

УДК 577.344

*О. А. КОЗЛЕНКОВА, Л. Г. ПЛАВСКАЯ, А. В. МИКУЛИЧ, И. А. ЛЕУСЕНКО,
А. И. ТРЕТЬЯКОВА, В. Ю. ПЛАВСКИЙ*

ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ БИЛИРУБИНА НА КЛЕТКИ ЖИВОТНЫХ В КУЛЬТУРЕ

*Институт физики им. Б. И. Степанова Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь,
e-mail: olga.kozlenkova@gmail.com, v.plavskii@ifanbel.bas-net.by*

Исследования, выполненные в настоящей работе, показали, что воздействие излучения светодиодных источников с максимумом полосы излучения около 465 нм, соответствующего спектру поглощения билирубина, способно оказывать повреждающее действие на клетки животных в культуре, находящиеся в логарифмической стадии роста, предварительно инкубированные с билирубином. Фотобиологический эффект обусловлен фотодинамическими процессами с участием синглетного кислорода, генерируемого триплетно возбужденным сенсibilизатором. Вид зависимости выживаемости клеток от энергетической дозы указывает на то, что сенсibilизатором выступает билирубин, а не его фотопродукты.

Ключевые слова: гипербилирубинемия, билирубин, фотосенсibilизатор, жизнеспособность клеток, МТТ-тест, фототерапия, синглетный кислород.

*O. A. KOZLENKOVA, L. G. PLAVSKAYA, A. V. MIKULICH, I. A. LEUSENKO,
A. I. TRETYAKOVA, V. Yu. PLAVSKII*

PHOTOSENSITIZING EFFECTS OF BILIRUBIN ON ANIMAL CELLS IN CULTURE

*B. I. Stepanov Institute of Physics of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus,
e-mail: olga.kozlenkova@gmail.com, v.plavskii@ifanbel.bas-net.by*

The studies performed in this work have shown that the radiation exposure to LED sources with an emission band maximum of about 465 nm corresponding to the absorption spectrum of bilirubin is able to cause damaging effects on animal cells in culture, being in a logarithmic growth stage, that have been pre-incubated with bilirubin. The photobiological effect is caused by photo dynamic processes with participation of singlet oxygen generated by a triplet-excited sensitizer. The type of cell survival depending on an energy dose indicates that the sensitizer serves as bilirubin but not its photoproducts.

Keywords: hyperbilirubinemia, bilirubin, photosensitizer, cell viability, MTT-test, phototherapy, singlet oxygen.

Введение. Способность билирубина оказывать сенсibilизирующее действие на биологические системы различного уровня структурной организации является предметом многочисленных исследований [1–7] в связи с широким использованием фототерапии для лечения гипербилирубинемии новорожденных детей. Как известно, синдром гипербилирубинемии (желтухи) обусловлен избыточным накоплением в крови, а также в подкожном жировом слое ребенка желчного пигмента (продукта обмена гемоглобина) – билирубина, придающего коже характерный золотисто-желтый цвет. Одним из наиболее распространенных и эффективных способов лечения гипербилирубинемии является фототерапия, которая заключается в тотальном воздействии на поверхность тела ребенка светом плотностью мощности $P = 0,5–5,0$ мВт/см², спектральный состав которого соответствует длинноволновой полосе поглощения билирубина ($\lambda = 400–530$ нм) [7–11]. Считается [7–11], что определяющую роль в снижении уровня билирубина в организме новорожденных под действием света играют процессы фотоизомеризации пигмента – образование его конфигурационных и структурных изомеров, которые являются более гидрофильными соединениями, чем нативный билирубин, и быстрее выводятся из организма. Помимо процессов фотоизомеризации определенный вклад в снижение уровня билирубина вносят реакции

самосенсибилизированного фотолиза билирубина, протекающего с участием синглетного кислорода [12]. При этом нельзя исключать, что синглетный кислород, генерируемый триплетно возбужденным билирубином, не будет вызывать фотодинамические повреждения других жизненно важных молекулярных структур и органелл клетки. Имеются также сведения, что кроме билирубина фотосенсибилизирующими свойствами обладает продукт его структурной фотоизомеризации – люмирубин [2, 3]. Это указывает на необходимость исследования сенсибилизирующего действия билирубина и его фотопродуктов на важнейшие биологические структуры с целью выработки мер, направленных на снижение возможных побочных эффектов действия света при проведении фототерапии. В последние годы актуальность данной проблемы еще более усилилась в связи с применением для терапии гипербилирубинемии новорожденных новых источников излучения на основе сверхъярких светодиодов, позволяющих варьировать в широком диапазоне как интенсивность, так и длину волны воздействующего излучения в пределах полосы поглощения пигмента [7–11].

