

СЕНСИБИЛИЗИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ Z,Z-БИЛИРУБИНА IX α И ЕГО ФОТОПРОДУКТОВ НА ФЕРМЕНТЫ В МОДЕЛЬНЫХ РАСТВОРАХ**В. Ю. Плавский^{*}, В. А. Мостовников,
А. И. Третьякова, Г. Р. Мостовникова**

УДК (335.34+535.37):577.3

*Институт физики им. Б. И. Степанова НАН Беларуси,
220072, Минск, просп. Независимости, 68; e-mail: plavskii@dragon.bas-net.by*

(Поступила 17 января 2008)

На модельных системах исследованы побочные эффекты, которые могут индуцироваться светом при проведении фототерапии гипербилирубинемии (желтухи) у новорожденных детей с целью снижения уровня Z,Z-билирубина IX α (Z,Z-БР IX α). Показано, что сенсibiliзирующее действие Z,Z-БР IX α , локализованного в участках сильного связывания макромолекулы сывороточного альбумина человека (САЧ), направлено прежде всего на аминокислотные остатки белка-носителя и не затрагивает молекул фермента (лактатдегидрогеназы (ЛДГ)), присутствующего в буферном растворе. Регистрируемое фотодинамическое повреждение ЛДГ обусловлено сенсibiliзацией со стороны фотоизомеров билирубина, характеризующихся более низкими константами ассоциации с САЧ и расположенными (в отличие от нативного Z,Z-БР IX α) на поверхности белковой глобулы САЧ. На основании исследования спектральных характеристик фотопродуктов Z,Z-БР IX α , сопоставления кинетики их накопления в растворе и кинетики фотоинактивации фермента сделан вывод, что определяющая роль в сенсibiliзованном повреждении ЛДГ принадлежит люмирубину. Эффект фотосенсibiliзации зависит от длины волны излучения, используемого для фотоконверсии билирубина. При обеспечении (к началу воздействия) одинакового количества поглощаемых пигментом квантов света различного спектрального диапазона побочный эффект минимален для излучения, соответствующего длинноволновому краю полосы поглощения билирубина. Показано, что при отношении концентраций билирубин/САЧ >2 (когда часть молекул пигмента сорбирована на поверхности белковой глобулы) билирубин способен выступать в качестве фотосенсibiliзирующего агента в отношении присутствующего в растворе фермента. Обсуждаются методы уменьшения побочного неблагоприятного действия света на организм новорожденных детей при проведении фототерапии гипербилирубинемии.

Ключевые слова: гипербилирубинемия новорожденных, билирубин, люмирубин, фотоизомеризация билирубина, фотопродукты билирубина, фотодинамическое повреждение, спектры поглощения и флуоресценции.

In order to decrease levels of Z,Z-bilirubin IX α (Z,Z-BR IX α), the investigation of side effects that can be induced by light in phototherapy for hyperbilirubinemia (jaundice) of newborn children was performed on model systems. It was shown that sensibilizing action of Z,Z-BR IX α which is localized in the areas of strong binding of the human serum albumin (HSA) macromolecule, is directed primarily at amino acid residues of the protein-carrier and does not impact the molecules of enzyme (lactate dehydrogenase, LDH), present in a buffer solution. The registered photodynamic damage of LDH is caused by sensitization from bilirubin photoisomers, that are characterized by much lower constants of association with HSA and located (as opposed to native Z,Z-BR IX α) on a surface of HSA protein globule. Based on the research of spectral characteristics of photoproducts Z,Z-BR IX α ; the comparison of their kinetics of accumulation in a solution; and a kinetics of enzyme's photoinactivation, the major role in sensibilized damaging of LDH was concluded to belong to lumirubin. The effect of a photosensitization depends on a wavelength of the radiation used for bilirubin photoconversion. When ensuring (to the beginning of the exposure) the identical number of light quanta from different spectral regions absorbed by a pigment, the side effect is minimal for the emission corresponding to a long-wave edge of bilirubin absorption band. It is shown that at a bilirubin/HSA concentration ratio >2 (when a portion of pigment molecules is sorbed on a surface

SENSIBILIZING ACTION OF Z,Z-BILIRUBIN IX α AND ITS PHOTOPRODUCTS ON ENZYMES IN MODEL SOLUTIONS**V. Y. Plavskii^{*}, V. A. Mostovnikov, A. I. Tretjakova, and G. R. Mostovnikova** (B. I. Stepanov Institute of Physics, National Academy of Sciences of Belarus, 68 Nezavisimosti Ave., Minsk, 220072, Belarus; e-mail: plavskii@dragon.bas-net.by)

of protein globule) bilirubin is capable of serving as sensitizer for enzyme present in the solution. Discussed in the paper are methods to decrease a negative side effect of light on newborn children's organism, when managing phototherapy for hyperbilirubinemia.

Keywords: hyperbilirubinemia in newborns, bilirubin, lumirubin, photoisomerization of bilirubin, photoproducts of bilirubin, photodynamic damage, absorption and fluorescence spectra.

Введение. Как известно [1—4], *Z,Z*-билирубин IX α (*Z,Z*-БР IX α , структурная формула которого показана на рис. 1) — тетрапиррольное соединение, высокая концентрация которого в крови новорожденных детей вызывает развитие синдрома гипербилирубинемии (желтухи) и требует принятия экстренных мер, направленных на снижение его уровня. Необходимость проведения лечебных мероприятий обусловлена потенциальным токсичным действием указанного гидрофобного соединения на организм новорожденного, прежде всего на клетки головного мозга, что может сказаться на физическом и нервно-психическом развитии младенца и даже быть непосредственной причиной его смерти [1]. В настоящее время одним из наиболее распространенных и эффективных способов лечения гипербилирубинемии новорожденных считается фототерапия [1—9], заключающаяся в тотальном воздействии на поверхность тела ребенка светом плотностью мощности $P = 0.3\text{—}5.0$ мВт/см², спектральный состав которого соответствует длинноволновой полосе поглощения билирубина ($\lambda = 400\text{—}530$ нм). В практической медицине метод начал широко использоваться с 70-х гг. прошлого столетия, и к настоящему времени в мире пролечено более миллиона младенцев [2]. Считается [10—13], что определяющую роль в снижении уровня билирубина в крови новорожденных при проведении фототерапии играют процессы фотоизомеризации пигмента — образование его конфигурационных (*Z,E*-БР IX α , *E,Z*-БР IX α , *E,E*-БР IX α) и структурных (*Z*-люмирубин (*Z*-ЛР) и *E*-люмирубин (*E*-ЛР)) изомеров (см. рис. 1). Указанные изомеры, прежде всего *Z*-ЛР и *E*-ЛР (далее ЛР), будучи более гидрофильными соединениями, чем нативный *Z,Z*-БР IX α , характеризуются повышенной скоростью экскреции [10—13].

