

## **ИН ВИТРО ЕФЕКТИ НА ДИОДЕН ЛАЗЕР (810 NM). ДОЗИМЕТРИЯ.**

Мария Мутафчиева<sup>1</sup>, Милена Драганова-Филипова<sup>2</sup>, Пламен Загорчев<sup>3</sup>,  
Георги Томов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Катедра Пародонтология и ЗОЛ, ФДМ, МУ-Пловдив

<sup>2</sup>Катедра Медицинска Биология, МФ, МУ-Пловдив

<sup>3</sup>Катедра по Медицинска Физика и биофизика, МФ, МУ-Пловдив

## ***IN VITRO* EFFECTS OF DIODE LASER (810 NM). DOSIMETRY.**

### **ВЪВЕДЕНИЕ**

Лекарят по дентална медицина е изправен пред нелеката задача да се грижи и опази оралното здраве на своите пациенти. Това задължение изисква познания, простиращи се далеч над учението за лечение на твърдите зъбни тъкани и зъбодържачия апарат. Изява в устаната кухня могат да дадат редица системни заболявания; орални лезии могат да бъдат част от симптомо-комплекса на тежки дерматостоматити, алергични и лекарствени реакции. Лигавичната патология често бива подценявана, а методите на лечение непознавани от денталните специалисти.

Съвременен подход в терапията на редица нозологични единици разкрива лазерната дентална медицина. Все повече колеги разполагат и прилагат в практиката си както високо- така и нискоинтензивни лазери. Мекотъканната лазеристика може да бъде разделена условно на лазерасистирана хирургия, свързана с отнемане на тъкани и неинвазивна лазерна биомодулация. И докато за нуждите на оралната хирургия се прилагат основно високоинтензивни лазери (CO<sub>2</sub>, Er:YAG; Nd:YAG) с предвидими резултати, то неизвестните в полето на лазерната биомодулация са многобройни.

Възможността за нетермално, недеструктивно повлияване на клетъчната функция лежи в основата на т.нар. нискоинтензивна лазерна терапия (НИЛТ). Редица научни изследвания потвърждават болкоуспокояващия, противовъзпалителен, регенеративен и други ефекти на този вид лъчение (1). В допълнение НИЛТ осигурява неинвазивно, стерилно и безболезнено лечение. В резултат на гореизложеното, лазерната биомодулация намира широко приложение в оралната медицина за повлияване на болкова симптоматика при постхерпетична невралгия, постхирургична чувствителност, възпалителни

заболявания като гингивит, синусит и др, както и в лечението на ерозивно-язвените заболявания на устната кухина като лихен планус, пемфигус, пемфигоид, хроничен улцеративен стоматит и др, ускорявайки оздравителните процеси в тъканите (1).

Публикуваните в литературата противоречиви резултати относно ефективността на НИЛТ могат да бъдат обяснени с големия брой параметри, обуславящи ефектите на биомодулация, като дължина на вълната, мощност, интензитет, време на облъчване, брой и последователност на сеансите, терапевтичен подход (с или без фотоатрактант). На практика, класическата НИЛТ се осъществява с лазери, излъчващи в оптичния диапазон 600-950 nm, с енергийни стойности по-ниски от тези необходими за загряване на тъканите. Сред най-често използваните устройства са He-Ne- и диодни лазери (1). Основното затруднение при провеждане на биостимулираща терапия произхожда от необходимостта за въвеждане на оптимални параметри според търсения ефект.

Ето защо целта на настоящето изследване е да се проучат *in vitro* ефектите на нискоинтензивната терапия с диоден лазер (810nm) върху виталността и секреторната активност на периферни мононуклеарни клетки и фибробластна клетъчна линия при различни параметри. Познаването на дозиметрията при този вид терапия ще подпомогне клиницистите при изготвянето на индивидуален клиничен протокол според нозологичната единица.

#### МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ НА ИЗСЛЕДВАНЕ

Как различните параметри на устройството повлияват противовъзпалителната активност на лазерното лъчение се установява в експериментална постановка, в която като материал на изследване са използвани безсерумни лимфоцитни клетъчни култури (PBMC), изолирани от венозна кръв от 12 здрави донори, всички подписали декларация за информирано съгласие. Проучването е одобрено от Етичната комисия на МУ-Пловдив с протокол №1/19.05.2011г.

