Svetlobna terapija: biološke in fizikalne osnove

Erik Margan, Institut Jožef Stefan
Rebeka Strgar, Slovensko združenje za fotomedicino in fotobiologijo
Igor Frangež, dr. med., Univerzitetni klinični center, Ljubljana

Uvod

Razvoj polprevodniških svetlobnih virov (LASER, LED) v zadnjih dveh desetletjih je s cenovno dostopnostjo, povečano specifično močjo in široko izbiro omogočil tudi razvoj naprav namenjenih svetlobni terapiji in sprožil množično uporabo svetlobe v medicini v raziskovalne in terapevtske namene, bodisi samostojno, ali kot dodatek uveljavljenim načinom zdravljenja. Obstajajo številne indikacije o statistično značilnih pozitivnih rezultatih, med zaželene lastnosti pa lahko prištejemo neinvazivnost, preprosto uporabo, ter odsotnost hujših stranskih učinkov. Vendar je metoda še vedno v razvojni fazi in zahteva poglobljeno preučevanje in premišljeno uporabo. Podali bomo kratek pregled dosedanjih dognanj možnih načinov vpliva svetlobe na biološke procese in skušali širše osvetliti temeljne fizikalne zakonitosti na katerih slonijo energijske interakcije med svetlobo in biološko snovjo.

O svetlobni terapiji nasploh

Uporaba svetlobe v terapevtske namene je v preteklosti bila znana predvsem kot helio-terapija. Ugodne učinke izpostavljanju sončni svetlobi so opazili že pred tisočletji. Zlasti primerno je izpostavljanje svetlobi v zgodnjih jutranjih in poznih popoldanskih ura, ko zemeljsko ozračje zmanjša količino sevanja v modrem in UV delu spektra ter omeji termične učinke. Znana pa so tudi nekatera bolezenska stanja, ki povzročajo preobčutljivost ali celo alergične reakcije na svetlobo (zlasti v modrem delu spektra).

Vendar je šele najnovejši razvoj tehnologije omogočil izdelavo takih virov, ki imajo razmeroma ozek in natančno določen sevalni spekter. S tem se je pojavila možnost eksperimentiranja in ugotavljanja tistih specifičnih delov spektra, kjer je terapevtski učinek najbolj ustrezen. Ob vsestranskem razvoju znanosti, ki mu je sledilo natančneje poznavanje celične zgradbe in metabolizma vse do molekularne ravni [1–6], je postalo mogoče določiti številne biološke procese, ki jih svetloba močno pospeši.

Žal so še vedno mnoge klinične raziskave izvedene kot splošne statistične študije, brez poglabljanja v podrobnosti celičnega metabolizma. Zato ne čudi da v strokovni literaturi najdemo tako pozitivna kot negativna mnenja o učinkovitosti svetlobne terapije. Namen tega prispevka je predvsem v poglabljanju razumevanja bio-kemičnega in fizikalnega ozadja celičnih procesov in vpogledu v možnosti ki jih v te namene nudi sodobna tehnika.

Uporabo svetlobe v medicini je mogoče v grobem razdeliti na tri poglavitne metode. Ena je v uporabi posebnih foto-občutljivih snovi, ki jih vnesemo v telo in nato s svetlobo aktiviramo, ter tako lokalno sprostimo zdravilne sestavine vnesene snovi („foto-dinamična terapija“). Druga je v uporabi svetlobe kot dodatne učinkovine k standardnim metodam zdravljenja. Tretja pa je samostojna uporaba svetlobe kot edinega terapevtskega sredstva. Mogoče je seveda tudi kombiniranje teh metod v posameznih fazah zdravljenja.

Uporaba svetlobe pri celjenju ran

Celjenje ran je le eno izmed mnogih področij uporabe svetlobne terapije, kjer je problematika dokaj specifična [15]. Številne študije so že bile opravljene tako na laboratorijskih živalih kot tudi klinično. V tem prispevku bomo le omenili nekatere biokemične procese, ki jiih je mogoče z ustreznim obsevanjem pospešiti. Več poudarka bo na posebnostih, ki se nanašajo na uporabo svetlobnih virov z ozirom na njihove optične in tehnične parametre.

Oceno uspešnosti celjenja ran je mogoče podati tako na osnovi objektivnih parametrov (hitrost celjenja, pojav morebitnih komplikacij, ostanek brazgotin, itd.), kot tudi subjektivnih (zlasti občutek bolečine). Vendar individualna odstopanja igrajo precejšno vlogo pri statistični obdelavi. Nekoliko bolj zanesljive so ocene dobljene v primerih, ko znana bolezenska stanja delujejo zaviralno na potek celjenja. Tako številne študije ugotavljajo značilno izboljšanje v hitrosti celjenja ran ob uporabi svetlobne terapije pri pacientih s diabetesom. Ugotavljajo tudi izboljšanje odpornosti na mehanske obremenitve v krajšem času kot v kontrolnih skupinah. Značilno se poveča tudi produkcija kolagena.

Razlikujemo tri faze v procesu celjenja: začetno fazo, v kateri dominirajo vnetni procesi in reakcije na poškodbo, vmesno fazo, v kateri prihaja do zaraščanja poškodovane površine tkiva, ter zaključno fazo, v kateri prihaja do zapiranja in zaraščanja rane. V vsaki od teh faz najdemo procese ki jih je mogoče s svetlobo spodbujati, bodisi da gre za primarne energijske reakcije na molekularni ravni, bodisi sekundarne reakcije, ki so posledica primarnih in pri katerih primarni produkti spodbujajo produkcijo sekundarnih produktov, oziroma služijo kot njihovi gradniki.

Ugodne učinke svetlobne terapije je mogoče razložiti ob upoštevanju dobro znanih bioloških mehanizmov celičnega metabolizma in medcelične signalizacije, vključno z induciranim izražanjem citokinov in faktorjev rasti. V mnogih raziskavah ugotavljajo povečano proizvodnjo proteinov in mRNA ravni interlekuinov IL-1α in IL-8 v keratinocitih (citokini odgovorni za začetno vnetno fazo celjenja ran) kot odziva na obsevanje z rdečo svetlobo. Ravno tako ugotavljajo spodbujanje citokinov ki pogojujejo razmnoževanje in razširjanje fibroblastov (basic fibroblast growth fatcor bFGF, hepatocyte growth factor HGF, stem cell factor SCF). Nekatere študije ugotavljajo še povečanje faktorjev rasti kot so VEGF (odgovornega za regeneracijo in rast novega ožilja), TGF-β (odgovornega za sintezo kolagena), ter spodbujanje preoblikovanja fibroblastov v mio-fibroblaste, ki pomagajo pri oženju in zraščanju ran. [7–10, 12]

Obstaja tudi cela vrsta študij izvedenih na laboratorijskih, živalih kjer so ugotavljali pospešeno regeneracijo poškodovanih živcev pri skupinah ki so bile izpostavljene različnim svetlobnim režimom v primerjavi s kontrolnimi skupinami.

To so le nekatere najpogosteje izpostavljene ugotovitve.