Цель настоящей работы – исследование фотосенсибилизирующего действия билирубина и его фотопродуктов на клетки животных в культуре.

Материалы и методы исследований. В качестве объекта исследования выбраны клетки почки зеленой африканской мартышки BGM. Клетки выращивали в одноразовых чашках Петри на питательной среде MEM (minimal essential medium) с 10 % сыворотки крупного рогатого скота при 37° С и 5%-м содержанием CO₂ в инкубаторе. В каждую чашку вносили по 3 мл ростовой среды с клетками. Посевная доза клеток составляла 130 000 мл⁻¹.

Использовали билирубин производства «Fluka» (Германия) без дополнительной очистки. По данным изготовителя, содержание основного вещества в препарате было не ниже 98,5 %. Раствор билирубина готовили по стандартной методике: 2,5 мг билирубина предварительно растворяли в 200 мкл 0,1 N NaOH (из-за его низкой растворимости в воде при физиологических значениях pH), а затем добавляли 1800 мкл бидистиллированной H₂O.

В качестве источника излучения использовали фототерапевтический аппарат «Ромашка» на базе светодиодного источника с длиной волны в максимуме полосы испускания при $\lambda_{исп} = 465$ нм, с регулируемой в диапазоне 5–20 мВт/см² плотностью мощности. Время облучения – 1–20 мин. Облучение монослоя клеток проводилось снизу, через дно чашек Петри. В эксперименте использовали культуру клеток в экспоненциальной стадии роста. На вторые сутки после посева в часть чашек Петри добавляли раствор билирубина в конечной концентрации 40 мкМ, инкубировали 2 ч при 37 °С в CO₂-инкубаторе, а затем облучали светодиодным источником. Для выяснения участия синглетного кислорода в механизме сенсибилизированного билирубином повреждения клеток в часть чашек перед облучением вносили тушитель синглетного кислорода азид натрия производства «Sigma-Aldrich» в концентрации 5·10⁻³ М. После облучения клетки инкубировали в термостате в течение 5 ч при 37 °С. В термостате обеспечивалось 5%-е содержание CO₂. Аналогичные манипуляции (за исключением облучения) выполняли с контрольными клетками. Оценку биологического действия оптического излучения проводили фотокolorиметрически с помощью МТТ-теста [13]. Данный тест основан на способности дегидрогеназ живых метаболически активных клеток превращать бледно-желтый водорастворимый 3-(4,5-диметилтиазол-2-ол)-2,5-дифенилтетразолий бромид в голубые кристаллы формазана (МТТ-ф), нерастворимые в воде. Нежизнеспособные мертвые клетки такой способностью не обладают. Использовали 3-(4,5-диметилтиазол-2-ол)-2,5-дифенил-2Н-тетразолий бромид (МТТ) производства «Applichem» (Германия). Раствор МТТ готовили по стандартной методике: 5 мг МТТ растворяли в 1 мл H₂O (концентрированный раствор). Спустя 5 ч инкубации клеток после облучения ростовую среду сливали и заливали новую (без сыворотки), содержащую 100 мкл концентрированного МТТ на 1 мл среды. С новой средой клетки инкубировали в течение 3 ч при 37 °С и 5%-м содержанием CO₂ в инкубаторе. После 3 ч инкубации, удаляли супернатант и оставляли монослой клеток в чашках Петри на ночь для высыхания. В каждую чашку Петри добавляли 1 мл диметилсульфоксида (ДМСО) и инкубировали 30 мин при комнатной температуре. Анализ выживаемости клеток проводили на длине волны $\lambda = 570$ нм. Жизнеспособность клеток после воздействия света характеризовали параметром $\gamma = (D_0/D_K) \cdot 100$ %, где D_0 и D_K – оптическая плот-

ность раствора формазана из опытных и контрольных чашек Петри соответственно. Каждая экспериментальная точка на графике зависимости γ от времени воздействия t является средним значением не менее пяти повторностей.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием стандартного отклонения по генеральной совокупности.

