

НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ПОВЫШЕНИЮ ЭФФЕКТИВНОСТИ И СНИЖЕНИЮ ПОБОЧНЫХ ПРОЯВЛЕНИЙ ФОТОТЕРАПИИ ГИПЕРБИЛИРУБИНЕМИИ НОВОРОЖДЕННЫХ ДЕТЕЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СВЕТОДИОДНЫХ И ЛАЗЕРНЫХ ИСТОЧНИКОВ

В.Ю. Плавский

канд. физ.-мат. наук, заместитель директора по научной и инновационной работе, научный руководитель центра центр «Лазерно-оптические технологии для медицины и биологии»
Институт физики НАН Беларуси
пр. Независимости, 68, г. Минск, 220072, Беларусь
тел.: +375 (17) 284-09-58
e-mail: v.plavskii@ifanbel.bas-net.by
ORCID 0000-0002-7434-4530

Т.С. Ананич

младший научный сотрудник
центр «Лазерно-оптические технологии для медицины и биологии»
Институт физики НАН Беларуси
пр. Независимости, 68, г. Минск, 220072, Беларусь
тел.: +375 (17) 284-04-38
e-mail: karskaja@gmail.com
ORCID 0000-0002-8329-1354

А.В. Микулич

заместитель заведующего центром
центр «Лазерно-оптические технологии для медицины и биологии»
Институт физики НАН Беларуси
пр. Независимости, 68, г. Минск, 220072, Беларусь
тел.: +375 (17) 284-19-91
e-mail: a.mikulich@ifanbel.bas-net.by
ORCID 0000-0002-1159-3580

А.И. Третьякова

научный сотрудник
центр «Лазерно-оптические технологии для медицины и биологии»
Институт физики НАН Беларуси
пр. Независимости, 68, г. Минск, 220072, Беларусь
тел.: +375 (17) 284-04-38
e-mail: tret2007@tut.by
ORCID 0000-0002-8454-216X

П.А. Мазманян

д-р мед. наук, проф., заведующий кафедрой, главный неонатолог МЗ РА
кафедра неонатологии
Ереванский государственный медицинский университет имени Мхитара Гераци
ул. Корюна 2, г. Ереван, 0025, Армения
тел.: +374 (91) 41-65-89
e-mail: pavelart@gmail.com
ORCID 0000-0002-8230-6534

Г.Г. Маргарян

врач
детская университетская клиника «Мурацан»
ул. Мурацани, 114, г. Ереван, 0075, Армения
тел.: +374 (91) 41-65-89
e-mail: pavelart@gmail.com

Л.Г. Плавская

научный сотрудник
центр «Лазерно-оптические технологии для медицины и биологии»
Институт физики НАН Беларуси
пр. Независимости, 68, г. Минск, 220072, Беларусь
тел.: +375 (17) 284-04-38
e-mail: l.plavskaya@ifanbel.bas-net.by
ORCID 0000-0003-0917-5977

В.М. Катаркевич

канд. физ.-мат. наук, ведущий научный сотрудник
центр «Лазерно-оптические технологии для медицины и биологии»
Институт физики НАН Беларуси
пр. Независимости, 68, г. Минск, 220072, Беларусь
тел.: +375 (17) 284-23-49
e-mail: v.katarkevich@ifanbel.bas-net.by
ORCID 0000-0001-5740-1225

И.А. Леусенко

научный сотрудник
центр «Лазерно-оптические технологии для медицины и биологии»
Институт физики НАН Беларуси
пр. Независимости, 68, г. Минск, 220072, Беларусь
тел.: +375 (17) 284-19-91
e-mail: i.leusenko@dragon.bas-net.by
ORCID 0000-0002-7787-7439

О.Н. Дудинова

младший научный сотрудник
центр «Лазерно-оптические технологии для медицины и биологии»
Институт физики НАН Беларуси
пр. Независимости, 68, г. Минск, 220072, Беларусь
тел.: +375 (17) 284-04-38
e-mail: o.n.dudinova@gmail.com
ORCID 0000-0003-4251-503X

В.В. Керопян

врач
Научно-исследовательский центр охраны здоровья матери и ребенка (НИЦОЗМР)
пр. Маштоца, 22, г. Ереван, 0002, Армения
тел.: +374 (91) 41-65-89
e-mail: pavelart@gmail.com

Введение. Развитие синдрома гипербилирубинемии (желтухи) у новорожденных детей обусловлено избыточным накоплением в крови, а также в подкожном слое желчного пигмента — Z,Z-билирубина IX α , придающего коже характерный золотисто-желтый цвет. Основным и наиболее распространенным способом лечения неонатальной гипербилирубинемии является фототерапия. В последние 7–10 лет в новых разработках фототерапевтической аппаратуры для лечения гипербилирубинемии наблюдается активная замена ламповых источников света на светодиодные. Однако, как показывает анализ имеющейся на мировом рынке сертифицированной аппаратуры для фототерапии неонатальной гипербилирубинемии на основе светодиодных источников, у разработчиков фототерапевтических систем нет единого мнения об оптимальных спектральном диапазоне и интенсивности излучения для эффективного снижения уровня билирубина.

Целью настоящей работы является поиск путей повышения эффективности и снижения побочных проявлений светолечения гипербилирубинемии новорожденных.

Материалы и методы. В статье обсуждаются новые возможности совершенствования технологий фототерапии желтухи новорожденных детей при использовании светодиодных и лазерных источников для снижения уровня билирубина в крови младенцев. Показано, что для терапевтических целей могут применяться несколько типов светодиодов, спектр испускания которых соответствует длинноволновому склону полосы поглощения билирубина. При этом эффективность фототерапии зависит не только от положения максимума спектра испускания светодиодов в пределах полосы поглощения билирубина, но и от ширины спектра воздействующего излучения.

Результаты. На основании изучения закономерностей влияния оптического излучения на выживаемость клеток животных в культуре при их сенсibilизации билирубином сделан вывод, что повреждающее действие значительно снижаются при переходе от квазимонохроматических светодиодных источников к лазерам, излучающим в том же спектральном диапазоне.

