

Original Works

**Auswirkungen direkter Laserbestrahlung
auf menschliche Lymphocyten**

E. Mester¹, S. Nagylucskay², W. Waidelich^{5,6}, S. Tisza³, P. Greguss⁴, D. Haina⁶
und A. Mester¹

¹ Chirurgische Klinik

² Hygienisches und Epidemiologisches Institut der Medizinischen Universität »Ssemelweis«

³ Ungarische Optische Werke

⁴ Labor für angewandte Biophysik der Universität Budapest, Ungarn

⁵ Institut für med. Optik, Universität München, Barbarastraße 16,
D-8000 München 40, Bundesrepublik Deutschland

⁶ Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung, Abteilung für Angewandte Optik, Darmstadt

Effects of Direct Laser Radiation on Human Lymphocytes

Summary. In vitro experiments with human lymphocytes showed that if irradiations with coherent light of a He-Ne-laser were performed an immune suppressor effect is obtained. Using incoherent light of the same wavelength, effects only occur (80% compared to the laser) if the light is linear polarized.

Key words: Biological effects of Laser – Lymphocytes – Light sensitivity of lymphocytes – Wound healing.

Zusammenfassung. In-vitro-Experimente an menschlichen Lymphocyten zeigten, daß durch Bestrahlungen mit kohärentem Licht eines He-Ne-Lasers eine immunsuppressive Wirkung erzielt wird.

Parallelversuche mit inkohärentem Licht der gleichen Wellenlänge ergaben nur eine Wirkung (80% der Laserwirkung), wenn das Licht linear polarisiert war.

Schlüsselwörter: Biologische Laserwirkung – Lymphocyten – Lichtempfindlichkeit von Lymphocyten – Wundheilung.

Die früher mit Hautomotransplantation durchgeführten Tierversuche haben gezeigt, daß Bestrahlungen mit einem He-Ne-Laser ($\lambda = 632,8$ nm) die immunsuppressive Wirkung von Antithymocytenserum bedeutend steigern und damit die Abstoßung des Transplantats verzögern [1]. In anderen Versuchen hatte zwar die Laserbestrahlung keine direkte Wirkung auf die Blastenbildung; damit war aber eine Zunahme der die Blastentransformation fördernden Wirkung des Phytohämagglutinins zu sehen [2]. Klinisch konnten wir in zahlreichen Fällen beweisen, daß die Heilung von resistenten, chronischen Hautgeschwüren durch die Laserbestrah-

lung gefördert wird [3,4]. Die pathologische Komplementaktivität im Serum des Patienten wird normalisiert [5]. Nach diesen Beobachtungen haben wir angenommen, daß es außer der lokalen Wirkung auch andere Veränderungen geben könne. Aus diesem Grunde untersuchten wir die Wirkung von Laserstrahlen auf isolierte menschliche T- (antigenwahrnehmende) und B- (antikörperproduzierende) Lymphocyten.

Nach unseren Befunden vermindert die direkte Laserbestrahlung sowohl die Aktivität der T-Lymphocyten, wie die Zahl der B-Lymphocyten. Dieser Effekt ist von mehreren Faktoren wie Leistung, Dosis und Wellenlänge abhängig. Rubinimpuls laser großer Leistung eignen sich zur Bestrahlung von T-Lymphocyten, während die kontinuierlich arbeitenden He-Ne-Laser oder Argonionenlaser viel wirksamer zur Bestrahlung von B-Lymphocyten sind. Die unterschiedliche Wirkung dieser zwei Lasertypen ist möglicherweise mit den voneinander abweichenden Formen und Flächen der T- und B-Lymphocyten zu erklären [6], wobei sicherlich auch die um Größenordnungen verschiedenen Bestrahlungszeiten eine Rolle spielen.

In dieser Arbeit wurde die immunsuppressive Wirkung der Strahlung eines He-Ne-Lasers ($\lambda = 633 \text{ nm}$) mit der einer intensiven thermischen Lichtquelle derselben Wellenlänge verglichen. Die beiden Lichtquellen waren auf gleiche Leistungsdichte abgeglichen, die Bestrahlungszeit betrug in beiden Fällen 96 s. Der Unterschied besteht darin, daß der Laser kohärentes, linear polarisiertes, die thermische Lichtquelle inkohärentes, unpolarisiertes Licht ausstrahlt.