Спектрофотометрические измерения выполняли на автоматизированном спектрофотометре Specord M 40 UV VIS («Jena», Германия), используя кюветы с базой 10 мм.

Результаты исследований и их обсуждение. Спектр испускания светодиодного источника (кривая 1), используемого для воздействия на клетки, и спектр поглощения билирубина в составе комплекса с сывороточным альбумином человека (кривая 2) представлены на рис. 1, а. Видно, что максимум спектра испускания светодиода ($\lambda_{\text{исп}} = 465$ нм) практически соответствует максимуму поглощения билирубина, связанного с альбумином ($\lambda_{\text{погл}} = 460$ нм). Следовательно, излучение светодиодного источника обеспечивает эффективное возбуждение билирубина.

Спектр поглощения питательной среды МЕМ с 10 % сыворотки крупного рогатого скота, используемой для выращивания клеток в отсутствие билирубина, показан на рис. 1, б (кривая 3). Как видно, спектр поглощения среды характеризуется выраженными максимумами в области $\lambda_{\text{погл}} = 411$ и 560 нм, а также «плечом» в области 445 нм. По всей видимости, максимум в области $\lambda_{\text{погл}} = 411$ нм и «плечо» на его длинноволновом склоне обусловлены присутствием в сыворотке крупного рогатого скота оксигемоглобина и дезоксигемоглобина соответственно в результате частичного гемолиза эритроцитов при получении сыворотки. Что касается максимума при $\lambda_{\text{погл}} = 560$ нм, то его происхождение связано главным образом с присутствием в питательной среде индикаторного красителя фенолового красного, используемого для визуального контроля

