RADIOPROTEKTIVNÍ ÚČINEK TERAPEUTICKÉHO LASERU

Radioprotective effects of therapeutic laser

Zuzana Freitinger Skalická, Zdeněk Hon, Leoš Navrátil

11: 453–458, 2009
ISSN 1212-4117

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zdravotně sociální fakulta, katedra radiologie a toxikologie

Summary

Ionizing ^{60}Co gamma-radiation used in radiotherapy belongs to main exogenous sources of free radicals, which can cause damage to healthy biomolecules and tissues. Free radicals are characterized by unpaired electrons. In the presence of oxygen, a molecule of oxygen is immediately bound instead of the unpaired electron, thus producing a peroxylic radical, which tends to get the missing electron from the another compound with forming the other free radical. This chain reaction is discontinued either by a bond of two radicals one to another or by a reaction with an antioxidant. After depletion of the anti-oxidative protection, the ratio between reduced and oxidized glutathione in cells, which is a sensitive parameter of the oxidative stress, decreases. The initial activity of main anti-oxidative enzymes – superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase is also of importance. Possibilities of interactions of ionizing and non-ionizing radiation (therapeutic laser) are considered in works of many foreign authors – for example different speed of the action of ionizing radiation itself in the concomitant action of ionizing radiation and therapeutic laser. Therapeutic lasers demonstrably affect cell organelles, membrane channels, nociceptors, mediators and cytokines. In clinical medicine, there are obvious analgesic anti-inflammatory and immunostimulating effects and also effects on healing of wounds. For the verification of the measure of the damage to the organism with ionizing radiation and possible radioprotective effect of laser, superoxide dismutase was studied in CD1 strain mice, which were exposed to ^{60}Co gamma rays, therapeutic laser and their combination. Superoxide dismutase is an enzyme making the superoxide radical non-harmful by its conversion to molecular oxygen and hydrogen peroxide, which can be furthermore decomposed by catalase or peroxidase. The results demonstrated a statistically significant difference in the group exposed to laser in combination with gamma rays 1.5 Gy compared with the other groups. Superoxide dismutase values were statistically significantly reduced, which indicates a lower anti-oxidative protection of the organism investigated.

Key words: therapeutic laser – superoxide dismutase – ionizing radiation

Souhrn

Ionizující záření gama ^{60}Co (kobaltu-60) používané v radioterapii patří k hlavním exogenním zdrojům volných radikálů, které mohou vést k poškození zdravých biomolekul a tkání. Volné radikály jsou charakterizovány nepárovými elektrony. V přítomnosti kyslíku se na místo nepárového elektronu okamžitě naváže molekula kyslíku a vzniká peroxylový radikál, který se snaží získat z jiné sloučeniny chybějící elektron, čímž vytváří jiný volný radikál. Tato řetězová reakce je přerušena buď vazbou dvou radikálů na sebe, nebo reakcí s antioxidantem. Po vyčerpání antioxidační ochrany klesá v buňkách poměr redukovaného a oxidovaného glutathionu jako citlivého ukazatele oxidačního stresu. Důležitá je rovněž počáteční aktivita hlavních antioxidačních enzymů – superoxidodismutázy (SOD) a glutathionperoxidázy. Možnostem interakce ionizujícího a neionizujícího záření (terapeutického laseru) jsou věnovány práce mnohých zahraničních autorů – např. rozdílné rychlosti účinku samotného ionizujícího záření při současném působení ionizujícího záření a terapeutického laseru. Terapeutické lasery prokazatelně ovlivňují buněčné orgány, membránové kanály, nociceptory, mediátory a cytokiny. V klinice je pak patrný efekt analgetický, protizánětlivý, imunostimulační a vliv na hojení ran. K verifikaci míry poškození organismu ionizujícím zářením a případnému radio-

protektivnímu efektu laseru bylo zvoleno sledování superoxiddismutázy u myši kmene CD1, které byly ozářeny ionizujícím zářením ^{60}Co , terapeutickým laserem a jejich vzájemnou kombinací. Superoxiddismutáza je enzym zneškodňující superoxidový radikál jeho přeměnou na molekulární kyslík a peroxid vodíku, který může být dále rozložen katalázou nebo peroxidázou. Výsledky ukázaly statisticky významný rozdíl mezi skupinou ozářenou laserem v kombinaci s gama zářením 1,5 Gy oproti ostatním skupinám. Hodnoty superoxiddismutázy byly statisticky významně sniženy, což ukazuje na nižší antioxidační ochranu zkoumaného organismu.

