

11. Вашанов Г.А., Каверин Н.Н. Взаимосвязи между основными антиоксидантными системами крови телят разного возраста. *Вестник ВГУ, Серия: Химия. Биология. Фармация*, 2009, вып. 1, с. 58-61.
12. Lam L., Ying L. Hasegawa S. Effects of citrus limonoids on glutathione S-transferase activity in mice. *J. Agric. Food Chem.*, 1989, vol. 37, pp. 878-880. [Vashanov G. A., Kaverin N. N. The relationship between the main antioxidant systems of blood of calves of different ages. *Bulletin of VSU, Series: Chemistry. Biology. Farmacia*, 2009, vol. 1, pp. 58-61. (In Russ.)]
13. Колесниченко Л.С., Кулинский В.И. Глутатионтрансферазы. *Успехи соврем. биол.*, 1989, т. 107, с. 179-194. [Kolesnichenko L.S., Kulinsky V.I. Glutathione Transferases. *The successes modern biol.*, 1989, vol. 107, pp. 179-194. (In Russ.)]

МТТ ДЕПОЛЯРИЗУЕТ МИТОХОНДРИИ В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ НЕЙРОНАХ

Шарипов Р.Р.¹, Лисина О.Ю.^{1,2}, Красильникова И.А.³, Вышенская Т.В.², Пинелис В.Г.³, Сурин А.М.^{1,3,4}

¹ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии»

ул. Балтийская, 8, г. Москва, 125315, РФ

²Московский технологический университет

пр. Вернадского, 78, г. Москва, 119454, РФ

³ФГАУ «Научный центр здоровья детей» Минздрава России

Ломоносовский пр, 2, стр.1, г. Москва, 119991, РФ

⁴Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова

ул. Островитянова, 1, г. Москва, 117513, РФ

Аннотация: МТТ-анализ – один из наиболее используемых методов определения выживаемости клеток в культуре при различных фармакологических воздействиях. Внутриклеточные дегидрогеназы восстанавливают МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид) до формазана, который сильно поглощает свет области короче ~600нм. Формазан образует агрегаты и обнаруживается в клетках по появлению темных «зерен». В настоящей работе выполнено исследование влияния МТТ на митохондриальный потенциал ($\Delta\Psi_m$) и поглощение света в культивируемых нейронах мозжечка крысы методами световой микроскопии. Изменения потенциала регистрировали с помощью флуоресцентного потенциал-чувствительного зонда родамин 123 (Rh123). Добавление МТТ (0,1мМ) вызывало быстрое и практически полное тушение флуоресценции Rh123, которое через 5-10 мин сменялось ростом флуоресценции в нуклеоплазме. Зонд выходил из митохондрий в цитозоль с последующей диффузией в ядро, что является характерным признаком падения $\Delta\Psi_m$. Столь же быстрым было тушение флуоресценции митотрекера зеленого (MTG), которое не сменялось ростом флуоресценции, поскольку MTG связывается с митохондриями необратимо. Рост флуоресценции Rh123 совпадал с началом снижения интенсивности света, проходящего сквозь клетки, в результате образования формазана. МТТ вызывал также необратимое снижение автофлуоресценции нейронов, обусловленной NADH. Восходящая фаза сигнала Rh123 и снижение интенсивности проходящего сквозь клетки света отражает, вероятно, прекращение окисления NADH комплексом I дыхательной цепи вследствие того, что NADH тратится на восстановление МТТ до формазана. В итоге прекращается работа комплекса I дыхательной цепи и развивается деполяризация митохондрий. Полученные результаты указывают на то, что МТТ (при концентрациях 0,1мМ и выше) вызывает быструю дисфункцию митохондрий и поэтому следует относиться с осторожностью к интерпретации данных о выживаемости клеток и активности дегидрогеназ на основании количества формазана, образовавшегося при инкубации клеточных культур с МТТ.

Ключевые слова: нейроны, митохондриальный потенциал, флуоресцентная микроскопия, МТТ.