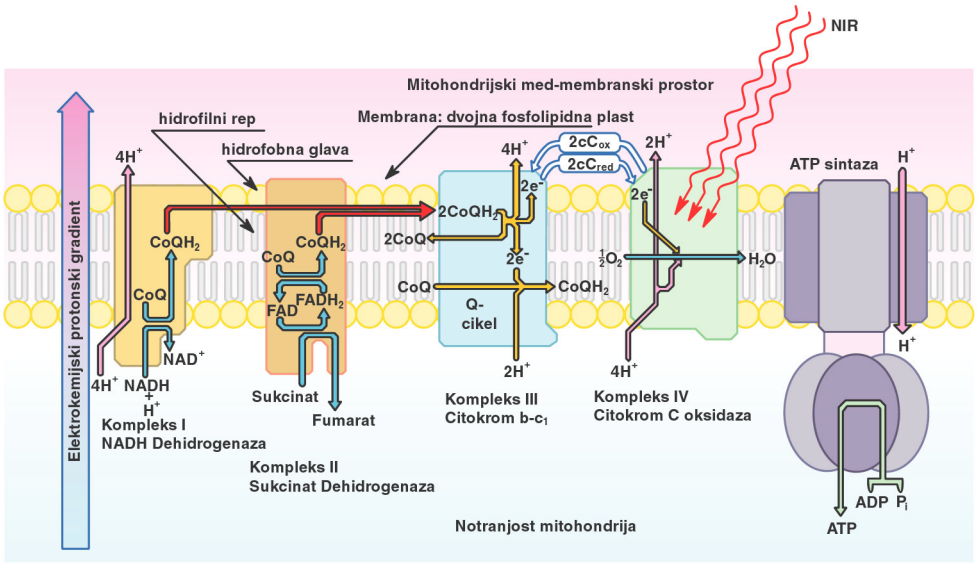
Spodbujanje celičnega metabolizma

Večina raziskovalcev s področja svetlobne terapije poudarja pomen vpliva svetlobe na celični metabolizem. Le ta je seveda osnova tudi vseh pravkar naštetih procesov. Metabolizem obsega ne le pretvorbo energije in gradnjo proteinov, encimov in raznih drugih celičnih gradnikov in aktivnih snovi, temveč tudi vzdrževanje trans-membranskega električnega potenciala in ionsko kontrolo prepustnosti membranskih por, skozi katere se odvija izmenjava snovi med celico in njeno okolico.

Med najbolje preučenimi so procesi v mitohondrijih, ki so svojevrstni celični pretvorniki energije. Ključno vlogo v teh energijskih procesih igra pet kompleksnih trans-membranskih molekul, ki posredujejo pri sintezi energijsko aktivnih molekul nujnih za mnoge druge celične procese, ob hkratnem ločevanju nabojev na elektrone in protone, ter druge pozitivne ione, v množici različnih redukcijsko-oksidacijskih procesov. Med njimi posebej izstopa citokrom C oksidaza, pri kateri se

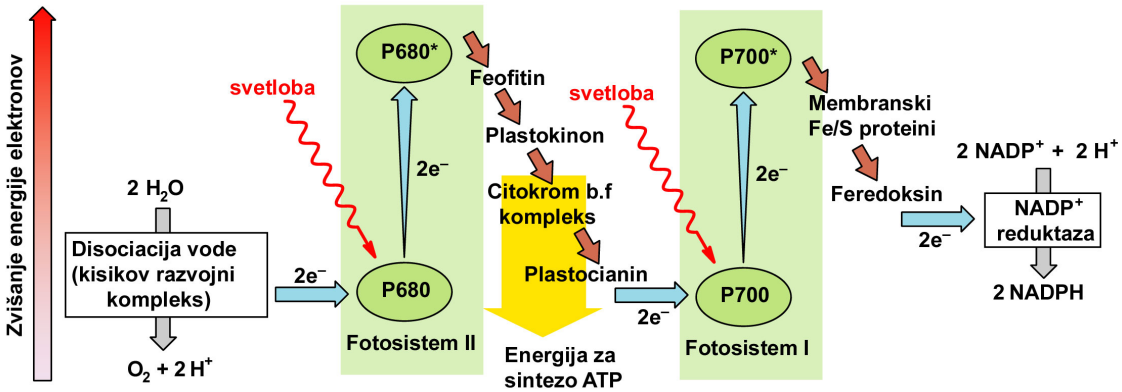
hitrost pretvorbe snovi in prenosa električnega naboja ob obsevanju z rdečo svetlobo močno poveča.

Na **Sl.1** so shematsko predstavljeni procesi dihalne verige v mitohondrijih. Poudariti je treba pomembnost nekaterih reakcij, kot so pretvorba koencima nikotinamid adenin dinukleotide med NADH in NAD^+ obliko, flavin adenin dinukleotide med FAD in $FADH_2$ obliko, ter pretvorba adenozin difossfata, ADP, v adenozin trifosfat, ATP. Le ta je ena ključnih substanc za prenos energije, ter celično in medcelično signalizacijo. Poleg tega je ena pomembnejših funkcij tega procesa vzdrževanje transmembranskega elektrokemičnega potencijala, ki je posledica transporta protonov (vodikovih ionov, H^+) pretežno iz notranjosti mitohondrija v medmembranski prostor, ter elektronov (prek negativnih ionov) v obratni smeri.



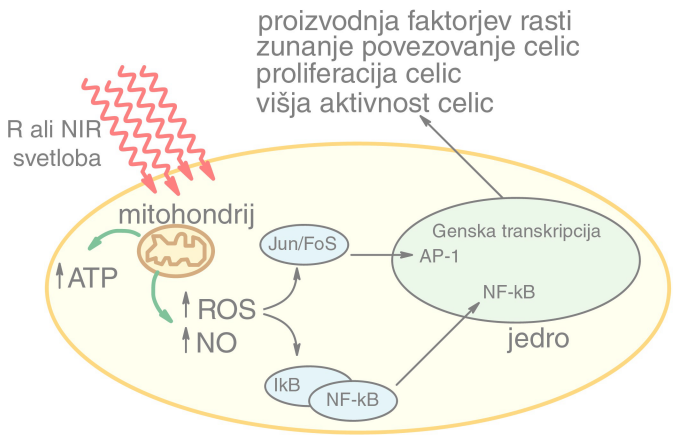
Sl.1: Shematski prikaz procesov v mitohondrijih. Obsevanje s bližnjo infrardečo svetlobo (NIR) močno pospeši delovanje citokrom C oksidaze in s tem celotno verigo. Med pomembnejšimi procesi v verigi so pretvorba koencima nikotinamid adenin dinukleotide med NADH in NAD^+ obliko, flavin adenin dinukleotide med FAD in $FADH_2$ obliko, ter pretvorba adenozin difossfata, ADP, v adenozin trifosfat, ATP. Poleg tega je ena pomembnejših funkcij tega procesa vzdrževanje transmembranskega elektrokemičnega potencijala, ki je posledica transporta protonov (vodikovih ionov, H^+).

Sl.2 prikazuje spremembe energijske ravni elektronov pri teh procesih. Energijo, ki jo prispeva svetloba postopoma izrabijo različni zaporedni procesi. Celotna veriga poteka v dveh fazah.



Sl.2: Energijski transport elektronov.

Omenjeni procesi in njihovi produkti igrajo pomembno vlogo v nadaljnjih celičnih procesih, kot je shematsko predstavljeno na **Sl.3**.



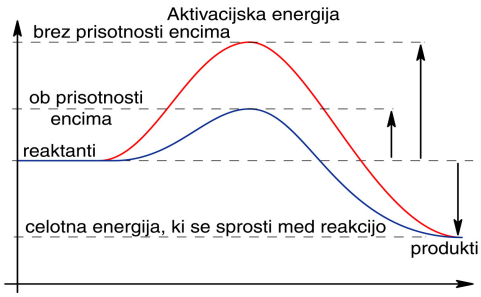
Sl.3: Nekateri pomembnejši celični procesi in medcelične signalizacije kot posledice obsevanja z rdečo in/ali infrardečo svetlobo. Poleg že omenjenega adenozin trifosfata, ATP, pomembno vlogo igra nastajanje dušikovega oksida, NO, ter reaktivnih kisikovih vrst, ROS, ki potem sprožajo mnoge antioksidativne procese, poleg tega pa tudi trasnkripcijske Jun/Fos proteine (gene). Ti vplivajo na izražanje faktorjev rasti in fosforilacijo, ter z dimerizacijo iz njih nastaja AP-1 transkripcijski faktor, ki vpliva na prepis DNA in RNA. ROS prav tako vpliva na inhibitorske faktorje, kot je IκB, ki regulira jedrski faktor kapa B, NfκB, ki sodeluje v različnih imunskih procesih.