Выводы. Современные полупроводниковые лазеры синей и сине-зеленой областей спектра в качестве перспективных источников для создания фототерапевтической аппаратуры для лечения гипербилирубинемии новорожденных.

Ключевые слова: гипербилирубинемия новорожденных, фототерапия, билирубин, люмирубин, фотоизомеризация, светодиоды, полупроводниковые лазеры.

NEW APPROACHES TO IMPROVE EFFICACY AND REDUCE SIDE EFFECTS OF PHOTOTHERAPY FOR NEONATAL HYPERBILIRUBINEMIA USING LED AND LASER SOURCES

V.Yu. Plavskii¹, L.G. Plavskaya¹, T.S. Ananich¹, V.M. Katarkevich¹, A.V. Mikulich¹, I.A. Leusenko¹, A.I. Tretiakova¹, O.N. Dudinova¹, P.A. Mazmanyanyan², V.V. Karapyan², G.G. Margaryan³

¹*Institute of Physics, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus;*

²*Yerevan State Medical University, Yerevan, Armenia;*

³*Children's University Clinic «Muratsan», Yerevan, Armenia*

Introduction. The development of hyperbilirubinemia syndrome (jaundice) in newborns is due to excessive accumulation in the blood, as well as in the subcutaneous layer of the bile pigment — Z,Z-bilirubin IX α , which gives the skin a characteristic golden yellow color. The main and most common treatment for neonatal hyperbilirubinemia is phototherapy. In the last 7–10 years, in the new development of phototherapeutic equipment for the treatment of hyperbilirubinemia, there has been an active replacement of tube light sources with LED ones. However, as analysis of the certified equipment for phototherapy of neonatal hyperbilirubinemia on the basis of LED sources available on the world market shows, the developers of phototherapeutic systems do not have a single opinion on the optimal spectral range and radiation intensity to effectively reduce bilirubin levels.

The aim of this work is to find ways to increase efficiency and reduce side effects of phototherapy of hyperbilirubinemia in newborns.

Materials and methods. The article discusses new opportunities for improving the phototherapy technology for jaundice in newborn babies using LED and laser sources to reduce the level of bilirubin in the blood of infants. It has been shown that for therapeutic purposes several types of LEDs can be used, the emission spectrum of which corresponds to the long-wavelength slope of the bilirubin absorption band. Moreover, the effectiveness of phototherapy depends not only on the position of the maximum emission spectrum of the LEDs within the bilirubin absorption band, but also on the width of the spectrum of the acting radiation.

Results. Based on a study of the patterns of the influence of optical radiation on the survival of animal cells in culture during their sensitization with bilirubin, it was concluded that the damaging effect is significantly reduced when switching from quasi-monochromatic LED sources to lasers emitting in the same spectral range.

Findings. Modern semiconductor lasers in the blue and blue-green spectral regions as promising sources for creating phototherapeutic equipment for the treatment of neonatal hyperbilirubinemia.

Key words: neonatal hyperbilirubinemia, phototherapy, bilirubin, lumirubin, photoisomerization, LEDs, semiconductor lasers.

НОВІ ПІДХОДИ ДО ПІДВИЩЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ І ЗНИЖЕННЯ ПОБІЧНИХ ПРОЯВІВ ФОТОТЕРАПІЇ ГІПЕРБІЛІРУБІНЕМІЇ НОВОНАРОДЖЕНИХ ДІТЕЙ З ВИКОРИСТАННЯМ СВІТЛОДІОДНИХ І ЛАЗЕРНИХ ДЖЕРЕЛ

В.Ю. Плавскій¹, Л.Г. Плавська¹, Т.С. Ананич¹, В.М. Катаркевіч¹, А.В. Микулич¹,
І.А.Леусенко¹, А.І. Третякова¹, О.Н. Дудінова¹, П.А. Мазманян², В.В. Карамян², Г.Г. Маргарян³

¹Інститут фізики НАН Білорусі, м. Мінськ, Білорусь;

²Єреванський державний медичний університет, м. Єреван, Вірменія;

³Дитяча університетська клініка «Мурацан», м. Єреван, Вірменія

Вступ. Розвиток синдрому гіпербілірубінемії (жовтяниці) у новонароджених дітей обумовлено надмірним накопиченням в крові, а також в підшкірному шарі жовчного пігменту — Z,Z-білірубину IX_a, що додає шкірі характерний золотисто-жовтий колір. Основним і найбільш поширеним способом лікування неонатальної гіпербілірубінемії є фототерапія. В останні 7–10 років в нових розробках фототерапевтичної апаратури для лікування гіпербілірубінемії спостерігається активна заміна лампових джерел світла на світлодіоди. Однак, як показує аналіз наявної на світовому ринку сертифікованої апаратури для фототерапії неонатальної гіпербілірубінемії на основі світлодіодних джерел, у розробників фототерапевтичної систем немає єдиної думки про оптимальні спектральному діапазоні і інтенсивності випромінювання для ефективного зниження рівня білірубину.

Метою цієї роботи є пошук шляхів підвищення ефективності і зниження побічних проявів світлолікування гіпербілірубінемії новонароджених.

Матеріали та методи. У статті обговорюються нові можливості вдосконалення технологій фототерапії жовтяниці новонароджених дітей при використанні світлодіодних і лазерних джерел для зниження рівня білірубину в крові немовлят. Показано, що для терапевтичних цілей можуть застосовуватися кілька типів світлодіодів, спектр випускання яких відповідає довгохвильовому схилу смуги поглинання білірубину. При цьому ефективність фототерапії залежить не тільки від положення максимуму спектра випускання світлодіодів в межах смуги поглинання білірубину, а й від ширини спектра діючого випромінювання.

Результати. На підставі вивчення закономірностей впливу оптичного випромінювання на живаність клітин тварин в культурі при їх сенсibilізації білірубіном зроблено висновок, що шкідлива дія значно знижується при переході від квазімонохроматичних світлодіодних джерел до лазерів, що випромінюють в тому ж спектральному діапазоні.

