

ФОТОБИОЛОШКИ ПРИНЦИПИ ТЕРАПИЈСКЕ ПРИМЕНЕ СВЕТЛОСТИ

Радослава Р. Радовановић¹, Немања Здравковић¹, Теодора Савић²

¹ Факултет ветеринарске медицине, Универзитет у Београду,
Булевар ослобођења 18, Београд, Србија

² Факултет за стране језике, Алфа Универзитет БК, Палмира Тољатија 3, Нови Београд

Кратак садржај:

Утицај светлости на ћелије и ткива биљака, животиња и људи је од првих спознаја деловања видљиве светлости био предмет интересовања и истраживања. Нова открића, као што су ласер, извори интензивне видљиве и инфрацрвене светлости доводе до интензивнијег проучавања деловања светлости на живе организме и њихове примене у терапијске сврхе. Познато је да светлост таласне дужине од 400 до 500 nm и око 600 nm убрзава деобу ћелија микроорганизама и поспешује синтезу протеина. У литератури је присутно више хипотеза, које објашњавају механизме деловања светлосног зрачења. На основу експерименталних спроведених последње деценије 20. века долази се до више хипотеза о механизма физиолошког деловања ласера ниског интензитета на ћелије и тело човека: 1) фотодинамичка активност светлости на мембране праћена интрацелуларним повећањем садржаја калцијума и стимулацијом ћелија, 2) фоторекативација ензима Cu-Zn супероксид дисмутазе и 3) фотолиза металних комплекса NO са ослобађањем овог вазодилататора. Потврда набројаних механизма се огледа у индиректном бактерицидном, регенеративном и вазодилаторном деловању ласера. Циљ овог прегледног рада је да се сагледавањем постојеће литературе објасне принципи деловања ласера на ћелијском нивоу.

Кључне речи: светлост, терапија, фотобиолошки принципи, ласер

Увод

Излагање дневној светлости је једна од најстаријих терапијских метода, коју је човек кроз цивилизације примењивао. Веровање у лековита својства Сунчеве светлости било је повезано са древним култом Сунца у старом Египту (Слика 1), а познато је да се хелиотерапија примењивала у и у кинеској и хинду медицини (*Grzybowski* и сар., 2016). Међутим, иако је утицај светлости на ћелије и ткива човека и животиња био предмет интересовања, један дуги период је био неистражен (*Vladimirov* и сар., 2004). Први модерни научни рад о утицају светлости и боја на здравље човека крајем 19. века је написао немачки песник Гете. На почетку 20. века је Нилс Рибберг Финсен добио Нобелову награду за продор у терапији кожне туберкулозе (*Lupus vulgaris*), до тада тешко излечиве болести која остаје активна и преко десет година, а користио је „концентрисано светлосно зрачење“, односно испитивао је деловање природне и хемијске светлости на кожу. Од почетка примене фототерапије па до открића ласера и активације биолошких процеса под утицајем зрачења ласером тзв. „биостимулације“ светлост има значајну примену у терапијске сврхе. Прва потврда терапијског деловања ласера је била 60. година прошлог века у Мађарској када је 1967. године професор Ендре Местер, који се сматра „оцем“ фотобиомодулације, испитивао деловање светлости ласера на ткиво, тачније да ли излагање овом извору светлости може да уништи ћелије тумора. Током експеримента је излагао мишеве са имплантима ћелија тумора различитим нивоима зрачења рубинског ласера таласне дужине 694 nm. Овај

научник је доказао да ћелије тумора нису уништене дозама за које је сматрано да су енергија ласера високе снаге, али је запазио да је дошло до бржег зарастања рана и раста длаке код мишева подвргнутих третману ласером у односу на контролну групу (Gaspar, 2009). FDA (Food and Drug Administration) је први пут одобрила примену ласера у терапији 1996. године за лечење синдрома карпалног тунела. Од тих дана развој ласера, који се примењују у медицинске сврхе је доживео велику експанзију. Ласер је због кохерентне светлости врло повољан за испитивање циљаног дејства специфичне компоненте светлости, за разлику од дневног светла. Данас су *low-intensity lasers (LIL)* и *light-emitting diodes (LED)* нашли широку примену у стоматологији, офталмологији, дерматологији, хирургији, реуматологији, ветеринарској медицини, спортској медицини и другим областима медицине.