S svetlobo inducirano pospešena sinteza ATP in povečanje protonskega gradienta vodita v povečano aktivnost ionskih transportnih procesov, denimo Na^+/H^+, Ca^{2+}/Na^+, Na^+/K^+ ATPaze, ter Ca^{2+} črpalk. ATP je tudi podlaga za nastajanje cikličnih adenozin monofosfatov, cAMP. Tako cAMP kot tudi Ca^{2+} so pomembni sekundarni signali za številne druge procese.

Poleg citokrom C oksidaze obstajajo tudi drugi kanali delovanja svetlobne terapije. Nekatere molekule, denimo porfirini in flavoproteini, imajo izrazite absorpcijske spektre in vplivajo na številne procese. Obstaja tudi hipoteza o alternirajočih redukcijskih lastnostih nekaterih spojin, ki ob osvetljevanju generirajo superoksidne anione, O_2^-, kar vpliva na številne druge redukcijsko-oksidacijske (redoks) procese.

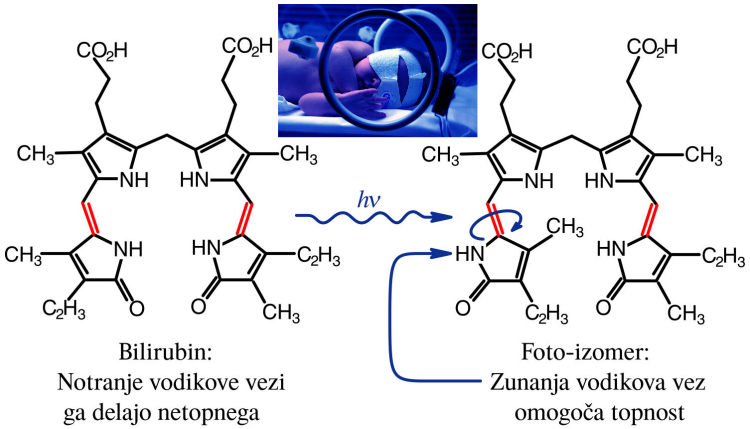
Povedati je treba da NO lahko inhibira delovanje citokrom C oksidaze, kar pripelje do problema doziranja pri svetlobni terapiji. Namreč, citokrom C oksidaza vsebuje dva Fe centra, haem a in haem a3, ter dva Cu centra, CuA in CuB. Inhibitorno reakcijo je mogoče pojasniti s tem, da NO in O_2 tekmujeta za povezovanje pri CuB/a3. Proces je seveda reverzibilen in eden izmed predlaganih modelov vpliva svetlobe je prav v preprečevanju vpliva NO na citokrom C oksidazo in posledično pospešeno aktivnost dihalne verige in produkcijo ATP.

Opisani procesi so pretežno nizkoenergijski in potekajo termodinamično spontano. Vendar nekateri procesi zahtevajo veliko več energije. Pri takih procesih igrajo odločilno vlogo različni encimi in koencimi (znanih je več kot 4000 vrst) ki delujejo kot katalizatorji: ko se encim prilepi na ustrezno molekulo se občutno zniža energijski prag, ki je nujen za potek reakcije. Ob prisotnosti encimov se pogostost takih procesov poveča za stotisoč krat in več v primerjavi z verjetnostjo da do njih pride le s termičnim vzbujanjem molekul. **Sl.4** shematsko ponazarja omenjene razlike v energijski ravni.



Sl.4: Razlika med zahtevano energijo v z encimi podprtih reakcijah in prez njihove prisotnosti.

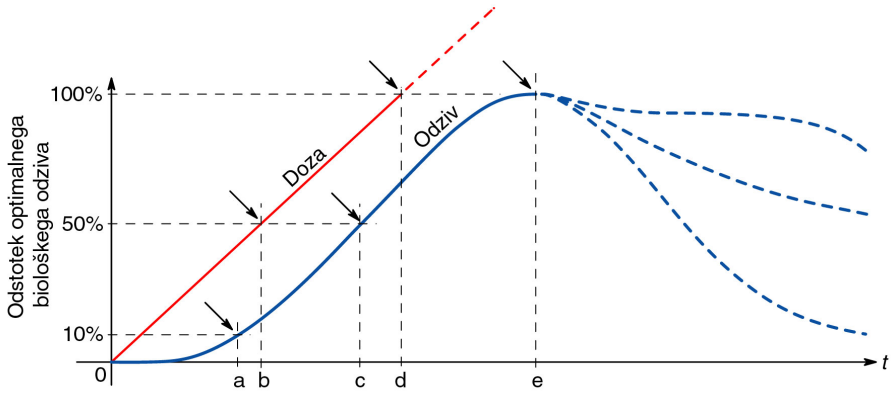
Sl.5 prikazuje še en drugačen proces, ki je že dolgo znan in predstavlja standardni postopek v medicinski praksi. Gre za problem bilirubinemije pri novorojenčkih [11]. Molekula bilirubina je v svoji običajni obliki netopna v vodi in se težko izloča. Če pa jo obsevamo z mordo svetlobo, pride do foto-izomerizacije: s svetlobo aktivirana kemična vez se zaradi spremembe molekularnega kota obrne, kar izpostavi enega izmed notranjih vodikov zunanjim vplivom. Električni potencial med tem vodikom in kisikom v vodi prevlada nad ostalimi adhezijskimi silami, molekula postane topna v vodi in se lahko izloči iz telesa. Izomerizacija molekul je tako še eden od možnih nizko-energijskih mehanizmov delovanja svetlobe.



Sl.5: Bilirubin v svoji osnovni obliki ni vodotopen, a če ga obsevamo z modro svetlobo, molekula spremni obliko in preide v svoj izomer. Na dušik vezan vodik se sedaj lahko bolj lepi na vodo, kar omogoča topnost v vodi in hitro izločanje iz telesa.

Problem doziranja in določanja osvetljevalnih parametrov

Korelacija med specifično absorpcijo svetlobe in povišanim akcijskim potencialom molekul potrjuje domnevo da svetloba vpliva na biološke procese. Kot pri vsakem drugem medikamentu se tudi pri svetlobni terapiji srečujemo s problemom doziranja. Večje doze (večja intenziteta svetlobe, daljši obsevalni čas) naj bi potemtakem povzročili tudi močnejši odziv. Vendar ta domneva drži le do določene meje. Odziv organizma na svetlobne učinke ponazarja **Sl.6**.