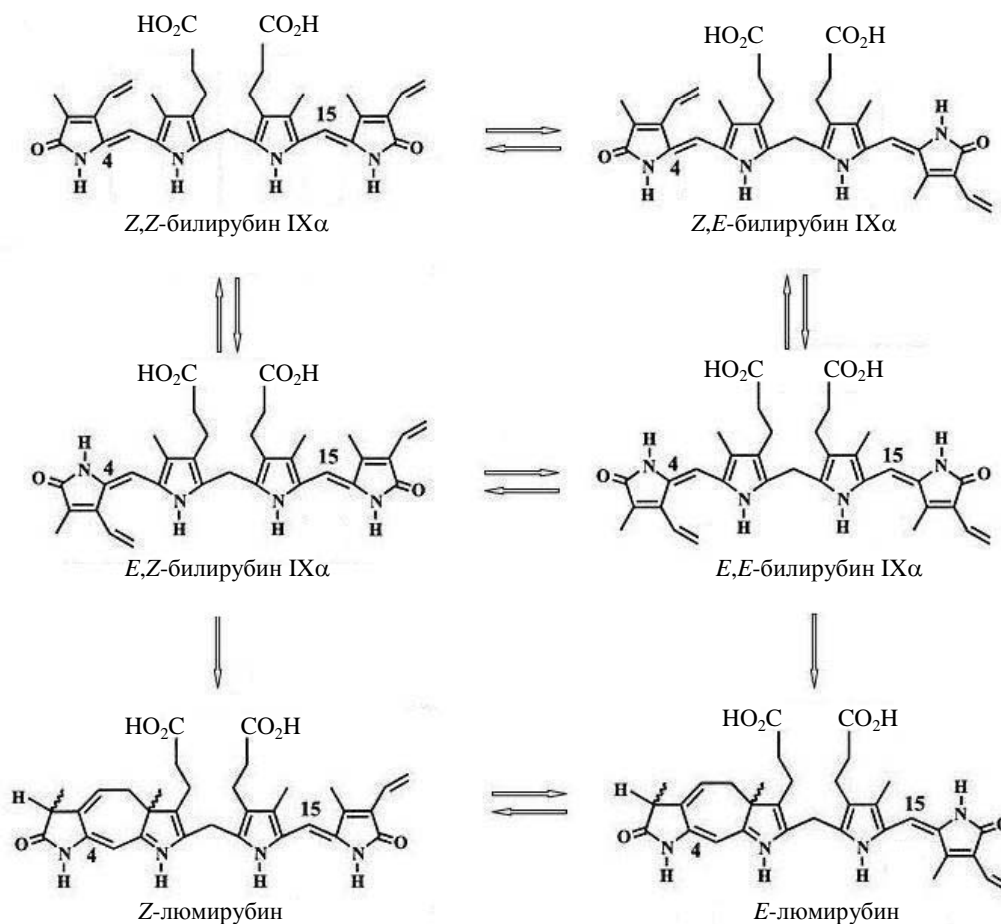


Рис. 1. Схема конфигурационной (*цис-транс*) и структурной фотоизомеризации *Z,Z*-билирубина IX α

Кроме процесса изомеризации Z,Z-БР IX α под действием света протекают также окислительные реакции (рис. 2), сопровождающиеся накоплением бесцветных продуктов на основе моно- и дипиррольных фрагментов, а также биливердина, образующегося в результате окисления метиленового мостика и характеризующегося протяженной полосой поглощения с максимумом около $\lambda = 660\text{--}750$ нм (в зависимости от типа растворителя) [14, 15]. Согласно [14—16], один из механизмов фотодеструкции билирубина состоит в участии синглетного кислорода в данном процессе (самосенсибилизированное окисление). Действительно, по ряду опосредованных оценок триплетный уровень билирубина имеет энергию ~ 150 кДж/см² [14], что обеспечивает возможность генерации синглетного кислорода, поскольку для последнего энергия S₁-уровня $^1\Delta_g = 94$ кДж/см². При этом, однако, нельзя исключить, что синглетный кислород, генерируемый триплетно возбужденным Z,Z-БР IX α , не будет вызывать фотодинамического повреждения других жизненно важных молекулярных структур и органелл клетки. Так, в [17] показана возможность фотодеструкции аминокислот основного транспортного белка крови — сывороточного альбумина человека (САЧ) — при воздействии излучения видимой области спектра на его комплексы с билирубином. Авторы [18] отмечают сенсibilизированное билирубином повреждение липопротеинов плазмы крови. Высказывалась также необходимость снижения дозовой нагрузки на младенца при проведении фототерапии вследствие обнаруженной возможности повреждения ядерной ДНК [19, 20], нарушения проницаемости клеточных мембран и гибели окрашенных билирубином клеток человека в культуре [21—25] при их облучении.

Все это указывает на необходимость исследования сенсibilизирующего действия билирубина на важнейшие биологические структуры для исключения (снижения) возможных неблагоприятных побочных эффектов действия света, особенно с учетом того, что суммарная длительность фототерапии при лечении тяжелых форм гипербилирубинемии иногда составляет более 100 ч при суммарной дозе до 200 Дж/см² [1—4].

Цель настоящей работы — исследование сенсibilизирующего действия Z,Z-БР IX α и его фотопродуктов в отношении фермента лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в модельных буферных растворах, содержащих ЛДГ и пигмент, связанный с САЧ, в широком диапазоне соотношения концентраций билирубин/альбумин,

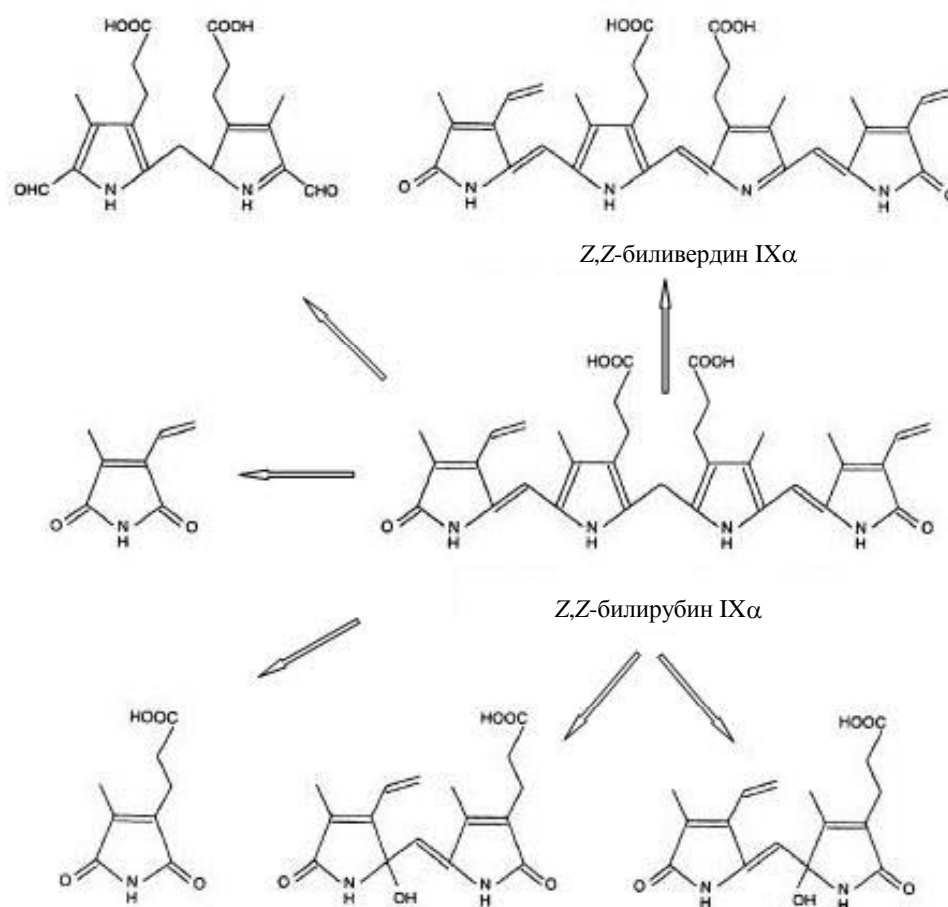


Рис. 2. Структурные формулы продуктов фотодеструкции Z,Z-билирубина IX α

а также для различных длин волн воздействующего излучения. Использование в качестве фотосенсибилизатора не свободного билирубина, а его комплекса с альбумином объясняется тем, что в крови билирубин преимущественно находится в связанном состоянии. К тому же в свободном состоянии в области нейтральных значений pH он крайне неустойчив и быстро претерпевает химические превращения. Необходимость варьирования отношения концентраций пигмент/белок и длин волн воздействующего излучения обусловлена тем, что превышение концентрации билирубина над связывающей способностью альбумина определяет тяжесть протекания гипербилирубинемии [1, 2], а эффективность фототерапии при использовании излучения, соответствующего длинноволновому краю полосы поглощения билирубина, существенно повышается по сравнению с вариантом, когда спектральный диапазон излучения расположен в области максимума спектра поглощения билирубина [7, 8, 26—28]. Анализ фотофизических процессов, определяющих зависимость терапевтического действия от длины волны излучения, представлен в [6, 29—32].

Выбор молекул фермента в качестве теста на фотосенсибилизирующее действие билирубина и его фотопродуктов обусловлен определяющей ролью макромолекул данного типа в регуляции метаболических процессов в организме и их способностью выступать в качестве наиболее чувствительной мишени для фотодинамических реакций, протекающих как по радикальному механизму, так и с участием синглетного кислорода. Вклад вышеуказанных реакций в деструктивное действие света в условиях фотосенсибилизации со стороны билирубина (или его фотопродуктов) оценен на примере ЛДГ, которая не содержит простетических групп, не поглощает в видимой области спектра, и поэтому изменение ее ферментативной активности при воздействии низкоинтенсивного излучения видимой области спектра может инициироваться лишь фотосенсибилизированными процессами.