Висновки. Сучасні напівпровідникові лазери синьої і синьо-зеленої частини спектру в якості перспективних джерел для створення фототерапевтичної апаратури для лікування гіпербілірубінемії новонароджених.

Ключові слова: гіпербілірубінемія новонароджених, фототерапія, білірубін, люмірубін, фотоізомеризація, світлодіоди, напівпровідникові лазери.

Введение

Развитие синдрома гипербилирубинемии (желтухи) у новорожденных детей обусловлено избыточным накоплением в крови, а также в подкожном слое желчного пигмента — Z,Z-билирубина IX_a, придающего коже характерный золотисто-желтый цвет [1,2]. Основным и наиболее распространенным способом лечения неонатальной гипербилирубинемии является фототерапия [1,3], заключающаяся в воздействии на поверхность тела новорожденного светом синей или сине-зеленой областей спектра, соответствующих полосе поглощения билирубина, при плотности мощности 0.5–2.0 мВт/см². Считается [1–3], что определяющую роль в снижении уровня билирубина в организме новорожденных при проведении фототерапии играют процессы фотоиндуцированной изомеризации пигмента — образование его конфигурационных (Z,E-билирубин IX_a, E,Z-билирубин IX_a, E,E-билирубин IX_a) и структурных (Z- и E-люмирубин) изомеров. Указанные изо-

меры, и прежде всего люмирубин, будучи более гидрофильными соединениями, чем нативный Z,Z-билирубин IX_a, характеризуются меньшей токсичностью и повышенной скоростью экскреции.

В последние 7–10 лет в новых разработках фототерапевтической аппаратуры для лечения гипербилирубинемии наблюдается активная замена ламповых источников света на светодиодные. Их использование перспективно как с точки зрения повышения терапевтической эффективности метода, так и для снижения (устранения) побочных неблагоприятных эффектов, обусловленных присутствием в спектре излучения традиционных источников света интенсивной ультрафиолетовой или инфракрасной составляющих [4–8]. Современные светодиоды на основе InGaN характеризуются отсутствием ультрафиолетовой и инфракрасной компонент, высокими оптической мощностью в сине-зеленой области спектра и ресурсом работы. При этом спектр излучения светодиодов (в отличие от флуоресцентных ламп) остается неизменным на протяжении всего срока эксплуатации.

Существующие типы светодиодных источников позволяют осуществлять фототерапию, воздействуя излучением, соответствующим как максимуму спектра поглощения билирубина, так и его длинноволновому склону.

Однако, как показывает анализ имеющейся на мировом рынке сертифицированной аппаратуры для фототерапии неонатальной гипербилирубинемии на основе светодиодных источников, у разработчиков фототерапевтических систем нет единого мнения об оптимальных спектральном диапазоне и интенсивности излучения для эффективного снижения уровня билирубина. Более того, казалось бы, что переход от ламповых к светодиодным источникам должен исключить проявление побочных неблагоприятных эффектов, регистрируемых в ходе светолечения. Однако, выполненные недавно исследования [9–11] показали, что проведение фототерапии у новорожденных детей с предельно низкой массой тела (менее 750 г) усугубляет состояние младенца. Следовательно, и выяснение причин, определяющих наличие побочных эффектов при реализации фототерапевтических технологий, также весьма актуально.

В настоящей работе мы остановимся на нерешенных проблемах использования светодиодных источников для фототерапии гипербилирубинемии новорожденных, а также рассмотрим возможные подходы к повышению эффективности и снижению побочных проявлений светолечения.

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 %-ым содержанием CO₂ в инкубаторе. В каждую чашку вносили по 3 мл ростовой среды с клетками. Посевная доза клеток составляла 130000 мл⁻¹.

Использовали билирубин производства Fluka (Германия) без дополнительной очистки. По данным производителя содержание основного вещества в препарате 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 на базе светодиодных источников с длиной волны в максимуме полосы испускания $\lambda_{\max} = 465$ нм и $\lambda_{\max} = 520$ нм, с регулируемой в диапазоне 5–20 мВт/см² плотностью мощности [12], а также аргоновый лазер, перестраиваемый в спектральном диапазоне

457,9–514,5 нм. 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. Аналогичные манипуляции (за исключением облучения) проводили с контрольными клетками. Оценку биологического действия оптического излучения проводили фотоколориметрически с помощью МТТ-теста [13]. МТТ-тест основан на способности дегидрогеназ живых метаболически-активных клеток превращать бледно-желтый водорастворимый 3-(4,5-диметилтиозол-2-ол)-2,5-дифенилтетразолий бромид в голубые кристаллы формазана (МТТ-ф), не растворимые в воде. Нежизнеспособные мертвые клетки такой способностью не обладают. Использовали 3-(4,5-диметилтиозол-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 %-ым 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 $\gamma = (D_o/D_k)100$ %, где D_o — и D_k — оптическая плотность 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.

Выбор спектрального диапазона для фототерапии неонатальной гипербилирубинемии

Вопрос о спектральном диапазоне излучения, оптимальном для проведения фототерапии гипербилирубинемии новорожденных, в современной

литературе является весьма дискуссионным. Так, долгое время считалось, что наиболее эффективными источниками излучения для этих целей являются специальные синие флуоресцентные лампы, максимумы в спектре излучения которых соответствуют области максимума спектра поглощения билирубина, связанного с альбумином крови ($\lambda_{\max} = 460$ нм, рис. 1, кривая 1). Имеются, однако, и сообщения об использовании для фототерапии синдрома гипербилирубинемии «зеленых» ($\lambda_{\max} = 517$ нм) и «сине-зеленых» («бирюзовых», $\lambda_{\max} = 490$ нм) флуоресцентных ламп, максимумы спектров испускания которых приходятся на длинноволновый склон полосы поглощения билирубина. При этом разработка зеленых и бирюзовых ламп была связана со стремлением повысить эффективность фототерапии за счет снижения экранирования излучения, способного вызывать фотоконверсию билирубина в крови, другими молекулами (и прежде всего гемоглобином), имеющими выраженное поглощение в области экстинкции билирубина. Кроме экранирующего действия компонентов кожи, длинноволновому смещению спектрального диапазона излучения, оптимальному для фотоконверсии билирубина способствует и трехкратное увеличение квантового выхода образования люмирубина (φ_{lum}) с увеличением длины волны воздействующего излучения в пределах полосы поглощения тетрапиррола. Фотофизические механизмы, определяющие зависимость $\varphi_{lum} = f(\lambda)$, обусловлены бихромомным характером поглощения и испускания света билирубином и его изомерами [14].