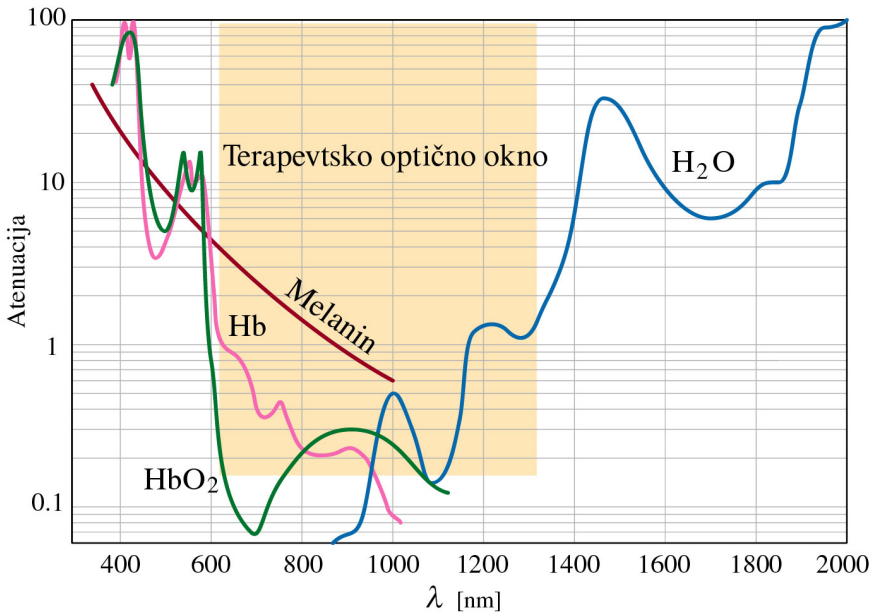
Sl.6: Ob enakomerni intenziteti svetlobe doza linearno narašča s časom. Biološki odziv je v začetku majhen, nato pa sorazmeren dozi, dokler ne dosežemo ravni ko povečanje doze n vpliva bistveno na biološke procese. Z nadaljnjim doziranjem intenzivnost nekaterih procesov stagnira, pri drugih počasi pada, pri nekaterih spet strmo pada. Karakteristični časovni zamiki so med 0 in a, kjer je odziv manjši od 10% optimalnega, med b in c je zamik med 50% doze in 50% odziva. Točka d je čas optimalne doze; če doziranje takrat prekinemo, odziv še naprej narašča do točke e, kjer doseže maksimalni učinek, ki se ohrani dalj časa. Predoziranje v glavnem ne povzroča močne negativne učinke, vendar je dolgočasovno doseženi učinek pogosto slabši od optimalnega.

Za razliko od večine klasičnih medikamentov, predoziranje pri svetlobni terapiji ne povzroča močnih negativnih učinkov, vendar so rezultati pogosto slabši od optimalnih. To je mogoče razložiti na več načinov. Eden je že omenjeni problem dušikovega oksida, ki pri povišani koncentraciji zavira delovanje citokrom C oksidaze. Podoben negativen vpliv je pri preveliki koncentraciji ROS. Poznamo vrsto antagonističnih snovi in procesov, ki se med seboj upočasnjujejo. Povečana elektrokemična aktivnost čez čas lahko zniža membranski elektrokemični potencial, kar vpliva na transport snovi skozi membranske pore. Prav tako nasičenost z določenimi snovmi lahko onemogoča odvijanje ostalih nujnih procesov. In končno, celica nima na voljo neomejenih energijskih in snovnih zalog, ko se le te izčrpajo je potreben čas da se spet obnovijo z vnosom iz medceličnega prostora. Zato je doziranje predvsem empirični proces, ki zahteva nekaj eksperimentiranja. V literaturi najdemo veliko priporočil in okvirnih intervalov, ni pa zanseljivih „kuharskih receptov“.

Problem doziranja dodatno zapletajo možnosti izbire različnih svetlobnih režimov.

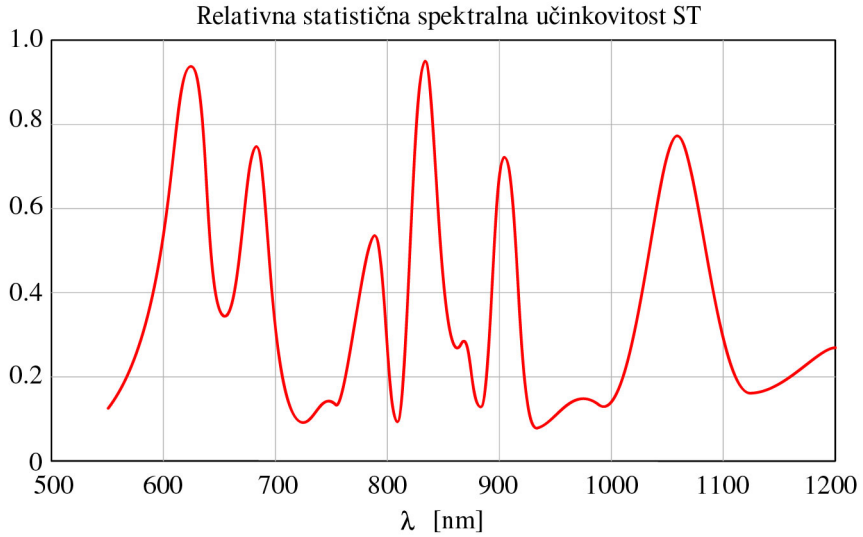
Najprej je potrebno poznati približen absorpcijski spekter ciljnih molekul in celičnih funkcionalnih struktur. Temu je potem treba prilagoditi valovno dolžino svetlobnega vira. Danes je že na voljo cela paleta različnih virov, bodisi za posamične valovne dolžine ali take ali drugačne kombinacije valovnih dolžin. Vendar pestrost izbire pogosto predstavlja prej težavo pri iskanju primernega vira, kot pa pomoč, zlasti v primeru kombiniranih virov.

Treba se je zavedati da se precej svetlobnega sevanja porazgubi, bodisi pri odboju od površine kože, bodisi ob sipanju na različnih notranjih plasteh tkiva. Optično gosta tkiva in snovi absorbirajo že sama veliko svetlobe. Absorpcija pa je zelo odvisna od valovne dolžine. Na **Sl.7** je narisano takoimenovano terapevtsko optično okno, znotraj katerega najpogostejše snovi (voda, hemoglobin, oksigenirani hemoglobin, melanin) prepuščajo največ svetlobe [20]. Za površinsko obdelavo kože teh omejitev ni, razen melanina. Za globinsko obdelavo pa je pomembna čim večja prepustnost.



Sl.7: Terapevtsko optično okno je svetlobno spektralno območje znotraj katerega svetloba najmanj oslabi. Obsega območje valovnih dolžin med 600 in 1350 nm.

Sl.8 pa predstavlja spekter statistično najbolj učinkovitih valovnih dolžin. Te valovne dolžine se najbolj absorbirajo v ustreznih kromoforah, kot so citokrom C oksidaza in druge.



Sl.8: Valovne dolžine na katerih je svetlobna terapija statistično najbolj učinkovita.

V **Tabeli 1** so podane valovne dolžine glede učinkovanja na specifično vrsto tkiva, celic, ali aktivnosti. Tabela se dokaj dobro ujema s spektrom na **Sl.8**. Tabela je bila oblikovana na osnovi statistično obdelanih raziskav objavljenih v številnih člankih.