Klíčová slova: terapeutický laser – superoxiddismutáza – ionizující záření

Současný stav

S klinickou aplikací terapeutického laseru se v poslední době setkáváme stále častěji a to i navzdory skeptickým postojům, které doprovázely začátky laseru. Bylo to dáno zejména malou mírou informací o biologických účincích nízkovýkonného laserového záření (terapeutického laseru), i když klinické výsledky byly nad rámec teoretických informací pozitivní.

Řada klinických prací i cílených výzkumů dokazuje příznivé účinky terapeutického laseru na lidský organismus. Laser je zdrojem monochromatického, polarizovaného a koherentního elektromagnetického záření, které využívá jevu stimulované emise záření aktivních částic buzených vnějším zdrojem energie. Do terapeutických laserů řadíme přístroje s výkonem zdroje do 500 mW. Tento laser prokazatelně ovlivňuje metabolismus buněčných organel, membránové kanály, citlivost nociceptorů i aktivitu cytokinů.

Zatímco biologické účinky ionizujícího záření jsou známy, biologický efekt terapeutického laseru je potřeba verifikovat. Možnostem interakce ionizujícího a neionizujícího záření jsou věnovány práce mnohých zahraničních autorů, např. rozdílnou rychlost účinku samotného ionizujícího záření při současném působení terapeutického laseru popsali u některých kmenů *E. coli* Simonian s Voskanianem. Využitím radioprotektivního efektu terapeutického laseru (zvýšením odolnosti organismu vůči účinkům ionizujícího záření) se věnují i další zahraniční autoři, např. J. J. Anders (Anders, 2004), K. Samoilova (Samoilova, 2004), L. Longo (Longo, 2002). Na základě výsledků těchto studií se i u nás začaly objevovat studie interakcí nízkovýkonného laserového záření a záření ionizujícího. Probatorní studie o interakcích ionizujícího a neionizujícího záření byly v České republice prezentovány před dvěma lety na odbor-

ných domácích i zahraničních konferencích (Freitinger Skalická, 2008).

Gama zářiče (ionizující záření) ^{60}Co patří k hlavním exogenním zdrojům volných radikálů, které pak mohou vést k poškození biomolekul a tkání. Dojde-li k vyčerpání antioxidační ochrany organismu, lze prokázat produkty poškození molekul volnými radikály. V buňkách klesá poměr redukovaného a oxidovaného glutathionu jako citlivého ukazatele oxidačního stresu. Důležitá je aktivita hlavních antioxidačních enzymů – superoxiddismutázy (SOD) a glutathionperoxidázy (GPx) a jejich změny během ozáření organismu.

Volné radikály

V našem organismu neustále vznikají částice, které pro nás představují trvalé potenciální nebezpečí. Tyto částice (volné radikály) jsou vysoce reaktivní, nenasycené molekuly, které jsou schopné přijmout vazebný elektron jiné sloučeniny. Mohou tak poškodit buňky, oslabit imunitní systém a napomáhat tak ke vzniku řady onemocnění. Antioxidanty mají schopnost volné radikály blokovat.

Antioxidant

Antioxidanty jsou molekuly blokující aktivitu kyslíkových radikálů – snižují pravděpodobnost jejich vzniku nebo je převádějí do méně reaktivních nebo nereaktivních stavů. Tím omezují proces oxidace v organismu. Antioxidační ochrana organismu představuje složitý komplex mechanismů, které pracují na vzájemné souhrě, doplňují se a mnohdy i potencují, navíc musejí být v rovnováze s prooxidačními látkami, tedy s produkcí volných radikálů. Nejdůležitějšími přirozenými antioxidanty v potravě jsou například vitaminy, karotenoidy, flavonoidy – rostlinná barviva, třísloviny dále pak antioxidanty na bázi aminokyselin – glutation a taurin. Mezi

antioxidanty chráníci organismus patří glutathion peroxidáza, superoxiddismutáza, kataláza, koenzym Q10 a další.

Zkoumaný antioxidant

Superoxiddismutáza (SOD) je důležitý přirozený, tedy tělu vlastní antioxidant (obr. č. 1). Účinně zhasí superoxidový radikál a přeměňuje ho na méně toxický peroxid vodíku. Je základním

antioxidačním enzymem. Nízká aktivita znamená zhoršenou antioxidační ochranu a při opakovaně stimulaci volnými radikály je indukována její syntéza. Stanovuje se fotometrickým testem v erytrocytech.