MTT DEPOLARIZE MITOCHONDRIA IN CULTURED NEURONS

Sharipov R.R.¹, Lisina O.Yu.^{1,2}, Krasilnikova I.A.³, Vyshenskaya T.V.², Pinelis V.G.³, Surin A.M.^{1,3,4}

¹Institute of General Pathology and Pathophysiology

Baltiiskaya str., 8, Moscow, 125315, Russia

²Moscow Technological Institute

Vernadskogo av., 78, Moscow, 119454, Russia

³Federal State Autonomous Institution «Scientific Center for Children's Health» of the Ministry of Health of the Russian Federation

Lomonosovsky av., 2/1, Moscow, 119991, Russia

⁴Pirogov Russian National Research Medical University

Ostrovityanova str., 1, Moscow, 117997, Russia

Abstract: MTT assay is one of the widespread methods of determining the viability of cells in culture with different pharmacological treatment. Intracellular dehydrogenases reduce MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) to formazan, which absorbs light in the spectral region <600nm. Formazan forms aggregates in the cells which appeared as dark spots. In the present work, we performed a light microscopy study on the impact of MTT on mitochondrial potential ($\Delta\Psi_m$) and the light absorption by cultured neurons from rat cerebellum. Changes of $\Delta\Psi_m$ were recorded employing fluorescent potential-sensitive probe rhodamine123 (Rh123). Application of MTT (0.1mM) caused a rapid and almost complete quenching of fluorescence Rh123, followed by (in 5-10 min) fluorescence increase in the nucleoplasm. Rh123 diffused out of the mitochondria to the cytosol followed by diffusion into the nucleus, which is a characteristic feature of the $\Delta\Psi_m$ fall. Equally rapid has been quenching of the MitoTracker

Green (MTG) fluorescence, however without subsequent fluorescence increase, because MTG irreversibly binds to mitochondria. Growth of Rh123 fluorescence coincided with the beginning of absorption of light passing through the cells, due to formation of formazan. MTT also caused irreversible reduction in the neuronal NADH autofluorescence. Rising phase of the Rh123 signal and decrease of the cell culture light transmittance likely reflects restriction of NADH oxidation by respiratory chain complex 1 because NADH is spent on the restoration of MTT to formazan. As a result, operation of the complex 1 is ceased and mitochondrial depolarization develops. The results obtained suggest that the MTT (at concentrations of 0.1 mM and above) causes rapid mitochondrial dysfunction and therefore should be treated with caution in the interpretation of data concerning cell survival and dehydrogenase activity based on the amount of formazan formed during the incubation of cell cultures with MTT.

Key words: neurons, mitochondrial potential, fluorescence microscopy, MTT.

Введение. Одним из основных этапов создания лекарств, снижающих гибель нейронов мозга, является исследование влияния биологически активных веществ на гибель клеток в первичных культурах, полученных из различных разделов мозга подопытных животных (преимущественно крыс и мышей). Для выполнения этого этапа разработан широкий спектр методов [1, 2]. К числу наиболее популярных методов оценки выживаемости клеток относится МТТ-анализ (3-(4,5-диМетилТиазол-2-ил)-2,5-дифенилТетразолий бромид), который основан на определении активности клеточных оксидо-редуктаз, восстанавливающих МТТ до сильно поглощающего в видимой области спектра, нерастворимого в воде формазана [3, 4].

Роль дисфункции митохондрий в патофизиологических процессах широко признана [5-7]. Одним из ключевых показателей функционального состояния митохондрий служит активность ферментов, являющихся NAD-зависимыми дегидрогеназами. В матрице митохондрий таковыми являются пируват дегидрогеназа и три дегидрогеназы цикла трикарбоновых кислот (ЦТК, цикла Кребса). МТТ-анализ считается одним из наиболее прямых методов определения активности дегидрогеназ, однако, несмотря на многолетнее применение, механизмы клеточного восстановления солей тетразолия и образования формазанов еще не полностью выяснены [8]. Показано, что помимо дегидрогеназ, находящихся в митохондриях, соли тетразолия могут быть восстановлены ферментами эндоплазматического ретикулаума [9, 10], цитозоля [9], короткоживущими внутриклеточными соединениями, например, супероксиданион радикалом [11], а также оксидоредуктазами, расположенными на плазматической мембране клеток [12]. В интактных клетках значительная часть формазана может образовываться в эндосомах и лизосомах [13]. Анализ выживаемости по активности дегидрогеназ может приводить как недооценке, так и переоценке доли живых клеток, причем результат зависит от вида клеток, условий инкубации [14] и способа перевода кристаллов формазана в растворимое состояние [15]. В большинстве публикаций митохондрии рассматривают как места локализации наиболее активных дегидрогеназ. В настоящей работе было исследовано влияния МТТ на важнейшие интегральные показатели функционального состояния митохондрий – изменения трансмембранного потенциала внутренней мембраны митохондрий ($\Delta\Psi_m$) и содержания NADH.