Предпринятые различными авторами многочисленные попытки с использованием ламповых

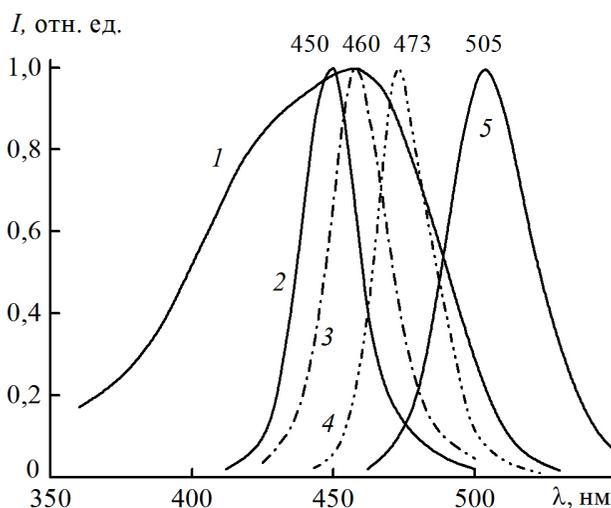


Рис. 1. Спектр поглощения билирубина в комплексе с альбумином человека (1) и нормированные спектры испускания светодиодов (2–5), перспективных для применения в фототерапевтических аппаратах для лечения желтухи новорожденных

источников выяснить оптимальный спектральный диапазон для эффективного снижения уровня билирубина не дали однозначного ответа. Главная проблема состояла в том, что спектр излучения некоторых ламповых источников лишь частично соответствовал спектру поглощения билирубина, а их мощность излучения в пределах полосы поглощения билирубина сильно различалась.

Следует отметить, что в литературе предпринимались неоднократные попытки построения так называемых спектров фототерапевтического действия (количественной зависимости ожидаемого терапевтического эффекта от длины волны воздействующего излучения), исходя из данных о спектральных характеристиках основных хромофоров крови в условиях *in vitro* и их концентрации *in vivo*, многослойной оптической модели кожи, теории переноса оптического излучения в рассеивающих средах и закономерностей фотоизомеризации билирубина. Основываясь на различных моделях моделированием процесса переноса излучения в литературе было показано, что для достижения максимальной эффективности фототерапии следует использовать свет из диапазона 472–480 нм, 480 нм, 480–510 нм, 484–496 нм, 490–510 нм. Таким образом, теоретические оценки также свидетельствуют, что для эффективной фототерапии желтухи новорожденных спектральный диапазон воздействующего излучения должен соответствовать не максимуму спектра поглощения билирубина, а его длинноволновому склону.

Появление светодиодных источников, позволяющих варьировать в широком диапазоне как спектральный диапазон излучения (за счет выбора соответствующих светодиодов, рис. 1, кривые 2–5), так и интенсивность светового потока, актуализировали проблему, не решенную с использованием флуоресцентных ламп. При этом принципиальное отличие светодиодных источников от ламповых — достаточно узкий спектр испускания: $\Delta\lambda = 15\text{--}25$ нм (для специальных синих флуоресцентных ламп $\Delta\lambda = 50\text{--}80$ нм). В этой связи следовало бы ожидать, что при выборе светодиодного источника с длиной волны, соответствующей оптимальному значению для фотоконверсии билирубина, терапевтический эффект будет значительно превышать таковой при использовании светодиодных источников с другими (не оптимальными) длинами волн в пределах полосы поглощения билирубина. Однако, клинические исследования, выполненные различными авторами с использованием светодиодных источников, не выявили ожидаемого 1.5-кратного увеличения эффективности фототерапии при переходе от излучателей с $\lambda_{\max} = 459$ нм к $\lambda_{\max} = 505$ нм или 497 нм (терапевтическое действие оказалось равнозначным).

Экранирующее действие молекул билирубина, локализованных в клетках ткани

По нашему мнению, одна из причин несоответствия расчетных спектров терапевтического действия клиническим данным, полученным с использованием светодиодных источников различных типов, состоит в способности билирубина, локализованного в клетках ткани, выступать в качестве селективного фильтра, экранирующего воздействующее излучение [15]. В пользу такого заключения свидетельствуют исследования, выполненные с клетками почки зеленой африканской мартовки BGM, предварительно инкубированными в питательной среде с повышенным уровнем D