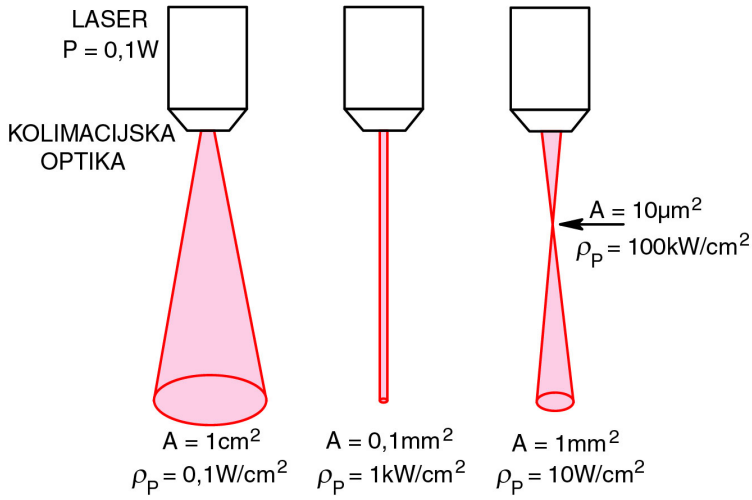
Osnovna težava s tovrstno statistiko je v tem da je težko ločiti dejansko učinkovitost posameznih valovnih dolžin od komercialne dosegljivosti svetlobnih virov s temi specifičnimi valovnimi dolžinami. Mnogi raziskovalci namreč nimajo možnosti priti do ustrezne opreme za preskušanje vseh mogočih valovnih dolžin in se torej osredotočijo na najbolj pogosto uporabljane naprave ali na cenovno dostopne naprave. Valovno dolžino svetlobe je mogoče poljubno nastavljati le v posebnih zelo dragih napravah, v cenejših pa ne gre drugače kot z vgradnjo ustreznih svetlobnih virov in zato nakup določene naprave pomeni tudi vezanost na določeno valovno dolžino.

Zvišanje akcijskega potencijala celic v odvisnosti od valovne dolžine svetlobe (*in vitro*, razen *)

valovna dolžina [nm]	vrsta celic / aktivacije					
	mastociti	leukociti	makrofagi	fibroblasti	fibro-mioblasti	osteo-blasti
630–670	+ +	+	+ +	+ + +	+	+
790	+ +	?	?	+ +	?	?
830	+ + +	+ + +	+ + +	+	+ + +	+ +
904	–	?	+/–	–	–	+ + +
1064	?	?	?	+*	?	+*
10600	?	?	?	+*	?	+*

Tabela 1: Legenda: [+] pozitiven učinek, [–] ni statistično značilnega učinka, [?] ni podatkov.

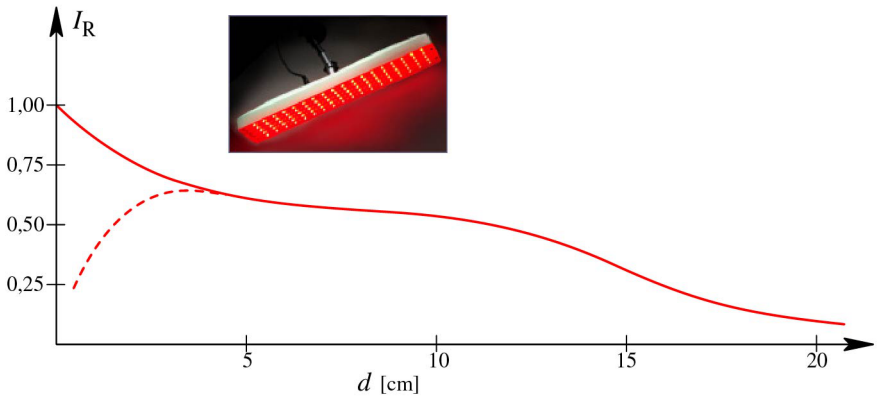
Naslednjo težavo predstavlja izbira moči svetlobnega vira in temu primernega časa obsevanja. Problem je povezan tudi s celotno sevalno površino svetlobnega vira, kotom sevanja in oddaljenosti od obsevane površine. Problematiko najbolj nazorno predstavimo v primeru laserskih virov. Mnogi laserski viri imajo nastavljivo kolimacijsko optiko, s katero je možno nastaviti širino žarka, **Sl.9**.



Sl.9: Odvisnost gostote sevalne moči pri laserskih virih z nastavljivo kolimacijo žarka.

Denimo da imamo laser z močjo 0.1W, katerega sevalni kot je nastavljen tako, da na določeni razdalji obseva površino 1cm^2. Površinska gostota sevalne moči je potem 0.1W/cm^2, vendar bo na manjši razdalji od vira večja (ker se obsevana površina zmanjša) in na večji razdalji manjša. Zato bo pri delu treba razdaljo skrbno nastaviti. Če pa smo žarek popolnoma kolimirali in je njegova širina le 0.1mm^2, bo gostota sevalne moči povečana na 1kW/cm^2 in bo od razdalje neodvisna. Nasprotno, če optiko nastavimo tako, da se žarek prekriža, in na določeni oddaljenosti osvetli površino 1mm^2, bo tam gostota sevalne moči 10W/cm^2. Toda pozor, na mestu kjer se žarek križa bo presek žarka zelo majhen, morda le 10μm^2, kar daje gostoto 100kW/cm^2! Če ob nepazljivem ravnanju laser le za hip preveč približamo, s tako gostoto moči lahko povzročimo hudo opeklino!

Takih težav pri drugih svetlobnih virih ni, tudi pri svetlečih diodah (LED) ne. Vendar tudi tam imamo manjše težave z določanjem pravilne razdalje. Nekateri proizvajalci rešujejo te težave z vgradnjo reflektorjev in leč, da dobijo čim bolj enakomeren žarek, drugi pa naredijo gosto mrežo majhnih virov na panelu večje površine. V tem primeru se gostota sevalne moči z razdaljo spreminja kot na **Sl.10**: v srednjem območje razdalj ostaja gostota sevalne moči skoraj konstantna.



Sl.10: Odvisnost gostote sevalne moči od razdalje pri širokem panelu z velikim številom gosto posejanih virov. Na optični osi enega vira na majhnih razdaljah gostota sevalne moči z razdaljo sprva pada, potem pa vedno več virov obseva določeno površino in se celotna gostota sevalne moči skoraj ne spreminja. Na večjih razdaljah pa spet pada. Na področju med posameznimi viri pa je svetilnost sprva majhna, in z razdaljo narašča.

V vsakem primeru pa smo soočeni s določenimi kompromisi. Pri viru, ki seva vzporedne žarke nimamo toliko težav z razdaljo, toda težava nastopi če je treba obdelati večjo površino. Pri večjih panelih pa vedno osvetljujemo večjo površino, tudi če je treba obdelati manjšo površino. Načeloma naj bi bila ta možnost bolj sprejemljiva, ker je zaradi biološkega odziva na dozo bolje imeti nekoliko manjšo moč vira, pa zato osvetljevati dalj časa in večjo površino, ter tako izkoristiti sistemski učinek aktivnosti okoliškega zdravega tkiva.

Naslednji problem predstavlja razlika med laserskimi viri, ki sevajo koherentno svetlobo, in vsemi ostalimi viri. Nekateri raziskovalci poudarjajo pomen koherentne svetlobe na biološke učinke, vendar, če te ugotovitve držijo, je koherenca pomembna le pri površinski obdelavi. Dejstvo je da se svetloba močno sipa že v prvih 20μm globine in je zato koherence med fotoni hitro konec. Poleg tega svetloba pri prehodu skozi različne plasti tkiva srečuje materiale različne optične gostote, z različno dielektrično konstanto, zato prihaja do sprememb valovnih dolžin in interference valov. Za monokrmatske vire, kot je laser, to pomeni da bo valovna dolžina v zraku različna od valovne dolžine v tkivu, pa tudi v različnih tkivih bo nekoliko različna, zato je tezo o pomembnosti koherence težko sprejeti. Zaradi sipanja svetlobe pa gostota sevalne moči z globino hitro pada.

Ravno tako nekateri raziskovalci izpostavljajo pomen polarizacije svetlobe. Tudi tu velja enak ugovor; tako kot koherenca, se tudi polarizacija lahko ohranja le v optično homogenem mediju.