Material und Methoden

Die Lymphocyten stammten aus 250–300 ml Blutproben von gesunden rh-positiven Spendern der Blutgruppe 0. Aus den heparinisierten Proben wurden die Lymphocyten durch Sedimentation in Gelatine und anschließende Zentrifugierung gewonnen [6]. Danach wurden sie in Parker-199-Nährflüssigkeit bis zu einer Konzentration von $10^5/\text{ml}$ suspendiert. 2 ml dieser Suspension wurden in Blutentnahmeröhrchen von 14 mm Durchmesser verteilt und die Bestrahlung durch die Öffnung der Glasröhrchen vorgenommen. Ein Teil der Lymphocyten wurde mit einem He-Ne-Laser (Wellenlänge: 632,8 nm; Polarisation: linear; Leistung: 50 mW) bestrahlt, der andere Teil mit einer inkohärenten Lichtquelle, bestehend aus 150-W-Halogenlampe mit Kaltlichtspiegel, Wärmeschutzfilter, Mehrschicht-Interferenzfilter und Abbildungsoptik (Wellenlänge: 633 nm; Halbwertsbreite: 18 nm; maximale Leistung: 150 mW bei einem kleinsten Strahldurchmesser von 13 mm).

Die Oberfläche der Präparate wurde jeweils mit gleicher Leistung bei gleichem Strahldurchmesser bestrahlt; die Gesamtenergie betrug bei beiden Lichtquellen 4 J.

Die Leistungsmessung erfolgte mit einem Spectra-Physics 401 C power meter. Dieses Meßgerät wurde für die beiden Lichtquellen verwendet. In Anbetracht der geringen Bandbreite der Strahlung der thermischen Lichtquelle braucht der spektrale Verlauf der Empfindlichkeit des verwendeten Meßgeräts nicht berücksichtigt zu werden.

Der Migrationshemmungstest wurde nach Falk und Mitarb. [7] mit einer Antigenmenge von $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ in Kunststoffröhrchen von 1,8 mm Innendurchmesser, die in Kunststoffkammern von 2 cm Innendurchmesser angebracht waren, durchgeführt. Die Auswertung des Migrationsfeldes geschah durch optische Projektion der Kammer auf Transparentpapier. Die markierten Projektionsbilder wurden ausgeschnitten und auf einer analytischen Waage ausgewogen.

Die Lymphocytenproben wurden vor und nach Bestrahlung im Thermostaten auf einer Temperatur von 37°C gehalten. Zur Vornahme der Bestrahlung befanden sich die Präparate 15 min auf Raumtemperatur (20°C). Die Kontrollproben wurden unter identischen Bedingungen gehalten. Durch Messung mit Kontakt-Thermometern auf Thermistor-Basis konnte festgestellt werden, daß durch die Bestrahlung nur eine geringfügige Temperatursteigerung von ca. $0,5^\circ \text{C}$ erfolgte. Beide Strahlungsquel-

len – Laser und die inkohärente Strahlungsquelle – sind typische Kaltlichtstrahler, die neben der gewünschten schmalbandigen Rotstrahlung keine Wärmestrahlung emittieren.

Die Zahl der antikörperproduzierenden Zellen wurde mit Fluoresceinisothyocyanat konjugiertem Anti-IgM-IgG-Immunsersum durch Auszählung von 500 Zellen bestimmt. Durch einen modifizierten Plaquetest [3] wurde nachgewiesen, daß eine Antikörperproduktion stattgefunden hatte. Als Antigen diente menschliches gereinigtes Antigen der Blutgruppe A [10].

Die Bestimmung der lebenden Zellen erfolgte nach Färbung mit Trypanblau durch Auszählung von 500 Zellen [9].

Alle Experimente wurden 5mal wiederholt. Der methodische Fehler liegt bei $\pm 6\%$.

Ergebnisse

Die Mittelwerte der Meßergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Zur Beurteilung der Migrationsfelder wurde das Gewicht aus Transparentpapier der ausgeschnittenen Projektionsfelder herangezogen. Aus dem Gewichtsquotienten des Migrationsfeldes mit Antigenzusatz zu dem des Migrationsfeldes ohne Antigen wurde der Migrationsindex errechnet. Die Erwartungswerte ergeben sich aus den Kontrollwerten und dem jeweiligen Anteil lebender Zellen.

Bei den mit unpolarisiertem inkohärentem Licht bestrahlten Proben ergab sich praktisch kein Unterschied zwischen den Meßwerten und den Kontrollwerten.

