

# UNTERSUCHUNGEN DER BIOLOGISCHEN WIRKUNG VON POLARISIERTEM LICHT

TAMARA KUBASOVA<sup>1\*</sup>, MÁRTA FENYÖ<sup>1</sup>, ZOLTÁN SOMOSY<sup>1</sup>, LAJOS GAZSÓ<sup>1</sup> UND IVÁN KERTÉSZ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Frédéric Joliot-Curie Nationales Forschungsinstitut für Radiobiologie und Radiohygiene und <sup>2</sup>Zentrales Forschungsinstitut für Physik, H-1775 Ungarn, Ungarn

(Eingang 21. Januar 1988; Abnahme 25. April 1988)

**Abstract** – Gegenstand der Untersuchung waren die biologischen Wirkungen einer einmaligen und viermaligen Bestrahlung von primären humanen embryonalen Fibroblasten mit polarisiertem Licht der Dichte  $4 \text{ J/cm}^2$  durch eine Halogenlampe. Der Funktionszustand der Plasmamembran wurde mit Hilfe der Techniken zur Bestimmung der Lektinbindung und der Bindung von polykationisiertem Ferritin bestimmt. Es konnte nachgewiesen werden, dass die ConA-Bindung der Zellen sich nicht änderte, während die Anzahl der negativ geladenen Bindungsstellen im Vergleich zu den unbehandelten (Kontroll-) Proben und den mit diffusum (nicht polarisiertem) Licht bestrahlten Zellkulturen in einem signifikanten Ausmaß anstieg. Die mikromorphologischen Untersuchungen ergaben keine ultrastrukturellen Veränderungen. Die quantitative Zunahme der negativen Oberflächenspannungen kann als Hinweis auf die biologischen Wirkungen aufgefasst werden, die polarisiertes Licht auf die Zellmembran ausübt. Der modifizierende Effekt von polarisiertem Licht auf die Überlebensrate von der ionisierenden Bestrahlung ausgesetzten *E. coli* manifestierte sich in einer Abnahme der anoxischen Strahlenempfindlichkeit.

## EINFÜHRUNG

Der Prozess der Wundheilung kann mit kohärentem, polarisiertem Laserlicht positiv beeinflusst werden. Trotz der in zahlreichen Publikationen berichteten positiven klinischen Erfahrungen ist der Mechanismus der biologischen Wirkung von Laserlicht nicht vollständig bekannt (Walker, 1985; Fork, 1971). Es wird angenommen, dass das polarisierte Licht in den Zellmembranen die Ausrichtung der polaren Köpfe des lipiden Bilayers verändert und dass dies funktionale Veränderungen verursacht (Kertész *et al.*, 1982).

In unserem Labor wurde der *in vitro*-Effekt von He-Ne-Laserlicht auf die Zellmembranen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass eine einmalige Laserbestrahlung einer Kultur von primären humanen embryonalen Fibroblasten mit einer Dosis von  $1 \text{ J/cm}^2$  weder zu funktionalen noch mikromorphologischen Veränderungen der Zelloberflächen führte (Kovács *et al.*, 1982). Andererseits induzierte eine wiederholte Laserbestrahlung funktionale Veränderungen in der Zellmembran. So nahm beispielsweise die Bindung von Lektin ab, obwohl die Zellen mikromorphologisch intakt schienen (Kubasova *et al.*, 1984a, 1984b).

Eine der Eigenschaften von Laserlicht - die Polarisation - wird für die Biostimulation verantwortlich gemacht (Fenyö, 1984). Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine polarisiertes Licht ausstrahlende Lichtquelle von inkohärentem Licht – namens EVOLITE - eine ähnliche biostimulierende Wirkung auf lebende Zellen wie Laserlicht ausübt. Trotz der vielen positiven Erfahrungen mit EVOLITE gibt es keine Referenzen zu den beteiligten biologischen Mechanismen. Die vorliegende Arbeit behandelt die Wirkung von polarisiertem Licht mit einer Dosis von  $4 \text{ J/cm}^2$  auf die Plasmamembran von primären humanen embryonalen Fibroblasten.