Dodatna težava pri laserskem sevanju je izredno ozek spekter, ki je širok le 1nm. Če se frekvenca svetlobe ne ujema z resonančno frekvenco encimskih kromofor, ki naj bi energijo sprejele, učinka ne bo. Nasprotno, pri svetlečih diodah, LED, je spekter širok običajno 35–40nm, zato tudi če se spektralni maksimum ne ujema natančno z resonančno frekvenco, je znotraj spektralne širine še vedno verjetnost prekrivanja, čeprav ob manjši intenziteti, kar lahko kompenziramo z daljšim časom obsevanja.

Zaradi tega so globinski učinki virov LED enako ustrezni kot laserski viri, morda celo primernejši.

In končno, mnogi raziskovalci poročajo o ugodnih učinkih modulacije svetlobe. V ogromni večini primerov gre za pulzno modulacijo, redkeje sinusno ali kakšne druge valovne oblike. Modulacijske frekvence ponavadi gredo od par utripov na sekundo pa vse do nekaj MHz (da ne bo pomote omenimo, da je frekvenca svetlobnega valovanja mnogo višja, okoli 400THz). Čeprav obstajajo natančni seznami modulacijskih frekvenc, ki naj bi bile primerne za specifične namene, celo za točno določena bolezenska stanja, je tu najmanj soglasja. Vpliv modulacije je zaenkrat mogoče upravičiti le s dejstvom, da celice ob intenzivnem vzbujanju potrebujejo določen relaksacijski čas za transport snovi in obnovo zalog, ter ponovno vzpostavitev elektrokemičnega ravnovesja na membrani. Ali točno določene frekvence dodatno izboljšajo terapevtski učinek, je treba še dokazati. Zaenkrat o tem le ugibamo in se zanašamo na praktične izkušnje.

Iz povedanega sledi da ni dovolj če se pri izbiri svetlobnega vira zanašamo le na tehnične specifikacije proizvajalcev. Predvsem mora terapevt natančno vedeti kaj želi doseči in na kakšen način to sploh lahko doseže. To pomeni da je dobro poznavanje tako biokemičnih procesov kot tudi fizikalnih zakonitosti, zlasti optike, zelo zaželeno.

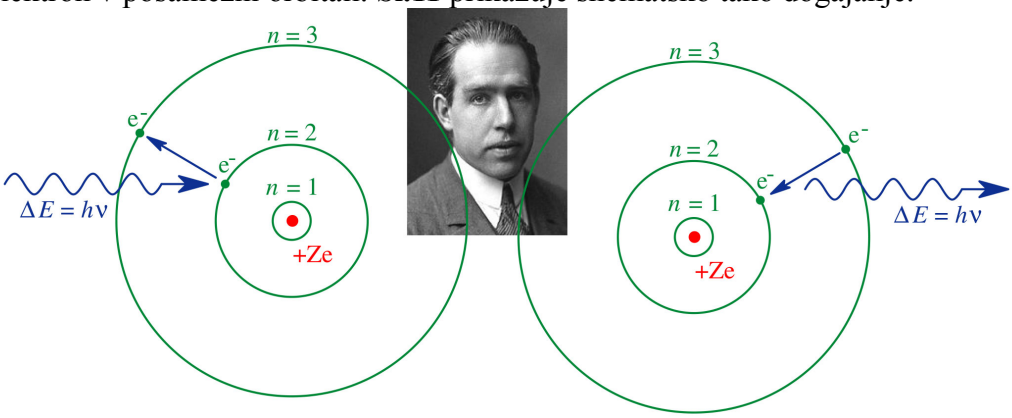
Fizikalne interakcije svetlobe s snovjo in energijska razmerja

Nemogoče je v nekaj vrstic stlačiti vse pomembne vidike fizikalnih interakcij svetlobe in snovi, ki jih strokovnjaki pridobijo v dolgih letih študija, zlasti če jih je treba razložiti nekomu, ki se je o tem sicer že učil, a mu to področje ni stroka. Našteli bomo le nekaj osnovnih dejstev, ki so nujni za začetno razumevanje in povezovanje pojavov s področja biokemije in fizike.

Od prve naivne Demokritove ideje o nedeljivih osnovnih gradnikih narave (atomih) do prvega uporabnega Bohrovega modela atoma so pretekla dobra tri tisočletja. Atomi niso nedeljivi, sestavljeni so iz električno pozitivno nabitega jedra in negativno nabitih elektronov, ki obdajajo jedro gibajoč se v različnih orbitalah. Različno število elektronov v zunanjih lupinah različnih

atomov je podlaga za možnost medsebojnega povezovanja atomov prek medsebojnega deljenja enega ali več zunanjih elektronov (v kemiji govorimo o valencah). Običajno je celotna vezalna energija elektronov povezanih atomov manjša kot pri vsakem atomu posebej, zato so molekularne vezi lahko stabilne. Vezalna energija, gre seveda za elektromagnetno energijo med elektroni in jedri atomov, je lahko različna, odvisno od števila elektronov in njihove oddaljenosti od jedra.

Na splošno je elektron z večjo lastno kinetično energijo lahko bolj oddaljen od jedra in hkrati šibkeje vezan na jedro. Vendar elektron ne more zasesti poljubne orbitale, ker zaradi majhnosti orbitale in hitrega gibanja okoli jedra zaznava svoje lastno električno polje. Zato elektroni lahko zasedejo le določene orbitale; pravimo da so njihova energijska stanja kvantizirana. Posamezni elektron sicer lahko preide iz nižje orbitale v višjo, vendar zato mora od nekod vzeti energijo. Ob prehodu nazaj pa mora enako količino energije oddati. Ta količina energije je enaka razliki energij ki jih ima elektron v posamezni orbitali. **Sl.11** prikazuje shematsko tako dogajanje.



Sl.11: Bohrov model atoma, levo je shematski prikaz absorpcije fotona, kar povzroči preskok na višjo orbitalo, desno pa je prikaz preskoka na nižjo orbitalo ob emisiji fotona.

Svetloba je elektromagnetno valovanje in kot taka lahko interagira z električnim poljem med elektronom in jedrom. Kot vsako drugo valovanje, tudi svetloba nosi energijo, ki je enaka produktu Planckove akcijske konstante h in frekvence ν (grška črka nü — tako označujemo frekvenco svetlobe, da jo razlikujemo od modulacijske frekvence f). Torej je energijska razlika med orbitalama enaka energiji zajete oziroma oddane svetlobe, $\Delta E = h\nu$.

Svetloba je torej tudi kvantiziran pojav. Kvantu elektromagnetnega polja pravimo foton (po grški besedi za svetlobo).

Ker nas pri doziranju zanimata tako specifična moč kot tudi energija, si oglejmo ustrezne relacije. Moč P izražamo v wattih [W], energijo E pa v jouleih [J]. Moč definiramo kot delo opravljeno v časovni enoti, opravljeno delo pa je enako porabljeni energiji. Zato je energija preprosto zmnožek moči in časa delovanja moči: $E = Pt$. Enote W in J sta bili določeni prek mehanskega dela, izraženega z enotami dolžine, mase in časa, torej metra [m], kilograma [kg] in sekunde [s]. Gre torej za razmeroma velike enote. Ker je Planckova konstanta zelo majhna, $h = 6.626\times10^{-34}$ [Js], si pri obravnavi energijskih interakcij na ravni atomov in molekul raje pomagamo z enoto elektron-volt, [eV]. Energija 1eV je enaka energiji, ki jo pridobi elektron, če ga pospešimo v električnem polju s potencijalno razliko 1V. Torej energijo izraženo v [eV] dobimo preprosto tako da energijo v [J] delimo z nabojem elektrona, ki znaša $q_e = 1.602\times10^{-19}$ As (amper sekunde). Ker električno moč v [W] lahko zapišemo kot produkt napetosti v voltih [V] in toka v amperih [A], sledi da lahko zapišemo energijo E [eV] = E [J]/q_e.

