

УДК 541.49+544.51+535.37

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ O₂-БИОСЕНСОРЫ: ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ

^{1,2}Мартусевич А.К., ¹Самоделькин А.Г., ²Мартусевич А.А., ²Соловьева А.Г.

¹ФГБОУ ВПО «Нижегородская государственная сельскохозяйственная академия»,
Нижегород;

²ФГБУ «Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр» Минздрава России,
Нижегород, e-mail: cryst-mart@yandex.ru

Целью работы явилась систематизация инструментальных методов детекции кислорода в биологических объектах. Приведены краткие сведения о биологической роли молекулярного кислорода, охарактеризованы наиболее значимые для задач детекции его физико-химические свойства. Подробно проанализированы современные технологии, позволяющие определять широкий спектр параметров оксигенации биологических объектов в биомедицинских исследованиях. При этом среди основных критериев оксигенации приведены и рассмотрены среднее потребление кислорода и его концентрация в тканях, которые позволяют оценить общий кислородный статус биообъекта. Показаны эволюция направления и основные физико-химические принципы действия наиболее значимых инструментальных кислородных биосенсоров. Получаемые с их помощью данные ценны в таких областях биомедицины, как метаболизм опухолей, нейробиология, гипоксические состояния, клеточная физиология, разработка новой биомедицинской аппаратуры и заживление ран. Для макрообъектов, таких как фрагменты тканей, органов или целостный организм, кислородный статус также имеет принципиальное значение, в частности в отношении радио- и химиотерапии, репродуктивных технологий и трансплантации органов.

Ключевые слова: активные формы кислорода, определение, биологические системы, кислород

MOLECULAR OXYGEN BIOSENSORS: THEORETICAL AND PRACTICAL ASPECTS

^{1,2}Martusevich A.K., ¹Samodelkin A.G., ²Martusevich A.A., ²Soloveva A.G.

¹Nizhny Novgorod State Agricultural Academy, Nizhny Novgorod;

²Volga Federal Medical Research Center, Nizhny Novgorod, e-mail: cryst-mart@yandex.ru

The aim of this paper is review of most known instrumental methods of oxygen detection in different biological objects. Short characteristics of biological role of molecular oxygen and its physical and chemical properties, which is important for its reveal in biological specimens. Modern technologies is allow to estimate the wide spectrum of biological objects oxygenation parameters are analyzed. Possibilities of method of oxygen homeostasis study in biomedical researches are shown. Most significant criterias of oxygenation status is the average consumption of oxygen and its concentration in biological tissues. Evolution of this scientific direction and main principles of action of most known instrumental oxygen sensors are shown. These data are useful for different fields of biomedicine, including tumors metabolism, hypoxia research, cell physiology, neurobiology, wound healing etc. Oxygenation status is also important for investigation of some macroscopic biological objects, such as tissues fragments, organs and whole organisms.

Keywords: reactive oxygen species, estimation, biological systems, oxygen

Известно, что для всех аэробных организмов, включая человека, молекулярный кислород является жизненно необходимым, выступая конечным акцептором электронов в митохондриальной дыхательной цепи и играя принципиальную роль в синтезе АТФ из АДФ. Частично восстановленные и высокореактивные кислородные метаболиты могут образовываться в последней и других реакциях электронно-транспортной цепи. В спектр этих метаболитов входят супероксид-анион радикал, перекись водорода и гидроксильный радикал. Указанные вещества вместе с иными окислительными агентами (в частности, гипохлорит, синглетный кислород и др.) именуются «активными формами кислорода» (АФК).

С учетом того, что АФК способны вызывать окислительную модификацию липидов, белков и ДНК, в клетках существует ряд защитных механизмов, прежде всего представленных антиоксидантными ферментами и специфическими путями деградации. На этом основании «окислительный стресс» может быть определен как дисбаланс между продукцией АФК и антиоксидантным потенциалом клеток. Согласно современным представлениям, оксидативный стресс является компонентом различных заболеваний человека, в том числе онкологических, а также играет роль в процессах старения [1]. В настоящее время большой интерес представляют также физиологические функции активных форм азота (АФА),

в частности, монооксида азота (NO) как универсального мессенджера в сердечно-сосудистой, нервной и иммунной системах [2], а также пероксинитрита (ONOO⁻) как молекулы, инициирующей развитие нитрозативного стресса. В связи с этим необходимы специфичные и чувствительные методы изучения продукции АФК и АФА для оценки их роли в организме [3, 4].

