

ТРАНСМЕМБРАННЫЕ ПОТЕНЦИАЛЫ И МИТОХОНДРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ОНКОКЛЕТОК КУЛЬТУРЫ HELa В ПРОЦЕССЕ РАЗМОРАЖИВАНИЯ И ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ АДЕНОВИРУСОМ

Морозова Г.И.¹, Корнилаева Г.В.², Гринкевич О.М.², Аскарлова К.З.¹, Лопатина О.А.², Фирсова Е.Л.²

¹ Российский университет дружбы народов

ул. Миклухо-Маклая, 6, г. Москва, 117198, РФ; e-mail: gimorozova@mail.ru

² ФГБУ НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи

г. Москва, РФ; e-mail: lopatina.online@yandex.ru

Поступила в редакцию: 01.08.2021

Аннотация. В последнее время актуально использование патогенных вирусов для борьбы с раковыми клетками, в том числе аденовирусов. Культура клеток линии карциномы шейки матки (HeLa) является популярной моделью для исследования факторов, влияющих на показатели жизнеспособности онкоклеток. Целью данной работы является исследование трансмембранных потенциалов (ТМП) и энергетической активности митохондрий в клетках HeLa чистой культуры в процессе их размораживания и культивирования после инфицирования аденовирусом. Для оценки цитофизических показателей использовали полихроматический флуоресцентный зонд 4-п-диметиламиностирил-1-метилпиридиний (ДСМ). Микрофлуорметрические исследования показали, что высокий уровень отрицательного ТМП $\geq |-150|$ mV, достигается через 6 - 12 ч, а максимальный ТМП $\geq |-200|$ mV - через 24 ч после размораживания и культивирования чистых клеток. Размножение аденовируса в клетках культуры HeLa приводит к дезэнергизации митохондрий, к изменению электрических и структурных свойств клеточных мембран и ядерного хроматина, в итоге к нарушению жизнеспособности раковых клеток.

Ключевые слова: культура клеток HeLa, аденовирусная инфекция, криоконсервация, трансмембранные потенциалы, активность митохондрий, флуоресцентный зонд ДСМ.

Культура клеток линии карциномы шейки матки (HeLa) широко используется в модельных медико-биологических исследованиях для выявления физико-химических особенностей жизнедеятельности раковых клеток [1]. В последние годы возрос интерес к микробиологическим способам борьбы с онкологией. Некоторые патогенные вирусы специально вводят в опухолевые клетки с целью частичного изменения клеточного генома, что в свою очередь ведёт к изменению свойств разных мембран, рецепторов на внешней поверхности, к усилению атаки макрофагов и Т-лимфоцитов на опухоль [2]. Криоконсервация является необходимым моментом сохранения клеточной культуры. Эффективность деконсервации (размораживания) клеток определяется способностью восстановления исходных свойств клеток [3,4]. Ранее установлено, что клетки культур с исходно более высоким уровнем отрицательных трансмембранных потенциалов (ТМП) на внешней и митохондриальных мембранах способны сохранять высокую функциональную и пролиферативную активность после их размораживания [1,3,5].