Како уопште делује зрачење ласера на живе организме је веома комплексно питање, иако је у литератури присутан велики број резултата истраживања и експерименталних спроведених последњих деценија. Стога, за циљ овог прегледног рада је постављено да се сагледавањем постојеће литературе објасне принципи деловања ласера на ћелијском нивоу.



Слика 1. Стари Египат: Akhenaten, Nefertiti и 3 њихове ћерке на сунчевој светлости (http://www.kenneymencher.com/pic_old/fertile_crescent_egypt/lesson_9_akhenaten_egypt.htm.)

Ране хипотезе деловања зрачења ласера на живе организме

У литератури је присутно више хипотеза, које објашњавају механизме деловања зрачења ласера. Могу се поделити у теорије базиране на идеји о специфичном деловању кохерентног (ласер) зрачења на ткива људи и животиња у целини и хипотезе о фотохемијском деловању светлости, укључујући зрачење ласера, *LED-a (Light Emitting Diodes)* и других извора видљиве и инфрацрвене светлости блиског подручја. Због својих карактеристика кохерентних зрака, ласер налази примену у медицини. Избором компоненти добијају се емисије светлости различитих таласних дужина који уз одређену снагу имају врло стриктно, ограничено, а самим тим и контролисано дејство.

Деловање видљиве светлости на ћелије и ткива живих организама

Да би уопште дошло до ефекта на ткиво, фотон мора да буде апсорбован, затим се та енергија преноси у виду различитих механизма где долази до примарних и секундарних ефеката. Један део примењене светлости се одбија и делује на околно ткиво. Молекули који имају фото-акцепторну способност се називају хромофоре, а најпотентнији ткивни хромофори су хемоглобин (даје црвену боју крви) и меланин (кожи даје тамнију боју након сунчања) који имају апсорпционе пикове у

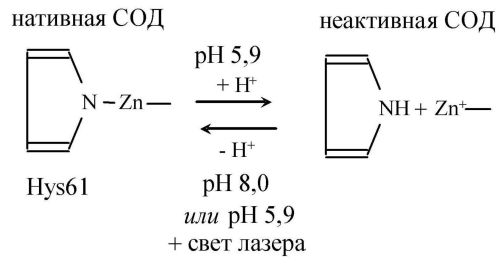
краткоталасним дужинама, па је зато, апсорпција светлости у ткиву већа у плавом делу спектра. Када хромофора апсорбује енергију фотона, долази до ексцитације услед прерасподеле електрона у љусци атома. Најчешће се повратак ексцитираног молекула врши расподелом енергије у виду вибрација, тј. долази до загревања ткива. Део енергије може бити и емитовати у виду флуоресценције, а остатак пренети на вибрације и термички ефекат. На крају деловањем на електронске нивое, ласерска светлост може да доведе до промене хемијске реактивности молекула стварајући синглет молекул. Синглет молекули побуђују оксидо-редукционе процесе који се одвијају преносом електрона различитим метало-ензимима (као што је Cu-Zn супероксид дисмутаза).

Хипотеза о три механизма деловања ласера

Анализирајући доступне литературне податке и на основу сопствених експерименталних резултата 1994. године руски научник Владимиров са сарадницима формулише хипотезу о три механизма деловања ласера ниског интензитета на ћелије и тело човека, који се базирају на 3 реакције: 1) фотодинамичка активност на мембране ћелија праћена интацелуларним повећањем садржаја калцијума и стимулацијом ћелија, 2) фоторекативација ћелијског ензима Cu-Zn супероксид дисмутазе (*SOD*) и 3) фотолитиза металних комплекса NO са ослобађањем овог вазодилатора. Потврда ова 3 механизма се огледа у индиректном бактерицидном, регенеративном и вазодилатационом деловању ласера.