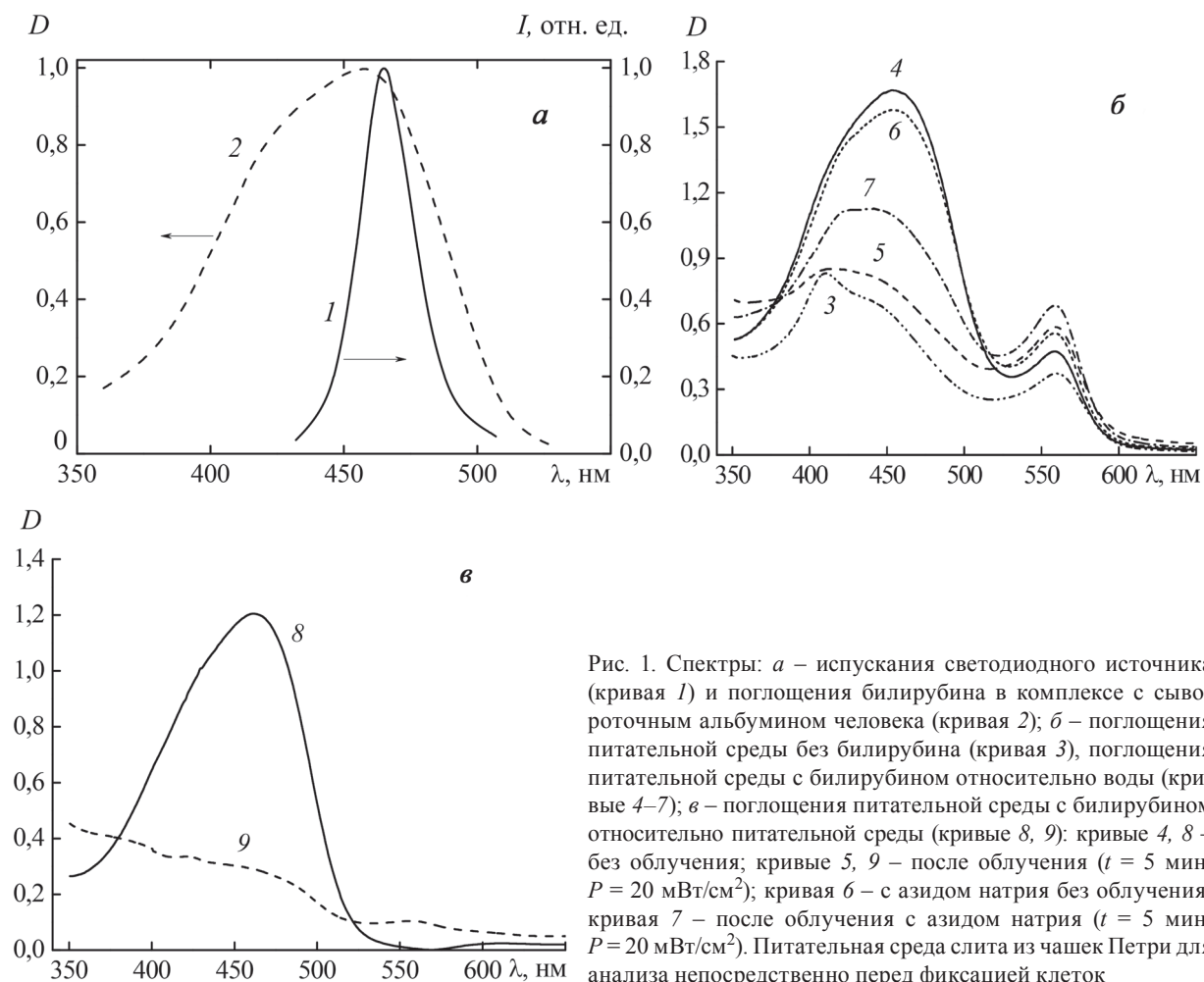


Рис. 1. Спектры: а – испускания светодиодного источника (кривая 1) и поглощения билирубина в комплексе с сывороточным альбумином человека (кривая 2); б – поглощения питательной среды без билирубина (кривая 3), поглощения питательной среды с билирубином относительно воды (кривые 4–7); в – поглощения питательной среды с билирубином относительно питательной среды (кривые 8, 9); кривые 4, 8 – без облучения; кривые 5, 9 – после облучения ($t = 5$ мин, $P = 20$ мВт/см²); кривая 6 – с азидом натрия без облучения; кривая 7 – после облучения с азидом натрия ($t = 5$ мин, $P = 20$ мВт/см²). Питательная среда слита из чашек Петри для анализа непосредственно перед фиксацией клеток

pH среды при культивировании клеток. Определенный вклад в поглощение в данной области спектра могут вносить и гемоглибиновые компоненты за счет Q-полос поглощения оксигемоглибина (с максимумами при $\lambda_{\text{max}} = 542$ и 578 нм) и дезоксигемоглибина (с максимумом при $\lambda_{\text{max}} = 554$ нм).

При внесении в питательную среду 40 мкМ билирубина (в конечной концентрации) в спектре поглощения доминирующими являются полоса с максимумом в области $\lambda_{\text{погл}} = 454$ нм (см. рис. 1, б, кривая 4), обусловленная указанным пигментом, и полоса с максимумом при $\lambda_{\text{погл}} = 560$ нм, сформированная главным образом за счет фенолового красного.

Поскольку токсичность билирубина в отношении клеток в культуре в основном определяется концентрацией неконъюгированного пигмента [14, 15], представляло интерес выяснить форму билирубина в питательной среде. Исследования показали, что в используемой среде билирубин находится в связанном состоянии, по всей видимости, в составе комплексов с белковыми молекулами (альбуминами, характеризующимися наиболее высоким сродством к билирубину [16, 17]). Как известно [16, 17], максимум в спектре поглощения свободной формы билирубина в воде при нейтральных значениях pH находится в области 440 нм, а в составе комплекса с сывороточными альбуминами – в области 460–462 нм. На первый взгляд, казалось бы, что положение максимума в области $\lambda_{\text{погл}} = 454$ нм (см. рис. 1, б, кривая 4) в спектре поглощения билирубинсодержащей питательной среды свидетельствует о том, что значительная часть молекул билирубина находится в свободном состоянии (вне комплексов с белковыми молекулами среды). Однако при записи дифференциального спектра поглощения билирубина в питательной среде относительно питательной среды (см. рис. 1, в, кривая 8) четко видно, что максимум в спектре поглощения билирубина соответствует его связанной форме ($\lambda_{\text{погл}} = 462$ нм). Поэтому следует отметить, что коротковолновое положение максимума в области $\lambda_{\text{погл}} = 454$ нм (см. рис. 1, б, кривая 4) обусловлено вкладом как билирубина, так и гемоглибина в формируемый суммарный спектр. Причем гемоглибиновые компоненты характеризуются более коротковолновым положением максимумов (полос Соре).