Следует отметить, что подобные методы анализа состояния отдельных клеток и организма в целом характеризуются малоинвазивностью без необходимости получения клеточного материала [4]. Эти технологии, позволяющие визуализировать физиологические и патофизиологические сдвиги, приобрели особое значение в биомедицинских науках.

По сравнению с другими методами диагностики (радиоизотопное исследование, МРТ, электронный парамагнитный резонанс, электрохимическая детекция) флуоресцентный имаджинг имеет существенно большую чувствительность, малоинвазивность и позволяет в дальнейшем анализировать результаты различными способами. Дополнительным преимуществом флуоресцентной детекции является то, что флуоресцентный сигнал молекулы-детектора принципиально изменяется, причем сам зонд активируется, но не накапливается в биообъекте, а может быть удален. Флуоресцентные зонды представляют собой небольшие органические молекулы, которые позволяют получить динамическую информацию о локализации и количестве интересующих исследователя молекул, нивелируя необходимость применения технологий генной инженерии в отношении анализируемого образца. В последние годы различные стратегии использования флуоресцентных зондов, включая фотоиндуцированный перенос электронов, флуоресцентно-резонансный энергетический трансфер, метод внутримолекулярного обмена и спироциклизация, хорошо изучены и применяются в отношении различных зондов. Для АФК и АФА подобные флуоресцентные зонды – это молекулы, специфически реагирующие с ними и обеспечивающие изменение их фотохимических свойств (интенсивность флуоресценции, длину волны поглощения/эмиссии и др.) [5].

Краткий обзор биологической роли кислорода

Трудно переоценить значимость определения уровня молекулярного кислорода, обеспечивающего клеточное дыхание организма. В связи с этим детальное понимание биологической роли соединения

представляет собой важную фундаментальную и прикладную проблему [6, 7]. Являясь ключевым метаболитом и источником энергии для клеток млекопитающих, кислород используется для синтеза АТФ в электронно-транспортной цепи и процессах окислительного фосфорилирования. Также он служит субстратом многочисленных энзиматических реакций, обеспечивающих адекватное функционирование клеток. С другой стороны, кислород способен играть и сигнальную роль в адаптации к гипоксии с вовлечением механизмов, ассоциированных с гипоксия-индуцированным фактором [8].

Физико-химические свойства молекулярного кислорода

Как известно, молекулярный кислород представляет собой малую неполярную молекулу, находящуюся в газообразном состоянии и обладающую умеренной растворимостью в жидкостях (около 200 мкМ при 37°C). Он поступает к клеткам путем пассивной диффузии и, у высших многоклеточных организмов, конвективного транспорта через сосудистую стенку из гемоглобина эритроцитов [3, 8].

К числу наиболее практически значимых измеряемых показателей в отношении молекулярного кислорода в биологических объектах принято относить:

- уровень оксигенации *in situ*;
- показатель сатурации эритроцитов;
- градиент концентраций кислорода в тканях.

Следует подчеркнуть, что измерение указанных параметров в динамике позволяет оценивать функционирование клеток и клеточных пулов.

В физиологических условиях значения рассматриваемых показателей гомеостазированы в достаточно узких пределах, причем существенные отклонения могут наблюдаться только в активно работающих мышцах, ткани мозга и возбудимых тканях. Уровень потребления тканями кислорода отражает активность процессов клеточного дыхания в биообъекте и, в комплексе с концентрацией АТФ, ионов и метаболитов и мембранным потенциалом митохондрий, характеризует биоэнергетический статус клетки. Отклонение данного показателя от нормы служит индикатором метаболических нарушений, митохондриальной дисфункции и патологии в целом [9]. Аналогично этому, сдвиги клеточной или тканевой оксигенации связаны с целым рядом патологических состояний, включая инсульты, онкологические заболевания, патологию неврологического профиля,

метаболическую дисфункцию и др. Известно, что как кратковременная, так и длительная гипоксия приводит к перестройке клеточного метаболизма, приводящего либо к гибели клетки, либо к формированию стресс-ответа (за счет эффекта Варбурга – экспрессии индуцированных гипоксией факторов, таких как HIF-1 α , RGC-1 α и т.д.) [8, 10, 11].