Результаты. Как отмечалось выше, МТТ-анализ основан на том, что внутриклеточные дегидрогеназы живых клеток восстанавливают МТТ до формазана, который сильно поглощает в диапазоне видимого спектра вплоть до ~600нм. Формазан, благодаря плохой растворимости в водной среде, склонен к самоагрегации и поэтому в клетках он обнаруживается по появлению темных «зерен» (см. рис. 1Г). Сопоставление флуоресцентных изображений нейрональной культуры с изображениями в проходящем свете (см. рис. 1А,Б) показывает, что в начале эксперимента (перед добавлением МТТ) флуоресценция Rh123 наиболее интенсивна вокруг ядра и в аксональных холмиках (см. рис. 1А), отражая перинуклеарное расположение митохондрий в теле нейронов и у основания аксонов [5]. Видно также, что остатки нейронов, погибших в процессе приготовления и за время последующего созревания культуры, имеют меньший размер, не окрашены Rh123 и не образуют формазана (для примера две таких «клетки» отмечены черными стрелками на рисунке 1 Б,Г; флуоресцентные изображения этих «клеток» отсутствуют на рисунке 1А,В).

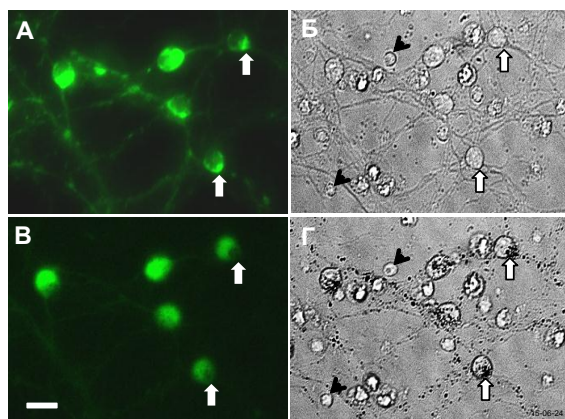


Рисунок 1 – МТТ вызывает изменение трансмембранного потенциала митохондрий в первичной культуре нейронов. Флуоресцентные изображения (А,В) и изображения в проходящем свете (Б,Г) культуры гранулярных нейронов мозжечка крысы (8DIV), окрашенных флуоресцентным потенциал-чувствительным зондом Rh123, перед добавлением МТТ (А,Б) и спустя 60 мин действия МТТ (0,1 мг/мл) (В,Г). Флуоресценцию Rh123 возбуждали при 485 ± 6 нм и регистрировали при 525 ± 20 нм. Изображения в проходящем свете получены с использованием порогового светофильтра, пропускающего излучение > 590 нм. Черные «зерна» на изображении (Г) соответствуют сильно поглощающим свет микрогранулам формазана. Измерения выполнены с применением 40x/NA1.35 масляно-иммерсионного объектива. Масштабная горизонтальная полоска соответствует 10 мкм

Добавление МТТ вызывает быстрое тушение флуоресценции Rh123 как в цитоплазме, так и в области ядра (нуклеоплазме), которое сменяется ростом флуоресценции, причем заметно бо́льшим в нуклеоплазме, чем в цитоплазме. Сопоставление средних сигналов Rh123 в цитоплазме и ядре (см. рис. 2) показывает, что первоначальное тушение практически одинаково в обоих компартментах. Восходящая фаза сигнала Rh123 отражает выход Rh123 из митохондрий в цитозоль, диффузию зонда по цитоплазме и проникновение его в ядро. Такое изменение сигнала Rh123 происходит при деполяризации митохондрий и перераспределении Rh123 из перинуклеарной зоны и области аксонального холмика по цитоплазме и ядру (выделено белыми стрелками на примере двух нейронов на рис. 1). Поскольку объем митохондрий в соме нейрона составляет не более 10% от объема сомы, то его концентрация в цито- и нуклеоплазме становится ниже концентрации самотушения, происходящего в митохондриях, и в итоге общая флуоресценция клетки растет [5, 16]. Последующее плавное снижение сигнала Rh123 отражает, по-видимому, диффузию этого зонда сквозь плазматическую мембрану и выход в окружающий клетки буфер (см. рис. 3).