Из рис. 1, б (кривая 4) видно также, что оптическая плотность билирубинсодержащей питательной среды в 10-миллиметровой кювете имеет достаточно высокое значение ($D \approx 1,6$) на длине волны 465 нм, соответствующей максимуму спектра испускания светодиодного источника. Однако, поскольку облучение монослоя клеток производили снизу, через дно чашки Петри, это исключало возможность экранирования излучения, воздействующего на клетки, компонентами питательной среды. Отметим также, что феноловый красный характеризуется очень слабым поглощением в диапазоне спектра испускания светодиодного источника ($\lambda_{\text{исп}} = 465$ нм), используемого для воздействия на клетки.

Зависимость процента жизнеспособных клеток от времени воздействия излучения светодиодного источника ($\lambda_{\text{исп}} = 465$ нм) плотностью мощности $P = 20$ мВт/см² на культуру клеток в отсутствие билирубина (кривая 1) и после ее сенсibilизации билирубином в концентрации 40 мкМ (кривая 2) представлена на рис. 2, из которого следует, что воздействие оптического излучения

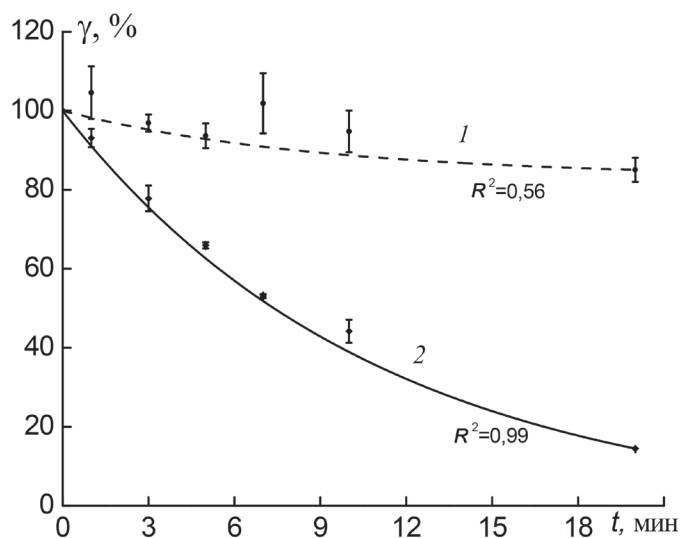


Рис. 2. Зависимость процента жизнеспособных клеток от времени воздействия излучения светодиодного источника с максимумом в спектре испускания при $\lambda_{\text{исп}} = 465$ нм, плотностью мощности $P = 20$ мВт/см² на клетки в отсутствие билирубина (кривая 1) и после их сенсibilизации билирубином в концентрации 40 мкМ (кривая 2)

на клетки в отсутствие билирубина в течение 1, 3, 5, 7, 10 мин практически не сказывается на их жизнеспособности (кривая 1). И только при максимальной использованной энергетической дозе $E = 24 \text{ Дж/см}^2$ ($t = 20$ мин) наблюдается снижение процента жизнеспособных клеток: $\gamma = (85,1 \pm 3,0) \%$.