За стимулиране на цитокиновата секреция клетките се третират с липополизахарид (LPS), който се добавя в хранителната среда непосредствено преди обработването с лазер. След облъчване клетките се инкубират при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> за 24 часа. Цитокиновата секреция на IL 1-β, IL-6 и IL-10 се отчита чрез ELISA – техника.

За определяне влиянието на различни параметри на НИЛТ върху преживяемостта и пролиферативната активност на фибробласти е използвана клетъчна линия McCoy-Plovdiv. Клетките се култивират в безсерумна

хранителна среда Ham's F-12 (Sigma-Aldrich) и DMEM (Sigma-Aldrich) в съотношение 1:1 с добавка на 100 U/ml penicillin и 100 mg/ml streptomycin. След достигане на монослой, клетките се третират с лазер с посочените параметри и се отглеждат за още 24 часа в инкубатор Heraeus (Germany) на 37° C, при 5% CO<sub>2</sub> и висока влажност. След изтичане на времето на инкубация се провежда МТТ-тест за определяне на клетъчна виталност.

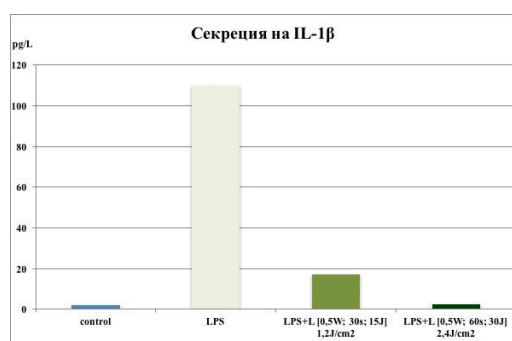
За целите на изследването е пресъздадена следната експериментална постановка: използван е диоден лазер "Syneron" с дължина на вълната 810nm. Сондата на лазера, с площ на излъчваното петно – 12,5 cm<sup>2</sup>, е фиксирана на статив на отстояние 2 мм, перпендикулярно на 96 ямковата плака, като всяка ямка се третира отделно. Използваните в задачата параметри са непрекъснат режим (CW); 0,5W за 30s и 60s за PBMC и CW; 0,1W, 0,5W и 1W, съответно за 30, 60 и 120s за Mc Coy - Plovdiv фибробластна клетъчна линия.

При нормално разпределение на резултатите се използва параметричният t-test за определяне на статистически значимата разлика в средните величини в групите при ниво на значимост P < 0,05.

## РЕЗУЛТАТИ

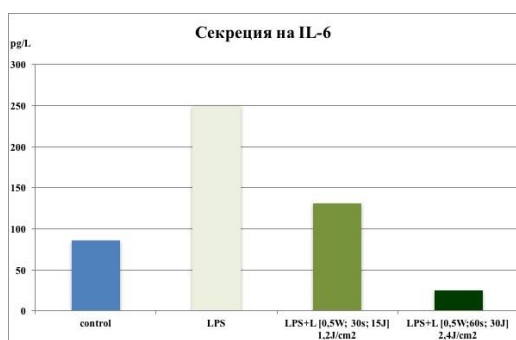
Влияние на НИЛТ върху секреторната активност на стимулирани с липополизахарид периферни мононуклеарни клетки (PBMC):

В третираните с LPS клетки секрецията на IL-1 $\beta$  рязко се покачва в сравнение със същата в контролните (нетретираните) клетки. Количеството секретирани цитокин достига 109 pg/ml. Лазерното лъчение с параметри 0,5W/30s; 1,2 J/cm<sup>2</sup> понижава нивата на IL-1 $\beta$  до 17 pg/ml, а дозата от 0,5W/60s; 2,4J/cm<sup>2</sup> инхибира секрецията почти до контролни стойности – 2,5 pg/ml (Фигура 1)



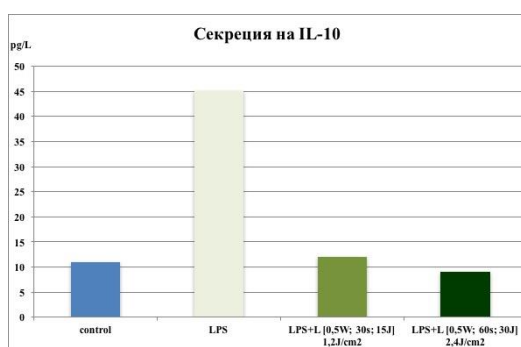
Фигура 1. Секреция на IL-1 $\beta$  след въздействие с лазер върху LPS стимулирани клетки.