Као модел за изучавање дејства ласера користе се митохондрије, које су енергетски генератор ћелије. У мембрани митохондрија се налази пет комплекса ензима који преношењем електрона формирају енергетске залихе трошећи храну и кисеоник. Између тих комплекса налазе се коензими, од којих су познатији цитохром Ц и коензим Q. Деловањем ласерске светлости мења се процес одвијања реакција у једном или другом смеру, ензимски систем се успорава или стимулише приспелим фотонима. Осим што утиче на енергетски биланс, светлосни фотони делују на саму мембрану митохондрија, а касније је доказано, и на мембрану самих ћелија. Услед топлотног дејства отварају се канали за јон калцијума, који је иначе секундарни гласник у ћелији, а коначан ефекат зависи од типа и специјализације ћелије. У терапијском смислу неки процес треба убрзати, нпр. растање костију, а неки процес и зауставити као што је бол, старење или тумор.

Експерименти са ензимом Cu-Zn супероксид дисмутазом изолованих еритроцита су показали да снижена рН вредност раствора и водоник пероксид инактивишу овај ензим, док до потпуне реактивације ензима долази после зрачења светлошћу He-Ne ласера (Gorbatenkova и сар., 1988; Vladimirov и сар., 1988). Претпоставља се да је овај феномен присутан и код живих организама. Пад киселости крви у организму човека је карактеристичан за оштећења виталних функција ћелија, а при чему се може очекивати смањење активности *SOD*. У циљу разјашњења механизма инактивације и фотореактивације *SOD* у киселој средини испитани су апсорпциони спектри и *EPR* (*Electric Paramagnetic Resonance*) сигнали ензима после инактивације киселином и зрачења ласером. Добијени подаци су показали да прототонизација резидуа хистидина у активном центру чини основу инактивације Cu-Zn *SOD*, док зрачење изазива депротонизација хистидина стварањем $>N$. Zn веза обнављајући активни центар ензима и саму активност ензима.



Слика 1. Фотореактивација ензима Cu-Zn супероксид дисмутазе после зрачења ласером (према Vladimirov и сар., 2004.)

Друга хипотеза, коју је поставила руска научница, естонског порекла Тина Кару 1988. године је хипотеза о деловању светлости ласера на оксидационо-редукциона својства носача електрона (Karū, 1988). Екситација комплекса цитохром-оксидазе, хромофора као што су CuA, CuB, или хема *a* (*a*3) утиче на оксидационо-редукционо стање ових центара и сходно томе на брзину преноса електрона у молекулу. Осим тога, модификацијом ових ензима отпушта се или кисеоник, или NO који имају снажно локално деловање у микроциркулацији.

Убрзо по постављању треће хипотезе, односно механизма Vladimirov и сар. (2004) су демонстрирали фотосензитивност комплекса са хемоглобином и цитохромом применом метода спектрофотометрије. Дошло је до смањења EPR сигнала NO хемоглобина после зрачења ласером. Истовремено, азот оксид се ослобођа, што се може проценити из повећаног EPR сигнала спина NO.

Сам NO је вазодилататор, јер локално шири крвне судове, доводи до побољшања микроциркулације и снабдевања органа крвљу (Maegawa и сар.,2000; Kozlov и сар.,1993). Осим ласером у терапијским дозама се чешће узима у виду лекова (Монизол, Моносан, нитро глицерин итд.).