Фотобиологический эффект значительно усиливается при сенсбилизации клеток билирубином (см. рис. 2, кривая 2). Для сравнения укажем, что при сенсбилизации клеток билирубином и энергетической дозе оптического излучения $E = 24 \text{ Дж/см}^2$ ($t = 20$ мин) $\gamma = (14,5 \pm 0,1) \%$. Характерно, что дозовая кривая в этом случае хорошо описывается ($R^2 = 0,99$) моноэкспоненциальной функцией. Это свидетельствует о том, что скорость фотосенсибилизированной деструкции клеток, оцениваемой по снижению их жизнеспособности, остается постоянной во всем исследуемом диапазоне дозовых нагрузок. Существенно также, что внесение в питательную среду 40 мкМ билирубина (в конечной концентрации) и последующая 2-часовая темновая инкубация клеток с сенсбилизатором практически не сказываются на жизнеспособности клеток. То есть регистрируемый эффект снижения жизнеспособности клеток при совместном действии света и билирубина (см. рис. 2, кривая 2) носит фотохимическую природу. По всей видимости, вклад фототермических процессов в сенсбилизированное билирубином снижение жизнеспособности клеток в выбранном интервале плотностей мощности (не более 20 мВт/см²) незначителен. На это указывают данные, представленные в таблице. Отсюда следует, что в условиях равенства энергетической дозы четырехкратное снижение плотности мощности воздействующего излучения (с 20 до 5 мВт/см²) при соответствующем четырехкратном увеличении времени воздействия (с 5 до 20 мин) практически не приводит к снижению фотобиологического эффекта. В то же время в случае заметного вклада фототермических реакций в фотодеструкцию клеток следовало бы ожидать более выраженного эффекта при воздействии излучения с большей плотностью мощности.

Следует отметить, что экспоненциальный характер дозовой зависимости при сенсбилизации клеток билирубином (см. рис. 2, кривая 2), свидетельствующий о неизменной скорости снижения жизнеспособности клеток в процессе их облучения, предполагает, как правило, и постоянство эффективной концентрации фотосенсибилизатора, ответственного за реализацию фотодинамического действия. В случае снижения концентрации сенсбилизатора из-за его фотодеструкции в процессе облучения угол наклона дозовой кривой к оси ординат должен увеличиваться, а при появлении в облучаемой системе фотопродуктов, характеризующихся более высокой эффективностью фотодинамического действия, – должен уменьшаться.

Влияние азид натрия на фотосенсибилизированное билирубином повреждение клеток в условиях постоянства энергетической дозы светового воздействия ($\lambda_{\text{исп}} = 465 \text{ нм}$) при варьировании времени и плотности мощности воздействующего излучения

Контролируемые параметры	Контрольная группа	Опытные группы		
		20	10	5
Плотность мощности воздействующего излучения, мВт/см ²	0	20	10	5
Время облучения, мин	0	5	10	20
Энергетическая доза, Дж/см ²	0	6	6	6
Процент жизнеспособных клеток, проинкубированных 2 ч с 40 мкМ билирубина, %	100,0 ± 7,5	45,5 ± 1,6	50,0 ± 6,4	48,7 ± 12,5
Процент жизнеспособных клеток, проинкубированных 2 ч с 40 мкМ билирубина и 5 мМ азид натрия, %	100,0 ± 13,5	97,9 ± 5,7	91,2 ± 10,4	90,2 ± 1,0

Как уже отмечалось ранее, один из продуктов структурной фотоизомеризации билирубина – люмирубин – способен оказывать более выраженное фотосенсибилизирующее действие [2] за счет более эффективной генерации синглетного кислорода [3]. С другой стороны, хорошо известно, что для билирубина в растворе, а также для его комплексов с белками при комнатной температуре характерна очень низкая фотохимическая стабильность [2, 17], что должно приводить к снижению концентрации фотосенсибилизатора в процессе облучения.

Действительно, из данных, представленных на рис. 1, б (кривые 4 и 5), видно, что при воздействии на клетки уже в течение 5 мин излучением с $\lambda_{\text{исп}} = 465 \text{ нм}$, плотностью мощности

