатов с полисахаридами.

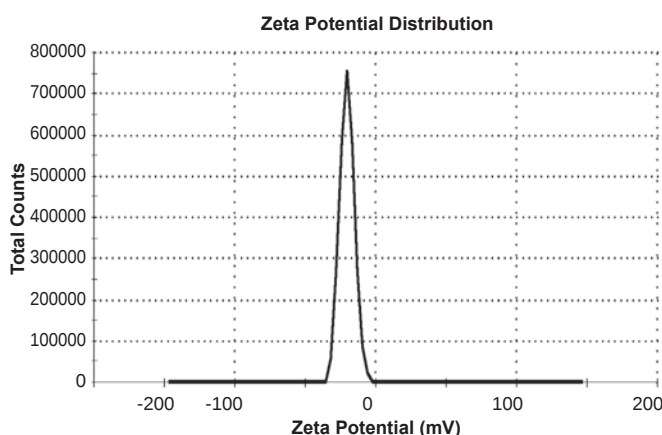


Рис. 1. Кривая распределения дзета-потенциала клеток эндотелия матки ($0,5 \times 10^6$ /мл). Метод динамического светорассеяния на анализаторе Malvern Zetasizer Nano ZS

Значение дзета-потенциала некоторых клеток человека (pH 7,0)

Клетки	Дзета-потенциал, мВ
Клетки эндотелия матки	-19,4±0,8
Фибробласты	-23,2±1,0
Мононуклеары крови	-21,9±0,2
Эритроциты	-31,8±1,1

Примечание: дзета-потенциал липосом (фосфатидил-холин) -62,3±1,5.

Установлено, что дзета-потенциал липосом из фосфатидилхолина — преобладающего мембранного липида — составляет почти -62 мВ, указывая на значимый вклад липидов в суммарный заряд клеточной мембраны. Тот факт, что в сравнении с липосомами животные клетки (эндотелиоциты матки, фибробласты, мононуклеары крови) характеризуются меньшим зарядом (см. табл.), можно объяснить присутствием в составе липидного бислоя белков и остатков нейтральных углеводов. Эритроциты, в отличие от других исследуемых клеток, имели почти на 10 мВ более отрицательный дзета-потенциал, что объясняется наличием на поверхности эритроцитов большого числа отрицательно заряженных остатков сиаловой кислоты [32].

Мы проследили изменение дзета-потенциала клеток эндотелия матки при уменьшении их жизнеспособности после теплового шока. Обнаружено, что после 30 мин. обработки при 45°C дзета-потенциал клеток увеличивался почти на 4,2 мВ: с $-19,4 \pm 0,8$ до $-23,6 \pm 0,8$ мВ. По данным проточной цитометрии, подобная обработка приводила к уменьшению количества жизнеспособных клеток почти на 62%, регистрируемое по появлению клеток, окрашиваемых пропидиум йодидом, а также к увеличению числа FITC-аннексин-позитивных клеток почти на 68%. В условиях отсутствия вносимых в суспензию клеток химических агентов, способных влиять на дзета-потенциал, регистрируемое увеличение последнего, вероятно, обусловлено изменением состава плазмалеммы при клеточной гибели.

Существенное увеличение числа окрашиваемых FITC-аннексином клеток после тепловой обработки свидетельствует о повышении содержания на внешнем слое плазмалеммы фосфатидилсерина [33]. В отличие от электронейтрального цвиттер-иона фосфатидилхолина, молекула фосфатидилсерина имеет в физиологических условиях значительный отрицательный заряд вследствие наличия карбоксильной группы. Это дополнительно свидетельствует о том, что повышение отрицательного заряда клеток при тепловом шоке, по-видимому, связано с экспозицией фосфатидилсерина на внешнем слое клеточной мембраны, сопутствующей апоптозу и некрозу [34].