Mechanismus reakce

Obr. č. 1 Mechanismus účinku superoxiddismutázy

Materiál a metodika

Parametry ozařování

Zdrojem gama záření v této studii byl ^{60}Co s dávkovým příkonem 0,7 Gy/min., myši byly ozářeny celotělově dávkou 1 Gy, respektive 1,5 Gy. Zdrojem laserového záření byla dioda s vlnovou délkou 830 nm a výkonem 300 mW. Hustota záření byla 20 J/myš na abdominální oblast.

Pokusy byly prováděny na laboratorních myších kmene CD1 (samice o hmotnosti 22–24 g), vždy 20 myši v každé skupině (10 směrných vzorků) rozdělených následovně:

- Skupina A – ozářena laserem (20 J/myš), po 30 minutách ozáření ^{60}Co do celkové dávky 1,5 Gy, odběr biologického materiálu 4. den.

- Skupina B – ozářena laserem (20 J/myš), po 30 minutách ozáření ^{60}Co do celkové dávky 1 Gy, odběr biologického materiálu 4. den.
- Skupina C – celotělově ozářena ^{60}Co do celkové dávky 1 Gy, odběr biologického materiálu 4. den.
- Skupina D – ozářena laserem (20 J/myš), po 30 minutách ozáření ^{60}Co do celkové dávky 1,5 Gy, odběr biologického materiálu za 30 minut.
- Skupina E – ozářena laserem (20 J/myš), po 30 minutách ozáření do celkové dávky 1 Gy, odběr biologického materiálu za 30 minut.
- Skupina F – celotělově ozářena ^{60}Co do celkové dávky 1 Gy, odběr biologického materiálu za 30 minut.

Myším byla odebrána žilní krev (obr. 2) s přídavkem heparinu. Vzorky krve byly po přidání příslušných konzervačních činidel uchovávány do doby analýzy při teplotě -80°C . Vzor-

ky byly směsné (vždy ze dvou myší) z důvodu malého množství krve z jednoho laboratorního zvířete.

Obr. č. 2 Odběr biologického materiálu

VÝSLEDKY

Graf č. 1 Grafické znázornění naměřených hodnot superoxiddismutázy

Ze statistického zpracování vyplývá, že vypočtená p-hodnota je menší než 0,5 a existuje tedy rozdíl mezi průměry jednotlivých skupin. U naměřených hodnot SOD jsou dvě skupiny,

které by bylo možné sloučit (nejsou mezi nimi výrazné rozdíly) – první skupinu tvoří A a D, druhou pak je B, C, E a F.

Tab. č. 1 Srovnání naměřených hodnot

Zdroj proměnlivosti (faktor)	Součet čtverců	Stupně volnosti	Průměrný čtverec	Testová statistika F -poměr	p-hodnota
Mezitřídní	2,00941	5	0,401882	3,28	0,0117
Vnitřní	6,61265	54	0,122456		
Celkový	8,62206	59			

Statistické zpracování

Metodologie

Pro porovnání vzorků mezi jednotlivými sloupci byla použita analýza rozptylu neboli ANOVA, která umožňuje srovnávat několik středních hodnot nezávislých náhodných výběrů. Při použití analýzy rozptylu se předpokládá tzv. homoskedasticita (stejný rozptyl u srovnávaných výběrů). Pokud mají výběry normální rozdělení, lze použít F-test, tj. parametrickou podobu analýzy rozptylu, v opačném případě musí být použita neparametrická podoba analýzy rozptylu, tzv. Kruskal-Wallisův test.

Při statistickém vyhodnocení bylo provedeno testování na homoskedasticitu za použití následujících testů: Cochranův test, Bartlettův test a Hartleyův test. Normalita byla testována pomocí Kolmogorov-Smirnova testu dobré shody, který je použitelný i pro malé statistické výběry. V případech kdy byla zamítnuta hypotéza o rovnosti jednotlivých sloupců tabulky H_0 , byla provedena post-hoc analýza, která spočívá v porovnání jednotlivých dvojic sloupců tabulky s cílem vybrat srovnatelné (homogenní) sloupce. Jako kritérium pro zařazení sloupce do homogenní skupiny byla použita LSD-statistika.

DISKUZE

Jednou z potenciálních a zkoumaných klinických aplikací laserového záření je minimalizace nežádoucích účinků u pacientů s nádorovým

onemocněním léčených ionizujícím zářením. Jedná se o problematiku, která je vysoce aktuální zejména pro radioterapeutická oddělení a obory zabývající se problematikou účinku ionizujícího a neionizujícího záření na živý organismus (radiobiologii).