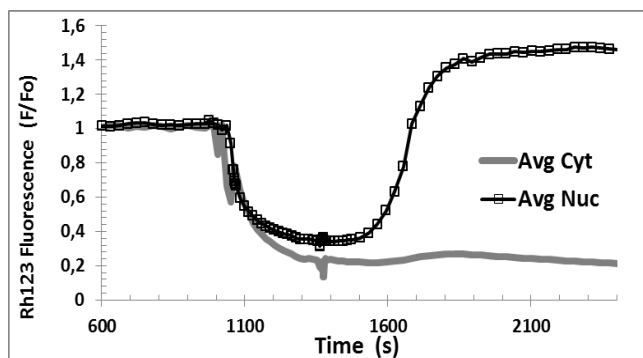


Рисунок 2 – Средние значения сигналов флуоресценции митохондриального зонда Rh123 ($n = 6$) в цитозоле и в области ядра, нормированные относительно уровней флуоресценции Rh123, предшествующих добавлению МТТ. Условия измерений как на рисунке 1

Для выяснения того, как деполяризация митохондрий, индуцированная МТТ, соотносится с образованием формазана, мы измеряли флуоресцентный сигнал зонда Rh123 одновременно со светопропусканием в красной области спектра (от 590 нм и выше). Оказалось, что снижение светопропускания в цитозоле нейронов, вызванное образованием формазана, начинается в момент развития митохондриальной деполяризации (в пределах восходящей фазы сигнала Rh123 (см. рис. 3).

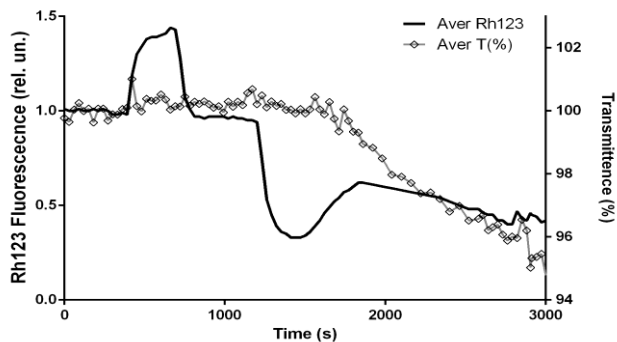


Рисунок 3 – Индуцированное МТТ падение трансмембранного потенциала митохондрий начинается одновременно с образованием формазана. Изменения флуоресценции митохондриального потенциал-чувствительного зонда Rh123 (левая шкала ординат) и светопропускания (сплошная черная линия, правая шкала ординат). Флуоресценция Rh123 и светопропускание нормированы относительно исходных значений в начале эксперимента. Приведены графики, усредненные по сигналам 30 нейронов. Условия измерений как на рисунке 1

Для выяснения причины первоначального резкого снижения флуоресценции Rh123 были измерены спектры поглощения МТТ и получены флуоресцентные изображения клеток, окрашенных флуоресцентными зондами, специфичными для ядра (Hoechst 33342), митохондрий (MitoTracker Green, MTG) и мембран (di-8-ANEPPS). Оптическая плотность раствора МТТ при длинах волн выше 480 нм не превышает 0,02 (0,1 мг/мл; 1 см). Из этого следует, что накопление МТТ в митохондриях в соответствии с трансмембранными потенциалами плазматической и митохондриальной мембран не может понизить флуоресценцию MTG или Rh123 (возбуждение и эмиссия 485 и 525нм) более чем на 0,2 % за счет абсорбции света МТТ. Эти аргументы справедливы и для di-8-ANEPPS, поскольку спектр возбуждения флуоресценции этого зонда близок к спектру MTG, а эмиссия сдвинута на ~100нм в красную область (Molecular Probes Handbook of Fluorescence).