Материалы и методы исследований. Использовали Z,Z-БР IX α производства Fluka (Германия) без дополнительной очистки. По данным производителя содержание основного вещества в препарате не ниже 98.5 %. В качестве белка-носителя для связывания пигмента использовали САЧ (Sigma, США, фракция V, содержание основного вещества ~99 %). Из-за низкой (~7 нМ [33]) растворимости билирубина в воде при физиологических значениях pH его предварительно растворяли в 0.05 М NaOH. Затем 8—10 мкл указанного раствора билирубина добавляли¹ к 10 мл 0.1 М фосфатного буферного раствора САЧ ($C_{САЧ} = 2$ мкМ) с pH 7.4. Конечную концентрацию билирубина доводили до $C_{БР} = 4$ мкМ; концентрация ЛДГ в растворе в момент облучения $C_{ЛДГ} = 8 \cdot 10^{-9}$ М. Изменение соотношения концентраций билирубин/САЧ осуществляли за счет изменения исходной концентрации альбумина; при этом концентрация пигмента оставалась неизменной.

При выборе соотношения концентраций альбумин/пигмент исходили из наличия в молекуле САЧ двух участков сильного связывания билирубина с константами ассоциации $K_{ac} = 5.5 \cdot 10^7$ и $4.4 \cdot 10^6$ М⁻¹ [34]. Концентрации исследуемых соединений определяли с учетом следующих молярных коэффициентов экстинкции в максимуме их длинноволновой полосы: САЧ $\epsilon_{280} = 3.55 \cdot 10^4$ М⁻¹·см⁻¹ [35], ЛДГ $\epsilon_{280} = 1.96 \cdot 10^5$ М⁻¹·см⁻¹ [35], билирубин в составе комплекса с САЧ $\epsilon_{458} = 4.70 \cdot 10^4$ М⁻¹·см⁻¹ [36]. Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре Specord M40 UV VIS (Carl Zeiss, Jena, Германия), спектры флуоресценции — на спектрофлуориметре СФЛ 1211А (Солар, Беларусь).

В качестве источников излучения использовали как специальную синюю флуоресцентную лампу Westinghouse F20T12, широко применяемую для фототерапии гипербилирубинемии новорожденных детей, так и лазеры: гелий-кадмиевый ЛГ-70 ($\lambda = 441.6$ нм) и аргоновый ЛГН-503 (с селекцией длин волн от 457.9 до 514.5 нм), производства НПО “Полярон”, г. Львов. Облучение растворов проводили в спектральных кюветах с базой $l = 5$ мм. Оптическая плотность в максимуме спектра поглощения билирубина в этом случае не превышала $D = 0.1$, что позволяло избежать экранирования излучения за счет эффекта “внутреннего фильтра”. Для повышения однородности облучения и насыщения кислородом растворы периодически перемешивались автоматической пипеткой.

Относительную ферментативную активность ЛДГ (Serva, Германия) до и после облучения в присутствии билирубина и САЧ характеризовали по скорости катализируемой ею биохимической реакции превращения пировиноградной кислоты в молочную. Метод определения ферментативной активности ЛДГ основан на измерении скорости снижения оптической плотности одного из компонентов в результате его расходования в процессе реакции и детально описан в [37]. Дозовые кривые представлены в полулогарифмическом масштабе, поскольку это позволяет наглядно констатировать возможное отклонение экспериментальных результатов от экспоненциальной зависимости.

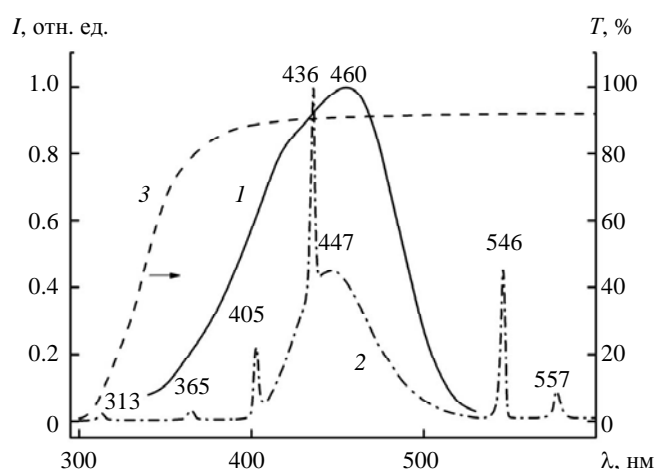
Спектр излучения флуоресцентной лампы регистрировали на спектральном комплексе КСВУ-23 (ЛОМО, Санкт-Петербург). Мощность оптического излучения контролировали измерителем средней мощности и энергии лазерного излучения ИМО-3С (основная относительная погрешность измерения $\delta \leq 6$ %).

¹ Внесение микроколичеств щелочи при указанном соотношении смешиваемых объемов практически не влияет на pH буфера.

Спектральные характеристики облучаемых компонентов и источников излучения. Спектры электронного поглощения САЧ и ЛДГ расположены в УФ области спектра и характеризуются максимумом при $\lambda = 280$ нм, который определяется главным образом триптофановыми, тирозиновыми и фенилаланиновыми аминокислотными остатками, входящими в состав указанных белковых молекул.

Спектр поглощения билирубина, связанного с САЧ, в буферном растворе с pH 7.4 представлен на рис. 3 (кривая 1); максимум расположен при $\lambda = 458$ нм. Спектр поглощения пигмента сформирован двумя хромофорами, характеризующимися наличием выраженных внутримолекулярных экситонных взаимодействий [29, 30, 38]. В спектре излучения флуоресцентной лампы Westinghouse F20T12 (кривая 2), кроме основной полосы флуоресценции с максимумом при $\lambda_{\text{изл}} = 447$ нм, присутствует ряд ртутных линий (313, 365, 405, 436, 546, 577 нм), расположенных в ближнем УФ и видимом диапазонах. Подчеркнем, что обычно фототерапию гипербилирубинемии проводят в инкубаторе (кювезе) для выхаживания новорожденных, верхняя стенка которого выполнена из полиметилметакрилата и является своеобразным защитным экраном для излучения ртутных линий с $\lambda \leq 313$ нм, способных вызывать фотодеструкцию белковых молекул [37]. По этой причине облучение исследуемых растворов светом лампы осуществляли через подложку из полиметилметакрилата (толщиной 6 мм), спектр пропускания которой приведен на рис. 3 (кривая 3). Интенсивность излучения лампы на уровне расположения кюветы с раствором составляла ≈ 1 мВт/см², что является типичным значением для фототерапевтических процедур, проводимых с целью лечения синдрома гипербилирубинемии новорожденных.

Рис. 3. Спектр поглощения буферного раствора Z,Z-билирубина IX α , связанного с САЧ (1), спектр испускания флуоресцентной лампы Westinghouse F20T12 (2), спектр светопропускания полиметилметакрилата толщиной 6 мм (3)



Излучение лазерных источников света соответствует максимуму спектра поглощения билирубина ($\lambda = 457.9$ нм), а также его коротковолновому ($\lambda = 441.6$ нм) и длинноволновому ($\lambda = 514.5$ нм) краям.

Специально проведенными исследованиями показано, что ни излучение лампы, ни излучение лазеров в используемом диапазоне интенсивностей ($P \leq 40$ мВт/см²) в отсутствие билирубина не оказывает влияния на ферментативную активность ЛДГ.

Кинетика сенсibilизированной фотоинактивации фермента. Длительное облучение буферных растворов, содержащих билирубин—САЧ ($C_{\text{БР}} = 4$ мкМ, $C_{\text{САЧ}} = 2$ мкМ) и ЛДГ ($C_{\text{ЛДГ}} = 8 \cdot 10^{-9}$ М), наряду с фотодеструкцией билирубина приводит к снижению каталитической активности фермента. Кинетики уменьшения оптической плотности в процентах к контролю ($(D/D_0) \cdot 100$ %) в максимуме спектра поглощения Z,Z-БР IX α и ферментативной активности ЛДГ (γ) в процентах к контролю при облучении лампой и лазерами представлены в полулогарифмическом масштабе на рис. 4. На начальном этапе дозовой зависимости (кривые 1, 3, 5) наблюдается быстрое обесцвечивание билирубина, затем скорость данного процесса падает (дозовая кривая отклоняется от прямой линии). По иной закономерности происходит снижение ферментативной активности ЛДГ (кривые 2, 4, 6). Так, в течение значительного дозового интервала фотодеструкция фермента отсутствует (ферментативная активность ЛДГ не отличается от контрольных, необлученных образцов). Затем отмечается некоторое снижение ферментативной активности, и скорость процесса фотоинактивации ЛДГ растет по мере увеличения дозы облучения, а следовательно, снижения концентрации Z,Z-БР IX α . Такой вид кинетики фотоинактивации ЛДГ позволяет заключить, что фотосенсибилизатором в отношении фермента выступает не билирубин, а его фотопродукты, концентрация которых увеличивается по мере облучения раствора.