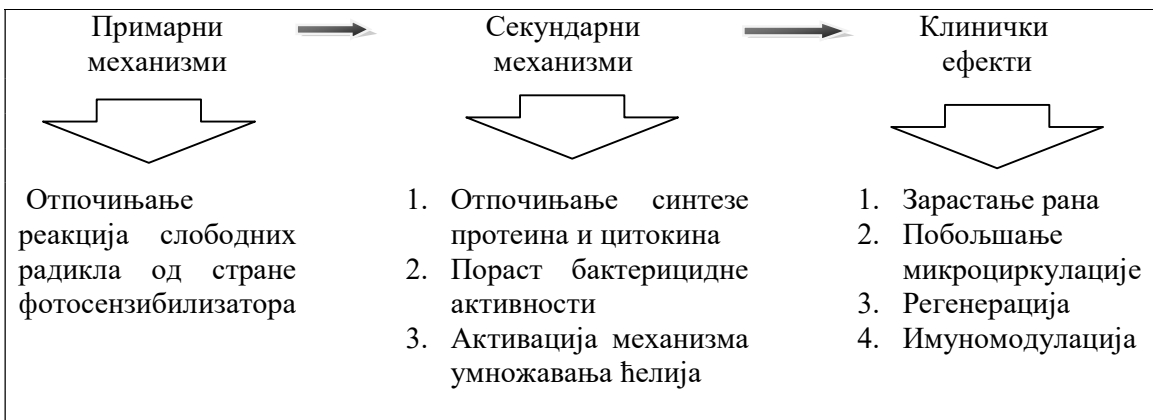
Ефекат ласера зависи од особина ткива које су одређене структуром, садржајем воде и циркулацијом крви (апсорпција, продирање, рефлексија, топлотна проводљивост, топлотни капацитет и густина) и од карактеристика ласерског зрака (Шема 1). У зависности од трајања деловања ласерског снопа на ткиво и ласерском исијавању на површини или у дубини ткива, разликују се три типа интеракција са ткивом:

- i. фотохемијски учинак (10s - 1.000s; $10^{-3} - 1 \text{ W/cm}^2$);
- ii. фототермички учинак (1ms - 100s; $1 - 10^6 \text{ W/cm}^2$);
- iii. фотојонизациони учинак (10ps - 100ns; $10^8 - 10^{12} \text{ W/cm}^2$).

Код екстремно дуге изложености деловању ласера мале снаге долази до фотохемијских промена услед апсорпције светлост без претходног загревања ткива. Најважнији случај је фото-осетљива оксидација која иницира цитотоксични процес. Убризавањем хромофора у ткиво (као што су деривати хематопорфирина, супстанце која природно настаје распадањем хемоглобина) и накнадним дејством ласером уништава се циљано ткиво. Ласером стимулисан фото-осетљив агенс изазива серију интрамолекуларних хемијских реакција које доводе до оксидације различитих ћелијских структура, примарно мембрана које мењају степен пропустљивости. Биостимулација припада овој групи. Смањује оток и убрзава одвођење сувишних продуката код зарастања рана.

Скраћивањем времена деловања и повећањем снаге јавља се фототермичко деловање. Основна примјена ласера у хирургији се заснива на претварању ласерске светлости у топлоту. Управо тај ефекат се користи за сечење и коагулацију ткива. Јонизационим ефектом молекули, који апсорбују светлост, порфирини и флавопротеини у респираторном ланцу митохондрија могу да пређу у деривате са особинама фотосензибилизатора (Giese,1980), „хипотеза реактивног синглет кисеоника“ (1981)

према којој синглет-радикалски кисеоник, подстиче синтезу РНК и ДНК, што није увек пожељно јер може да доведе до појаве туморских ћелија. Нека клиничка дејства још увек немају научно образложење.



Шема 1. Приказ примарних и сеундарних механизма дејства ласера на животињско ткиво (модификовано по Владимиров и сар., 2004.)