Полученные результаты демонстрируют возможность применения метода ДСР для характеристики клеток человека по их поверхностному заряду, в том числе для выявления фосфатидилсерина — раннего маркера апоптоза [34]. Предложенный подход представляет интерес для разработки быстрых, требующих минимальной пробоподготовки методик анализа мембран донорских клеток и оценки понижения их жизнеспособности до и после презервации. Актуальным направлением применения ДСР является исследование электрохимических свойств мембран клеток при патологии, различных воздействиях, а также процессах клеточной дифференцировки и развития [35].

Наряду с поверхностным зарядом важным электрохимическим параметром животных клеток является уровень окислительно-восстановительной активности их метаболитов. Для анализа клеточных метаболитов мы применили сенсор на основе электрода, модифицированного углеродными нанотрубками. Последние обеспечивают эффективную адсорбцию биомолекул на электроде и увеличивают сигнал их окисления при характерных потенциалах [22–24]. Благодаря этому, модифицированные сен-

соры (МС) могут быть использованы для прямого чувствительного определения редокс-активных метаболитов клеток.

Установлено, что суспендированные в ФСБ мононуклеары крови генерируют на поверхности МС три пика окисления при потенциалах +0,8; +1,05 и +1,2 В, обозначенные как пик 1, 2 и 3 соответственно (рис. 2). Сходный сигнал производили и другие исследуемые в работе клетки. По нашим данным, регистрируемый сигнал обусловлен ключевыми клеточными метаболитами. В частности, при потенциале пика 1 обнаруживаются аминокислоты и пептиды, включая глутатион, а также НАД(Ф)Н. Отмеченные биомолекулы, в особенности, основной внутриклеточный антиоксидант глутатион, проявляют выраженные антиокислительные свойства [36–38], что коррелирует с их относительно низким потенциалом окисления. Пики 2 и 3 соответствуют гуаниновым и адениновым нуклеотидам, и их величина, по-видимому, отражает присутствие в клетках соответственно ГТФ и АТФ — ключевых макроэргических молекул.

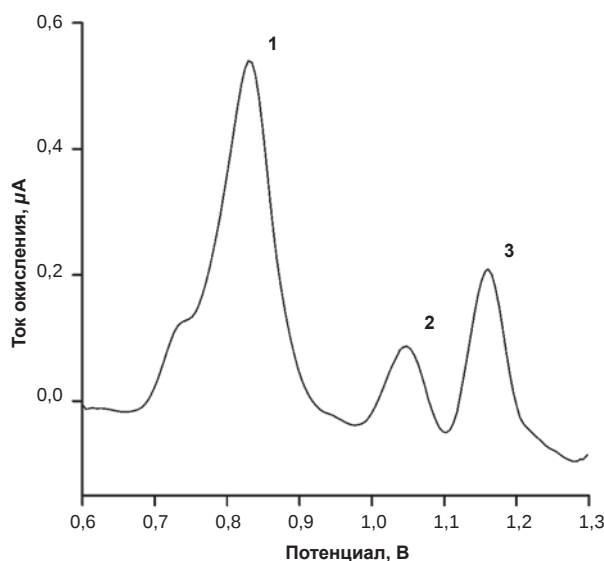


Рис. 2. Кривая окисления метаболитов клеток эндотелия матки на поверхности модифицированного сенсора: 1, 2 и 3 — пики окисления. Квадратно-волновая вольтамперометрия. Концентрация клеток 1×10^6 /мл

Внутриклеточное содержание адениновых нуклеотидов, в особенности АТФ, является важным биохимическим показателем интенсивности метаболических процессов в клетке. Концентрация АТФ в клетках служит полезным диагностическим маркером для оценки их жизнеспособности [39], индукции апоптоза [40, 41], повреждения кардиомиоцитов [42] и функциональности сперматозоидов [43].

Мы изучили возможность анализа АТФ и энергетического статуса клеток человека с помощью МС. Сигнал окисления АТФ, адсорбированного на МС, линейно увеличивался в диапазоне концентраций 0,05–15 мМ согласно уравнению: $I (\mu A) = 0,03 \pm 0,15 + 0,6 \pm 0,03 \times C (mM)$; $R = 0,99$, что свидетельствует о широком диапазоне линейной зависимости и воспроизводимости анализа АТФ.