Флуоресценция локализованного в митохондриях MTG тушится почти полностью в течение 5 мин, и никакого последующего увеличения зеленой флуоресценции в области вне митохондрий (в области ядра) не происходило (см. рис. 4А). Это обусловлено тем, что MTG специфично окрашивает митохондрии, но не выходит в цитозоль при их деполяризации [17]. Флуоресценция Hoechst 33342 за то время, когда MTG тушился почти полностью, снижалась на ~30 % (см. рис. 4Б). Изменения флуоресценции di-8-ANEPPS имели двухфазный характер – после первоначального снижения происходил рост, вызванный, по-видимому, перераспределением краски между плазмалеммой и внутриклеточными мембранами. Как видно из рисунка 3, в течение первых 5мин аппликации МТТ формазан еще не успевает образоваться. Вероятно, первоначальное быстрое тушение флуоресценции Rh123 и MTG вызвано непосредственным взаимодействием этих

флуорофоров с МТТ. Возможно, между указанными флуоресцентными зондами и МТТ образуются не флуоресцирующие комплексы подобные тем, которыми объясняют самотушение митохондриального зонда Rh123 при его накоплении в митохондриях [5, 16].

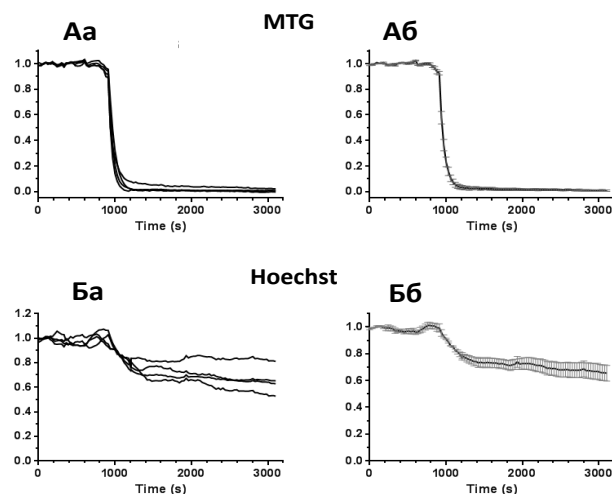


Рисунок 4 – МТТ полностью тушит флуоресценцию только митохондриально локализованного зонда. Изменения флуоресценции локализованного в митохондриях зонда MTG (А), и ядерного красителя Hoechst 33342 (Б) и зонда di-8-ANEPPS, исходно распределенного в плазматической мембране (В). В левой колонке (а) представлены сигналы индивидуальных нейронов, в правой (б) средние значения изменений флуоресценции. Сигналы регистрировали от четырех представительных нейронов целиком. Условия как на рисунке 1

Ранее было показано, что восстановление МТТ до формазана в большинстве случаев является NADH-зависимым процессом [18, 19], хотя NADH, участвующий в восстановлении МТТ, не всегда локализован в матриксе митохондрий [9, 12, 18]. Кроме того, доля этого NADH зависит, вероятно, от типа клеток.

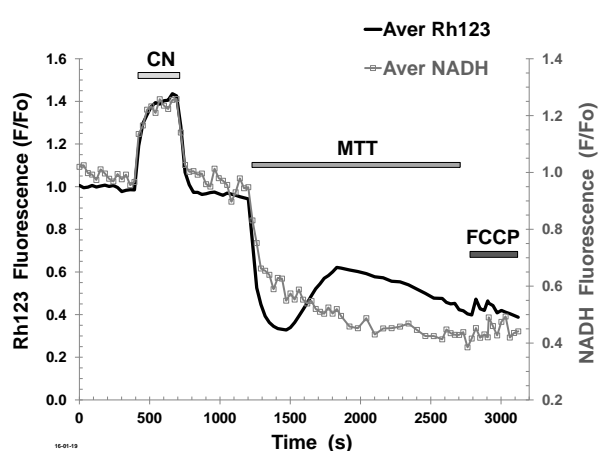


Рисунок 5 – Деполяризация митохондрий связана с потреблением NADH на восстановление МТТ до формазана. Ингибитор дыхания цианид (1мМ NaCN) добавляли для определения максимального уровня NADH в митохондриях. Протонофор FCCP (1 мкМ) добавляли в конце эксперимента для полной деполяризации митохондрий и истощения митохондриального NADH (нулевой уровень NADH). Сигнал NADH возбуждали и регистрировали соответственно при 360 ± 8 и 460 ± 20 нм. Концентрация МТТ 0,1мкг/мл. Графики получены усреднением сигналов 37 клеток. Остальные условия как на рисунке 1

