4. Singleton V.L., Rossi J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents // American Journal of Enology and Viticulture. – 1965. – Vol.16. – P. 144-158.

ФОТОСТАБИЛЬНОСТЬ БИЛИРУБИНА И ЕГО ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ НА КЛЕТКИ ЖИВОТНЫХ В КУЛЬТУРЕ

Козленкова О.А., Дудинова О.Н., Плавская Л.Г., Микулич А.В., Леусенко И.А., Третьякова А.И., Плавский В.Ю.

Институт физики имени Б.И. Степанова НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Введение. Способность билирубина оказывать сенсибилизирующее действие на биологические системы различного уровня структурной организации является предметом многочисленных исследований вследствие широкого использования фототерапии для лечения гипербилирубинемии (желтухи) новорожденных детей. В последние годы актуальность данной проблемы еще более обострилась в связи с применением в терапевтических целях новых источников излучения на основе сверхъярких светодиодов, позволяющих варьировать в широком диапазоне как интенсивность, так и длину волны воздействующего излучения в пределах полосы поглощения билирубина.

Цель данной работы – сравнительные исследования фотостабильности билирубина в клетках и в составе комплекса с альбумином, а также изучение механизма сенсибилизированного пигментом повреждения клеток животных в культуре при воздействии излучения светодиодных источников синей и зеленой областей спектра.

Материалы и методы. Фотостабильность билирубина исследовали в питательной среде MEM (с 10% сыворотки крупного рогатого скота), в которой билирубин в основном связан с альбумином, а также в клетках почки африканской зеленой мартышки BGM в логарифмической стадии роста. Клетки выращивали в одноразовых чашках Петри при 37 ºС и 5% содержанием CO_2 в инкубаторе. Монослои клеток предварительно инкубировали с билирубином в концентрации 40 мкМ в течение 2 ч, затем подвергали воздействию излучения светодиодного источника с длиной волны в максимуме полосы испускания $\lambda = 465$ нм или $\lambda = 520$ нм. Фотостабиль-

ность билирубина оценивали спектрофотометрически, сравнивая оптическую плотность раствора билирубина, экстрагируемого с помощью ДМСО из клеток непосредственно после облучения светодиодным источником и из необлученных клеток. Критерием сенсибилизированного билирубином повреждения клеток служил колориметрический тест, отражающий их метаболическую активность.

Результаты и обсуждение. Проведенные исследования показали, что билирубин может оказывать сенсибилизирующее действие на клетки (что проявляется в снижении их выживаемости) при возбуждении оптическим излучением длиной волны λ = 465 нм и λ = 520 нм. 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 сенсибилизатором тушителя синглетного кислорода – азида натрия – значительно снижает как повреждающее действие света в отношении клеток, так и степень обесцвечивания билирубина в растворе. Следовательно, синглетный кислород играет определяющую роль в исследуемых процессах. В отсутствие билирубина, а также при инкубации клеток с билирубином ($C_{БР}$ = 40 мкМ) без светового воздействия эффект слабо выражен.

Зависимость выживаемости клеток от энергетической дозы при облучении клеток в присутствии билирубина светодиодами синей (λ = 465 нм) или зеленой (λ = 520 нм) областей спектра описывается моноэкспоненциальной функцией (рисунок 1).

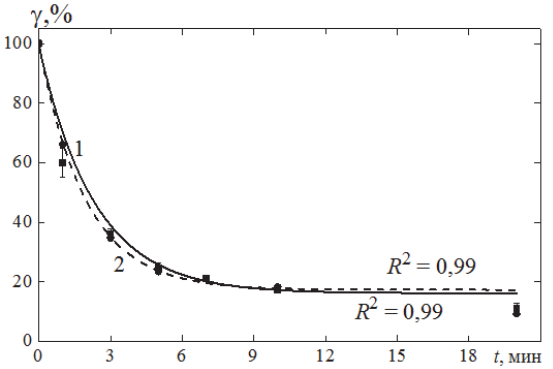

Рисунок 1. Зависимость процента жизнеспособных клеток, сенсибилизированных билирубином в концентрации 40 мкМ, от времени воздействия излучения светодиодных источников с λ = 465 нм (*кривая 1*) и λ = 520 нм (*кривая 2*), плотностью мощности P = 20 мВт/см^2.