Для определения внутриклеточного АТФ на МС клетки предварительно лизировали путем гипосмотического шока для высвобождения метаболитов.

Добавление 0,5 мМ АТФ к лизату клеток эндотелия матки приводило к увеличению пика 3 до величины $1,12 \pm 0,10 \mu A$, почти равной сумме пиков, генерируемых отдельно АТФ ($0,65 \pm 0,03 \mu A$) и лизатом клеток ($0,42 \pm 0,04 \mu A$) в тех же концентрациях. Это указывает на возможность количественного анализа АТФ в лизатах клеток с использованием МС. Учитывая тот факт, что другие адениновые нуклеотиды, наряду с АТФ, также могут вносить вклад в пик 3, мы оценили корреляцию величины этого пика с содержанием АТФ и жизнеспособностью клеток с помощью независимых методов.

Для уменьшения жизнеспособности клетки эндотелия матки обрабатывали доксорубицином, который, интеркалируя в ДНК, ингибирует топоизомеразу II и вызывает повреждение клеток и индукцию апоптоза [44]. С помощью пролиферативного MTS-теста предварительно были подобраны 2 концентрации доксорубина: наибольшая нетоксичная (2 μM) и вызывающая гибель 50% клеток в культуре (9 μM). Значения электрохимического сигнала клеток (пик 3) после их культивирования в присутствии антибиотика приведены на рис. 3.

Установлено, что доксорубин в концентрации 9 μM вызывает почти 3-кратное уменьшение пика адениновых нуклеотидов в клетках, очевидно, вследствие индукции апоптоза/некроза, сопровождающихся понижением содержания энергетических молекул [40, 41]. При этом электрохимический сигнал клеток достоверно уменьшался почти на 22% уже при действии доксорубина в концентрации 2 μM , нетоксичной для клеток по данным MTS-теста (рис. 3).

Дополнительно, мы оценили как электрохимический сигнал клеток эндотелия матки соотносится с внутриклеточной концентрацией АТФ, детектируемого в реакции с люциферазой. В этом опыте клетки кратковременно подвергли тепловому шоку при 45°C, который сопровождался значительным падением сигнала адениновых нуклеотидов клеток на МС (рис. 4).

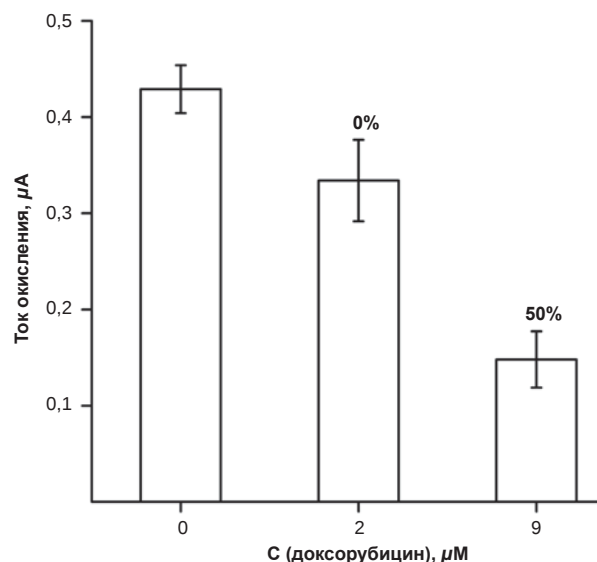


Рис. 3. Диаграмма значений цитотоксичности различных концентраций доксорубина. Измерен сигнал адениновых нуклеотидов клеток эндотелия матки, выращенных в присутствии доксорубина, на модифицированном сенсоре. Клетки лизировали в концентрации $0,5 \times 10^6$ /мл. MTS-тест

По данным проточной цитометрии, уже 15-минутное прогревание клеток приводило к появлению около 13% апоптотических и 38% некротических клеток в суспензии. По данным люциферазного метода уменьшение электрохимического сигнала обработанных клеток коррелировало с понижением содержания внутриклеточного АТФ (рис. 4).