Die Empfindlichkeit der Zellen für die ionisierende Bestrahlung kann auf verschiedene Arten modifiziert werden: durch physikalische Faktoren (wie Bestrahlungsart oder Temperatur), durch chemische Faktoren (Sensibilisierung und Schutz der Agenzien) und durch biologische oder physiologische Faktoren (Zellzyklusstadium, DNA-Gehalt) (Fenyö, 1984). Bisher sind in Bezug auf die bestrahlungsmodifizierende Wirkung von nicht polarisiertem und polarisiertem Licht noch keine experimentellen Daten verfügbar. In der vorliegenden Arbeit wurde die Überlebensrate von mit polarisiertem Licht vorbehandelten *E. coli* auch nach der Exposition der Bakterien mit  $\gamma$ -Strahlung untersucht.

\* Kontaktperson für Korrespondenz

† *Abkürzungen*: ConA, Concanavalin A, ein Lektin; DRF, Dosisreduktionsfaktor; G, Golgi-Apparat; M, Mitochondrium; N, Nucleus; REM, Rasterelektronenmikroskopie; TEM, Transmissionselektronenmikroskopie; [<sup>3</sup>H]ConA, [<sup>3</sup>H]Concanavalin A.

## MATERIALIEN UND METHODEN

*Zellkulturen aus primären humanen embryonalen Fibroblasten.* Die primären humanen embryonalen Fibroblasten stammten von gesunden, im zweiten oder dritten Monat unterbrochenen Schwangerschaften. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in Petrischalen aus Glas mit einem Durchmesser von 3,5 cm kultiviert. Das Nährmedium bestand aus 2 ml Parker 199-Lösung mit 10%-igem hitzeinaktiviertem Kälberserum von neugeborenen Kälbern. In unseren Untersuchungen wurden 96-h-Zellmonolayer mit polarisiertem und diffusem (nicht polarisiertem) Licht behandelt.

*Bestrahlung von Zellkulturen mit polarisiertem und diffusem Licht.* Die Zellkulturen wurden aus 6,5 cm Entfernung (gemessen zwischen dem Polaroid-Filter und der Zellschicht in den Petrischeiben) mit von einer EVOLITE-Lampe (Westdeutschland, Bild-system AB) emittiertem polarisiertem Licht bestrahlt. Unter diesen Bedingungen wurde die gesamte Oberfläche auf den Petrischeiben dem Lichtstrahl des polarisierten Lichts ausgesetzt. Die Höhe der Nährlösung (ohne Kälberserum) in den Petrischeiben betrug 0,5 cm. Während der Bestrahlung wurden die Abdeckungen entfernt. Die Bestrahlungsdauer betrug 7 Minuten. Bei der höchsten Intensität und Stufe 5 der applizierten Lichtquelle mit polarisiertem Licht war die Bestrahlungsdosis der Oberfläche der Zellkulturen gleich 4 J/cm<sup>2</sup>.

Die Kontrollzellen wurden mit nicht polarisiertem Licht bestrahlt, d. h., mit diffusem Licht derselben Lichtquelle. Um eine gleich hohe Bestrahlungsdosis sicherzustellen, wurde die Lichtquelle 7 Minuten lang ohne Polaroid-Filter mit halber Intensität, Stufe 3, betätigt. Darüber hinaus wurden diese Experimente auch mit unbehandelten Zellkulturen durchgeführt.

*Lektinbindung durch mit polarisiertem und nicht polarisiertem Licht bestrahlte humane Fibroblasten.* Beide bestrahlten Zellkulturen (mit polarisiertem und nicht polarisiertem Licht) und die Kontrollzellkulturen wurden bei Raumtemperatur 10 Minuten lang mit einem radioaktiven Lektin markiert, nämlich mit [<sup>3</sup>H]Concanavalin A ([<sup>3</sup>H]ConA)<sup>†</sup>: Concanavalin A, [<sup>3</sup>H(g)]-, Net-491, spezifische Radioaktivität 50,0 Ci/mmol, New England Nuclear, Boston, MA. In jede Petrischale wurden 0,5 ml physiologische Kochsalzlösung mit 0,5 µCi [<sup>3</sup>H]ConA gefüllt, anschließend wurde das nicht gebundene Lektin mehrfach gespült. Die Bestimmung der Lektinbindung erfolgte unmittelbar, 30 Minuten und 120 Minuten nach der Lichtbehandlung. Die gebundene Radioaktivität wurde mit einem Flüssigkeitsszintillationsspektrometer gemessen, und die Ergebnisse wurden als Prozentwert der Werte für die unbehandelten Kontrollkulturen ausgedrückt. Jedes Experiment wurde in verschiedenen Anordnungen durchgeführt, und es erfolgten jeweils drei parallele Messungen.