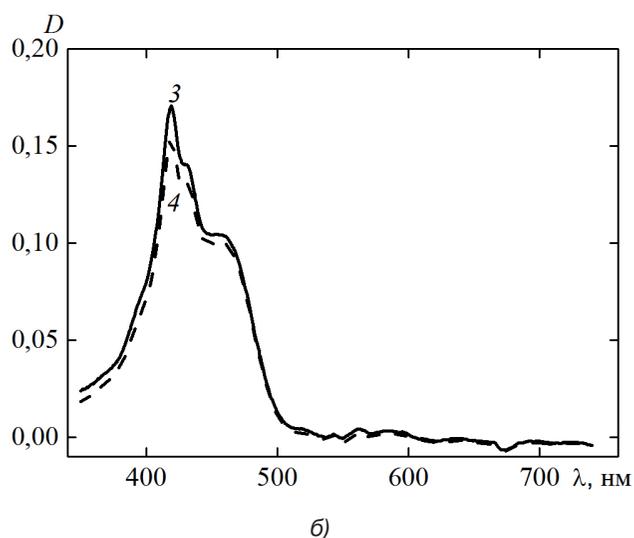
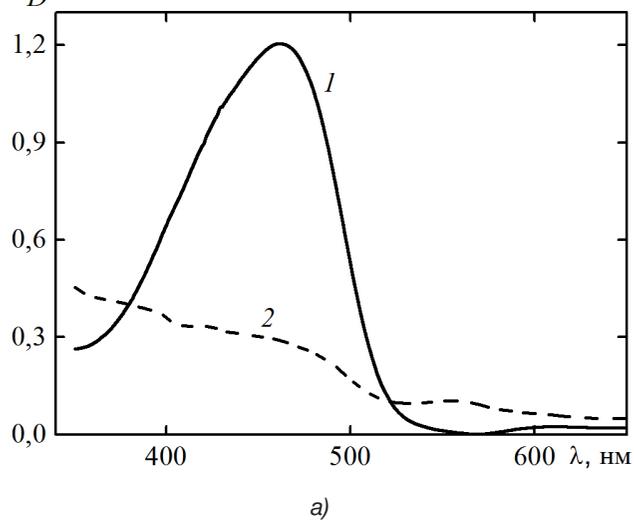


Рис. 2. Спектры поглощения билирубина в питательной среде (а) и в растворе ДМСО после экстракции из клеток почки зеленой африканской мартовки BGM (б) до (1, 3) и после (2, 4) воздействия излучения светодиодного источника с $\lambda_{\max} = 465$ нм, плотностью мощности $P = 20$ мВ/см² в течение $t = 5$ мин

билирубина. В указанных экспериментах клетки, выращенные на дне кюветы, подвергались воздействию излучения светодиодного источника с $\lambda_{\max} = 465$ нм с плотностью мощности $P = 20$ мВ/см² в течение $t = 5$ мин через дно кюветы. Излучение, проходя через клетки, попадало также на питательную среду, в которой билирубин находился преимущественно в комплексе с альбумином. Как следует из данных, представленных на рис. 2, излучение вышеуказанных параметров практически не вызывает разрушения билирубина в клетках, но полностью разрушает билирубин, связанный с альбумином питательной среды.

Таким образом, включение билирубина в клетки, где он преимущественно локализован в митохондриях, сопровождается многократным усилением его фотохимической устойчивости по сравнению с молекулами пигмента, связанными с альбумином. Среди возможных причин повышенной фотоустойчивости билирубина в клетках: а) образование наряду с мономерами димерных форм тетрапиррола; б) наличие близко расположенных антиоксидантов; в) замедленная диффузия кислорода, задействованного в реакциях самосенсибилизированного обесцвечивания пигмента; г) тушение возбужденного состояния билирубина другими биомолекулами.

Следовательно, билирубин, локализованный внутри животных клеток, характеризуется повышенной фотохимической стабильностью, что с одной стороны, позволяет рассматривать его в качестве селективного светофильтра, экранирующего излучение, потенциально способное вызывать изомеризацию указанного тетрапиррола, связанного с альбумином, а с другой стороны, повышенная фотоустойчивость билирубина в клетках может способствовать реализации его фотосенсибилизирующих свойств.

Фотосенсибилизированное билирубином и его фотопродуктами повреждение клеток животных в культуре

Проведенные исследования показали, что билирубин может оказывать сенсibiliзирующее действие на клетки (что проявляется в снижении их выживаемости) при возбуждении оптическим излучением с длиной волны $\lambda_{\max} = 465$ нм и $\lambda_{\max} = 520$ нм. При этом изменение плотности мощности излучения в 3–4 раза при соответствующей компенсации дозы за счет изменения времени облучения практически не сказывается на фотобиологическом действии. Внесение в культуру клеток совместно с сенсibilизатором тушителя синглетного кислорода — азида натрия — значительно снижает как повреждающее действие света в отношении клеток, так и степень обесцвечивания билирубина

в растворе. Следовательно, фотоинактивация клеток при их сенсibilизации билирубином носит фотохимическую (а не фототермическую) природу, и синглетный кислород играет определяющую роль в исследуемых процессах. В отсутствие билирубина, а также при инкубации клеток с билирубином ($C_{\text{БР}} = 40 \text{ мкМ}$) без светового воздействия эффект слабо выражен.

Зависимость выживаемости клеток от энергетической дозы при облучении клеток в присутствии билирубина светодиодами синей ($\lambda_{\text{max}} = 465 \text{ нм}$) или зеленой ($\lambda_{\text{max}} = 520 \text{ нм}$) областей спектра описывается моноэкспоненциальной функцией (рис. 3), свидетельствующей о постоянстве скорости фотоинактивации клеток в процессе их облучения. Такой вид дозовой зависимости обычно указывает на то, что сенсibilизатором выступает сам билирубин, а не его фотопродукты. Другая характерная особенность представленных кривых – практически идентичный фотобиологический эффект излучения $\lambda_{\text{max}} = 465 \text{ нм}$, соответствующего максимуму спектра поглощения билирубина в комплексе с альбумином, и излучения $\lambda_{\text{max}} = 520 \text{ нм}$, соответствующего длинноволновому склону указанного спектра. Одна из возможных причин близости биологических эффектов, инициируемых в клетках излучением с $\lambda_{\text{max}} = 465$ и 520 нм , состоит в том, что билирубин, локализованный в клетках, существенно отличается по абсорбционным характеристикам от пигмента, связанного с альбумином крови. В случае схожести спектров поглощения билирубина в клетках и питательной среде, следовало бы ожидать более высокой скорости фотоповреждения клеток при воздействии излучения с $\lambda_{\text{max}} = 465 \text{ нм}$, соответствующего максимуму спектра поглощения пигмента. По нашему мнению, нельзя также исключить наличия нескольких отличающихся мест локализации билирубина в клетке, что может приводить к гетерогенности спектральных характеристик пигмента.