След третиране с LPS секретцията на IL-6 от PBMC се покачва значимо в сравнение с тази в контролните (нетретираните) клетки и достига 249 pg/ml. Въздействието с лазер с параметри 0,5W/30s; 1,2J/cm<sup>2</sup> понижава секретцията до 131pg/ml, а дозата 0,5W/60s; 2,4J/cm<sup>2</sup> инхибира секреторния потенциал на лимфоцитите дори под контролни стойности – 25 pg/ml, срещу 86 pg/ml в контролите (Фигура 2).



Фигура 2. Секретция на IL-6 след въздействие с лазер върху LPS стимулирани клетки.

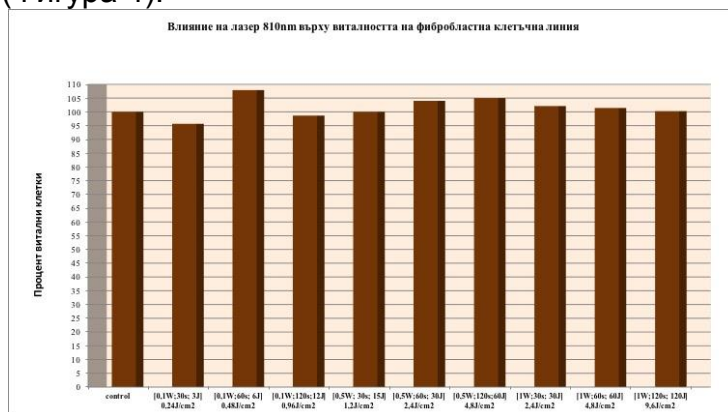
IL-10 в контролните нетретираните клетки е 10,9 pg/ml. Бактериалният ендотоксин увеличава нивата на цитокина до 45 pg/ml, а нарастващите дози лазерно лъчение понижава тази индуцирана секретция съответно – 0,5W/30s до 12 pg/ml, а 0,5W/60s - до 9 pg/ml (Фигура 3).



Фигура 3. Секретция на IL-10 след въздействие с лазер върху LPS стимулирани клетки.

Влияние на НИЛТ върху виталността и пролиферативната способност на човешка фибробластна клетъчна линия.

Лъчението с диоден лазер (810nm) при анализирани параметри няма токсичен ефект и не променя виталността на фибробластните клетки. Енергийните стойности от  $0,24\text{J}/\text{cm}^2$  (0,1W;30s) и  $0,96\text{J}/\text{cm}^2$  (0,1W;120s) понижават процента живи клетки съответно до 95,6% и 98,6%. Минимален пролиферативен ефект е налице при лъчение с параметри  $0,48\text{J}/\text{cm}^2$  (0,1W/60s/6J) – 107,93%;  $2,4\text{J}/\text{cm}^2$  (0,5W/60s/30J) – 104%;  $4,8\text{J}/\text{cm}^2$  (0,5W/120s/60J) – 105%;  $2,4\text{J}/\text{cm}^2$  (1W/30s/30J) – 102,13%;  $4,8\text{J}/\text{cm}^2$  (1W/60s/60J) – 101,41% и  $9,6\text{J}/\text{cm}^2$  (1W/120s/120J) – 100,25%. Не се установява статистически значима разлика в процента витални клетки между групите третирани с различни параметри на НИЛТ, както и между тях и контролната, нетретирана група (Фигура 4).



Фигура 4. Влияние на лазер 810nm върху виталността на фибробластна клетъчна линия

## ДИСКУСИЯ

Възпалението е първата защитна реакция на организма, отключваща се в отговор на травматично увреждане на тъканите или под действието на различни патогенни фактори. То е абсолютно необходимо при оздравяването на рани и в борбата на организма срещу инфекциозни агенти. Когато обаче увреждащият причинител персистира, отделящите се в хода на възпалението медиатори, цитокини, растежни фактори и т.н., задействат каскада от имунни реакции, причиняващи тъканна деструкция, отключващи автоимунни и/или малигнени заболявания.