Такой вид дозовой зависимости указывает на то, что сенсибилизатором выступает билирубин, а не его фотопродукты. Другая характерная особенность представленных кривых – практически идентичный фотобиологический эффект излучения λ = 465 нм, соответствующего максимуму спектра поглощения билирубина в комплексе с альбумином, и излучения λ = 520 нм, соответствующего длинноволновому склону указанного спектра.

По всей видимости, следует констатировать о резком изменении спектральных характеристик билирубина при его связывании с клеточными органеллами, что может быть обусловлено структурными перестройками тетрапиррола при изменении микроокружения.

Впервые показано, что включение билирубина в клетки, где он преимущественно локализован в митохондриях, сопровождается многократным усилением его фотохимической устойчивости по сравнению с молекулами пигмента, связанными с альбумином (*рисунок 2*). Среди возможных причин повышенной фотоусточивости 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 триплетного состояния билирубина другими биомолекулами.

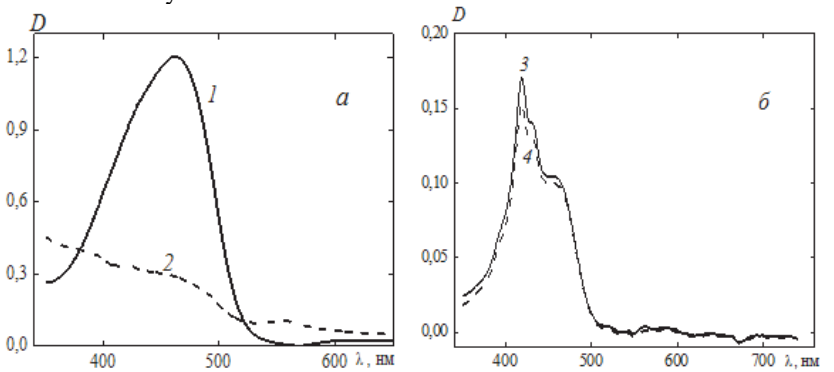

Рисунок 2. Спектры поглощения билирубина в питательной среде (*а*) и в растворе ДМСО (*б*) после экстракции из клеток без их предварительного облучения (*кривые 1, 3*) и после воздействия излучения λ = 465 нм, плотностью мощности P = 20 мВт/см^2 в течение t = 5 мин (*кривые 2, 4*).

Таким образом, билирубин, локализованный внутри животных клеток, характеризуется повышенной фотохимической стабильностью и может выступать в качестве фотосенсибилизатора, оказывая летальное действие на клетки. Определяющую роль в механизме фотосенсибилизированного билирубином повреждения клеток играет синглетный кислород. Спектральные характеристики билирубина при встраивании в клетки претерпевают существенные изменения.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВОДОРОСЛЕЙ В АКВАКУЛЬТУРЕ БЕЛАРУСИ

Козлова Т.В., Дмитрович Н.П., Козлов А.И., Райлян Н.М.

Полесский государственный университет, Пинск, Республика Беларусь

Реформирование аграрного производства и преодоление его спада предполагает развитие энерго- и ресурсосберегающих технологий в производстве сельскохозяйственной продукции. В этом аспекте наибольшее значение имеет развитие аквакультуры, являющейся одной из наиболее динамично развивающихся отраслей производства пищевых гидробионтов. В последнее время в аквакультуре все большее значение приобретают водоросли. Известно, что водоросли, как в естественных, так и в искусственных водоемах активно потребляются гидробионтами на разных стадиях их развития и составляют основу естественной кормовой базы рыб. Так, установлено, что в рыбоводных прудах в кишечниках личинок *Chironomus plumosus* L., *Glyptotendipes barbipes* Staeg. *Cricotopus gr. Silvestris* F. в период их планктонной стадии развития обнаружено до 30–62% водорослей, среди которых доминирующее значение имели, в основном, зеленые [1].

Хорошо зарекомендовали себя водоросли и в индустриальной аквакультуре. Получен положительный эффект от использования суспензии хлореллы при выращивании в производственных условиях молоди ценных видов рыб. Так, эксперимент по выращиванию личинок радужной форели в возрасте 8 дней после выклева проводили на базе инкубационного цеха ОАО «Рыбхоз «Полесье» в течение 15 дней. Добавка суспензии хлореллы в лотки, где содержались личинки, показала, что при переходе личинок форели на активное питание, выживаемость в опытных лотках была на 10% выше, чем в контроле. При дальнейшем подращивании личинок в