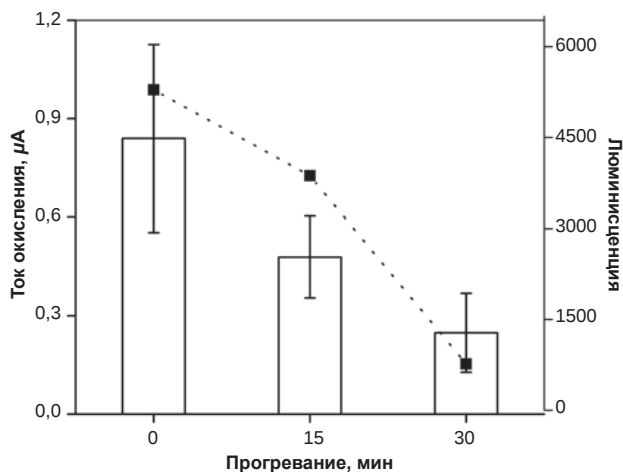


Рис. 4. Диаграмма влияния теплового шока клеток эндотелия матки на электрохимический сигнал адениновых нуклеотидов (столбцы) и люминесцентный сигнал в люциферазной реакции (линия). Суспензию клеток ($1 \times 10^5/\text{мл}$) выдерживали при 45°C в течение 15 и 30 мин и лизировали перед анализом

В совокупности результаты демонстрируют, что МС характеризуются большей чувствительностью к изменению жизнеспособности клеток, чем МТС-тест. Сигнал адениновых нуклеотидов клеток на МС отражает уровень АТФ в клетках при изменении их жизнеспособности. Разработанные сенсоры являются эффективным инструментом для анализа метаболической активности клеток человека и выявления ранних изменений в их жизнеспособности. Преимуществом сенсоров является возможность одновременного определения в нескольких микролитрах пробы клеточных метаболитов, различающихся по редокс-свойствам. Проводимый анализ не требует применения нестабильных/дорогостоящих биохимических реактивов и специализированного оборудования, используемых, например, в люциферазном методе.

ЛИТЕРАТУРА:

- Barry F.P., Murphy J.M. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2004; 36(4): 568–84.
- Laughlin M.J., Eapen M., Rubinstein P. et al. Outcomes after transplantation of cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2004; 351(22): 2265–75.
- Schiffer C.A., Anderson K.C., Bennett C.L. et al. Platelet transfusion for patients with cancer: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *J. Clin. Oncol.* 2001; 19(5): 1519–38.
- Исламов Р.Р., Ризванов А.А., Гусев Д.С. и др. Генная и клеточная терапия нейродегенеративных заболеваний. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия* 2007; 2(3): 29–37.
- Balsam L.B., Wagers A.J., Christensen J.L. et al. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature* 2004; 428(6983): 668–73.
- Silva G.V., Litovsky S., Assad J.A.R. et al. Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in canine chronic ischemia model. *Circulation* 2005; 111(2): 150–6.



Рис. 5. Прототип биоаналитического устройства для анализа метаболической активности клеток в составе портативного электрохимического анализатора (Em Stat, Palm Instruments) и одноразового печатного электрода

Разработанные сенсоры востребованы для быстрой оценки качества клеточных биоматериалов в биотехнологии и трансплантологии, а также для диагностического скрининга патологий, сопровождающихся изменением метаболизма клеток. Нами предложен прототип электрохимического устройства для исследования метаболической активности клеток (рис. 5), состоящего из портативного анализатора и плоского электрода (screen-printed electrode), изготавливаемого с помощью технологии трафаретной печати. Используемые печатные электроды, наряду с воспроизводимыми свойствами, имеют низкую себестоимость, что является важной предпосылкой для их практического использования в биоанализе [45].