Обзор технологий, направленных на определение параметров оксигенации биологических образцов

Область, связанная с разработкой методов измерения параметров оксигенации биологических объектов, развивается уже на протяжении многих лет. Первоначально ее формирование инициировалось внедрением в исследования кислородных электродов Кларка [12], специальных фотометрических (с использованием миоглобина) [13, 14] и ЭПР-систем [15], продемонстрировавших свою информативность для фундаментальных исследований в сфере изучения процессов биоэнергетики, метаболизма, клеточной биологии и токсикологии. Следует отметить, что применение данных методов позволило использовать простые макроскопические модели. В частности, с их помощью были изучены характеристики изолированных митохондрий, суспензий клеток и проведен ряд исследований *in vivo* [12].

В дальнейшем возможности детектирующих систем были существенно расширены за счет микроэлектродов [16–18], систем для смежных клеток [19], ЭПР-зондов [20], ¹⁹F-изотопных исследований [21], применения пимонизадола в качестве красителя [22], фибро-оптических сенсоров [23], а также было улучшено техническое обеспечение ранее разработанных инструментальных методов.

Принципиально новой технологией, впервые предложенной Д. Вилсоном с соавт. (1988) [24], явилось применение биологических O₂-сенсоров, основанных на гашении фосфоресценции и использовании растворимых зондов. В последнее десятилетие данные диагностические системы совершили революцию в отношении целого ряда химических сенсоров, методологии измерения и инструментального обеспечения, позволяя решать новые аналитические и прикладные задачи. Кроме того, были предложены несколько новых оптических сенсорных методов, включая исследование кислород-зависимой флуоресценции GFP-комплексов [25] и визуализацию поздней флуоресценции [26]. С учетом того, что в настоящее время приведенные техноло-

гии перестают быть уделом единичных лабораторий, существующие платформы для оптической детекции и визуализации кислорода в биологических образцах приобретают специфические характеристики и технические параметры, требующие глубокого понимания областей их применения и обоснованности выбора тех или иных диагностических технологий.

Биомедицинские приложения методов определения кислородного гомеостаза биологических объектов

Показано, что среднее потребление кислорода/концентрация O₂ могут быть измерены с использованием внеклеточных кислородных зондов, вводимых в анализируемый образец. Подобные исследования могут быть проведены в кюветах или микропланшетах с помощью стандартных флуоресцентных или времяпролетных спектрометров [9, 21]. Для оценки абсолютного уровня поглощения тканями кислорода должны использоваться запечатанные, газонепроницаемые пробирки [27]. В случае, если биологический образец содержит гетерогенное или преципитирующееся вещество (например, клеточную суспензию), должна быть проведена гомогенизация для исключения образования локального кислородного градиента и искажения результата анализа.

При наличии задачи определения относительного уровня потребления кислорода (между обработанными каким-либо воздействием и интактными клетками) требования к методам исследования могут быть упрощены, в частности, за счет использования стандартных микропланшет, которые не препятствуют росту клеток, трансмембранному транспорту жидкостей и др.; а также частичного запечатывания образцов добавлением минеральных масел в ячейку перед измерением [27]. Масло создает барьер для поступления кислорода в образец из окружающей среды и приводит к формированию градиента концентрации соединения в нем, который может быть оценен с помощью зондов и соотнесен с уровнем потребления кислорода [28]. Подобный подход наиболее применим в отношении скрининга большого количества аналогичных образцов (составление библиотек состояния митохондрий и цитотоксичности при различных воздействиях, анализ панелей трансформированных клеток и микробных культур). Для этих целей может использоваться простое измерение интенсивности флуоресценции с соответствующим контролем для исключения потенциальных артефактов оптической интерференции и измерения.