*Bindung von kationisiertem Ferritin durch mit polarisiertem und nicht polarisiertem Licht bestrahlte humane Fibroblasten.* Die Veränderungen an der Oberflächenspannung der Zellmembran wurden mit Hilfe von polykationisiertem Ferritin (Sigma, St. Louis, MO) (Danon *et al.*, 1972) in einer Endkonzentration von 0,3 mg/ml untersucht. Die Zellen wurden bei Raumtemperatur 1 Minute lang versetzt. Das nicht gebundene Ferritin wurde durch wiederholte Spülung entfernt, und die Zellen wurden zur Raster- und Transmissionselektronenmikroskopie präpariert.

*Elektronenmikroskopie.* Die während der mikromorphologischen Untersuchungen angewendeten und mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) und Rasterelektronenmikroskopie (REM) durchgeführten Methoden sind in Kubasova *et al.* (1984b) beschrieben.

*Modifizierung der Wirkung von polarisiertem Licht auf die Strahlenempfindlichkeit.* In flüssigem Minimalmedium wurden *Escherichia coli* B (r6ATCC Nr. 23227), fortan *E. coli*, bis zum Erreichen der unbeweglichen Phase gezüchtet. Die Zellen wurden drei Mal durch Zentrifugierung gewaschen und bei 10<sup>7</sup>/ml erneut in Puffer suspendiert (Ewig, 1983). Vor der Exposition mit γ-Strahlen wurde die Suspension 10 Minuten lang mit polarisiertem Licht bestrahlt (7 cm). Die γ-Bestrahlung erfolgte mit dem Apparat RH-γ-30 <sup>60</sup>CO mit einer Dosisrate von 67,05 Gy/min. Die Überlebenskurven wurden auf der Grundlage von vier experimentellen Punkten konstruiert. Diese Kurven wiesen eine lineare Form auf und lassen sich durch den folgenden Ausdruck beschreiben (Powers *et al.*, 1959; Alper, 1960):

$$\ln S/S_0 = \ln n - kD$$

wobei *S* die Anzahl der bei Dosis *D* überlebenden Zellen, *S*<sub>0</sub> die ursprüngliche Anzahl von Zellen und *k* das als Inaktivierungskonstante bezeichnete Gefälle der Kurve ist. *n* wird als Extrapolationszahl bezeichnet.

Suspensionen mit 10<sup>7</sup> lebensfähigen Zellen wurden vor Beginn der Bestrahlung 15 Minuten lang mit Nitrogen und Luft über der brodelnden Suspension äquilibriert. Das Gas brodelte während der gesamten γ-Bestrahlung weiter.

## ERGEBNISSE

### [<sup>3</sup>H]ConA-Bindung

Der Funktionszustand der Plasmamembran von humanen Fibroblasten unter dem Einfluss der Wirkung von polarisiertem und nicht polarisiertem Licht wurde in den 2 h nach der Bestrahlung mit Hilfe der Technik der Bestimmung der Lektinbindung verfolgt. Es zeigte sich, dass weder die einmalige noch die viermalige Exposition die Fähigkeit der Zellen zur Lektinbindung veränderte (Abb. 1A, 1B). Die Bindung von [<sup>3</sup>H]ConA an die Mannose-Glucose-Gruppen auf den Zelloberflächen wurde weder von polarisiertem noch von nicht polarisiertem Licht beeinflusst, wie der Vergleich mit den nicht behandelten Kontrollfibroblasten zeigt.

|                     |                          |
|---------------------|--------------------------|
| as % of control     | als % der Kontrollgruppe |
| Time after exposure | Zeit nach Exposition     |

Abb. 1. [<sup>3</sup>H]ConA-Bindung von mit polarisiertem und diffusem Licht der Energiedichte 4 J/cm<sup>2</sup> behandelten primären humanen embryonalen Fibroblasten. (A) einmalige Exposition, (B) viermalige Exposition. Es wurde keine signifikante Differenz in der Fähigkeit zur Lektinbindung von behandelten und nicht behandelten Proben beobachtet.