Na osnovi teh relacij sedaj lahko izrazimo energijo svetlobnih kvantov v eV. Denimo da želimo izvedeti kakšno energijo imajo fotoni rdeče svetlobe z valovno dolžino $\lambda = 630$nm, ali 630×10^{-9}m. Vemo da fotoni potujejo s svetlobno hitrostjo $c = 299792458$ [m/s], ali ~3×10^{8} [m/s]. Čas v katerem svetloba prepotuje dolžino enega vala (eno nihalno periodo) je $\tau = \lambda/c$, frekvenca nihanja pa je

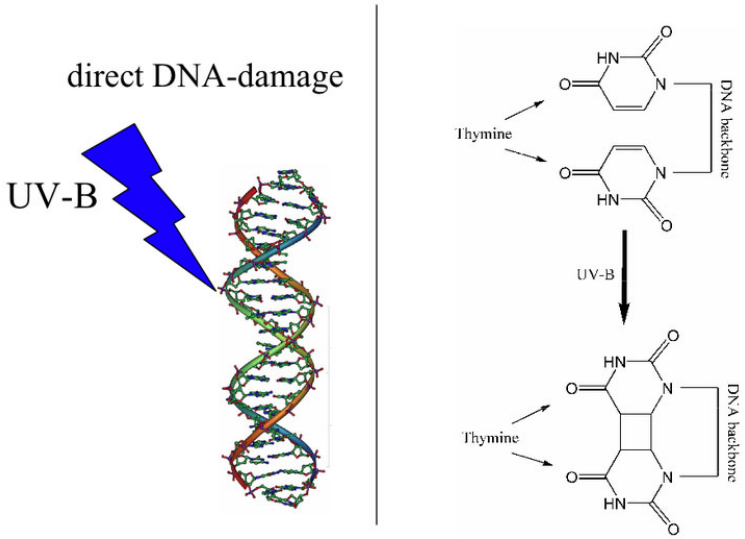
enaka številu period na sekundo, torej $\nu = 1/\tau$, zato je svetlobna hitrost zmnožek valovne dolžine in frekvence, ali $c = \lambda\nu$. Valovni dolžini 630nm torej ustreza frekvenca $\nu = c/\lambda = 476\times10^{12}$ Hz. Zato bo energija $E = h\nu = 3.15\times10^{-19}$ J, ali $E = h\nu/q_e = hc/\lambda q_e = 1{,}968$ eV, oziroma približno 2eV.

Iz zadnje relacije lahko za znano energijo v eV poiščemo ustrezno valovno dolžino:

E [eV]	1	2	3	4
λ [nm]	1240	620	413	310
območje	IR	rdeča	vijolična	UV

Za tiste ki so bolj navajeni kemičnih enot za ocenjevanje jakosti molekularnih vezi povejmo, da energija 1eV na aktivirani delec snovi ustreza 96,48534 kJ/mol.

Vemo da sončno UV sevanje poškoduje kožo, **Sl.12**, če se mu izpostavljamo dalj časa, med tem ko ne opazimo nobenih poškodb če se sončimo za zastekljenim oknom, ki preprečuje UV sevanje, prepušča pa vse daljše valovne dolžine. Vemo tudi da se nekatere šibke vezi med organskimi molekulami začnejo pri ~3eV. Videli smo že tudi da kožni pigment, voda, in hemoglobin močno absorbirajo svetlobo zunaj območja 600–1200nm. Lahko torej ugotovimo da rdeča in infrardeča svetloba ne moreta neposredno razbiti molekularnih vezi, to se lahko zgodi le ob pomoči ustreznih encimov.



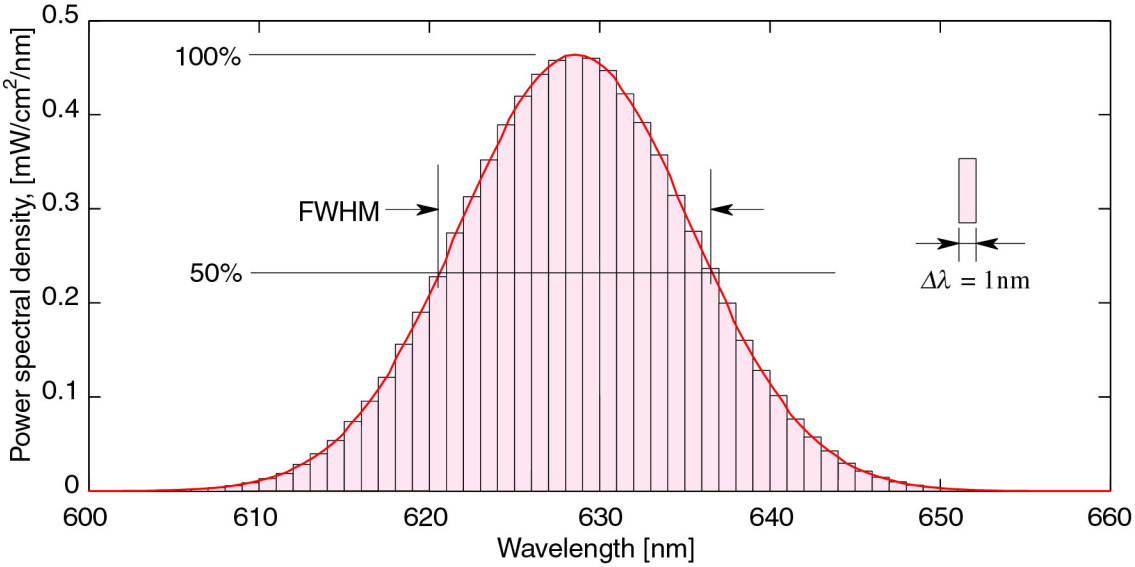
Sl.12: Sprememba kemičnih vezi v genskem materialu ob obsevanju z UV svetlobo.

Sklepamo torej, da obsevanje z R/IR svetlobo le spodbuja naravne biokemične porcese, ne more pa imeti neposrednega vpliva na vezi med organskimi molekulami, ne more jih poškodovati.

Na koncu je treba še pojasniti kako definiramo sevalno gostoto moči in kako lahko objektivno primerjamo različne svetlobne vire med seboj. Videli smo že na **Sl.9** kako določamo površinsko gostoto sevalne moči pri laserski (monokromatski, koherentni) svetlobi. Podobno je tudi pri drugih virih, le da pri takih, ki sevajo v širšem spektru moramo upoštevati tudi spektralno gostoto moči. To je najlažje razumeti ob pogledu na **Sl.13**, kjer je podan tipičen spekter sevanja rdeče LED. Spektralno širino ponavadi določamo pri polovici maksimalne intenzitete (angl., full width half magnitude, FWHM). Ker je sevanje fotonov pri vseh nekoherentnih virih naključno, ima spekter približno obliko Gaussove krivulje. Spektralna širina pri LED je običajno okoli 35nm. Za oceno celotne sevalne gostote moči razdelimo spekter na 1nm široke stolpce in jih seštejemo. Če je spekter približno Gaussov, lahko privzamemo približek površine kvadrata visokega kot maksimim sevanja in širokega kot je spektralna širina.