Познато је да светлост таласне дужине од 400 до 500 nm и око 600 nm убрзава деобу ћелија микроорганизама и поспешују синтезу протеина, биолошких катализатора. Многобројни литературни подаци говоре у прилог стимулативном деловању зрачења ласера на ћелије организма. Запажени ефекти у клиничким испитивањима, као што су антиинфламаторно деловање ласера, убрзана регенерација оштећеног ткива и побољшање циркулације крви су повезани са дејством ласера добијеним у експерименталним истраживањима и то: 1) повећање активности ћелија-леукоцита и фагоцита, 2) повећање ћелијске деобе, и раста ћелија 3) активације синтезе протеина и цитокина, 4) побољшање циркулације крви као резултат опуштања зида крвног суда (вазодилатација). *Boulton* и сар. (1986) су доказали да је зрачење две врсте ћелија фибробласта са He-Ne ласером 15 минута убрзало раст ћелија у експоненцијалној фази и адхеренцију ћелија за супстрат. Зрачење L-ћелија са He-Ne ласером је после 3. и 4. дана после зрачења изазвало повећање митотичког индекса (*Gamaeva* и сар., 1983). Такође, *Yew* и сар.(1982) су доказали солидно повећање митотичког индекса епителних ћелија мрежњаче ока после зрачења He-Ne ласером (83 W/m², 10 минута). Уопштено, постоји веза између дозе и стимулативног деловања зрачења ласером. Двоструко већи број бактерија *Escherichia coli* је доказан при зрачењу подлоге инфрацрвеним ласером таласне дужине 890 nm и дозом 0,7 J/m², док је инхибиција раста запажена са дозом реко 2,5 J/m² (*Tiphlova* и *Karu*, 1991). *Passarella* и сар.(1988 а,б) су доказали да је дошло до повећања метаболизма АТР-АДР, повећања садржаја АТР, раста електричног потенцијала унутар ћелијских мембрана и рН унутар ћелије са незнатним променама у конзистенцији унутар ћелијске супстанце после ласерског озрачивања митохондрија ћелија јетре. Морфолошке промене у митохондријама лимфоцита после зрачења He-Ne ласером ових ћелија је доказала *Karu* (1992). Зрачење ласером доводи до повећања садржаја интрацелуларног калцијума у леукоцитима и појачаног бојења нуклеинске киселине у ћелијама флуоросцентном бојом (акридин наранџастом) и промене морфолошке структуре хроматина. Експерименти су показали да зрачење ласера показује ефекат на фагоците у *in vivo* и *in vitro* условима (*Ricevuti* и сар.,1989). *Schwengel*, и сар. (1993) су доказали ширење крвних судова (вазодилатацију) после зрачења и одсуство овог ефекта после замене крви са физиолошким раствором.

Важна чињеница, коју су показала вишеструка истраживања како на ћелијским културама (*Pereira* и сар.,2002), животињским моделима (*Kana* и сар.,1981) тако и у клиничким студијама, је концепт бифазног ефекта (одговора) на дозу када се упореди са укупном количином енергије светлости. Експериментални резултати сугеришу да су густина енергије и густина снаге кључни биолошки параметри за ефикасност ласерске терапије и оба се користе у терапеутском оквиру (тј. доњи и горњи праг за оба параметара између којих је ласерска терапија ефикасна, а изван њих је сувише слаба да има било какав ефекат, или је тако интензивна да инхибише ткиво) (*Sommer* и сар., 2001).

Закључак

Терапија ласерима мале снаге (фотобиомодулација, ласерска биостимулација) напредовала је последњих три деценија. Више нису актуелне контроверзе око ласерске биостимулације, које су биле актуелне крајем осамдесетих година прошлог века и данас нема сумње да монохроматска светлост ласера ниског интензитета и *LED*-а делује директно на организам, на молекуларном нивоу. Сматра се да постоји универзални фотобиолошки механизам деловања светлости на респираторни ланац код еукариотских и прокариотских ћелија (крајњи ензими у респираторном ланцу су фотоакцептори). Поред активације ћелијског метаболизма кроз респираторни ланац, постоје и други начини активације диференцираних ћелија (на пример леукоцити). На крају, због интеракције између различитих ћелија на нивоу ткива механизам деловања ласера се додатно усложњава. Како се дејство ласера на ткиво може изразити као једначина са много непознатих, упркос многим научним сазнањима може се рећи да смо још увек далеко од потпуног разумевања механизма деловања зрачења ласера на ткива и организам, а поготово на индивидуалне варијације терапијског ефекта.