Принципиально закономерности сенсibilизированной фотоинактивации ЛДГ не различаются при воздействии излучения флуоресцентной лампы и лазеров (см. рис. 4). При этом использование лазерного излучения, соответствующего различным участкам спектра поглощения билирубина и его фотопродуктов, позволяет изучить сенсibilизированное действие в отношении ЛДГ в условиях обеспечения (к началу воздействия) одинакового количества поглощаемых билирубином квантов света ($N = 1.66 \cdot 10^{15}$ см⁻² · с⁻¹)

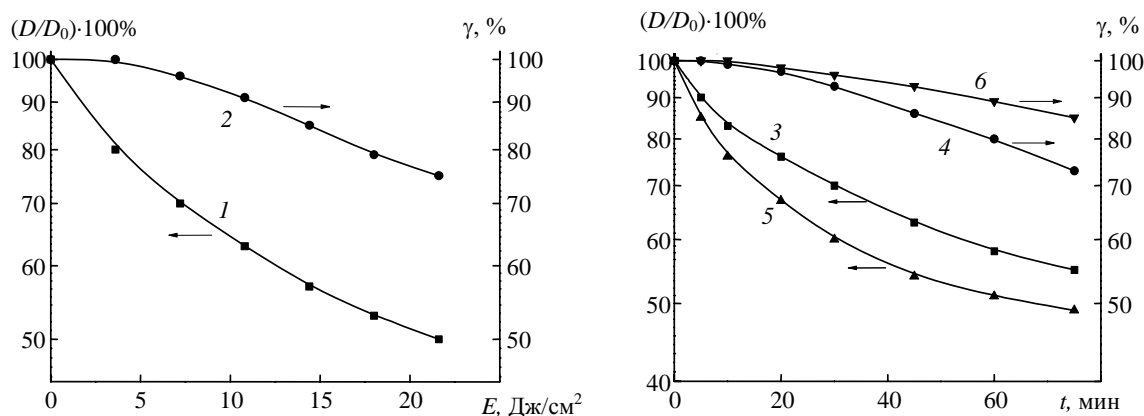


Рис. 4. Кинетика снижения оптической плотности в максимуме спектра поглощения *Z,Z*-билирубина IX α (1, 3, 5) и фотоинактивации ЛДГ (2, 4, 6) при их облучении в присутствии САЧ флуоресцентной лампой (1, 2), гелий-кадмиевым лазером с $\lambda = 441.6$ нм (3, 4) или аргоновым лазером с $\lambda = 514.5$ нм (5, 6); $C_{\text{БР}}/C_{\text{САЧ}} = 2/1$; E — доза облучения, t — время облучения

разных длин волн. Учитывая различие оптической плотности билирубина на длинах волн излучения лазеров, выполнение указанного условия обеспечивали за счет изменения интенсивности воздействующего излучения: $P = 4.0$ мВт/см² для $\lambda = 441.6$ нм, $P = 3.7$ мВт/см² для $\lambda = 457.9$ нм и $P = 35.4$ мВт/см² для $\lambda = 514.5$ нм (при неизменной исходной концентрации облучаемых компонентов). Обращает на себя внимание то, что при облучении, соответствующем одинаковому начальному поглощению билирубином квантов различных длин волн, наиболее высокая начальная скорость снижения оптической плотности в максимуме поглощения билирубина наблюдается при воздействии излучения с $\lambda = 514.5$ нм (кривая 5), наиболее низкая — при $\lambda = 441.6$ нм (кривая 3).

Проведенные исследования показали также, что при одинаковом времени облучения и вышеуказанных условиях наибольшая инактивация фермента наблюдается при воздействии излучения с $\lambda = 441.6$ нм (рис. 4, кривая 4), наименьшая — при $\lambda = 514.5$ нм (кривая 6); излучение с $\lambda = 457.9$ нм по сенсibiliзирующей активности в отношении ЛДГ занимает промежуточное положение (для исключения загромождения кривые не приведены).

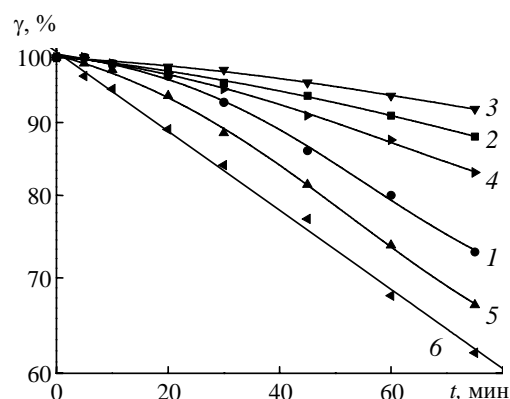
Установлено, что сенсibiliзированное повреждение ЛДГ протекает с участием синглетного кислорода (¹O₂), о чем свидетельствует снижение эффекта фотоинактивации при внесении в облучаемую смесь известных тушителей ¹O₂ — азида натрия (рис. 5, кривая 2) или никотинамидадениндинуклеотида восстановленного (NADH, кривая 3), а также увеличение степени фотоинактивации ЛДГ при замене буфера на основе H₂O (кривая 1) на D₂O (кривая 5). Как известно, тест на D₂O является одним из показателей участия ¹O₂ в фотохимической реакции, поскольку время жизни синглетного кислорода и вероятность его химического взаимодействия с биосубстратом на порядок выше в тяжелой воде по сравнению с H₂O.

Примечательно, что как D₂O, так и NaN₃ влияют также на фотолиз билирубина, однако скорость обесцвечивания раствора увеличивается (D₂O) или уменьшается (NaN₃) не более чем на 3—5%. Поэтому наиболее вероятно, что увеличение деструктивного действия в отношении ЛДГ при переходе к D₂O и уменьшение степени фотоинактивации фермента при внесении NaN₃ не обусловлены изменением концентрации фотопродуктов-сенсibiliзаторов, а свидетельствуют об участии ¹O₂ в изучаемом процессе. Вместе с тем более высокое протективное действие NADH (характеризующегося константой скорости тушения ¹O₂ $k_q = 7.9 \cdot 10^7$ М⁻¹ · с⁻¹ и являющегося донором электрона и протона) по сравнению с NaN₃ ($k_q = 4.4 \cdot 10^8$ М⁻¹ · с⁻¹) не исключает участия радикальных процессов в исследуемых эффектах фотоинактивации фермента. Возможно также участие гидроперекисей в фотодеструкции ЛДГ, поскольку добавление в облучаемый раствор каталазы (фермента, с высокой скоростью расщепляющего H₂O₂) оказывает выраженное защитное действие в отношении ЛДГ (кривая 4).

Как уже отмечалось, при начальном соотношении концентраций $C_{\text{БР}}/C_{\text{САЧ}} = 2/1$ сенсibiliзатором в отношении присутствующего в растворе фермента выступает не билирубин, а образующиеся при его облучении фотопродукты. Ситуация изменяется, когда концентрация билирубина значительно превышает концентрацию белка-носителя. В этом случае билирубин не только способен встраиваться в два участка сильного связывания на молекуле САЧ, но и может занимать 10—14 мест на поверхности белковой глобулы, характеризующихся слабым связыванием с макромолекулой [39]. В качестве примера представлена дозовая зависимость фотоинактивации ЛДГ при $C_{\text{БР}} = 4$ мкМ, $C_{\text{САЧ}} = 1$ мкМ (рис. 5, кривая б). Как видно,

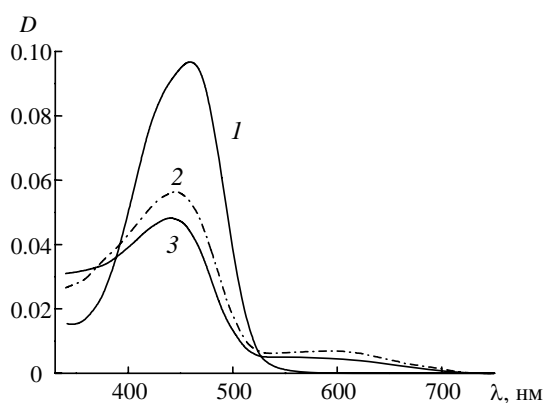
при избытке (по сравнению с САЧ) билирубина наблюдается увеличение скорости фотоинактивации ЛДГ, при этом дозовая зависимость близка к экспоненте. Наиболее вероятно, что при условии $C_{БР}/C_{САЧ} > 2$ билирубин способен выступать в качестве фотосенсибилизирующего агента в отношении ЛДГ.