Работа частично финансировалась в рамках 7 Рамочной программы Евросоюза, проект FP7-PEOPLE-2010-IRSES-269267 (ENSOR), а также проекта по развитию инновационной инфраструктуры в Казанском (Приволжском) федеральном университете по постановлению Правительства Российской Федерации № 219.

- Смолянинов А.Б., Пыхтин Е.В., Булгин Д.В. и др. Клеточные технологии в лечении терминальной стадии хронической ишемии нижних конечностей. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия* 2007; 2(3): 40–6.
- Kizilel S., Garfinkel M., Opara E. The bioartificial pancreas: progress and challenges. *Diabetes Technol. Ther.* 2005; 7(6): 968–85.
- Houlihan D.D., Newsome P.N. Critical review of clinical trials of bone marrow stem cells in liver disease. *Gastroenterology* 2008; 135(2): 438–50.
- Киясов А.П., Одинцова А.Х., Гумерова А.А. и др. Трансплантация аутогенных гемопоэтических стволовых клеток больным хроническими гепатитами. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия* 2008; 3(1): 70–5.
- Woodley D.T., Remington J., Huang Y. et al. Intravenously injected human fibroblasts home to skin wounds, deliver type VII collagen, and promote wound healing. *Mol. Ther.* 2007; 15(3): 628–35.
- Koizumi N., Inatomi T., Suzuki T. et al. Cultivated corneal epithelial stem cell transplantation in ocular surface disorders. *Ophthalmology* 2001; 108(9): 1569–74.