#### *Bindung von kationisiertem Ferritin*

Zwischen der Bestrahlung mit polarisiertem und nicht polarisiertem Licht lässt sich ein eindeutiger Unterschied nachweisen.

Die Akkumulation von negativen Oberflächenspannungen 30 Minuten nach der einmaligen Bestrahlung mit polarisiertem Licht war signifikant (Abb. 2). Im Gegensatz zur Kontrollprobe (Abb. 2A) war das polykationisierte Ferritin gleichmäßig in kleinen Gruppen an die Zellmembran gebunden (Abb. 2B), und dieses Phänomen dauerte auch nach 2 h an.

Auch die Behandlung der Zellkulturen mit diffusem Licht erhöhte die Bindung von polykationisiertem Ferritin (Abb. 2C). Doch die Anzahl der negativ gebundenen Bindungsstellen war signifikant niedriger als diejenige der polarisiertem Licht ausgesetzten, und zwar sowohl nach 30 als auch nach 120 Minuten.

#### *Morphologische Bewertung*

Die ultrastrukturellen Untersuchungen an Fibroblasten ergaben keine signifikante Abweichung zwischen der unbehandelten Kontrollkultur (Abb. 3A) und den mit polarisiertem (Abb. 3B) und diffusem (Abb. 3C) Licht bestrahlten Zellkulturen.

Bei der mikromorphologischen Untersuchung der Zelloberflächen mit Hilfe der REM ließ sich keine auffällige Veränderung des mikromorphologischen Aussehens zwischen mit polarisiertem Licht behandelten Fibroblasten (Abb. 4B) und den nicht bestrahlten Kontrollfibroblasten (Abb. 4A) feststellen.

#### *Modifizierung der Wirkung von polarisiertem Licht auf die Überlebensrate von $\gamma$ -bestrahlten E. coli*

Bei der Vorbehandlung der Zellen mit polarisiertem Licht war der anoxische  $k$ -Wert gleich  $7,63 \text{ Gy}^{-1} \times 10^{-4}$ ; ohne Lichtbestrahlung beträgt die durchschnittliche Inaktivierungskonstante  $9,55 \text{ Gy}^{-1} \times 10^{-4}$  (Abb. 5). Das bedeutet, dass eine Vorbehandlung mit polarisiertem Licht die anoxische  $\gamma$ -Strahlenempfindlichkeit um einen DRF (Dosisreduktionsfaktor) von 1,25 reduziert. Ähnliche Experimente wurden mit Luft als äquilibrierendem Gas durchgeführt. In diesem Fall wurde kein Unterschied zwischen der Strahlenempfindlichkeit der mit polarisiertem Licht vorbehandelten Zellen und der Kontrollzellen festgestellt.

Abb. 2. Bindung von kationisiertem Ferritin durch primäre humane embryonale Fibroblasten. (A) Unbehandelte Kontrollzellen, (B) 30 Minuten nach der Bestrahlung der Zellen mit polarisiertem Licht der Dichte 4 J/cm<sup>2</sup>, (C) 30 Minuten nach der Bestrahlung der Zellen mit diffusem Licht der Dichte 4 J/cm<sup>2</sup>. Vergrößerung: Maßstabsbalken = 0,1  $\mu\text{m}$ .

### DISKUSSION

Biophysikalische Modellexperimente haben die Sättigung der durch polarisiertes Licht induzierten biostimulierenden Wirkung bei einer Dosis von 4 J/cm<sup>2</sup> gezeigt. Aus diesem Grund wählten wir diese Dosis für unsere Experimente an lebenden Zellen.