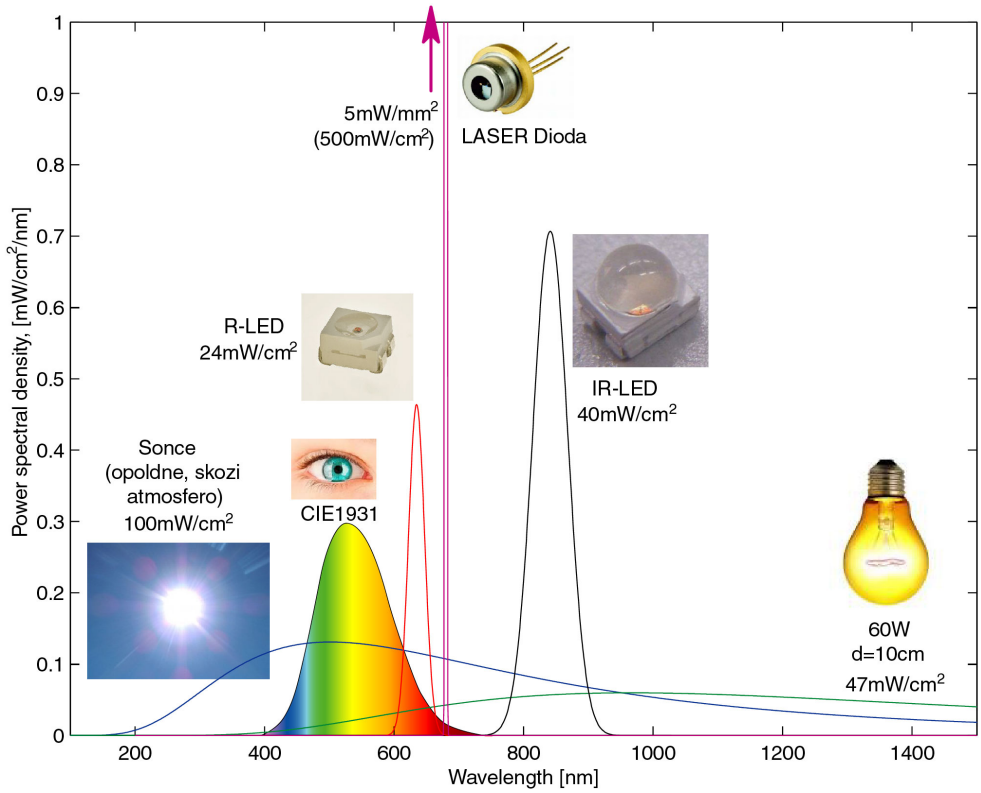
Ob določanju celotne sevalne moči je treba upoštevati obsevano površino in spekter. Če je denimo sevalni maksimum 0,5mW/cm^2/nm, in spektralna širina 35nm, bo celotna površinska gostota

sevalne moči kar produkt teh števil, torej 10,5mW/cm^2. Viri LED imajo ponavadi leče in zrcala s katerimi usmerjajo sevanje v razmeroma ozek sevalni kot. Osvetljenost površine je potem odvisna tudi od kosinusa sevalnega kota glede na normalo na obsevano površino (Lambertov zakon). Sevalni kot definiramo tako da določimo pri katerem kotu pade svetlobna moč na polovico maksimalne. Gre seveda za prostorski kot, ki ga merimo v steradianih [sr].



Sl.13: Določitev spektralne širine in spektralne gostote sevalne moči.

Na **Sl.14** so za občutek predstavljene nekatere gostote spektralnih moči različnih svetlobnih virov.



Sl.14: Primerjava sevalnih spektrov različnih virov v primerjavi z relativno občutljivostjo človeškega očesa (CIE1931). Sonce seva kot idealno črno telo po Planckovem zakonu sevanja v širokem spektru in ima maksimum ~1.4mW/cm^2/nm, ali skupno ~100mW/cm^2. Navadna 50W žarnica seva na razdalji 10cm okoli 47mW/cm^2, rdeča LED pa, čeprav integralno seva le 24mW/cm^2, ima sevalni maksimum precej višji kot sonce na teh frekvencah, prav tako tudi IR-LED, ki seva običajno še močneje, ima pa tudi nekoliko širši spekter. Polprevodniška laserska dioda z ustrezno kolimacijsko optiko seva 5mW/mm^2, kar je enakovredno 500mW/cm^2, a le v ozkem spektru (~1nm).

Viri in dodatne informacije

(Opomba: Wikipedia ni vedno najbolj zanesljiva, kljub temu pa jo priporočam, ker je pogosto na koncu strani mogoče najti reference do originalnih zgodovinsko pomembnih člankov, poleg tega je primerna za hitro iskanje povezanih in sorodnih vsebin in pojmov)

[1] <http://en.wikipedia.org/wiki/Adenosine_triphosphate>

[2] <http://en.wikipedia.org/wiki/NADH>

[3] <http://en.wikipedia.org/wiki/FADH>

[4] <http://en.wikipedia.org/wiki/Cell_metabolism>

[5] <http://en.wikipedia.org/wiki/Mitochondrion>

[6] <http://en.wikipedia.org/wiki/Cytochrome_c_oxidase>

[7] Huang, Y.; Chen, A.; Carroll, J.; Hamblin, M.: "Biphasic Dose Response in Low Level Lightherapy" (2009) *Dose-Response* **7** (4): 358–383. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2790317/>

[8] Tafur, J., Mills, P. J.: "Low-Intensity Light Therapy: Exploring the Role of Redox Mechanisms" (2008) *Photomedicine and Laser Surgery* **26** (4): 323. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2996814/>

[9] Karu, T. I.: "Mitochondrial Signaling in Mammalian Cells Activated by Red and Near-IR Radiation" (2008) *Photochemistry and Photobiology* **84** (5): 1091–1099. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18651871>

[10] Preto, J., Pettini, M.: "Long-range resonant interactions in biological systems" (2012) arXiv: [physics.bio-ph] <http://arxiv.org/abs/1201.5187v1>

[11] Newman, B.T., Kuzniewicz, M.W., Liljestrand, P., Wi, S., McCulloch, C., Escobar, G.J.: "Numbers Needed to Treat With Phototherapy According to American Academy of Pediatrics Guidelines" <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2843697/>

[12] Desmet, K.D., *et al.*: "Clinical and Experimental Applications of NIR-LED Photobiomodulation" *Photomedicine and Laser Surgery*, Volume 24, Number 2, 2006, © Mary Ann Liebert, Inc., Pp. 121–128

[13] Yuan, P., Leonetti, M.D., Hsiung, Y., MacKinnon, R.: "Open structure of the Ca^{2+} gating ring in the high-conductance Ca^{2+}-activated K^{+} channel" *Nature* <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature10670>

[14] Vladimirov, *et al.*: "Photobiological Principles of Therapeutic Applications of Laser Radiation" *Biochemistry* (Moscow) Vol. 69 No. 1 2004

[15] Hawkins, D., Abrahamse, H.: "Phototherapy — a treatment modality for wound healing and pain relief" *African Journal of Biomedical Research*, Vol. 10 (2007); 99 – 109

[16] Dorner, R., *et al.*: "Quantum coherent contributions in biological electron transfer" (2011) arXiv:[q-bio.BM] <http://arxiv.org/abs/1111.1646v2>

[17] Schmiegelow, C.T., Schmidt-Kaler, F.: "Light with orbital angular momentum interacting with trapped ions" (2011) arXiv: [physics.atom-ph] <http://arxiv.org/abs/1112.3377v1>

[18] Singh, N.: "Quantum effects in biology: master equation studies of exciton motion in photosynthetic systems" arXiv:[cond-mat.stat-mech] <http://arxiv.org/abs/1203.0147v1> (2012)

[19] Barends, T., et al.: "Structure and mechanism of a bacterial light-regulated cyclic nucleotide phosphodiesterase" *Nature* Vol 459, 18 June 2009, <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature07966>

[20] Cundin, L.X., Roach,W.P.: "Kramers-Krönig analysis of biological skin" arXiv:[q-bio.TO] <http://arxiv.org/abs/1010.3752v1> (2010)