Нискоинтензивното лазерно лъчение е с доказано противовъзпалително действие (1, 2). Сред ефектите на този вид терапия върху имунните клетки се посочват способността за повишаване на фагоцитната и хемотаксисната активност на лимфоцити, индуциране на промени в ядрения хроматин на

PBMS, промотира функцията на макрофагите (1), модулира секрецията на цитокини (3). НИЛТ е неселективна, повлиявайки отделни фази на възпалителния процес, тя намира приложение при лечението на многообразна патология - от травматични увреждания, през най-често срещаните възпалителни процеси в устната кухина като гингивити, пародонтити, алвеолити и др, до тежки хронични състояния с имунна генеза като лихен планус.

Резултатите от ELISA-теста показват, че НИЛТ в нарастващи дози потиска секрецията на всички анализирани цитокини. Понижените нива на IL-1 $\beta$ , IL-6 и IL-10 след третиране определят потенциала на това лъчение да поддържа баланс между про- и анти-инфламаторните цитокини и да модулират имунния отговор.

От фигури 1, 2 и 3 ясно се вижда, че по-значима редукция в секрецията на IL-1 $\beta$ , IL-6 и IL-10 се постига при третиране с 0,5W/60s и сумарна доза 30J (2,4J/cm<sup>2</sup>).

Основен дял в лигавичната патология касае лезиите с нарушена цялост, оформящи групата на ерозивно-язвените заболявания. Силната болка и възможността за наслагване на вторична инфекция определят необходимостта от провеждане на терапия, повлияваща симптоматиката и ускоряваща регенерацията.

НИЛТ от своя страна е с доказана ефективност в ускоряване заздравяването на рани (1,4), повлиявайки и трите фази на този процес (проинфламаторна, вазоактивна фаза на възпаление; пролиферативна фаза и фаза на ремоделация) (4). Хистологично изследване на третирани с лазер раневи повърхности демонстрира оптимизиране на епителизацията, клетъчното съдържание, формацията на грануляционна тъкан и депозита на колаген (5). В допълнение, проведен биохимичен анализ разкрива значимо увеличаване на общото количество колаген при едновременно редуциране на съдържанието на пепсин разтворим колаген, което определя повишена резистентност към протеолитично разграждане (6).

Основна роля в поддържане интегритета на съединителната тъкан и осъществяване на репаративните процеси при нараняване изпълняват фибробластите и техните екстрацелуларни матриксни продукти. Биостимулиращите ефекти на НИЛТ върху тези клетки се изразяват в ускоряване пролиферацията, матурацията и придвижването, както и трансформацията им в миофибробласти - основни виновници за контракцията на раневите ръбове (1,4). Докладвани са и въздействия върху секреторната активност на фибробластите, изразяващи се в редуциране на продукцията на проинфламаторния простагландин E<sub>2</sub> и повишаване секрецията на фибробласт-растежен фактор bFGF (1,4). В противоречие, други автори не откриват значима разлика във фибробластната пролиферация, колагеновата биосинтеза, клетъчната миграция и хемотаксис при третиране със следните дължини на вълната -632,8; 647; 790; 830nm (7,8). Според Lucio Frigo и

колектив противоречивите резултати в литературата могат да бъдат обяснени с прилагането на неоптимални дози лъчение (9).

Известно е, че ефектите на НИЛТ са подчинени на т.нар. “двуфазов дозов отговор”, при който ниските дози на енергия (2 J/cm<sup>2</sup>) стимулират биологичните процеси, а високите (над 16 J/cm<sup>2</sup>) ги инхибират (1). След обзор на данните в литературата Lucio Frigo и колектив определят енергийния диапазон между 0,2 J/cm<sup>2</sup> и 4 J/cm<sup>2</sup> като оптимален за постигане ефектите на биостимулация (9).

В настоящата задача е изследвано *in vitro* въздействието на диоден лазер с дължина на вълната 810nm върху човешка фибробластна клетъчна линия при различни параметри.