Рис. 5. Кинетика фотоинактивации ЛДГ в присутствии билирубин-альбуминового комплекса при воздействии излучения гелий-кадмиевого лазера с $\lambda = 441.6$ нм: 1, 6 — в отсутствие добавок; 2 — в присутствии $5 \cdot 10^{-3}$ М NaN_3 ; 3 — в присутствии $1 \cdot 10^{-4}$ М NADH; 4 — в присутствии $1 \cdot 10^{-8}$ М каталазы; 5 — раствор билирубин—САЧ—ЛДГ в D_2O ; $C_{БР} = 4$ мкМ; $C_{САЧ} = 2$ (1–5) и 1 мкМ (6)



Спектральные характеристики фотопродуктов Z,Z-БР IX α . Для выяснения вклада фотопродуктов билирубина в фотоинактивацию фермента остановимся на спектральных характеристиках продуктов фотоизомеризации и фотоокисления пигмента. Отметим, что как конфигурационные, так и структурные фотоизомеры билирубина — очень неустойчивые соединения [40]. Как правило, регистрация спектров поглощения изомерных форм пигмента осуществляется лишь в основной полосе (с максимумом в области $\lambda = 450\text{—}460$ нм) с помощью полихроматора, установленного на выходе хроматографической колонки после разделения компонентов. Поэтому абсорбционные и спектрально-люминесцентные характеристики изомеров изучены слабо, а данные разных авторов весьма противоречивы [12, 41—47]. Связывание с альбумином оказывает некоторое стабилизирующее действие на изомеры [40], однако в этом случае в растворе присутствует большой набор фотопродуктов билирубина, и поэтому сведения о спектральных характеристиках изомерных форм билирубина в составе комплекса с САЧ фрагментарны [12, 45].

Типичные изменения, индуцируемые в спектрах поглощения билирубин-альбуминового комплекса ($C_{БР}/C_{САЧ} = 2/1$) воздействием в течение $t = 75$ мин излучения гелий-кадмиевого лазера с $\lambda = 441.6$ нм, $P = 4$ мВт/см² и аргонового лазера с $\lambda = 514.5$ нм, $P = 35.4$ мВт/см² в условиях одинакового исходного количества поглощаемых билирубином квантов света различных длин волн, представлены на рис. 6. Облучение растворов сопровождается снижением оптической плотности в максимуме полосы поглощения пигмента, ее приростом на коротковолновом крае спектра поглощения билирубина, а также образованием новой полосы поглощения в области $\lambda = 530\text{—}700$ нм. Несмотря на одинаковое количество квантов, изначально поглощаемых билирубином при воздействии светом с $\lambda = 441.6$ нм (кривая 2) и $\lambda = 514.5$ нм (кривая 3), излучение зеленой области вызывает более выраженные изменения в максимуме полосы поглощения и в УФ части спектра. Прирост оптической плотности в красной области более выражен при воздействии излучения $\lambda = 441.6$ нм.



Имеются основания полагать, что при дозовой нагрузке, вызывающей сенсибилизированное повреждение ЛДГ, снижение оптической плотности в максимуме полосы поглощения билирубина обусловлено преимущественно образованием структурных фотоизомеров (Z- и E-ЛР), тогда как вклад *цис-транс*-фотоизомеров (Z,E, E,Z и E,E-БР IX α) и продуктов фотоокисления пигмента менее выражен.

Рис. 6. Спектры поглощения Z,Z-билирубина IX α , связанного с САЧ, до облучения (1) и при воздействии излучением гелий-кадмиевого лазера с $\lambda = 441.6$ нм, $P = 4$ мВт/см² (2); аргонового лазера с $\lambda = 514.5$ нм, $P = 35.4$ мВт/см² (3) в течение 75 мин; $C_{БР}/C_{САЧ} = 2/1$

Так, удаление молекулярного кислорода из раствора перед его облучением приводит к снижению начальной скорости обесцвечивания раствора (контролируемой при $\lambda = 460$ нм) не больше чем на 10 %. Это указывает на то, что процессы самосенсибилизированного фотоокисления пигмента, характеризующиеся очень низким квантовым выходом $\phi_{FO} < 0.01$, не вносят определяющего значения в фотоконверсию били-

рубина. Можно ожидать значительного вклада в снижение оптической плотности в максимуме полосы поглощения пигмента *Z,E*-БР IX α , образование которого характеризуется наибольшим (среди продуктов *цис-транс*-фотоизомеризации билирубина) квантовым выходом ($\phi_{Z,E} < 0.11$). Однако, согласно [12], коэффициент молярной экстинкции *Z,E*-БР IX α , связанного с САЧ, в максимуме полосы поглощения ($\lambda = 475$ нм) несколько выше соответствующего значения для *Z,E*-БР IX α в его максимуме при $\lambda = 460$ нм. Поэтому образование *Z,E*-изомера не должно приводить к снижению оптической плотности в синей области спектра. В то же время для свободной формы стереоизомеров (в отсутствие альбумина) в литературе приводятся иные сведения о соотношении коэффициентов молярной экстинкции *Z,E*- и *Z,Z*-БР IX α ($\epsilon_{Z,E}/\epsilon_{Z,Z}$). Так, по данным [41] $\epsilon_{Z,E}/\epsilon_{Z,Z} = 0.80$, по данным [46] — 0.70. Что касается вклада других геометрических фотоизомеров билирубина (*E,Z*- и *E,E*-БР IX α) в снижение оптической плотности раствора в синей области спектра при его облучении, по всей видимости, он очень незначителен. На это указывает тот факт, что квантовый выход образования *E,Z*-изомера (в зависимости от длины волны воздействующего излучения) в 10—80 раз ниже соответствующего значения $\phi_{Z,E}$ [3, 12, 46], а коэффициент молярной экстинкции близок к такому для *Z,Z*-БР IX α : $\epsilon_{E,Z}/\epsilon_{Z,Z} = 0.98$ [41, 45].

Важно подчеркнуть, что вследствие обратимости реакций *цис-транс*-фотоизомеризации билирубина между *Z,Z*, *Z,E*, *E,Z* и *E,E*-стереоизомерами быстро устанавливается равновесие. Время, необходимое для установления стационарной концентрации изомеров, определяется плотностью мощности воздействующего излучения и в используемом диапазоне интенсивностей ($P = 3.7\text{—}35.4$ мВт/см²) не превышает 1 мин с момента начала облучения [43, 48]. В отличие от процессов стереоизомеризации, реакции структурной фотоизомеризации, сопровождающиеся образованием люмирубина, являются необратимыми (см. рис. 1). Поэтому концентрация люмирубина растет по мере облучения раствора (в течение ~30—120 мин [43, 46, 48]), в то время как концентрация *цис-транс*-изомеров постепенно снижается вследствие убыли *Z,Z*-БР (из-за протекающих процессов фотоокисления, структурной фотоизомеризации) и установления равновесия между стереоизомерами на более низком уровне концентраций. Характерно, что при соотношении концентраций $C_{БР}/C_{САЧ} = 1/2$ (т. е. когда билирубин локализован в участке наиболее сильного связывания белка) и дозовой нагрузке, обеспечивающей примерно двухкратное снижение оптической плотности в максимуме полосы поглощения пигмента, концентрация люмирубина в растворе превышает концентрацию *Z,Z*- и *Z,E*-БР IX α [49]. Причем по мере заполнения билирубином второго участка связывания на альбумине (при увеличении соотношения $C_{БР}/C_{САЧ}$ до 2/1) выход люмирубина увеличивается, а *Z,E*-БР IX α — уменьшается примерно в полтора раза [48, 50].

Таким образом, при используемом отношении концентраций $C_{БР}/C_{САЧ} = 2.0$ и времени облучения, индуцирующем снижение оптической плотности в синей области спектра в 1.5—2.0 раза, основной вклад в обесцвечивание раствора вносит люмирубин, характеризующийся в области $\lambda = 450$ нм молярным коэффициентом экстинкции в $\approx 2.0\text{—}2.7$ раза ниже, чем *Z,Z*-БР IX α [41, 46].