Целью данной работы является исследование ТМП и митохондриальной активности в клетках культуры HeLa в процессе её размораживания, культивирования и после инфицирования аденовирусом. В серии предыдущих исследований выявлены возможности полихроматического флуоресцентного зонда 4-(п-диметиламиностирил)-1-метилпиридиния (ДСМ) как чувствительного и информативного молекулярного инструмента для исследования митохондриальной активности и трансмембранных потенциалов (ТМП) в клетках при разных условиях [3,6-13]. Как показано ранее при исследовании оптических свойств ДСМ [6], изменение цвета (сдвиг спектра) его флуоресценции в клеточных структурах зависит от соотношения двух форм зонда в клетке: зелёной - при вертикальном погружении молекул в неполярную область мембран, и красной - за счёт свободного зонда в водной среде внутри митохондрий и горизонтально расположенных молекул ДСМ на поверхности полимерных структур при связывании его катионов с ДНК, РНК. В последнем случае резко возрастает квантовый выход красной флуоресценции ДСМ из-за снижения подвижности связанных молекул зонда. Соответственно, конечный цветовой эффект зависит от концентраций ДСМ внутри митохондрий и ядра, что регулируется их ТМП-ми и отражает энергетический статус клеток. Согласно хемиосмотической теории Митчелла снижение энергетической активности митохондрий в клетках сопряжено с падением протонного потенциала на их мембранах [14]. В результате происходит перераспределения катионов ДСМ между митохондриями, цитоплазмой и ядром в соответствии с электродиффузной теорией [6,15]. При этом цвет флуоресценции зонда в митохондриях изменяется от ярко-жёлтого до бледно-зеленого. Одновременно снижается энергетически значимый градиент электрического поля на ядерной мембране (плюс со стороны кардиоплазмы) [12,16]. В итоге катионы ДСМ проникают в ядро, появляется оранжевая флуоресценция ДСМ связанного с отрицательно заряженными полимерными структурами хроматина (ДНК, РНК) [6,13]. Возгоранию оранжевой флуоресценции ДСМ в ядрах соответствует превышение оптимальной концентрации свободного зонда внутри митохондрий (до предела растворимости в воде), что свидетельствует об исходно высоком ТМП клеток, прежде всего в митохондриях. Эти особенности изменения полихроматической флуоресцентной картины ДСМ позволяют

визуально распознавать различные степени энергетической активности клеток. При этом можно оценить соответствующие им уровни ТМП на внешней и митохондриальной мембранах с помощью калибровки – метода прямого измерения суммарного ТМП в клетках по насыщению катионов ДСМ в митохондриях [7,13].

ОБЪЕКТЫ, МЕТОДЫ И УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТОВ

В работе использовали культуру клеток карциномы шейки матки линии HeLa. Для культивирования клеток применяли 199 питательную среду («Биолот») с добавлением 10%-ной эмбриональной бычьей сыворотки («Gibco»). Клетки инкубировали в термостате с CO₂ в культуральных флаконах (матрасах) объёмом 50 мл [1]. Для процедуры снятия замороженных клеток использовали версен 0,02% с химопсином 0,1 мг/мл. Для последующих исследований замороженные клетки из суспензии осаждали центрифугированием (5 мин, 500 g), удаляли культуральную среду и ресуспендировали осадок в среде без сыворотки. Инфицирование клеток культуры после размораживания производили путём добавления аденовируса человека (тип 2) из расчета 1–10 БОЕ/кл. с последующим перемешиванием и культивированием заражённой культуры в течение 1ч при 37⁰С. Суспензии чистых и заражённых клеток разводили теплой средой с 2% СНТ до концентрации (3–4)·10⁵ кл/мл, параллельно инкубировали при 37⁰С в течении 3–24 ч. Жизнеспособность клеток оценивали по тесту с трипановым синим аналогично [3, 13].

Для окрашивания клеток в работе использовали флуоресцентный зонд 4-п-диметиламиностирил-1-метилпиридиний (ДСМ), синтезированный в Институте органического синтеза АН Латвии [6,17]. В специальном эксперименте с целью выбора контрольных образцов деконсервированных клеток в наиболее адекватном энергетическом состоянии исследовали клетки, окрашенные ДСМ (в монослое на покровных стёклах в пенициллиновых флаконах) через различные временные интервалы после их размораживания и культивирования согласно предложенной ранее методике [11]. Витальное флуорохромирование чистых клеток после их культивирования осуществляли путём добавления физиологического раствора с ДСМ до конечных концентраций зонда в интервале 0,5–20 мкМ с последующим перемешиванием и инкубацией клеток при 37⁰ С в течение 15–40 мин. По интенсивности флуоресценции ДСМ в митохондриях, нарастающей по мере аккумуляции в них катионов зонда (до 1 мМ – предела растворимости ДСМ в водной среде митохондрий), оценивали ТМП клеток согласно [7] в разное время после культивирования.