Исследование кислородного статуса *in vivo* имеет большое фундаментальное и прикладное значение. Оценка текущего уровня оксигенации в живых активно функционирующих тканях (например, в мозге или мышцах), кислородный градиент в сосудистом русле (крупных сосудах и капиллярной сети) и опухолям может быть проведена с использованием внеклеточных зондов и флуоресцентного кислородного имаджинга в реальном времени [29]. Также для данных задач могут быть применены фибро-оптические зонды и измерение «от точки к точке» [30]. В последние годы для мониторинга оксигенации тканей успешно используются широкопольные системы флуоресцентной микроскопии в реальном времени (FLIM) и конфокальные лазерно-сканирующие комплексы высокого разрешения [31]. Следует отметить, что указанные методы в комплексе могут быть применены при исследованиях *in vivo* и *ex vivo*.

Кроме того, расширяется «ассортимент» новых дендримерных зондов с кумариновыми антеннами, применяемых для измерения локальной оксигенации участков мозга грызунов с помощью специально подготовленных двухфотонных FLIM-систем [32]. Для этой цели не проникающий в клетки зонд PtP-C343 вводят в кровоток и детектируют его в ткани мозга на различных расстояниях от артерий [33]. Эта система позволяет добиться пространственного разрешения 10 мкм, а стабильность ее калибровки по кислороду практически не зависит от условий окружающей среды, тогда как период полужизни зонда в организме – 2 ч.

Другие известные исследования параметров оксигенации тканей *in vivo* включают [3]:

- картирование оксигенации радужной оболочки глаза грызунов при действии анестетиков, снижающих венозное давление кислорода [30];

- динамику оксигенации в отдельных скелетных мышечных волокнах лягушки, что позволило установить адаптивное повышение парциального давления кислорода в них при высокочастотной стимуляции;

- измерение парциального давления кислорода в микроциркуляторном русле;

- особенности кислородного статуса опухолей;

- проведение FLIM-анализа кортикального внесосудистого кислорода при моделировании ишемии-реперфузии.

Совершенствование внутриклеточных кислородных зондов позволило существенно расширить возможности детектирования кислорода, в том числе с учетом *in situ* ок-

сигенации активно функционирующих тканей. Так, адгезированные клетки в их естественном дифференцированном состоянии могут быть изучены в открытых микропланшетах или в запечатанном виде (перфузируемые клетки или клеточные культуры). В этих случаях основными контролируемыми и оптимизируемыми параметрами являются плотность клеток и их метаболическая активность, характеристики диффузии и массообмена в образце (объем среды, вязкость и температура), а также парциальное давление кислорода во внешней среде [28]. Внутриклеточные зонды могут быть применены совместно с флуоресцентной время-пролетной спектроскопией для упрощения, удобства и минимизации объема образца и оптимизации результата анализа. Приведенная исследовательская методология дает возможность отслеживать сдвиги клеточного дыхания и метаболизма, ответ клеток на стимуляцию различными эффекторами (в том числе – в динамике самого измерения) и на гипоксию [28]. Она уже была применена в нескольких работах с использованием сложных биологических систем [34].

Внутриклеточные зонды также могут быть применены в микроскопической визуализации для задач полуколичественного отслеживания клеточного кислорода, а также более точного выполнения FLIM-анализа [35]. В частности, они были использованы при проведении оценки кислородного статуса *in situ* скелетных мышц и для *ex vivo* визуализации исследования каротидного гломуса, в котором уровень оксигенации клеток коррелировал с другими показателями их функционирования.

Следует также заметить, что перфузионные камеры, микрожидкостные устройства и 3D-клеточные культуры приобрели большую популярность в биологических экспериментах [36]. Для подобных систем прямой контроль оксигенации в образцах затруднителен, в связи с чем может быть он выполнен только с применением внутриклеточных зондов и последующего бесконтактного измерения. Аналогично в отношении адгезированных клеток и тканей, находящихся в условиях, исключающих перемешивание (например, в микропланшетах под слоем масла), применение внутриклеточных зондов способно значительно повысить чувствительность исследования по сравнению с методами, основанными на внеклеточной детекции.