Еще одна характерная черта спектрально проявляющихся фотохимических процессов в молекулах билирубина — коротковолновое смещение полосы поглощения по мере увеличения дозы облучения. По нашему мнению, это обусловлено более коротковолновым (по сравнению с нативным билирубином) положением спектра поглощения люмирубина, накапливающегося в растворе при его облучении. В пользу указанного предположения свидетельствуют данные [42, 43, 46, 51], согласно которым максимум спектра поглощения люмирубина в свободном состоянии (в отсутствие белка) смещен на 10—12 нм в коротковолновую область по сравнению с *Z,Z*-БР IX α в том же растворителе. (Сведений о спектральных характеристиках люмирубина, связанного с САЧ, обнаружить не удалось.) Как уже отмечалось, спектр поглощения *Z,E*-изомера, связанного с САЧ, характеризуется максимумом при $\lambda = 475$ нм [12], тогда как максимум спектра поглощения *E,Z*-БР IX α в составе комплекса с САЧ практически совпадает с таковым для *Z,Z*-БР IX α ($\lambda = 460$ нм) [45].

Наиболее вероятная причина прироста поглощения в УФ области спектра по мере увеличения дозы облучения комплексов САЧ—билирубин — образование продуктов фотоокисления билирубина (на основе моно- и дипиррольных фрагментов, характеризующихся максимумом при $\lambda = 320$ нм [16]), а также люмирубина и его фотопродуктов [7]. Согласно [7], одна из полос поглощения люмирубина характеризуется максимумом при $\lambda = 337$ нм, а его фотопродуктов — при 350—370 нм. В области $\lambda = 380$ нм расположена также полоса поглощения биливердина, который практически не флуоресцирует и не обладает сенсibilизирующим действием [14, 15]. Кроме названных соединений, определенный вклад в наблюдаемый прирост поглощения в УФ области могут также вносить продукты сенсibilизированного билирубином разрушения триптофановых аминокислотных остатков САЧ (формилкинурина, кинурина), поглощающих в области $\lambda = 360$ нм и способных генерировать синглетный кислород и оказывать фотодинамическое действие [37].

Неоднозначен также вопрос о фотопродуктах, формирующих полосу поглощения в области $\lambda = 530\text{—}700$ нм по мере увеличения дозы воздействующего излучения. Примечательно, что при использовании широкополосного лампового источника прирост поглощения в данном диапазоне спектра не столь выражен [15]. Это дало повод некоторым авторам [15] усомниться в наличии фотопродукта с максимумом поглощения в диапазоне $\lambda = 530\text{—}700$ нм. В связи с этим следует отметить, что один из максимумов спектра поглощения люмирубина, по данным [7], расположен в области $\lambda = 590$ нм, а биливердина — в диапазоне $660\text{—}750$ нм [14, 15]. Однако, согласно результатам хроматографических исследований, увеличение оптической плотности в области $530\text{—}700$ нм не коррелирует ни с приростом концентрации люмирубина, ни с приростом концентрации биливердина, регистрируемого в следовых количествах [49]. Более того, увеличение поглощения в данной области спектра наблюдается и после выхода концентрации люмирубина на стационарный уровень, что позволило предположить [49] связь указанного прироста с процессами фотополимеризации люмирубина.

Некоторая информация о спектрах поглощения фотопродуктов билирубина при его облучении в составе комплекса с САЧ получена из спектров возбуждения флуоресценции (рис. 7). Как известно [29, 30], флуоресценция Z,Z-БР IX α , связанного с САЧ, характеризуется очень низким квантовым выходом ($\Phi_{\text{фл}} = (1\text{—}3) \cdot 10^{-3}$) с максимумом при $\lambda = 530$ нм. При $\lambda_{\text{рег}} = 530$ нм для необлученного раствора регистрируется спектр возбуждения с максимумом при $\lambda = 457$ нм (кривая 1), что практически соответствует полосе поглощения интактного пигмента. Для облученного раствора спектр возбуждения расположен при $\lambda = 460$ нм (кривая 2) и значительно уширен, что, по-видимому, объясняется вкладом во флуоресценцию присутствующих в растворе люмирубина и продуктов *цис-транс*-изомеризации билирубина с близкими, но несколько отличающимися спектрами поглощения и флуоресценции. Кроме того, для облученного раствора билирубина при $\lambda_{\text{рег}} = 680$ нм, соответствующей полосе флуоресценции люмирубина [7], регистрируется спектр возбуждения с максимумами при $\lambda = 335, 457$ и 590 нм (кривая 3), а при $\lambda_{\text{рег}} = 720$ нм — с максимумами при $\lambda = 348$ и $610\text{—}620$ нм (кривая 4), который, согласно [7], принадлежит продуктам фотолиза люмирубина. Отметим, что вследствие многокомпонентного состава облученного раствора положение указанных максимумов в спектре возбуждения флуоресценции (рис. 7) смещается на $\Delta\lambda = \pm 10$ нм в зависимости от длины волны регистрации флуоресценции и дозы воздействующего излучения на раствор, а значит, соотношения концентраций компонентов.

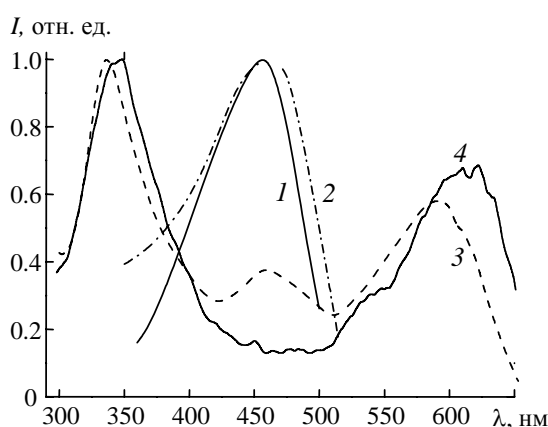


Рис. 7. Типичные спектры возбуждения флуоресценции Z,Z-билирубина IX α , связанного с САЧ (1), и его фотопродуктов (2—4) при $\lambda_{\text{рег}} = 530$ (1, 2), 680 (3) и 720 нм (4)

Обсуждение результатов. Представленные данные свидетельствуют о том, что длительное облучение ($t = 30\text{—}75$ мин) модельных растворов, содержащих Z,E-БР IX α , связанный с САЧ, способно приводить к фотоинаktivации белка-фермента (ЛДГ), присутствующего в малых концентрациях в облучаемом растворе. Фотосенсибилизирующим агентом в отношении фермента выступает либо сам Z,E-БР IX α , либо его фотопродукты. Вклад указанных фотосенсибилизаторов в фотоинаktivацию ЛДГ определяется начальным соотношением концентраций $C_{\text{БР}}/C_{\text{САЧ}}$. Так, при $C_{\text{БР}}/C_{\text{САЧ}} \leq 2/1$ молекулы билирубина локализованы в участках сильного связывания САЧ и сенсибилизирующее действие пигмента направлено на аминокислотные остатки белка-носителя [17]. Фотосенсибилизаторами в отношении ЛДГ в этом случае выступают продукты фотоконверсии билирубина, что подтверждается кинетикой фотоинаktivации фермента (рис. 4, кривые 2, 4, б): в течение значительного дозового интервала фотодеструкция отсутствует, затем

отмечается некоторое снижение ферментативной активности, и скорость фотоинактивации ЛДГ растет по мере увеличения дозы облучения, а следовательно, снижения концентрации Z,Z-БР IX α (кривые 1, 3, 5) и роста концентрации фотопродуктов.

На наш взгляд, при указанном начальном соотношении концентраций билирубин/САЧ определяющая роль в сенсibilизированном повреждении ЛДГ принадлежит люмирубину — хорошо растворимому в воде продукту структурной фотоизомеризации пигмента [51], тогда как вклад продуктов стереоизомеризации Z,Z-БР IX α незначителен. На это указывает тот факт, что концентрация конфигурационных фотоизомеров билирубина (Z,E, E,Z и E,E-изомеров) выходит на стационарный уровень (вследствие динамического равновесия между стереоизомерами) через ≈ 1 мин с момента начала облучения в используемом интервале интенсивностей [43, 48]. Поэтому в случае сенсibilизирующего действия *цис-транс*-фотоизомеров на дозовой кривой следовало бы ожидать снижения ферментативной активности ЛДГ практически непосредственно после начала облучения. Образование же люмирубина — достаточно медленный процесс, и его накопление в растворе происходит в течение длительного времени ($t = 30$ — 120 мин [43, 46, 48]), зависящего от интенсивности воздействующего излучения. К тому же константа связывания люмирубина с САЧ, по оценкам [52], на два порядка ниже соответствующей величины для Z,Z-БР IX α , и в отличие от билирубина люмирубин расположен на поверхности белковой глобулы САЧ. Таким образом, если фотохимически активные интермедиаты, образующиеся при поглощении света билирубином, практически не имеющим в участках сильного связывания макромолекулы контакта с водным окружением [29, 30], в первую очередь взаимодействуют с аминокислотными остатками САЧ (как это следует из [17]), то люмирубин может сенсibilизировать процесс фотодеструкции как САЧ, так и ЛДГ.