13. Yang H., Acker J., Chen A. et al. In situ assessment of cell viability. *Cell Transplant.* 1998; 7(5): 443–51.
14. Ichii H., Inverardi L., Pileggi A. et al. A novel method for the assessment of cellular composition and beta-cell viability in human islet preparations. *Am. J. Transplant.* 2005; 5(7): 1635–45.
15. Bravo D., Rigley T.H., Gibran N. et al. Effect of storage and preservation methods on viability in transplantable human skin allografts. *Burns* 2000; 26(4): 367–78.
16. Stephens D.J., Allan V.J. Light microscopy techniques for live cell imaging. *Science* 2003; 300(5616): 82–6.
17. Owens M.A., Vall H.G., Hurley A.A. et al. Validation and quality control of immunophenotyping in clinical flow cytometry. *J. Immunol. Methods.* 2000; 243(1–2): 33–50.
18. Spegel C., Heiskanen A., Skjolding L.H.D. et al. Chip based electroanalytical systems for cell analysis. *Electroanalysis* 2008; 20(6): 680–702.
19. Jacobs C.B., Peairs M.J., Venton B.J. Review: Carbon nanotube based electrochemical sensors for biomolecules. *Anal. Chim. Acta.* 2010; 662(2): 105–27.
20. Stoltz J.F. Electrochemical properties of platelets: clinical and pharmacological applications. *Ann. NY Acad. Sci.* 1983; 416(1): 720–41.
21. Fernie A.R., Trethewey R.N., Krotzky A.J. et al. Metabolite profiling: from diagnostics to systems biology. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2004; 5(9): 763–9.
22. Абдуллин Т.И., Никитина И.И., Ишмухаметова Д.Г. и др. Электроды, модифицированные углеродными нанотрубками, для электрохимических ДНК-сенсоров. *Журн. аналит. химии.* 2007; 62(6): 667–71.
23. Абдуллин Т.И., Бондарь О.В., Ризванов А.А. и др. Биосенсоры на основе углеродных нанотрубок для характеристики структуры ДНК. *Прикл. Биохим. Микробиол.* 2009; 45(2): 252–6.
24. Shakhmaeva I.I., Saifullina D.V., Sattarova L.I. et al. Electrochemical sensor for blood deoxyribonucleases: design and application to diagnostics of autoimmune thyroiditis. *Anal. Bioanal. Chem.* 2011; 401(8): 2591–7.
25. Сайфуллина Д.В., Шахмаева И.И., Абдуллин Т.И. Способ оценки метаболической активности клеток и устройство для его осуществления. Заявка на патент РФ №2011118802.
26. Kanof M.E., Smith P.D., Zola H. Isolation of whole mononuclear cells from peripheral blood and cord blood. In *Current Protocols in Immunology*. John Wiley & Sons, Inc.; 2001.
27. Korohoda W., Wilk A. Cell electrophoresis – a method for cell separation and research into cell surface properties. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 2008; 13(2): 312–26.
28. Kuo Y.-C., Shih K.-H., Yang J.-T. Capillary electrophoresis of bone marrow stromal cells with uptake of heparin-functionalized poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles during differentiation towards neurons. *Electrophoresis* 2010; 31(2): 315–23.
29. Carmona-Ribeiro A.M., Ortis F., Schumacher R.I. et al. Interactions between cationic vesicles and cultured mammalian cells. *Langmuir.* 1997; 13(8): 2215–18.
30. Kuo Y.-C., Lin T.-W. Electrophoretic mobility, zeta potential, and fixed charge density of bovine knee chondrocytes, methyl methacrylate, sulfopropyl methacrylate, polybutylcyanoacrylate, and solid lipid nanoparticles. *J. Phys. Chem. B.* 2006; 110(5): 2202–8.
31. Zeta potential: An introduction in 30 minutes (Technical note). Malvern Instruments. MRK654-01.
32. Marchesi V.T., Tillack T.W., Jackson R.L. et al. Chemical characterization and surface orientation of the major glycoprotein of the human erythrocyte membrane. *PNAS USA* 1972; 69(6): 1445–9.
33. Koopman G., Reutelingsperger C.P., Kuijten G.A. et al. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 1994; 84(5): 1415–20.
34. Vermes I., Haanen C., Steffens-Nakken H. et al. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods.* 1995; 184(1): 39–51.
35. Sundelacruz S., Levin M., Kaplan D.L. Role of membrane potential in the regulation of cell proliferation and differentiation. *Stem Cell Rev.* 2009; 5(3): 231–46.
36. Meucci E., Mele M.C. Amino acids and plasma antioxidant capacity. *Amino Acids.* 1997; 12(3): 373–7.
37. Kirsch M., De Groot H. NAD(P)H, a directly operating antioxidant? *Free Radic. Biol. Med.* 2001; 31(9): 1569–74.
38. Fernandes R.S., Cotter T.G. Apoptosis or necrosis: intracellular levels of glutathione influence mode of cell death. *Biochem. Pharmacol.* 1994; 48(4): 675–81.
39. Petty R.D., Sutherland L.A., Hunter E.M. et al. Comparison of MTT and ATP-based assays for the measurement of viable cell number. *J. Biolumin. Chemilumin.* 1995; 10(1): 29–34.
40. Richter C., Schweizer M., Cossarizza A. et al. Control of apoptosis by the cellular ATP level. *FEBS Lett.* 1996; 378(2): 107–10.
41. Lelli J.L., Becks L.L., Dabrowska M.I. et al. ATP converts necrosis to apoptosis in oxidant-injured endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* 1998; 25(6): 694–702.
42. Buja L.M., Entman M.L. Modes of myocardial cell injury and cell death in ischemic heart disease. *Circulation* 1998; 98(14): 1355–7.
43. Wang C., Chan S.Y., Ng M. et al. Diagnostic value of sperm function tests and routine semen analyses in fertile and infertile men. *J. Androl.* 1988; 9(6): 384–9.
44. Gewirtz D.A. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem. Pharmacol.* 1999; 57(7): 727–41.
45. Albareda-Sirvent M., Merkoci A., Alegret S. Configurations used in the design of screen-printed enzymatic biosensors. A review. *Sens. Actuators.* 2000; 69(1–2): 153–63.

Поступила 30.08.2011