Наконец, принципиально возможны комбинации различных кислород-сенсорных зондов и технологий определения кислородного статуса в сложных биосистемах, в том числе в клеточных культурах,

при тканевой инженерии или в экспериментах, проводимых в условиях гипоксической среды. Предложенные методы измерения включают [1, 3]:

– камеры для создания гипоксических условий (макро-системы), в которых имеется возможность моделировать различный уровень парциального давления кислорода;

– твердофазные кислородные сенсоры, помещаемые внутрь специальных камер;

– ручные оптические сканеры, получающие информацию с сенсоров, расположенных внутри и вне камеры, и учитывающие текущую концентрацию кислорода;

– пробирки-емкости для клеточных культур со встроенными сенсорными портами, также интегрирующимися с портативными сканерами;

– микропланшеты с клетками, содержащие дополнительно внутриклеточные или внеклеточные кислородные зонды (микросистемы);

– флуоресцентные времяпролетные спектрометры для микропланшет, способные оценивать уровень оксигенации и респираторного ответа клеточных популяций;

– системы визуализации, которые позволяют проводить детальный анализ отдельных клеток, клеточных популяций и живых тканей на высоком разрешении (наноразрешение).

Заключение

В настоящее время описан и апробирован достаточно широкий спектр различных кислородных сенсоров, протоколов измерения и прикладных инструментов для его осуществления, причем каждый из них имеет свои преимущества и ограничения. Для того, чтобы адекватно подобрать и использовать их в отношении конкретной биологической модели или исследовательской задачи, необходимо оценить их аналитические возможности для рассматриваемых условий эксперимента, установить структурно-функциональные взаимоотношения и разработать детальный протокол измерения. Так, только некоторые из предложенных сейчас зондов и методов позволяют достичь качественной, стабильной и воспроизводимой оценки уровня кислородообеспечения клеток и тканей, а также точной калибровки. Многие другие подходы остаются на стадии доработки общей концепции метода, недостаточно оптимизированы, демонстрируют неудовлетворительные рабочие характеристики и аналитическую точность или позволяют получить только полуколичественные данные (относительные сдвиги концентрации кислорода или требуют контрольного уровня параметров). Это ограни-

чивает их широкое использование специалистами в области биомедицины.

Другим лимитирующим фактором в распространении раскрываемых технологий является недостаточность представлений потенциальных пользователей данных методов о базисных принципах каждой конкретной технологии кислородного детектирования и возможностях оценки и грамотного описания результатов, полученных с их помощью. Это зачастую приводит к получению негативных данных и отрицанию информативности технологий, что затрудняет их внедрение в исследовательскую практику.

Для преодоления указанных затруднений и более широкого распространения методов, основанных на использовании кислородных зондов, которые разработаны в настоящее время в достаточном количестве, необходимы дополнительные предметные ориентированные изыскания, а также проведение сравнительного анализа их результатов в различных биологических экспериментах с демонстрацией их информативности и полезности в крупных физиологических, патофизиологических и клинических работах.

С практических позиций, фундаментальные изыскания в области биоэнергетики, метаболизма, клеточной биологии и токсикологии, выполненные с применением кислород-детектирующих технологий, более предпочтительны для исследования макроскопических образцов, таких как митохондриальные фракции клеток, суспензии клеточных линий и перфузируемые ткани [3]. В настоящее время акцент делается на анализе сложных моделей и биосистем в реальном времени: адгезированных дифференцированных клеток, *ex vivo* и *in vivo* систем (функционирующий мозг, мышечная ткань, ткань опухоли, сосудистое русло). Достижением последнего времени также следует считать детальное картирование и реконструкцию кислородного градиента как в микрошкалах, так и в 3D-варианте относительно целых тканей и даже отдельных клеток [26], требующие в дальнейшем основательной верификации. Предложенные визуализирующие платформы со «сверхразрешением» содержат в себе инновационные кислородные зонды с замедленным действием, что открывает принципиально новые перспективы для раскрытия кислородного метаболизма биосистем различного уровня.

Характеризуя значимость измерения концентрации кислорода и его градиента в тканях и клетках, следует отметить ценность этих сведений в таких областях

биомедицины, как метаболизм опухолей, нейробиология, гипоксические состояния, клеточная физиология, разработка новой биомедицинской аппаратуры и заживление ран. Для макрообъектов, таких как фрагменты тканей, органов или целостный организм, кислородный статус также имеет принципиальное значение, в частности в отношении радио- и химиотерапии, репродуктивных технологий и трансплантации органов [37]. Требования к системам неинвазивного измерения концентрации кислорода важны для многих областей биомедицины и различных биомоделей. Также это имеет принципиальное значение для биотехнологии, мониторинга состояния окружающей среды, продуктов и контроля химических производств различного профиля и направленности.