Еще одна характерная особенность фотосенсibilизированного повреждения ЛДГ — более выраженное действие излучения синей области спектра ($\lambda = 441.6$ нм) по сравнению с излучением зеленой области ($\lambda = 514.5$ нм). Данный вывод следует из результатов, показанных на рис. 4 (кривые 4 и б), где для равенства количества поглощаемых билирубином квантов света в начальный момент времени интенсивность излучения с $\lambda = 514.5$ нм превышала таковую для $\lambda = 441.6$ нм в ≈ 8.6 раза. При этом сенсibilизированная фотоинактивация фермента протекает с участием синглетного кислорода и пероксида водорода, как следует из рис. 5.

В отличие от ЛДГ фотодеструкция билирубина в данных условиях облучения протекает более интенсивно при воздействии светом с $\lambda = 514.5$ нм (рис. 6, кривая 3) по сравнению с $\lambda = 441.6$ нм (кривая 2) или $\lambda = 457.9$ нм. При этом при дозах воздействующего излучения, обеспечивающих полутора-двукратное снижение оптической плотности при $\lambda = 460$ нм, определяющий вклад в указанную трансформацию спектра вносит образование люмирубина, концентрация которого превышает таковую для других изомеров, характеризующегося к тому же наиболее низким коэффициентом молярной экстинкции ($\epsilon_{Z,Z}/\epsilon_{LP} = 2.0$ — 2.7) [41, 46]. В связи с этим наблюдаемое различие скорости обесцвечивания билирубина (контролируемой в максимуме спектра его поглощения) при воздействии излучения $\lambda = 441.6$ и 514.5 нм (рис. 4, кривые 3 и 5) обусловлено более высоким (в ≈ 2 раза) квантовым выходом образования люмирубина при $\lambda = 514.5$ нм [12, 45, 47, 51]. Причины зависимости квантового выхода образования продуктов фотоизомеризации от длины волны воздействующего излучения — бихромофорный характер строения пигмента, структурная и спектральная неидентичность хромофоров, а также наличие внутримолекулярного переноса энергии (обусловленного экситонными взаимодействиями между хромофорами), эффективность которого изменяется при варьировании длины волны излучения в пределах длинноволновой полосы поглощения билирубина [29, 30, 38].

Как уже отмечалось, несмотря на более высокое содержание люмирубина в растворе при воздействии $\lambda = 514.5$ нм, его сенсibilизирующее действие (рис. 4, кривая б) менее выражено, чем при использовании света с $\lambda = 441.6$ нм (кривая 4). По-видимому, различие в фотодинамических эффектах объясняется более высокой молярной экстинкцией люмирубина при $\lambda = 441.6$ нм по сравнению с $\lambda = 514.5$ нм [41, 45, 46]. Негативное влияние света на биохимическую активность ЛДГ еще больше усиливается (рис. 4, кривая 2) при переходе к широкополосному источнику излучения — флуоресцентной лампе, половина интенсивности которой сосредоточена в фиолетовой области спектра (рис. 3). Указанная полоса испускания лампы перекрывается и с интенсивной полосой поглощения люмирубина, максимум которой расположен в УФ области при $\lambda = 335$ нм (рис. 7, кривая 3). Логично предположить, что ее наличие у люмирубина обусловлено хромофором, содержащим (в отличие от билирубина и его стереоизомеров) семичленный цикл (см. рис. 1), поскольку, согласно [53], коротковолновый максимум спектра поглощения билирубина расположен при $\lambda < 250$ нм.

Проведенные исследования показали также, что при значительном избытке Z,Z-БР IX α по сравнению с альбумином ($C_{БР}/C_{САЧ} = 4/1$) билирубин способен выступать в качестве фотосенсibilизирующего агента в отношении ЛДГ, что подтверждается отсутствием лаг-периода на дозовой кривой фотоинактивации

фермента (рис. 5, кривая б). Отметим, что в этом случае кинетика инактивации ЛДГ близка к экспоненте. Вероятно, проявлению фотосенсибилизирующего действия билирубина в отношении фермента при $C_{\text{БР}}/C_{\text{САЧ}} > 2/1$ способствует расположение части молекул пигмента на поверхности белковой глобулы САЧ [39]. Имеются основания полагать, что такая ситуация может реализоваться в реальной клинической практике у младенцев с высоким уровнем билирубина, особенно с учетом того, что вследствие изменения конформации альбумина при некоторых видах гипербилирубинемии его связывающая способность может многократно снижаться [54]. По этой причине, несмотря на близость концентраций альбумина (370 мкМ) и билирубина (170—350 мкМ) в крови новорожденных детей с синдромом гипербилирубинемии, регистрируется некоторое количество несвязанного билирубина [1], способного выступать в качестве фотосенсибилизатора в отношении макромолекул, выполняющих ферментативные функции. Однако нельзя не отметить, что в крови содержится также и ряд компонентов, в том числе низкой молекулярной массы, способных выступать в качестве тушителей и акцепторов активных форм кислорода, что может в значительной мере препятствовать фотоинактивации ферментов.

Снижению побочных эффектов, потенциально возможных при проведении фототерапии гипербилирубинемии вследствие сенсибилизирующего действия со стороны люмирубина, может способствовать чередование фототерапевтических процедур и пауз между воздействиями (при сохранении суммарной энергетической нагрузки). Для успешной реализации данного подхода необходимо, чтобы пауза между сеансами фототерапии была достаточной для диффузии люмирубина в глубь ткани и его последующей экскреции.

Выполненные исследования позволяют утверждать, что использование для фототерапии гипербилирубинемии новорожденных квазимонохроматических источников излучения на основе сверхъярких светодиодов, спектральный диапазон которых соответствует длинноволновому краю полосы поглощения, перспективно с точки зрения как повышения терапевтической эффективности метода, так и снижения побочных неблагоприятных эффектов, вызываемых сенсибилизирующим действием билирубина и его фотопродуктов. Как известно [55, 56], современные светоизлучающие диоды на основе AlInGaN, перспективные для фототерапии гипербилирубинемии новорожденных детей, характеризуются достаточно узким спектром испускания (полуширина $\Delta\lambda \sim 30$ нм) с максимумом в областях 470 или 505 нм, отсутствием УФ составляющей и оптической мощностью, превышающей 1 Вт. Ресурс таких источников находится на уровне 50000 ч (для флуоресцентных ламп он не превышает 2000 ч). При этом спектр излучения светодиодов (в отличие от флуоресцентных ламп) остается неизменным на протяжении всего срока службы. В настоящее время фототерапевтические аппараты на основе светоизлучающих диодов для лечения желтухи новорожденных детей начали серийно производиться как в Республике Беларусь [57], так и в ряде зарубежных стран [58].

Выводы. Показано, что Z,Z-БР IX α , а также его фотопродукты (прежде всего люмирубин) способны оказывать сенсибилизирующее действие в отношении лактатдегидрогеназы, присутствующей в растворе во время облучения билирубин-альбуминового комплекса. Закономерности кинетики фотоинактивации фермента определяются соотношением концентраций билирубин/САЧ. В условиях одинакового количества поглощаемых квантов на длинах волн, соответствующих максимуму полосы поглощения Z,Z-БР IX α ($\lambda = 457.9$ нм), а также ее коротковолновому ($\lambda = 441.6$ нм) и длинноволновому ($\lambda = 514.5$ нм) краям, минимальные побочные эффекты наблюдаются при воздействии излучения зеленой области спектра. При проведении фототерапии гипербилирубинемии новорожденных снижению побочных неблагоприятных эффектов может способствовать использование светодиодных источников, а также чередование сеанса фототерапии и паузы между световыми воздействиями.

Авторы признательны чл.-кор. НАН Беларуси К. Н. Соловьеву за обсуждение материалов статьи.