Однако идентичности повреждающего действия излучения светодиодных источников с длинами волн $\lambda_{\text{max}} = 465$ и 520 нм можно дать и иное объяснение. Оно состоит в том, что в качестве фотосенсibilизирующего агента в клетках выступает не билирубин, а его фотопродукты, такие как люмирубин, характеризующиеся спектром поглощения, отличающимся от исходного билирубина, и обладающие более высоким квантовым выходом генерации синглетного кислорода. В пользу такого предположения указывают данные [16,17], свидетельствующие об усилении эффектов сенсibilизации при предварительном облучении билирубина. С другой стороны, как уже отмечалось, в случае определяющего вклада фотопродуктов в эффекты сенсibilизации, в дозовой кривой должен наблюдаться определенный лаг-период, в течение которого фотоповреждающее действие

не регистрируется, а при дальнейшем увеличении времени облучения должно наблюдаться увеличение скорости фотодеструкции [16]. Однако, поскольку процессы фотоизомеризации билирубина реализуются весьма быстро (пикосекундный диапазон), и являются наиболее эффективными для билирубина фотохимическими реакциями, то вклад фотопродуктов в общее поглощение света при выбранном диапазоне интенсивностей может быть значительным после облучения клеток в течение нескольких секунд. Естественно, что такой лаг-период не удастся зарегистрировать в дозовой кривой (рис. 3) при выбранных условиях облучения. Проявлению вклада фотопродуктов в эффекты сенсibilизированного повреждения клеток может способствовать и крайне низкое значение квантового выхода генерации синглетного кислорода билирубином ($\phi_{\Delta} \approx 0,02$).

Таким образом, представленные данные свидетельствуют, что билирубин, локализованный в клетках ткани, а также его фотопродукты способны выступать в качестве фотосенсibilизаторов, и при воздействии света, соответствующего спектру поглощения пигмента, вызывать гибель клеток. Наличие такого повреждающего действия может быть одной из причин побочных проявлений фототерапии гипербилирубинемии новорожденных детей, особенно при ее проведении у младенцев с предельно низкой массой тела [9–11]. Следовательно, фототерапевтические мероприятия при лечении детей с синдромом гипербилирубинемии должны быть направлены на снижение дозовой нагрузки на младенца.

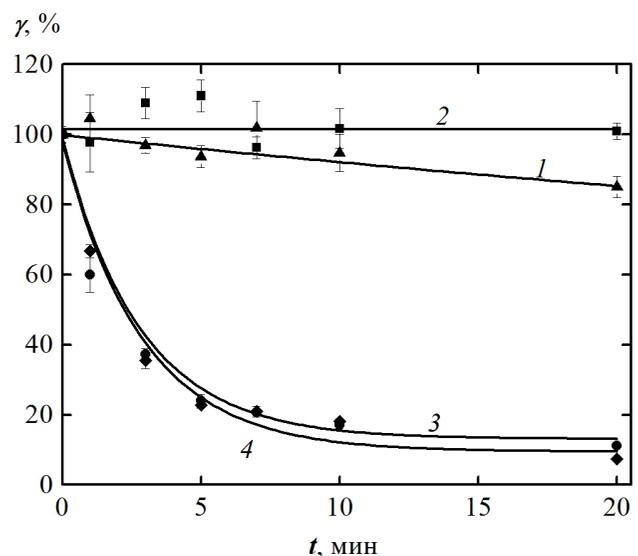


Рис. 3. Зависимость процента жизнеспособных клеток от времени облучения светодиодными источниками с $\lambda_{\text{max}} = 465 \text{ нм}$ (1, 3) и $\lambda_{\text{max}} = 520 \text{ нм}$ (2, 4) с плотностью мощности $P = 20 \text{ мВт/см}^2$ в отсутствие билирубина (1, 2) и при его концентрации в питательной среде 40 мкМ (3, 4)

Фотоповреждение клеток, сенсibilизированных билирубином, при воздействии лазерных и светодиодных источников

Кроме выше приведенных доводов, на возможную роль фотопродуктов билирубина указывают также: а) зависимость фотоповреждающего действия света на клетки от длины волны воздействующего излучения при ее изменении в пределах полосы поглощения билирубина (рис. 4); б) сравнение

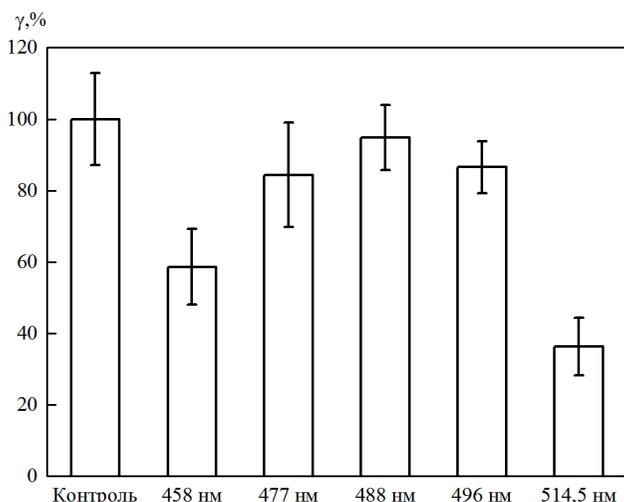


Рис. 4. Процент жизнеспособных клеток (по отношению к контролю), сенсibilизированных билирубином, при воздействии в течение $t=5$ мин лазерным излучением различных длин волн при плотности мощности 10 мВт/см^2