Препараты окрашенных клеток на стёклах, приготовленные методом раздавленной капли, исследовали на микроскопе – флуориметре Люам-И2 с фотометрической приставкой ФМЭЛ (ЛЮМО). Условия возбуждения, наблюдения и регистрации флуоресценции ДСМ в клетках использовали аналогично условиям в работах [3-13]. Микрофотографирование клеток на микроскопе осуществляли через объектив 90^x в фоторежиме на видеокамеру фирмы Sony, закрепленной на специальном тубусе микроскопа. Для каждого образца исследовали массивы по 100–200 клеток в контроле и опыте. Статистическую обработку данных проводили по Стьюденту [18].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе исследований установлено, что флуоресценция ДСМ в цитоплазме клеток зависит от времени их культивирования после размораживания. Экспериментально выбраны оптимальные рабочие концентрации ДСМ в диапазоне 2-5 мкМ для контрольных чистых клеток и время инкубации их с зондом – 30 мин при 37⁰ С. При этих же условиях в сравнительных опытах производили окрашивание клеток путём добавления ДСМ к суспензиям чистых и заражённых клеток с последующим их перемешиванием и культивированием.

В таблице 1 представлены результаты микрофлуорометрической оценки значений ТМП в чистых клетках в разные сроки после их размораживания и культивирования. Оценки показали, что в первые 3 ч в этих клетках сохраняется сравнительно низкий уровень ТМП, который фактически близок к уровню ТМП на внешней мембране, что соответствует начальному этапу адаптации мембран и клеточного метаболизма после размораживания и температурного скачка. Рост флуоресценции ДСМ и ТМП митохондрий в чистых клетках отчётливо регистрируется после 6ч, высокий уровень суммы ТМП в большинстве клеток достигается только через 12- 24 ч преимущественно за счёт периодической активации митохондриального ретикулула, когда идёт активный митотический процесс.

Люминесцентно-микроскопические исследования показали, что клетки HeLa в разных образцах отличаются по характеру флуоресценции в них зонда ДСМ. На рисунке 1 представлены изображения в свете флуоресценции зонда чистых клеток (а) после их культивирования в течение 24 ч, и аналогичных клеток после заражения их

Таблица 1. Средние значения ТМП ($\Delta\Phi$) в чистых клетках HeLa через разные интервалы времени после размораживания и культивирования

Время культивирования клеток, часы	3	6	12	24
$\Delta\Phi = \Delta\Phi_n + \Delta\Phi_{mx}$ mv	95 ± 7	168 ± 10	187 ± 10	255 ± 15

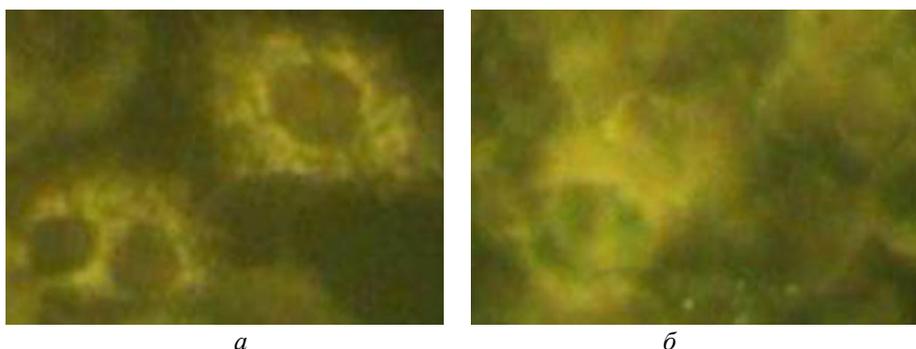


Рисунок 1. Клетки HeLa в свете флуоресценции зонда ДСМ (5 мкМ) через 24 ч их культивирования: *а* – чистые клетки, *б* – клетки, инфицированные аденовирусом (пояснение в тексте). Об. 90^х

аденовирусом (*б*). На изображении контрольных клеток видны гранулярные и цепочечные активные митохондрии с ярко-жёлтой флуоресценцией, накопившие катионы зонда. В то же время есть клетки с низкой энергетической активностью или без активных митохондрий, что может быть связано с конкуренцией активно делящихся клеток за кислород и питательный ресурс.