- [1] Н.П.Шабалов. Неонатология. Учебник для медицинских вузов, 2, Санкт-Петербург, Спец. лит. (1999) 77—123
- [2] American Academy of Pediatrics. Subcommittee on Hyperbilirubinemia. Management of Hyperbilirubinemia in the Newborn Infant 35 or More Weeks of Gestation. Pediatrics, **114** (2004) 297—316
- [3] J.F.Ennever. Photochem. Photobiol., **47** (1988) 871—876
- [4] R.A.Polin. Biol. Neonate, **58** (1990) 32—43
- [5] H.J.Vreman, R.J.Wong, D.K.Stevenson. Semin. Perinatol., **28** (2004) 326—333
- [6] V.A.Mostovnikov, G.R.Mostovnikova, V.Y.Plavski. Proc. SPIE, **2370** (1994) 558—561
- [7] Г.Р.Мостовникова, В.А.Мостовников, В.Ю.Плавский, А.И.Третьякова, С.П.Андреев, А.Б.Рябцев. Опт. журн., **67** (2000) 60—63
- [8] Г.Р.Мостовникова, В.А.Мостовников, Г.А.Шишко, В.Ю.Плавский, А.Б.Рябцев, И.А.Леусенко, В.В.Гиневич, А.В.Мостовников, А.И.Третьякова, А.В.Микулч. Материалы междунар. конф. “Лазерно-оптические технологии в биологии и медицине”, 14—15 октября 2004 г., Минск, Ин-т физики НАН Беларуси, **1** (2004) 189—194
- [9] L.A.Stokowski. Adv. Neonatal Care, **6** (2006) 303—312
- [10] J.F.Ennever, I.Knox, S.C.Denne, W.T.Speck. Pediatr. Res., **19** (1985) 205—208

- [11] H.Okada, K.Masuya, S.Yasuda, K.Okubo, K.Kawada, T.Kusaka, M.Namba, T.Nishida, T.Imai, K.Isobe, S.Itoh. *Early Hum. Dev.*, **81** (2005) 619—622
- [12] A.F.McDonagh, G.Agati, F.Fusi, R.Pratesi. *Photochem. Photobiol.*, **50** (1989) 305—319
- [13] S.Onishi, K.Isobe, S.Itoh, M.Manabe, K.Sasaki, R.Fukusaki, T.Yamakawa. *J. Biochem. (Tokyo)*, **100** (1986) 789—795
- [14] Р.Бенассон. Флеш-фотолиз и импульсный радиолиз. Применение в биохимии и медицинской химии, Москва, Мир (1987)
- [15] А.Е.Мышкин, В.Н.Сахаров. *Успехи химии*, **51** (1982) 72—91
- [16] G.L.Landen, Y.T.Park, D.A.Lightner. *Tetrahedron*, **39** (1983) 1893—1907
- [17] F.F.Rubaltelli, G.Jori. *Photochem. Photobiol.*, **29** (1976) 991—1000
- [18] S.A.Hulea, T.L.Smith, E.Wasowicz, F.A.Kummerow. *Biochim. Biophys. Acta*, **1304** (1996) 197—209
- [19] B.S.Rosenstein, J.M.Ducore, S.W.Cummings. *Mutation Res.*, **112** (1983) 397—406
- [20] T.Christensen, J.B.Reitan, G.Kinn. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **7** (1990) 337—346
- [21] A.W.Girotti. *Photochem. Photobiol.*, **24** (1976) 525—532
- [22] M.R.Deziel, A.W.Girotti. *J. Biol. Chem.*, **255** (1980) 8192—8198
- [23] F.Bohm, F.Drygalla, P.Charlesworth, K.Bohm, T.G.Truscott, K.Jokiel. *Photochem. Photobiol.*, **62** (1995) 980—983
- [24] E.Roll. *Acta Paediatrica*, **94** (2005) 1437—1442
- [25] E.B.Roll, T.Christensen. *Acta Paediatrica*, **94** (2005) 1448—1454
- [26] G.P.Donzelli. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **4** (1998) 126—128
- [27] G.P.Donzelli, S.Pratesi, G.Rapisardi, G.Agati, F.Fusi, R.Pratesi. *Lancet*, **346** (1995) 184—185
- [28] F.Ebbesen, G.Agati, R.Pratesi. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.*, **88** (2003) 430—431
- [29] В.Ю.Плавский, В.А.Мостовников, Г.Р.Мостовникова, А.И.Третьякова. *Журн. прикл. спектр.*, **74**, № 1 (2007) 108—119
- [30] В.Ю.Плавский, В.А.Мостовников, А.И.Третьякова, Г.Р.Мостовникова. *Опт. журн.*, **74** (2007) 11—21
- [31] V.Y.Plavski, V.A.Mostovnikov, G.R.Mostovnikova. In “Spectroscopy of Biological Molecules”, Eds. J.C.Merlin, S.Turrell, J.P.Huvenne, Dordrecht, Boston, London, Kluwer Acad. Publ. (1995) 271—272
- [32] В.Ю.Плавский, В.А.Мостовников, Г.Р.Мостовникова, А.И.Третьякова. *Материалы междунар. конф. “Лазерная физика и применения лазеров”*, 14—16 мая 2003 г., Минск, Ин-т физики НАН Беларуси (2003) 309—312
- [33] R.Brodersen. *J. Biol. Chem.*, **254** (1979) 2364—2369
- [34] J.Jacobsen, R.Brodersen. *J. Biol. Chem.*, **258** (1983) 6319—6326
- [35] C.N.Pace, F.Vajdos, L.Fee, G.Grimley, T.Gray. *Protein Sci.*, **4** (1995) 2411—2423
- [36] J.W.Greenberg, V.Malhotra, J.F.Ennever. *Photochem. Photobiol.*, **46** (1987) 453—456
- [37] В.А.Мостовников, Г.Р.Мостовникова, А.И.Жданович, В.Ю.Плавский, Е.Б.Килина, С.А.Третьяков, В.А.Самойлюкович. *Журн. прикл. спектр.*, **49**, № 2 (1988) 230—237
- [38] В.Ю.Плавский, В.А.Мостовников, А.И.Третьякова, Г.Р.Мостовникова. *Материалы междунар. конф. “Лазерная физика и оптические технологии”*, 25—29 сентября 2006 г., Гродно, Гродн. гос. ун-т, **2** (2006) 336—339
- [39] Е.П.Шаповаленко, И.В.Колосов. *Биоорг. химия*, **4** (1978) 514—522
- [40] D.A.Lightner, T.A.Wooldridge, A.F.McDonagh. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **86** (1979) 235—243
- [41] V.Malhotra, J.F.Ennever. *J. Chromatogr.*, **383** (1986) 153—157
- [42] J.F.Ennever, A.T.Costarino, R.A.Polin, W.T.Speck. *J. Clin. Invest.*, **79** (1987) 1674—1678
- [43] M.G.Migliorini, P.Galvan, G.Sbrana, G.P.Donzelli, C.Vecchi. *J. Biochem.*, **256** (1988) 841—846
- [44] M.Bacci, R.Linari, G.Agati, F.Fusi. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **3** (1989) 419—427
- [45] J.F.Ennever, T.J.Dresing. *Photochem. Photobiol.*, **53** (1991) 25—32
- [46] Y.Kanna, T.Arai, R.Tokumar. *Bull. Chem. Soc. Jpn*, **66** (1993) 1482—1489
- [47] G.Agati, F.Fusi, R.Pratesi, P.Galvan, G.P.Donzelli. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **47** (1998) 181—189
- [48] Y.Kanna, T.Arai, K.Tokumar. *Bull. Chem. Soc. Jpn*, **67** (1994) 2758—2762
- [49] S.Yasuda, S.Itoh, T.Imai, K.Isobe, S.Onishi. *Pediatr. Int.*, **43** (2001) 270—275
- [50] S.Onishi, S.Itoh, K.Isobe, M.Ochi, T.Kunikata, T.Imai. *J. Biochem.*, **257** (1989) 711—714
- [51] S.Onishi, S.Itoh, K.Isobe. *J. Biochem.*, **236** (1986) 23—29
- [52] Y.Moroi, R.Matuura, T.Hisadome. *Bull. Chem. Soc. Jpn*, **58** (1985) 1426—1431
- [53] Г.Е.Добрецов, Ю.И.Миллер. *Укр. биохим. журн.*, **62** (1990) 29—33
- [54] <http://www.luxeon.com>
- [55] <http://www.nichia.com>
- [56] Г.Р.Мостовникова, К.У.Вильчук, А.Б.Рябцев, А.В.Мостовников, И.А.Леусенко, В.В.Гиневич, В.А.Мостовников, В.Ю.Плавский, Т.В.Гнедько, Л.А.Матальцкая, О.Н.Гриценко. *Материалы междунар. конф. “Лазерная физика и оптические технологии”*, 25—29 сентября 2006 г., Гродно, Гродн. гос. ун-т, **2** (2006) 355—358
- [57] D.S.Seidman, J.Moise, Z.Ergaz, A.Laor, H.J.Vreman, D.K.Stevenson, R.Gale. *J. Perinatol.*, **23** (2003) 123—127
- [58] M.J.Maisels, E.A.Kring, J.DeRidder. *J. Perinatol.*, **27** (2007) 565—567