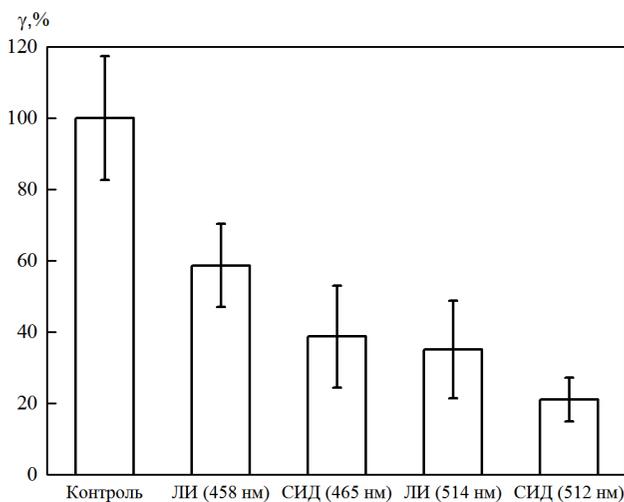


Рис. 5. Процент жизнеспособных клеток (по отношению к контролю), сенсibilизированных билирубином, при облучении в течение $t=5$ мин лазерными и светодиодными источниками близких длин волн при плотности мощности 10 мВт/см^2 (ЛИ — лазерное излучение; СИД — светоизлучающий диод)

фотобиологических эффектов лазерных и светодиодных источников с близкой длиной волны в максимуме интенсивности спектра испускания (рис. 5). Так, с использованием перестраиваемого лазерного источника (аргоновый лазер, рис. 4) установлена выраженная зависимость жизнеспособности клеток при их сенсibilизации билирубином от длины волны воздействующего излучения при ее изменении в диапазоне $457,9 \dots 514,5 \text{ нм}$. Из рис. 4 следует, что наибольший повреждающий эффект наблюдается при воздействии на монослой клеток излучения с $\lambda = 514,5 \text{ нм}$ или $457,9 \text{ нм}$. Воздействие излучения с длиной волны $476,5 \text{ нм}$, $488,0 \text{ нм}$ и $496,5 \text{ нм}$ слабо сказывается на жизнеспособности клеток.

Показано, что при близких длинах волн монохроматического лазерного излучения ($\lambda_{\text{max}} = 465$ или 512 нм) фотоцитотоксический эффект в отношении клеток, окрашенных билирубином, значительно более выражен при воздействии немонахроматического излучения.

Таким образом, при близких длинах волн лазерного излучения ($\Delta\lambda \approx 0,01 \text{ нм}$) и излучения светодиодного источника ($\Delta\lambda \approx 24 \text{ нм}$) фототоксический эффект в отношении клеток, сенсibilизированных билирубином, более выражен при воздействии немонахроматического излучения, что скорее всего обусловлено вкладом фотопродуктов билирубина в эффекты сенсibilизации.

Зависимость терапевтического действия светодиодных источников от ширины спектрального диапазона

Выполненные нами исследования показали, что эффективность фототерапии гипербилирубинемии новорожденных детей при использовании узкополосных светодиодных источников зависит не только от положения максимума спектра испускания светодиодов в пределах полосы поглощения билирубина, но и от ширины спектра воздействующего излучения. Установлено, что расширение спектрального диапазона излучения (рис. 6) за счет добавления к свету синего диапазона с $\lambda_{\text{max}} \approx 462 \text{ нм}$ зеленой компоненты с $\lambda_{\text{max}} \approx 505 \text{ нм}$ (в условиях одинаковой интегральной плотности мощности) приводит к повышению эффективности снижения уровня общего билирубина в крови новорожденных детей [18].

Наблюдаемый эффект обусловлен гетерогенностью спектральных характеристик билирубина в условиях различного микроокружения, а также зависимостью оптимальной длины волны излучения для фотоизомеризации пигмента от глубины залегания кровеносных сосудов, являющихся местом протекания реакций фототрансформации билирубина. Причинами гетерогенности

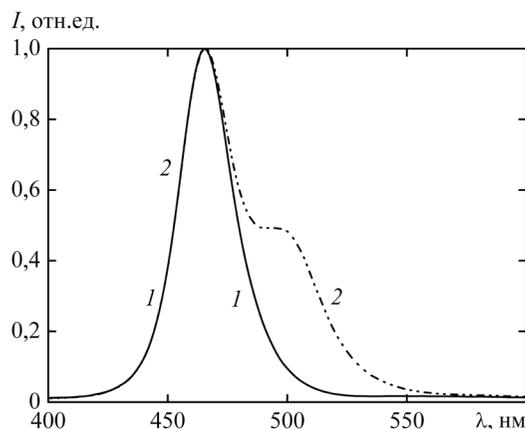


Рис. 6. Спектры испускания светодиодных источников синей (1) и сине-зеленой (2) областей спектра, используемых в фототерапевтическом аппарате для лечения гипербилирубинемии

спектральных характеристик билирубина являются: локализация билирубина в 2–3 различных сайтах молекулы альбумина, способного к тому же находиться в различном агрегатном состоянии как в сосудистом, так и внесосудистом руслах; существенное влияние жирных кислот и лекарств, связанных с альбумином, на структуру билирубина [18]. Кроме того, расширение спектрального диапазона воздействующего излучения за счет добавления зеленой компоненты приводит к увеличению облучаемых объемов крови, в которых инициируются реакции фотоизомеризации с повышенным квантовым выходом люмирубина, лежащие в основе терапевтического действия света при лечении гипербилирубинемии. При этом зеленая компонента способна вызывать фотоизомеризацию билирубина в сосудистом русле, недоступном воздействию излучения синей области. Другими словами, эффективная изомеризация молекул билирубина в кровеносных сосудах (капиллярах), локализованных на различной глубине от поверхности ткани (в диапазоне 0–2 мм), инициируется отличающимися длинами волн. По этой причине использование широкополосного излучения со спектром, соответствующим длинноволновому спектру полосы поглощения билирубина имеет определенные преимущества перед квазимонохроматическим излучением. Помимо названных обстоятельств, причинами повышения эффективности фототерапии при переходе от светодиодного источника с $\lambda_{\max} = 462$ нм к широкополосному источнику с $\lambda_{\max} = 462$ и 505 нм в условиях одинаковой суммарной интенсивности излучения может быть смещение под действием излучения зеленой области спектра динамического равновесия между равновесными концентрациями геометрических изомеров, обусловленное обратимостью процессов *цис–транс*-изомеризации и перекрытием спектров поглощения изомеров и нативного *Z,Z*-билирубина.