Как видно на рисунке 1б, в препарате клеток с аденовирусом через 24 ч их культивирования происходят катастрофические изменения: большинство клеток в состоянии с низкими ТМП и митохондриальной активностью, при этом много дезэнергизированных клеток с оранжевыми ядрами, утратившими положительный ТМП на ядерной мембране [16]. Характерны области с диффузной жёлто-зелёной флуоресценцией ДСМ, обусловленные, по-видимому, связыванием катионов ДСМ с отрицательно-заряженными участками биополимеров в аденовирусных скоплениях и в разрушенных структурах клеток [6,11].

В серии дальнейших экспериментов производили сравнительную оценку уровней ТМП в чистых и заражённых клетках через 12 ч их культивирования, когда в препаратах с аденовирусом ещё нет катастрофического разрушения клеточных структур, а в чистых препаратах размороженные клетки достигают уже достаточно высокий энергетический потенциал.

Используя предложенную ранее методику, основанную на полихроматических свойствах флуоресценции ДСМ, все исследуемые клетки распределяли по четырём диапазонам суммы ТМП на их плазматической (φ_n) и митохондриальной (φ_{mx}) мембранах, откалиброванных с помощью зонда ДСМ [6,7,13]. При этом в качестве информативного и чувствительного показателя энергетической активности популяции клеток (ЭАП) для каждого образца использовали отношение между количеством клеток в пулах с высокими и низкими значениями ТМП по аналогии с работой [13].

Данные экспериментов, представленные в таблице 2 и на рисунке 2, демонстрируют снижение доли активных клеток с высокими ТМП почти в 2 раза и росте доли клеток с очень низкими ТМП на 34 % после культивирования клеток с аденовирусом по сравнению с чистыми клетками. Показатель ЭАП наиболее наглядно отражает эффекты снижения энергетического потенциала онкоклеток в присутствии аденовируса. Наблюдаемые эффекты в заражённых клетках могут быть обусловлены резким снижением количества активных митохондрий, осмотическим нарушением и соответственно снижением ТМП на внешней мембране в результате прямого взаимодействия аденовирусов с клеточными структурами и под влиянием процесса его размножения в клетках.

Таблица 2. Распределение клеток по величинам суммы трансмембранных потенциалов ($\Delta\varphi$) в чистой культуре HeLa и с аденовирусом через 12 ч культивирования. ЭАП – индекс энергетической активности клеток каждого пула (n_i).

$\Delta\varphi = \Delta\varphi_n + \Delta\varphi_{mx}$ mv	< 80	90 - 150	160 - 220	230 - 290	ЭАП
n_i	1	2	3	4	$(n_3+n_4)/(n_1+n_2)$
чистые клетки, %	4 ± 1	15 ± 2	32 ± 3	48 ± 5	4.2 ± 0.3
клетки с аденовирусом, %	43 ± 4	13 ± 2	44 ± 4	9 ± 1	0.95 ± 0.01

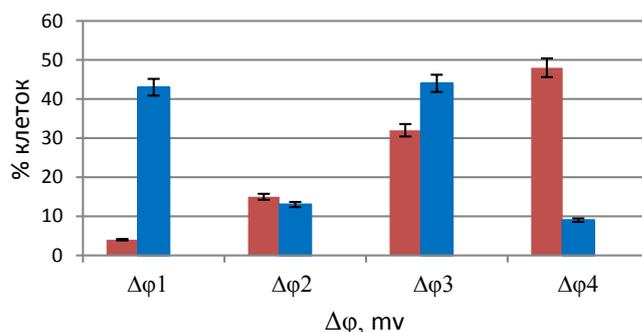


Рисунок 2. Диаграммы распределения пулов клеток по диапазонам их суммарного ТМП ($\Delta\phi$) в чистой культуре HeLa (красная) и с аденовирусом (синяя). По вертикали - % клеток в пуле (n_i) с $\Delta\phi_i$ определённого диапазона