Die biologische Wirkung von polarisiertem Licht auf primäre humane embryonale Fibroblasten wurde mit Hilfe von Techniken untersucht, die auf sensible Weise die Neuordnung der Plasmamembranen, namentlich der Bindung von Lektin und polykationisiertem Ferritin, anzeigen. Außerdem wurde die Überlebensrate von mit polarisiertem Licht vorbehandelten *E. coli* nach der  $\gamma$ -Bestrahlung der Bakterien bestimmt. Es zeigte sich, dass eine einmalige oder viermalige Exposition mit einer Dosis von 4 J/cm<sup>2</sup> keinen Einfluss auf die Fähigkeit der Zellen zur Lektinbindung hatte, während die signifikante Zunahme der Anzahl von negativ geladenen Bindungsstellen auf den Zelloberflächen einen unzweideutigen Beweis für das Ansprechen der Zellmembran auf die Exposition darstellt. Ähnliche Ergebnisse erzielten wir in unseren mit Laserstrahlen durchgeführten Experimenten: Eine einmalige Bestrahlung von primären humanen embryonalen Fibroblasten mit einem He-Ne-Laser mit 1 J/cm<sup>2</sup> induzierte keine signifikanten Änderungen der Menge des an die Zellmembran gebundenen [<sup>3</sup>H]ConA. Die viermalige Behandlung in 24-h-Intervallen führte jedoch zu einem Rückgang der Lektinbindung

und einer quantitativen Zunahme der negativen Oberflächenspannungen auf der Zellmembran (Kovács *et al.*, 1982; Kubasova *et al.*, 1984a, 1984b).

Abb. 3. Ultrastruktur von primären humanen embryonalen Fibroblasten. (A) Unbehandelte Kontrollprobe. (B) 30 Minuten nach der Bestrahlung der Zellen mit polarisiertem Licht der Dichte 4 J/cm<sup>2</sup>, (C) 30 Minuten nach der Bestrahlung der Zellen mit diffusem Licht der Dichte 4 J/cm<sup>2</sup>. G: Golgi-Apparat, N: Nucleus, M: Mitochondria. Vergrößerung: Maßstabbalken = 0,2 µm.

Abb. 4. Rasterelektronenmikroskopie von primären humanen embryonalen Fibroblasten. (A) Unbehandelte Kontrollprobe, (B) 30 Minuten nach der Bestrahlung mit polarisiertem Licht der Dichte 4 J/cm<sup>2</sup>. Vergrößerung: Maßstabbalken = 1 µm.

|  |  |
|--|--|
| SURVIVING FRACTION (S/S <sub>0</sub> )         | ÜBERLEBENDER ANTEIL (S/S <sub>0</sub> )    |
| DOSE (Gy)                                      | DOSIS (Gy)                                 |
| NITROGEN RESPONSE                              | NITROGENREAKTION                           |
| IRRADIATED WITH EVOLITE BEFORE GAMMA TREATMENT | VOR GAMMA-BEHANDLUNG MIT EVOLITE BESTRAHLT |

Abb. 5. Die Kurve der Dosisreaktion von unter anoxischen Bedingungen bestrahlten *E. coli*.

Nicht polarisiertes Licht wird zwar für eine Reihe von biologischen Wirkungen verantwortlich gemacht (Boder *et al.*, 1983), die Anzahl der negativ geladenen Bindungsstellen von mit diffusem Licht bestrahlten Zellen stieg jedoch im Vergleich zu unbehandelten Fibroblasten nur in einem nicht signifikanten Umfang. Die durch polarisiertes Licht verursachten funktionalen Änderungen der Plasmamembran traten im Vergleich zu diffusem Licht in deutlich höherem Ausmaß auf. So liefern der Anstieg der Anzahl von negativ geladenen Bindungsstellen auf der Zelloberfläche von humanen Fibroblasten sowie der modifizierende Effekt, den polarisiertes Licht auf die Strahlenempfindlichkeit von *E. coli* ausübt, zum Teil die Erklärung für die Beteiligung der Zellmembran am bereits nachgewiesenen biostimulierenden Prozess.

#### SCHLUSSFOLGERUNGEN

Es wurde die These aufgestellt, dass die durch polarisiertes Licht induzierten und in der klinischen Praxis (Chirurgie, Rheumatologie) festgestellten positiven Heilungseffekte in erster Linie auf Veränderungen in der Zellmembran zurückzuführen sind.

*Danksagungen* – Die Autoren möchten Professor Dr. L. B. Sztanyik, Generaldirektor des Nationalen Forschungsinstitut für Radiobiologie und Radiohygiene "Frédéric Joliot-Curie", und Dr. G. J. Köteles, Generaldirektor der wissenschaftlichen Abteilung desselben Instituts, für ihr Interesse und ihre Unterstützung danken. Die wertvolle technische Unterstützung von Frau E. Hrisztodulakis und Frau E. Fodor sei an dieser Stelle auch hervorgehoben.

#### LITERATURANGABEN