$P = 20$ мВт/см² наблюдается значительное обесцвечивание питательной среды. Как следует из дифференциальных спектров, представленных на рис. 1, в (кривые 8 и 9), обесцвечивание среды при воздействии излучения с $\lambda_{исп} = 465$ нм происходит за счет деструкции билирубина. Более того, уже через 5 мин облучения полоса поглощения, характерная для билирубина, на фоне его фотопродуктов практически не регистрируется (рис. 1, в, кривая 9). Это свидетельствует о том, что через 5 мин после облучения концентрация интактного *Z,Z*-билирубина в растворе существенно уменьшилась. Имеются основания полагать, что в облученном растворе и концентрация конфигурационных стереоизомеров билирубина (*Z,E*-, *E,Z*-, *E,E*-билирубина) также незначительна, поскольку значения коэффициентов молярных экстинкций для указанных изомеров в области 460 нм очень близки к таковому для *Z,Z*-билирубина [2]. Существенно ниже (примерно в 2,0–2,7 раза) коэффициент молярной экстинкции для структурных фотоизомеров билирубина (*Z*- и *E*-люмирубина) [2]. По этой причине, а также учитывая необратимость процесса структурной фотоизомеризации (в отличие от конфигурационной), можно ожидать, что после 5 мин облучения среди изомеров билирубина наиболее значительный вклад в поглощение в видимой области спектра вносит люмирубин. Что касается продуктов фотоокисления билирубина на основе моно- и дипиррольных фрагментов, то они являются бесцветными и практически не поглощают излучение в диапазоне спектра испускаемого светодиодного источника. Известно также, что при облучении билирубина в результате окисления метиленового мостика в следовых количествах образуется и биливердин, характеризующийся протяженной полосой поглощения с максимумами около 375 и 660 нм [2]. Однако в отличие от люмирубина биливердин практически не обладает фотосенсибилизирующим действием.

Выполненные исследования показали (см. рис. 1, б), что фотообесцвечивание билирубина в питательной среде осуществляется с участием синглетного кислорода, поскольку отношение оптических плотностей облученных ($D_{обл}$) и контрольных ($D_{к}$) растворов в присутствии тушителя синглетного кислорода азид натрия ($D_{обл}/D_{к} = 0,69$; см. рис. 1, б, кривые 6 и 7) значительно выше, чем для таких же растворов в отсутствие азид ($D_{обл}/D_{к} = 0,46$; см. рис. 1, б, кривые 4 и 5). Таким образом, азид натрия несколько снижает скорость фотолиза билирубина в питательной среде. При этом, по всей видимости, азид натрия не влияет на скорость фотоизомеризации пигмента. Отметим также, что указанный тушитель синглетного кислорода резко уменьшает и степень фотоповреждения клеток при их сенсибилизации билирубином. На это указывают данные МТТ-теста, приведенные в таблице. Видно, что при облучении клеток ($P = 20$ мВт/см², $t = 5$ мин), сенсибилизированных билирубином, фракция жизнеспособных клеток в отсутствие других добавок составляет (по отношению к контролю) $\gamma = (45,5 \pm 1,6)$ %. При таком же облучении клеток в присутствии 5 мМ азид натрия фракция жизнеспособных клеток значительно увеличивается и составляет $\gamma = (97,9 \pm 5,7)$ %. Таким образом, в отличие от фотолиза билирубина в питательной среде, азид натрия фактически блокирует разрушение клеток при их сенсибилизации билирубином. Данный факт является свидетельством определяющей роли синглетного кислорода в механизме сенсибилизированной билирубином фотодеструкции клеток. Действительно, выполненные ранее исследования показали [18], что триплетно-возбужденный билирубин способен генерировать синглетный кислород, хотя и с невысоким квантовым выходом ($\gamma_{\Delta} = 0,02$).

Итак, резюмируя сказанное, можно заключить, что, несмотря на значительную степень фотодеструкции билирубина в питательной среде уже через 5 мин облучения, кинетика снижения жизнеспособности клеток описывается экспоненциальной зависимостью даже при семикратном снижении (по сравнению с контролем, $\gamma = 100$ %) количества жизнеспособных клеток (при $t = 20$ мин $\gamma = (14,5 \pm 0,1)$ %).

Заключение. Результаты, полученные в настоящей работе, показывают, что воздействие на клетки животных с повышенным уровнем содержания билирубина излучения, соответствующего его спектру поглощения, способно инициировать их гибель. Эффект реализуется за счет фотодинамического действия с участием синглетного кислорода. Для дальнейшего развития технологий лечения гипербилирубинемии и снижения возможных побочных эффектов необходимо совместно со специалистами-медиками разработать подходы, направленные на снижение сенсибилизирующего действия билирубина при проведении фототерапии.