Список литературы

1. Nagano T. Bioimaging probes for reactive oxygen species and reactive nitrogen species // *J. Clin. Biochem. Nutr.* – 2009. – Vol. 45. – P. 111–124.
2. Palmer R.M.G., Ferrige A.G., Moncada S. Nitric oxide release account for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor // *Nature.* – 1987. – Vol. 327. – P. 524–526.
3. Dmitriev R.I., Papkovsky D.B. Optical probes and techniques for O₂ measurement in live cells and tissue // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2012. – Vol. 69. – P. 2025–2039.
4. Kojima H. et al. Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins // *Anal. Chem.* – 1998. – Vol. 70. – P. 2446–2453.
5. Nagano T., Takizawa H., Hirobe M. Reaction of nitric oxide with amines in the presence of dioxygen // *Tetrahedron Lett.* – 1995. – Vol. 36. – P. 8239–8242.
6. Semenza G.L. Life with oxygen // *Science.* – 2007. – Vol. 318, № 5847. – P. 62–64.
7. Wilson D.F. Quantifying the role of oxygen pressure in tissue function // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2008. – Vol. 294, № 1. – P. H11–H13.
8. Semenza G.L. Oxygen-dependent regulation of mitochondrial respiration by hypoxia-inducible factor 1 // *Biochem. J.* – 2007. – Vol. 405, № 1. – P. 1–9.
9. Brand M.D., Nicholls D.G. Assessing mitochondrial dysfunction in cells // *Biochem. J.* – 2011. – Vol. 435, № 2. – P. 297–312.
10. Lin J., Handschin C., Spiegelman B.M. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators // *Cell Metab.* – 2005. – Vol. 1, № 6. – P. 361–370.
11. Bartrons R., Caro J. Hypoxia, glucose metabolism and the Warburgs effect // *J. Bioenerg. Biomembr.* – 2007. – Vol. 39, № 3. – P. 223–229.
12. Clark L.C., Wolf R., Granger D., Taylor Z. Continuous recording of blood oxygen tension by polarography // *J. Appl. Physiol.* – 1953. – Vol. 6, № 3. – P. 189–193.
13. Wittenberg J.B. Myoglobin-facilitated oxygen diffusion: role of myoglobin in pxygen entry into muscle // *Physiol. Rev.* – 1970. – Vol. 50, № 4. – P. 559–636.
14. Sullivan S.M., Pittman R.N. In vitro O₂ uptake and histochemical fiber type of resting hamster muscles // *J. Appl. Physiol.* – 1984. – Vol. 57, № 1. – P. 246–253.
15. Williams B.B. et el. Clinical electron paramagnetic resonance oximetry using India ink Oxygen transport to tissue // *Adv. in Exp. Med. Biol.* – 2010. – Vol. 662. – P. 149–156.
16. Braun R.D. et al. Comparison of tumor and normal tissue oxygen tension measurement using OxyLite or microelectrodes in rodents // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2001. – Vol. 280, № 6. – P. H2533–H2544.
17. Cringle S.J., Yu P.K., Su E.N., Yu D.Y. Oxygen distribution and consumption in the developing rat retina // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2006. – Vol. 47, № 9. – P. 4072–4076.
18. Dewhirst M.W. et al. Determination of local oxygen consumption rates in tumors // *Cancer Res.* – 1994. – Vol. 54, № 13. – P. 3333–3336.
19. Wu C.-C. et al. A Clark-type oxygen chip for in situ estimation of respiratory activity of adhering cells // *Talanta.* – 2010. – Vol. 81, № 1–2. – P. 228–234.