Сопоставление полученных результатов позволяет заключить, что в размороженных клетках HeLa после их культивирования в течение 12 ч в присутствии аденовируса (типа 2) изменяются биофизические свойства по сравнению с чистой культурой: резко увеличивается пул клеток в низком диапазоне ТМП, преимущественно, за счёт снижения энергетической активности митохондрий. Флуоресцентные эффекты ДСМ в инфицированных онкоклетках свидетельствуют не только об изменении электрических свойств у трёх типов клеточных мембран, но и о деструктивных изменениях в ядерном хроматине в присутствии активных аденовирусов, которые существенно нарастают через 24 ч культивирования таких клеток. Вследствие этих процессов возможно нарушение функциональной активности и в итоге снижение жизнеспособности раковых клеток.

Можно предполагать, что в реальной карциноме такие изменения в мембранах и в энергетическом статусе митохондрий (при локальном инфицировании опухолевой зоны аденовирусом) будут способствовать сдерживанию роста опухоли, в том числе и благодаря активации иммунных клеток микроокружения [2,19].

Список литературы/References:

1. Подчерняева Р.Я., Корнилаева Г.В., Морозова Г.И. Новый подход к методам крио и деконсервации для сохранения генофонда коллекции клеточных культур. *Цитология*, 2004, т. 46, № 9, с. 837 [Podchernyaeva R.Y., Kornilaeva G.V., Morozova G.I. New approach to cryopreservation and deconservation methods for preservation of gene pool of cell culture collection. *Cytology*, 2004, vol. 46, no. 9, p. 837. (In Russ.)]
2. Разумов И.А., Святченко В.А., Протопопова Е.В., Кочнева Г.В., Киселёв Н.Н. и др. Оценка онколитической активности ряда ортопоксвирусов, аденовирусов и парвовирусов в отношении клеток глиом человека. *Вестник РАМН*, 2013, № 12, с. 4-8. [Razumov I.A., Svyatchenko V.A., Protopopova E.V., Kochneva G.V., Kiselev N.N. et al. Oncolytic evaluation of a number of orthopoxviruses, adenoviruses and parvoviruses against human glioma cells activity. *RAMS Bulletin*, 2013, no. 12, pp. 4-8. (In Russ.)]
3. Toshakov V.G., Morozova G.I., Onishchenko N.A. Energy metabolism of cryopreved rad hepatocytes. *Cryoletters*, 1991, no. 12, pp. 259-272.
4. Лопатина О.А., Морозова Г.И., Подчерняева Р.Я., Фирсова Е.Л., Данлыбаева Г.А., Михайлова Г.Р., Бакланова О.В. Энергетическое состояние клеток Mpf после криоконсервации. *Биофизика живой клетки*. Пушкино: РАН, ИБФ, 2008, т. 9, с. 84-85. [Lopatina O.A., Morozova G.I., Podchernyaeva R.Ya., Firsova E.L., Danlybaeva G.A., Mikhailova G.R., Baklanova O.V. Energy state of Mpf cells after cryopreservation. *Biofizika zhivoj kletki*. Pushchino: RAS, IBF, 2008, vol. 9, pp. 84-85. (In Russ.)]
5. 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. *Cellular Therapy and Transplantation (CTT)*, 2016, vol. 5, no. 2(15), pp. 60-65.
6. Морозова Г.И., Добрецов Г.Е., Дубуре Р.Р., Дубур Г.Я., Голицын В.М., Владимиров Ю.А. Флуоресценция зонда 4-(*n*-диметиламиностирил)-1-метилпиридиния в живой клетке. *Цитология*, 1981, т. 23, № 8, с. 916-923. [Morozova G.I., Dobretsov G.E., Dubur R.R., Dubur G.Ya., Golitsyn V.M., Vladimirov Yu.A. Fluorescence of 4- (*n*-dimethylaminostyryl) -1-methylpyridinium probe in a living cell. *Cytology*. 1981, vol. 23, no. 8, pp. 916-923 (In Russ.)].
7. 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 цитоплазматической и митохондриальной мембранах. *Биологические мембраны*, 1986, т. 3, № 3, с. 266-273. [Dobretsov G.E., Kosnikov V.V., Morozova G.I., Likhacheva L.M., Aidaraliev R.K., Vladimirov Yu. A. Measurement of the concentration gradient of the fluorescent probe - cation DSM on the cytoplasmic and mitochondrial membranes. *Biological membranes*, 1986, vol. 3, no. 3, pp. 266 -273. (In Russ.)]
8. Морозова Г.И., Онищенко Н.А., Оржеховская И. Г., Коробкова Е. Н., Полосина О. В., Базиева Ф.Х., Баукина О.В. Микрофлуориметрический метод идентификации и оценка физиологического состояния лимфоцитов и нейтрофилов в цельной нативной крови с помощью флуоресцентного зонда-катиона ДСМ: клиника и эксперимент. *Гематология и трансфузиология*, 1997, т. 42, № 3, с. 43-47. [Morozova G.I.,