Список использованной литературы

1. The side effects of phototherapy for neonatal jaundice: what do we know? What should we do? / T. Xiong [et al.] // *Eur J. Pediatr.* – 2011. – Vol. 170. – P. 1247–1255.
2. Сенсибилизирующее действие *Z,Z*-билирубина IX α и его фотопродуктов на ферменты в модельных растворах / В. Ю. Плавский [и др.] // *Журн. прикладной спектроскопии.* – 2008. – Т. 75, № 3. – С. 383–394.
3. Bilirubin phototoxicity to human cells by green light phototherapy in vitro / F. Böhm [et al.] // *Photochem. Photobiol.* – 1995. – Vol. 62, N 6. – P. 980–983.
4. Long-term hazards of neonatal blue-light phototherapy / J. Oláh [et al.] // *Brit J. Dermatol.* – 2013. – Vol. 169, N 2. – P. 243–249.
5. Apoptosis in the small intestine of neonatal rat using blue light-emitting diode devices and conventional halogen-quartz devices in phototherapy / K. Tanaka [et al.] // *Pediatr Surg Int.* – 2008. – Vol. 24. – P. 837–842.
6. Effect of phototherapy on blood endothelin and nitric oxide levels: clinical significance in preterm infants / G. S. Liu [et al.] // *World J. Pediatr.* – 2008. – Vol. 4. – P. 31–35.
7. *Plavskii, V. Yu.* Bilirubin: Chemistry, Regulation and Disorder // V. Yu Plavskii; ed. J. F. Novotny, F. Sedlacek. – New York: Nova Science Publishers Inc., 2012. – P. 1–65.
8. *Maisels, M. J.* Phototherapy for neonatal jaundice / M. J. Maisels, A. F. McDonagh // *N. Engl. J. Med.* – 2008. – Vol. 358, N 9. – P. 920–928.
9. *Stokowski, L. A.* Fundamentals of phototherapy for neonatal jaundice / L. A. Stokowski // *Adv. Neonatal Care.* – 2006. – N 6. – P. 303–312.
10. *Плавский, В. Ю.* Фототерапевтические системы для лечения гипербилирубинемии новорожденных детей / В. Ю. Плавский, А. И. Третьякова, Г. Р. Мостовникова // *Опт. журн.* – 2014. – Т. 81, № 6. – С. 51–62.
11. Пути повышения эффективности фототерапевтических технологий лечения гипербилирубинемии новорожденных в свете современных представлений о биофизических механизмах фотоконверсии билирубина / В. Ю. Плавский [и др.] // *Инновационные технологии в медицине.* – 2014. – Т. 2, № 1. – С. 84–98.
12. *Landen, G. L.* On the role of singlet oxygen in the self-sensitized photo-oxygenation of bilirubin and its pyromethenone models / G. L. Landen, Y. T. Park, D. A. Lightner // *Tetrahedron.* – 1983. – Vol. 39, N 11. – P. 1893–1907.
13. *Mosmann, T.* Rapid colorimetric assay for cellular growth and survivals: application to proliferation and cytotoxicity assay / T. Mosmann // *J. Immunol Methods.* – 1983. – Vol. 65. – P. 55–63.
14. Cytotoxicity of bilirubin for human fibroblasts and rat astrocytes in culture: effect of the ratio of bilirubin to serum albumin / L. Chuniaud [et al.] // *Clin. Chim. Acta.* – 1996. – Vol. 256 – P. 103–114.
15. *Brito, M. A.* Bilirubin toxicity to human erythrocytes: A review / M. A. Brito, R. F. M. Silva, D. Brites // *Clin. Chim. Acta.* – 2006. – Vol. 374. – P. 46–56.
16. Спектрально-флуоресцентные и поляризационные характеристики *Z,Z*-билирубина IX α / В. Ю. Плавский [и др.] // *Журн. прикладной спектроскопии.* – 2007. – Т. 74, № 1. – С. 108–118.
17. *Мышкин, А. Е.* Фотохимия билирубина. Успехи химии / А. Е. Мышкин, В. Н. Сахаров. – 1982. – Т. 51, № 1. – С. 72–91.
18. Phosphorescence of bilirubin and efficiency of bilirubin-sensitized generation of singlet oxygen / V. Yu. Plavskii [et al.] // 37th Meeting of the American Society for Photobiology, San Diego, California, June 14–19, 2014. Program and Abstract. – [S. l.], 2014 – P. 82.

Поступила в редакцию 11.02.2016