Для проверки того, что падение митохондриального потенциала в нейронах может быть связано с затратами NADH на восстановление МТТ до формазана, были одновременно отслежены изменения $\Delta\Psi_m$ и автофлуоресценции клеток, обусловленной NADH. Оказалось, что сразу после добавления МТТ, автофлуоресценция начала снижаться одновременно с падением сигнала Rh123 (см. рис. 5). Снижение сигнала NADH имело двухфазный характер и продолжалось в течение всего действия МТТ вплоть до достижения минимального уровня. Добавление протонофора FCCP (1мкМ), который обычно используют в конце эксперимента для определения минимального сигнала NADH [5], не вызвало дальнейшего падения автофлуоресценции.

Чтобы выяснить влияние ферментов дыхательной цепи на восстановление МТТ, комплексы I и IV были блокированы соответственно цианидом (NaCN, 1мМ) и ротеноном (20мкМ). Скорость образования формазана оценивали по начальному наклону графиков светопоглощения в течение первых 10-15 мин действия МТТ. Нам не удалось обнаружить достоверных отличий скорости образования формазана в присутствии указанных ингибиторов (3-5 экспериментов с каждым ингибитором, по 30 нейронов в каждом опыте). Стоит, однако отметить, что наблюдалась тенденция снижения скорости восстановления МТТ при блокаде комплекса I и увеличения скорости восстановления при блокаде комплекса IV.

Обсуждение. МТТ-тест относится к самым распространённым методам анализа выживаемости клеток, в том числе нейронов, при различных воздействиях, например, при исследовании механизма действия и протекторных свойств различных биологически активных соединений [14]. Выживаемость клеток самых разных типов, в особенности нейронов, зависит от функционального состояния митохондрий, важнейшим интегральным показателем которых служит $\Delta\Psi_m$ [5, 6, 20]. МТТ, будучи ароматическим катионом, способен накапливаться в митохондриях и восстанавливаться там до сильно поглощающего свет формазана. Эта реакция была использована для тестирования активности внутриклеточных дегидрогеназ, преимущественно митохондриальной локализации [19, 21]. В настоящей работе методом флуоресцентной микроскопии нейронов, нагруженных митохондриальным зондом Rh123, а также красителем, связывающимся с ядерной ДНК (Hoechst33342) или красителем, накапливающимся в мембранах (di-8-ANEPPS), было обнаружено, что МТТ может вызывать быструю деполаризацию митохондрий. Данные микроскопии в проходящем свете показали, что образование поглощающего свет формазана начинается вслед за развитием деполаризации митохондрий. Измерения кинетики светопропускания ($>590\text{nm}$) в присутствии цианида или ротенона, когда прекращалось потребление NADH первым звеном дыхательной цепи, позволило обнаружить тенденцию снижения скорости образования формазана при блокировании комплекса I и увеличения скорости при блокировании комплекса IV.

Полученные в настоящей работе результаты позволяют заключить, что при использовании МТТ-теста, как метода определения функционального состояния клеток, необходимо учитывать то, что сам МТТ-реагент и, возможно, продукт его восстановления формазан, способны влиять на исследуемые клетки, деполаризуя митохондрии. Из этого следует, что при выполнении подобных измерений необходимо ограничиваться минимальными концентрациями МТТ и сокращать время измерений. Дальнейшие исследования должны показать может ли измерение кинетических параметров тушения флуоресценции быть адекватной заменой инкубации клеток с МТТ в течение десятков минут с применением высоких концентраций этого вещества (и его аналогов), которые используют в клеточной биологии в настоящее время.

Работа была выполнена при поддержке грантов РФФИ 13-02-00278, 15-04-07885 и 16-04-00792, и гранта Минобрнауки. 8.344.2014К.