20. Bobko A.A. et al. Trityl-based EPR probe with enhanced sensitivity to oxygen // *Free Radic. Biol. Med.* – 2009. – Vol. 47, № 5. – P. 654–658.
21. Diepart C. et al. Comparison of methods for measuring oxygen consumption in tumor cells in vitro // *Anal. Biochem.* – 2010. – Vol. 396, № 2. – P. 250–256.
22. Rosenberg C. et al. Pimonidazole adduct immunohistochemistry in the rat kidney: detection of tissue hypoxia // *Meth. Mol. Biol.* – 2009. – Vol. 466. – P. 161–174.
23. Liu Q., Vo-Dinh T. Spectral filtering modulation method for estimation of hemoglobin concentration and oxygenation based on a single fluorescence emission spectrum in tissue phantoms // *Med. Phys.* – 2009. – Vol. 36, № 10. – P. 4819–4829.
24. Rumsey W.L., Vanderkooi J.M., Wilson D.F. Imaging of phosphorescence: a novel method for measuring oxygen distribution in perfused tissue // *Science.* – 1988. – Vol. 241, № 4873. – P. 1649–1651.
25. Takahashi E. et al. In vivo oxygen imaging using green fluorescent protein // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2006. – Vol. 291, № 4. – P. C781–C787.
26. Mik E.G. et al. In vivo mitochondrial oxygen tension measured by a delayed fluorescence life time technique // *Bioophys. J.* – 2008. – Vol. 95, № 8. – P. 3977–3990.
27. Hynes J., Natoli E.Jr., Will Y. Fluorescent pH and oxygen probes of the assessment of mitochondrial toxicity in isolated mitochondria and whole cells // *Curr. Protoc.* – 2009. – Ch 2, Un. 2.16.
28. Zhdanov A.V., Ogurtsov V.I., Taylor C.T., Papkovsky D.V. Monitoring of cell oxygenation and responses to metabolic stimulation by intracellular oxygen sensing technique // *Integr. Biol.* – 2010. – Vol. 2, № 9. – P. 443–451.
29. Huppert T.J. et al. A multicompartment vascular model for inferring baseline and functional changes in cerebral oxygen metabolism and arterial dilatation // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 2007. – Vol. 27, № 6. – P. 1262–1279.
30. Shonat R.D., Kight A.C. Oxygen tension imaging in the mouse retina // *Ann. Biomed. Eng.* – 2003. – Vol. 31, № 9. – P. 1084–1096.
31. Fang Q. et al. Oxygen advection and diffusion in three-dimensional vascular anatomic network // *Opt. Express.* – 2008. – Vol. 16, № 22. – P. 17530–17541.
32. Lebedev A.Y. et al. Dendric phosphorescence probes for oxygen imaging in biological systems // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* – 2009. – Vol. 1, № 6. – P. 1292–1304.
33. Dunphy I., Vinogradov S.A., Wilson D.F. Oxyphor R2 and G2: phosphors for measuring oxygen by oxygen-dependent quenching of phosphorescence // *Anal. Biochem.* – 2002. – Vol. 310, № 2. – P. 191–198.
34. Zhdanov A., Dmitriev R., Papkovsky D. Bafilomycin A1 activates respiration of neuronal cells via uncoupling associated with flickering depolarization of mitochondria // *Cell Mol. Life Sci.* – 2011. – Vol. 8, № 5. – P. 903–917.
35. Fercher A. et al. Imaging of cellular oxygen and analysis of metabolic responses of mammalian cells // *Methods Mol. Biol.* – 2010. – Vol. 591. – P. 257–273.
36. Sinks L.E. et al. Synthesis and calibration of phosphorescent nanoprobes for oxygen imaging in biological systems // *J. Vis. Exp.* – 2010. – Vol. 37. – e1731.