Onishchenko N.A., Orzechowska I.G., Korobkova E.N., Polosin V.O., Baziyeva F.H., Baukina O.V. Microfluorimetric identification and assessment of the physiological state of lymphocytes and neutrophils in whole native blood by means of fluorescent probe-cation DSM: clinical and experimental data. *Gematal. Transfuziol.*, 1997, vol. 42, no. 3, pp. 43-47. (In Russ.)]

9. Morozova G.I., Parkhomenko T.V., Klitsenko O.A., Tomson V.V. Stimulating Effect of Erythropoietin on Thymocyte Energetics Established in vitro with Potential-sensitive Fluorescent Probe. *Biochemistry Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*, Moscow: 2008, vol. 1, no. 4, pp. 325-330.

10. Тарнопольская О.В., Непомнящая Е.М., Бирбраер В.М., Тюрбеева М.Л., Макарова Е.И. Средний мембранный потенциал клеток опухолей пяти гистотипов. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*, 2014, № 10, с. 108-109. [Tarnopolskaya O.V., Nepomnyaschaya E.M., Birbraer V.M., Tyurbееva M.L., Makarova E.I. Average membrane potential of five histotypes tumor cells. *International Journal of Applied and Basic Research*, 2014, no. 10, pp. 108-109 (In Russ.)]

11. Морозова Г.И., Лопатина О.А., Михайлова Г.Р., Данлыбаева Г.А., Подчерняева Р.Я. Сравнительное исследование эффектов частотно-резонансных воздействий и голографической информационной копии на модели клеток мозга хорька с помощью потенциал-чувствительного флуоресцентного зонда. *Биомедицинская радиоэлектроника*, 2013, № 5, с. 28-34. [Morozova G.I., Lopatina O.A., Mikhailova G.R., Danlybaeva G.A., Podchernyaeva R.Ya. Comparative study of the frequency-resonance and holographic information copy effects on ferret brain cells as model using a potential-sensitive fluorescent probe. *Biomedicine Radioengineering*, 2013, no. 5, pp. 28-34. (In Russ.)]

12. Морозова Г.И., Корнилаева Г.В., Подчерняева Р.Я., Куленич 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. 31-38. [Morozova G.I., Kornilaeva G.V., Podchernyaeva R.Ya., Kulenich T.M., Bozhenko V.K. Study of influence millimeter-wave EHF- irradiation on membrane structures of the T-lymphoblastoid cells culture using a fluorescent probe-cation DSM. *Biomedicine Radioengineering*, 2014, no. 11, pp. 31-38. (In Russ.)]

13. Морозова Г.И., Козлова М.А., Акшинцев А.А. Оценка экологической токсичности водных растворов ксенобиотиков в малых дозах на клетках донорской крови с помощью потенциал-чувствительного флуоресцентного зонда. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2019, т. 4, № 3, с. 428-424. [Morozova G.I., Kozlova M.A., Akshintsev A.A. Evaluation of the ecological toxicity of aqueous solutions with low xenobiotics doses on donor blood cells using a potential-sensitive fluorescent probe. *Aktualnye voprosy biologicheskoy fiziki i himii*, 2019, vol. 4, no. 3, pp. 428-424 (In Russ.)]