Список литературы / References:

1. Bellamy W.T. Prediction of response to drug therapy of cancer. A review of in vitro assays. *Drugs*. 1992, vol. 44, no. 5, pp. 690-708.
2. Galluzzi [et al.] Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death Differ.*, 2009, vol. 16, no. 8, pp.103-107.
3. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.*, 1983, vol. 65, pp. 55-63.
4. Denizot F., Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability *J. Immunol. Methods*, 1986, vol. 89, pp. 271-277.
5. Duchen M.R., Surin A.M., Jacobson J. Imaging mitochondrial function in intact cells. *Methods in Enzymology*, 2003, vol. 361, pp. 353-389.
6. Khodorov B. Glutamate-induced deregulation of calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction in mammalian central neurones. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 2004, vol. 86, no. 2, pp. 279-351.
7. Lukyanova L.D. Mitochondrial Signaling in Hypoxia. *Open Journal Endocrine Metabolic Diseases*, 2013, vol. 3, pp. 20-32.
8. Сурин А.М., Горбачева Л.Р., Струкова С.М., Пинелис В.Г., Сторожевых Т.П. Флуоресцентно-микроскопические методы оценки функционального состояния и выживаемости нейронов. *Руководство к экспериментальным работам по физиологии*, 2009, с. 141-187. [Surin A.M., Gorbacheva L.R., Strukova S.M., Pinelis V.G., Storozhevych T.P. Fluorescence microscopy methods for assessing functional status and survival of neurons. *Guide to the experimental work on the physiology*, 2009, pp.141-187. (In Russ.)]
9. Berridge M.V., Tan A.S. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys*, 1993, vol. 303, no. 2, pp. 474-482
10. Goodwin C.J., Holt S.J., Riley P.A. [et al.] Growth hormone-responsive DT-diaphorase-mediated bioreduction of tetrazolium salts, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1996, vol. 226, pp. 935-941.
11. Tarpey M.M., Fridovich I. Methods of Detection of Vascular Reactive Species Nitric Oxide, Superoxide, Hydrogen Peroxide, and Peroxynitrite. *Circ. Res.*, 2001, vol. 89, pp. 224-236.
12. Bernas T., Dobrucki J.W. The role of plasma membrane in bioreduction of two tetrazolium salts, MTT, and CTC. *Arch. Biochem. Biophys*. 2000, vol. 380, pp. 108-116.
13. Liu Y., Peterson D.A., Kimura H., Schubert D. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction, *J. Neurochem*. 1997, vol. 69, pp. 581-593.
14. Stepanenko A.A., Dmitrenko V.V. Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. *Gene*, 2015, vol. 574, no. 2, pp. 193-203.
15. Grela E., Ząbek A., Grabowiecka A. Interferences in the optimization of the MTT assay for viability estimation of proteus mirabilis. *Avicenna J Med Biotechnol.*, 2015, vol. 7, no. 4, pp. 159-167.
16. Ward M.W., Rego A.C., Frenguelli B.G., Nicholls D.G. Mitochondrial membrane potential and glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells, *J Neurosci*, 2000, vol. 20, no. 19, pp. 7208-7219.

17. Buckman J.F., Hernández H., Kress G.J., Votyakova T.V., Pal S., Reynolds I.J. MitoTracker labeling in primary neuronal and astrocytic cultures: influence of mitochondrial membrane potential and oxidants. *J Neurosci Methods*, 2001, vol. 104, no. 2, pp. 165-176.
18. Marshall N.J., Goodwin C.J., Holt S.J. A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. *Growth Regul.*, 1995, vol. 5, pp. 69-84.
19. Нарциссов Р.П. Анализ изображения клетки – следующий этап развития клинической цитохимии в педиатрии. *Педиатрия. Журнал им. Г.Н.Сперанского*, 1998, т. 77, № 4, с. 101-105. [Narcissov R.P. Analysis of cell imaging – the next stage of clinical cytology in pediatrics. *Pediatrics. Zhurnal im. G.N. Speranskogo*, 1998, vol. 77, no. 4, pp. 101-105 (In Russ.)]
20. Nicholls D.G., Budd S.L. Mitochondria and neuronal survival, *Physiol. Rev.*, 2000, vol. 80, pp. 315-360.
21. Закиров Р.Ш., Сорокина Е.Г., Карасёва О.В., Семёнова Ж.Б., Петричук С.В., Рошаль Л.М., Пинелис В.Г. Функциональное состояние митохондрий лимфоцитов периферической крови при черепно-мозговой травме у детей. *Вестник РАМН*, 2015. [Zakirov R.S., Sorokina E.G., Karaseva O.V., Semenova Zh.B., Petrichuk S.V., Roshal L.M., Pinelis V.G. Peripheral blood lymphocytes mitochondrial functional in children with traumatic brain injury. *Vestnik RAMN*, 2015 (In Russ.)]