Литература:

1. Grzybowski A, Sak J. and Pawlikowski J. (2016) A brief report on the history of phototherapy, *Clinics in Dermatology* 34,532–537 2016.
2. Vladimirov Yu. A, Osipov A. N., and Klebanov G. I. (2004) Photobiological Principles of Therapeutic Applications of Laser Radiation. *Biochemistry (Moscow)*, Vol. 69, No. 1, pp. 81-90. Translated from *Biokhimiya*, Vol. 69, No. 1, 2004, pp. 103-113.
3. Gáspár L. Professor Endre Mester, the Father of Photobiomodulation, (2009) *J Laser Dent*;17(3):146-148
4. Pereira A.N., P. Eduardo Cde, E. Matson and M.M. Marques, (2002) Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts, *Lasers Surg Med* 31 263-7.
5. Kana J.S., G. Hutschenreiter, D. Haina and W. Waidelich, (1981) Effect of low-power density laser radiation on healing of open skin wounds in rats, *Arch Surg* 116 293-6.
6. Sommer A.P., A.L. Pinheiro, A.R. Mester, R.P. Franke and H.T. Whelan, (2001) Biostimulatory windows in low-intensity laser activation: lasers, scanners, and NASA's light-emitting diode array system, *J Clin Laser Med Surg* 19 29-33.
7. Gorbatenkova, E. A., Azizova, O. A., and Vladimirov, Yu. A. (1988) *Biofizika*, 33, 717-718.

8. Vladimirov, Y. A., Gorbatenkova, E. A., Paramonov, N. V., and Azizova, O. A. (1988) *Free Rad. Biol. Med.*, 5, 281-286.
9. Giese, A. C. (1980) in *Photosensitization of Organisms with Special Reference to Natural Photosensitizers* (Hillenkamp, F., Pratesi, R., and Sacchi, C., eds.) Plenum Press, N. Y., pp. 299-319.
10. Karu, T. I. (1988) *Lasers Life Sci.*, 2, 53-64.
11. Boulton, M., and Marchall, J. (1986) *Lasers Life Sci.*, 1, 125-134.
12. Gamaeva, N. F., Shishko, E. D., and Yanish, V. (1983) *Doklady AN SSSR*, 273, 224-227.
13. Yew, D. T., Lam, S. T. L., and Chan, Y. W. (1982) *Acta Radiol. Oncol. Rad. Phys.*, 21, 433-438
14. Tiphlova, O., and Karu, T. (1991) *Crit. Rev. Biomed. Eng.*, 18, 387-412.
15. Passarella, S., Ostuni, A., Atlante, A., and Quagliariello, E. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 156, 978-986.
16. Passarella, S., Roncall, L., Cicero, R., and Quagliariello, E. (1988) *Laser Life Sci.*, 2, 161-165.
17. Karu, T. (1992) *Laser Therapy*, 4, 5-24.
18. Ricevuti, G., Mazzone, A., Monaia, C., Fratino, P., Degiulio, R., Dell'Acqua, R., Leonardi, G., Jucci, A., and Sacchi, S. (1989) *Inflammation*, 13, 507-527.
19. Schwengel, R. H., Gregory, K. W., Hearne, S. E., Scott, H. J., Beauman, G. J., Mergner, W. J., Caplin, J. L., and Ziskind, A. A. (1993) *Lasers Surg. Med.*, 13, 284-295.
20. Maegawa, Y., Itoh, T., Hosokawa, T., Yagashi, K., and Nishi, M. (2000) *Lasers Surg. Med.*, 27, 427-437.
21. Kozlov, V. I., Builin, V. A., Samoilo, N. G., and Markov, I. I. (1993) *Basis of Laser Physio- and Reflexotherapy [in Russian]*, Zdorovya, Samara-Kiev.
22. Pereira A.N., P. Eduardo Cde, E. Matson and M.M. Marques, (2002) Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts, *Lasers Surg Med* 31 263-7.
23. Sommer A.P., A.L. Pinheiro, A.R. Mester, R.P. Franke and H.T. Whelan, (2001) Biostimulatory windows in low-intensity laser activation: lasers, scanners, and NASA's light-emitting diode array system, *J Clin Laser Med Surg* 19 29-33.