14. Askarova K.Z., Morozova G.I., Anoshin A.A. Modeling the Accumulation Kinetics of Anionic Photo-sensitizers in Tumor Cells with Different Trans-membrane Potentials. *J. Mech.Cont.& Math. Sci., Special Issue-1*, March, 2019, pp. 483-490.

15. Скулачев В.П. *Энергетика биологических мембран*. М: Наука, 1989, 123 с. [Skulachev V. P. *Energy of biological membranes*. M.: Science, 1989, 123 p. (In Russ.)]

16. Морозова Г.И., Полетаев А.И., Борщевская Т.А. Инвертированный электрохимический потенциал на ядерной мембране клеток и его связь с клеточной энергетикой. *Сборник докладов 2-го съезда биофизиков России*. М.: 1999, с. 256-257. [Morozova G.I., Poletaev A.I., Borschevskaya T.A. Inverted electrochemical potential on the nuclear membrane of cells and its relationship with cellular energy. *Reports of the 2nd Russia biophysicists Congress*. M.: 1999, pp. 256-257. (In Russ.)]

17. Добрецов Г.Е. *Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов*. М.: Наука, 1989, 277 с. [Dobretsov G. E. *Fluorescent probes in the study of cells, membranes and lipoproteins*. M.: Science, 1989, 277 p. (In Russ.)]

18. Бейли И.Н. *Статистические методы в биологии*. М.: Наука, 1963, 277 с. [Bailey I.N. *Statistical methods in biology*. M.: Science, 1963, 277 p. (In Russ.)]

19. Кжышковская Ю.Г., Стахеева М.Н., Литвяков Н.В. и др. *Иммунная система и эффективность ротивоопухолевого лечения*. Томск: издательство ТГУ, 2015, 130 с. [Kzhyshkovska Yu.G., Stakheeva M.N., Litviakov N.V. et al. *Immune system and the effectiveness of anticancer treatment*. Tomsk: University Publishing House, 2015, 130 p. (In Russ.)]

TRANSMEMBRANE POTENTIALS AND MITOCHONDRIA ENERGY ACTIVITY IN HELA CANCER CELLS DURING ITS DEFROSTING AND AFTER INFECTED WITH ADENOVIRUS**Morozova G.I.¹, Kornilaeva G.V.², Grinkevich O.M.², Askarova K.Z.¹, Lopatina O.A.², Firsova E.L.²**¹Russian Peoples' Friendship University

st. Miklukho-Maklay, 6, Moscow, 117198, Russia, e-mail: gimorozova@mail.ru

²N.F. Gamalei Research Center of Epidemiology and Microbiology

Moscow, Russia, lopatina.online@ya

Abstract. Recently, the use of pathogenic viruses including adenoviruses to fight cancer cells, has become relevant. Cervical carcinoma cell line (HeLa) culture is a convenient model to study the factors influencing the cancer cells viability. This work aim is to study the transmembrane potentials (TMP) and mitochondria energy activity in pure HeLa cells during its defrosting and after infected with adenovirus. A polychromatic fluorescent probe 4-n-dimethylamnostyryl-1-methylpyridinium (DSM) was used to evaluate the cells cytophysical parameters. Microfluorometric studies found that high $TMP \geq |-150|$ mv is reached after 6–12 hours and the maximum $TMP \geq |-200|$ mv is reached after 24 hours after thawing and culturing pure cells. It was found that adenovirus reproduction in HeLa culture cells leads to mitochondria deenergization, a change in the electrical and structural properties of cell membranes and nuclear chromatin, as a result, to disruption of cancer cells viability.

Key words: *HeLa cell culture, adenovirus infection, cryopreservation, transmembrane potentials, mitochondria energy.*