37. Will Y. et al. Analysis of mitochondrial function using phosphorescent oxygen-sensitive probes // *Nat. Protoc.* – 2006. – Vol. 1, №6. – P. 2563M2572.

References

1. Nagano T., *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 2009, vol. 45, pp. 111–124.
2. Palmer R.M.G., Ferrige A.G., Moncada S., *Nature*, 1987, vol. 327, pp. 524–526.
3. Dmitriev R.I., Papkovsky D.B., *Cell. Mol. Life Sci.*, 2012, vol. 69, pp. 2025–2039.
4. Kojima H. et al., *Anal. Chem.*, 1998, vol. 70, pp. 2446–2453.
5. Nagano T., Takizawa H., Hirobe M., *Tetrahedron Lett.*, 1995, vol. 36, pp. 8239–8242.
6. Semenza G.L., *Science*, 2007, vol. 318, no. 5847, pp. 62–64.
7. Wilson D.F., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2008, vol. 294, no. 1, pp. H11–H13.
8. Semenza G.L., *Biochem. J.*, 2007, vol. 405, no. 1, pp. 1–9.
9. Brand M.D., Nicholls D.G., *Biochem. J.*, 2011, vol. 435, no. 2, pp. 297–312.
10. Lin J., Handschin C., Spiegelman B.M., *Cell Metab.*, 2005, vol. 1, no. 6, pp. 361–370.
11. Bartrons R., Caro J., *J. Bioenerg. Biomembr.*, 2007, vol. 39, no. 3, pp. 223–229.
12. Clark L.C., Wolf R., Granger D., Taylor Z., *J. Appl. Physiol.*, 1953, vol. 6, no. 3, pp. 189–193.
13. Wittenberg J.B., *Physiol. Rev.*, 1970, vol. 50, no. 4, pp. 559–636.
14. Sullivan S.M., Pittman R.N., *J. Appl. Physiol.*, 1984, vol. 57, no. 1, pp. 246–253.
15. Williams B.B. et al., *Adv. in Exp. Med. Biol.*, 2010, Vol. 662, pp. 149–156.
16. Braun R.D. et al., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2001, Vol. 280, no. 6, pp. H2533–H2544.
17. Cringle S.J., Yu P.K., Su E.N., Yu D.Y., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2006, vol. 47, no. 9, pp. 4072–4076.
18. Dewhirst M.W. et al., *Cancer Res.*, 1994, vol. 54, no. 13, pp. 3333–3336.
19. Wu C.-C. et al., *Talanta*, 2010, vol. 81, no. 1-2, pp. 228–234.
20. Bobko A.A. et al., *Free Radic. Biol. Med.*, 2009, vol. 47, no. 5, pp. 654–658.
21. Diepart C. et al. *Anal. Biochem.*, 2010, vol. 396, no. 2, pp. 250–256.
22. Rosenberg C. et al., *Methods Mol. Biol.*, 2009, vol. 466, pp. 161–174.
23. Liu Q., Vo-Dinh T., *Med. Phys.*, 2009, vol. 36, no. 10, pp. 4819–4829.
24. Rumsey W.L., Vanderkooi J.M., Wilson D.F. *Science*, 1988, vol. 241, no. 4873, pp. 1649–1651.
25. Takahashi E. et al., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2006, vol. 291, no. 4, pp. C781–C787.
26. Mik E.G. et al., *Biophys. J.*, 2008, vol. 95, no. 8, pp. 3977–3990.
27. Hynes J., Natoli E.Jr., Will Y., *Curr. Protoc.*, 2009, Ch 2, Un. 2.16.
28. Zhdanov A.V., Ogurtsov V.I., Taylor C.T., Papkovsky D.V., *Integr. Biol.*, 2010, vol. 2, no. 9, pp. 443–451.
29. Huppert T.J. et al., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2007, vol. 27, no. 6, pp. 1262–1279.
30. Shonat R.D., Kight A.C., *Ann. Biomed. Eng.*, 2003, vol. 31, no. 9, pp. 1084–1096.
31. Fang Q. et al., *Opt. Express*, 2008, vol. 16, no. 22, pp. 17530–17541.
32. Lebedev A.Y. et al., *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2009, vol. 1, no. 6, pp. 1292–1304.
33. Dunphy I., Vinogradov S.A., Wilson D.F., *Anal. Biochem.*, 2002, vol. 310, no. 2, pp. 191–198.
34. Zhdanov A., Dmitriev R., Papkovsky D., *Cell Mol. Life Sci.*, 2011, vol. 8, no. 5, pp. 903–917.
35. Fercher A. et al., *Methods Mol. Biol.*, 2010, vol. 591, pp. 257–273.
36. Sinks L.E. et al., *J. Vis. Exp.*, 2010, vol. 37, e1731.
37. Will Y. et al., *Nat. Protoc.*, 2006, vol. 1, no. 6, pp. 2563–2572.

Рецензенты:

Перетягин С.П., д.м.н., профессор, президент ассоциации Российских озонотерапевтов, г. Нижний Новгород;

Пахмутов И.А., д.в.н., профессор кафедры анатомии, хирургии и внутренних незаразных болезней, Нижегородская государственная сельскохозяйственная академия, г. Нижний Новгород.

Работа поступила в редакцию 28.12.2014.