Řada klinických prací i cílených výzkumů dokazuje příznivé účinky terapeutického laseru na lidský organismus. Terapeutický laser prokazatelně ovlivňuje buněčné organelly, membránové kanály, nociceptory i cytokiny.

V této probatorní studii jsme neprokázali statisticky významný radioprotektivní účinek terapeutického laseru, ale výsledky tento trend naznačují. Prokázali jsme statisticky významný rozdíl mezi skupinami ozářenými 1,5 Gy oproti ostatním skupinám, což ukazuje sníženou antioxidační ochranu u myši v této skupině. Tento trend by bylo možné statisticky zhodnotit na větším počtu skupin. V současné době provádíme další navazující studie, protože v literatuře tato problematika není souhrnně popsána a možnostem interakce ionizujícího a neionizujícího záření verifikovaných antioxidačním enzymem superoxiddismutázou není věnováno mnoho odborných publikací.

ZÁVĚR

Výsledky experimentů navozují řadu otázek, které bude možné zodpovědět teprve dalšími studiemi. Především zda existuje závislost hus-

toty energie a vlnové délky laseru na jeho radio-
protektivním efektu a rovněž nakolik lokální
aplikace laseru má radioprotektivní účinek i na
další orgány.

* Tato práce byla částečně podpořena interní granto-
vou agenturou ZSF JU 901-104-0209.

LITERATURA

ANDERS, J. et al.: Photobiomodulation Improves Cutaneous Wound Healing in an Animal Model of Type II Diabetes. *Photomedicine and Laser Surgery*. August 2004, 22(4): 281–290. doi:10.1089/pho.2004.22.281.
DE WITH, A., GEULICH, K. O.: Wavelength dependence of laser-induced DNA damage in lymphocytes observed by single-cell gel electrophoresis. *J Photochem Photobiol*, 1995. Vol. 30, no 1, s. 71–76.
FREITINGER SKALICKÁ, Z. et al.: The Assessments of the Intracellular Antioxidant Protection of the Organism after LLLT Irradiation. *Laser in med.sci.*, 2008.
GROSSMANN, N. et al.: 780 nm low power diode laser irradiation stimulates proliferation of keratinocyte cultures: involvement of reactive oxygen species. *Lasers Surg Med*. 1998. Vol. 22, no 4, s. 212–218.
GULSOY, M. et al.: The biological effects of 632.8-nm low energy He-Ne laser on peripheral blood mononuclear cells in vitro. *J. of Photochem. and Photobiology B. Biology*, 2006. Vol. 82, no 3, s. 199–202.

HOLEČEK, V.: Volné radikály a antioxidanty. [online], [cit.2009-09-01] Dostupné z: <http://www.o-zdravi.cz/clanky/volne-radikaly-a-antioxidanty-mudr-vaclav-holecek-csc.html>

IHSAN, F. R.: Low-level laser therapy accelerates collateral circulation and enhances microcirculation. *Photomed Laser Surg*. 2005. Vol. 23, no 3, s. 289–294.

LONGO, L.: Postiglione M LASERS the applications continue to emerge. In *Private Hospital Healthcare Europe 2002*, Campden Publishing Ltd., London, 2002. s. 217–218.

SAMOILOVA, K. et al.: Systemic mechanism of anti-inflammatory, immunomodulating, and wound healing effects of visible and infrared light. *Laser in Med. Sci*. 2004.

SIMONIAN, N. V., VOSKANIAN, K. Sh.: Effect of laser radiation and combined ionizing and laser radiation on the cell-division time of bacteria. *Radiobiologia*, 1988, Vol. 28, no 2, s. 262–264.

SIPOSAN, D. G.: An in vitro study of the effect of low-level laser radiation on human blood. In: *Laser Florence*, Florencie, 2003. s 25–27.

SMOL'YANINOVA, N. K. et al.: Effects of He-Ne laser irradiation on chromatin properties and synthesis of nucleic acids in human peripheral blood lymphocytes. *Biomed Sci*, 1991. Vol. 2, no 2, s. 121–126.

SMOL'YANINOVA, N. K., KARU, T. et al.: Effects of He-Ne laser irradiation on chromatin properties and synthesis of nucleic acids in human peripheral blood lymphocytes. *Biomed Sci*. 1991. Feb. 2.

Zuzana Freitinger Skalická et al.
zuzana.skalikova@centrum.cz