Резултатите от проведения МТТ-тест показват, че третирането с лазер няма токсичен ефект и не променя виталността на клетките. Установява се минимално понижаване в процента на живите клетки, без да е налице статистически значима разлика с контролната, нетретирана група.

Установеният в задачата, макар и минимален пролиферативен ефект, потвърждава стимулиращото действие на НИЛТ върху фибробластна клетъчна култура и съвпадат с тези на повечето изследователи (1). В подкрепа на феномена за “двуфазов дозов отговор” най-висок процент клетки (107,93%) е измерен в ямките, третирани с ниска енергийна доза - 6J (0,48J/cm<sup>2</sup>).

Прави впечатление, че при една и съща сумарна енергийна стойност 30J и 60J, получени при комбиниране на различни мощност и времетраене, съответно 0,5W/60s и 1W/30s за 30J и 0,5W/120s и 1W/60s за 60J се постига различен пролиферативен ефект. Характерно за НИЛТ е прилагането на ниска изходна мощност, в порядъка на 10-50 миливата (4). За посочените сумарни дози 30J (0,5W/60s – 104%; 1W/30s – 102,13%) и 60J (0,5W/120s – 105%; 1W/60s – 101,41%) по-висок е процентът на клетките в групите, третирани с по-ниската (0,5W) от двете мощности. Едновременно с това, в групите с приложена мощност от 1 W се установява тенденция към понижаване на пролиферацията при увеличаване на времето, съответно общото количество енергия. Тези данни са в подкрепа на схващането, че всеки един от параметрите при дозиметрирането на лечебния протокол е от значение за наблюдавания краен ефект от терапията.

В обобщение, жизнеспособността на клетките се запазва при всички приложени и анализирани в задачата параметри, определяйки ги като безопасни за клинично приложение. Според получените в настоящето изследване резултати, пролиферацията на фибробластните клетки, обуславящи регенеративния потенциал на НИЛТ, изисква прилагане на по-ниска мощност, съответно по-ниска сумарна енергия в сравнение с тези необходими за постигане на оптимален противовъзпалителен ефект.

#### Заклучение

НИЛТ е съвременна и обещаваща терапевтична модалност за пациентите с лигавична патология, повлиявайки възпалението и ускорявайки

оздравителния процес. Познаването на дозиметрията при работа с лазерното устройство е от решаващо значение за постигане ефектите на биостимулация според конкретния клиничен казус.

#### КНИГОПИС

1. Walsh L.J. The current status of low level laser therapy in dentistry. Part 1. Soft tissue applications. Australian Dental Journal. 1997;42:247-254
2. Pavlic V; Vujic-Aleksic V. Phototherapy approaches in treatment of oral lichen planus. Photodermatol Photoimmunol Photomed. 2014; 30: 15–24
3. Esmaeelinejad M, Bayat M. Effect of low-level laser therapy on the release of interleukin-6 and basic fibroblast growth factor from cultured human skin fibroblasts in normal and high glucose mediums. J Cosmet Laser Ther. 2013 Dec;15(6):310-7
4. Walsh LJ. LOW LEVEL LASER THERAPY  
file:///Users/petaruzunov/Downloads/LLLT%20introduction%20(3).pdf
5. Lyons RF, Abergel RP, White RA, Dwyer RM, Castel JC, Uitto J. Biostimulation of wound healing in vivo by a helium-neon laser. Ann Plast Surg. 1987;18(1):47-50.
6. Reddy GK, Stehno-Bittel L, Enwemeka CS. Laser photostimulation accelerates wound healing in diabetic rats. Wound Repair Regen. 2001;9:248-255.
7. Gabbiani G, Hirschel BJ, Ryan GB, Statkov PR, Majno G. Granulation tissue as a contractile organ. J Exp Med 1972;135:719–734.
8. Gabbiani G. Modulation of fibroblastic cytoskeletal features during wound healing and fibrosis. Pathol Res Pract 1994;190:851–853.
9. Frigo L, Fávero GM, Lima HJ, Maria DA, Bjordal JM, Joensen J, Iversen VV, Marcos RL, Parizzoto NA, Lopes-Martins RA. Low-level laser irradiation (InGaAlP-660 nm) increases fibroblast cell proliferation and reduces cell death in a dose-dependent manner. Photomed Laser Surg. 2010; 28 Suppl 1: 151-156