Заключение

Рассмотрены актуальные проблемы и новые возможности совершенствования технологий фототерапии желтухи новорожденных детей с использованием светодиодных источников различных типов для снижения уровня билирубина в крови младенцев. Показано, что возможности широко используемого метода фототерапии далеко не исчерпаны. Применение современных типов диодных лазеров сине-зеленой области спектра вместо широко используемых светодиодных источников позволяет создать фототерапевтическую установку, обеспечивающую высокую эффективность снижения уровня билирубина у детей с синдромом гипербилирубинемии при минимальных побочных эффектах, обусловленных сенсibiliзирующим действием фотопродуктов билирубина.

Настоящие исследования выполнены при частичной финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований и Государственного комитета по науке Министерства образования и науки Республики Армения (проект Ф17АРМ-028).

Литература

1. Lamola AA. A pharmacologic view of phototherapy. *Clin. Perinatol.* 2016 June;43(2):259–76. <https://doi.org/10.1016/j.clp.2016.01.004>.
2. Novotny JF, Sedlacek F, editors. *Bilirubin: Chemistry, Regulation and Disorder*. New York: Nova Science Publishers. 2012. Plavskii VYu. Biophysical and technical aspects of phototherapy for neonatal hyperbilirubinemia; p. 1–65.
3. Plavskii VYu, Tret'yakova AI, Mostovnikova GR. Phototherapeutic systems for the treatment of hyperbilirubinemia of newborns. *J. Opt. Technol.* 2014 June;81(6):341–8. <https://doi.org/10.1364/JOT.81.000341>.
4. Xiong T, Qu Y, Cambier S, Mu D. The side effects of phototherapy for neonatal jaundice: what do we know? What should we do? *Eur J Pediatr.* 2011 October;170(10):1247–55. <https://doi.org/10.1007/s00431-011-1454-1>.
5. Ramy N, Ghany EA, Alsharany W, Nada A, Darwish RK, Rabie WA. Jaundice, phototherapy and DNA damage in full-term neonates. *J. Perinatol.* 2016 February;36(2):132–6. <https://doi.org/10.1038/jp.2015.166>
6. Tatli MM, Minnet C, Kocyigit A, Karadag A. Phototherapy increases DNA damage in lymphocytes of hyperbilirubinemic neonates. *Mutat. Res.* 2008 June 30;654(1):93–5. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.06.013>.
7. Stevenson DK, Wong RJ, Arnold CC, Pedroza C, Tyson JE. Phototherapy and the risk of photo-oxidative injury in extremely low birth weight infants. *Clin. Perinatol.* 2016 June;43(2):291–5. <https://doi.org/10.1016/j.clp.2016.01.005>.
8. Wickremasinghe AC, Kuzniewicz MW, Grimes BA, McCullough CE, Newman TB. Neonatal phototherapy and infantile cancer. *Pediatrics.* 2016 June;137(6):e20151353. <https://doi.org/10.1542/peds.2015-1353>.

9. Morris BH, Oh W, Tyson JE, Stevenson DK, Phelps DL, O'Shea TM. Aggressive vs. conservative phototherapy for infants with extremely low birth weight. *N. Engl. J. Med.* 2008 October 30;359:1885–96. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0803024>.
10. Tyson JE, Pedroza C, Langer J, Green C, Morris B, Stevenson D. Does aggressive phototherapy increase mortality while decreasing profound impairment among the smallest and sickest newborns? *J. Perinatol.* 2012 September;32(9):677–84. <https://doi.org/10.1038/jp.2012.64>.
11. Arnold C, Pedroza C, Tyson JE. Phototherapy in ELBW newborns: does it work? Is it safe? The evidence from randomized clinical trials, *Semin. Perinatol.* 2014 November;38(7):452–64. <https://doi.org/10.1053/j.semperi.2014.08.008>.
12. Plavskii VYu, Mostovnikov VA, Ryabtsev AB, Mostovnikova GR, Plavskaya LG, Nikeenko NK, et al. Apparatus for low-level laser therapy: Modern status and development trends. *J. Opt. Technol.* 2007 April;74(4):246–57. <https://doi.org/10.1364/JOT.74.000246>.
13. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survivals: application to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol Methods.* 1983 16 December;65(1-2):55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
14. Plavskii VYu, Mostovnikov VA, Mostovnikova GR, Tret'yakova AI. Spectral fluorescence and polarization characteristics of Z,Z-bilirubin IX α . *J. Appl. Spectrosc.* 2007 January;74(1):120–32. <https://doi.org/10.1007/s10812-007-0019-6>.
15. Kozlenkova OA, Plavskaya LG, Mikulich AV, Leusenko IA, Tret'yakova AI, Plavskii VYu. Photodamage of the cells in culture sensitized with bilirubin. *J. Physics: Conf. Series;* 2016 August;741(1):012063. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/741/1/012063>.
16. Plavskii VYu, Mostovnikov VA, Tret'yakova AI, Mostovnikova GR. Sensitizing effect of Z,Z-bilirubin IX α and its photoproducts on enzymes in model solutions. *J. Appl. Spectrosc.* 2008 May;75(3):407–19. <https://doi.org/10.1007/s10812-008-9061-2>.
17. Böhm F, Drygalla F, Charlesworth P, Böhm K, Truscott TG, Jokiel K. Bilirubin phototoxicity to human cells by green light phototherapy in vitro. *Photochem. Photobiol.* 1995 December;62(6):980–3. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1995.tb02397>.
18. Plavskii VY, Mikulich AV, Leusenko IA, Tret'yakova AI, Plavskaya LG, Serdyuchenko NS, et al. Spectral range optimization to enhance the effectiveness of phototherapy for neonatal hyperbilirubinemia. *J. Appl. Spectrosc.* 2017 June;84(1): 92–102. <https://doi.org/10.1007/s10812-017-0433-3>.