Tabelle 1. Wirkung von Bestrahlungen auf menschliche Lymphocyten, durchgeführt mit Laser und thermischer Lichtquelle gleicher Leistungsdichte bei einer Wellenlänge von 633 nm. Erwartungswerte: E, Meßwerte: M, Prozentuale Änderung: P

Zelltypen und Test	Unbe- strahlt (Kon- trolle)	Thermische Lichtquelle						Laser polarisiert		
		unpolarisiert			polarisiert			E	M	P
		E	M	P	E	M	P			
Lebende Zellen (%)	93,2	—	93,0	—	—	88,0	—	—	86,7	—
B-Lymphocyten Immunfluoresz. mit polyspezif. Immunsersum (%)	17,1	17,06	17,0	-0,4%	16,15	11,3	-30%	15,91	9,6	-40%
T-Lymphocyten Migrationsfeld ohne Antigen (mg)	12,1	12,1	12,0	-0,8%	11,4	6,3	-45%	11,3	5,6	-50%
Antigendeterm.- Migrationsfeld (mg)	3,6	3,6	3,6	0%	3,4	8,6	+153%	3,3	9,0	+173%
Migrationsindex	0,298	0,298	0,300	+0,7%	0,298	1,365	+358%	0,292	1,607	+450%

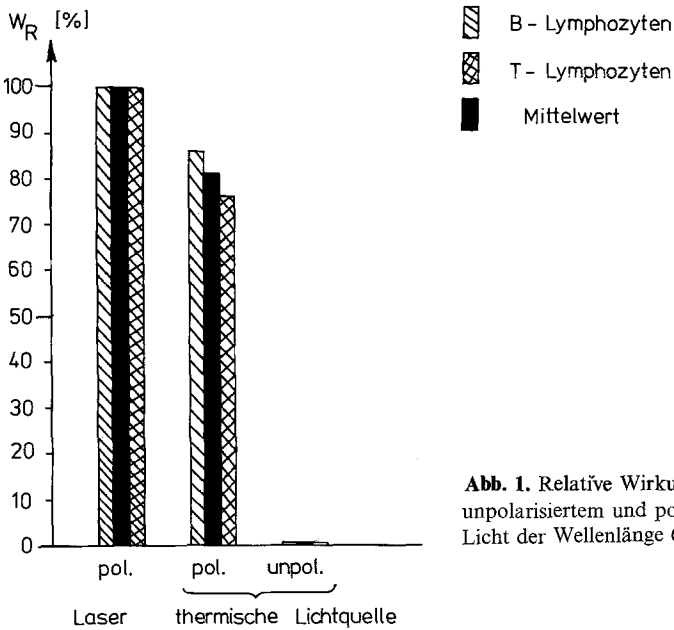


Abb. 1. Relative Wirkung W_R der Bestrahlung mit unpolarisiertem und polarisiertem inkohärentem Licht der Wellenlänge 633 nm. (Laser = 100%)

Im Gegensatz dazu verringert sich nach Einbringen eines Polarisators in den gleichen Strahlengang die Zahl der antikörperproduzierenden B-Lymphocyten um 30%. Die Messungen an T-Lymphocyten zeigen bei den antigenfreien Migrationsfeldern eine Abnahme um 45%, während bei den antigendeterminierten Feldern eine Zunahme von 153% zu verzeichnen ist.

Noch deutlicher unterscheiden sich die Meßwerte bei den mit dem Laser bestrahlten Proben. Die Zahl der B-Lymphocyten verringert sich um 40%. Bei den Untersuchungen der T-Lymphocyten nehmen die Migrationsfelder ohne Antigenzusatz um 50% ab, die Felder mit Antigenzusatz um 173% zu.

Abbildung 1 veranschaulicht die unterschiedliche Wirkung von unpolarisiertem und polarisiertem thermischen Licht sowie von Laserlicht auf menschliche Lymphocyten. Die bei Bestrahlung mit dem Laser erzielten Meßwerte wurden gleich 100% gesetzt.

Polarisiertes inkohärentes Licht der Wellenlänge 633 nm erreicht 81% der Wirkung von Laserlicht, während für unpolarisiertes inkohärentes Licht – berücksichtigt man die Fehlergrenzen – bezüglich der hier beschriebenen Untersuchungen keinerlei Wirkung nachgewiesen werden konnte.

Diskussion

Die in der Einleitung diskutierte immunsuppressive Wirkung von Bestrahlungen mit dem He-Ne-Laser konnte durch in-vitro-Experimente an menschlichen Lymphocyten quantitativ nachgewiesen werden. Inkohärentes monochromatisches Licht zeigt unter gleichen Versuchsbedingungen nur dann eine Wirkung, wenn es linear polarisiert ist.

Weitere gleichartige Versuche, die beispielsweise den Einfluß verschiedener Arten von Polarisation oder den der räumlichen Kohärenz des Laserlichtes klären sollen, sind noch im Gange.

Literatur

1. Naményi, J., Mester, E., Földes, I., Tisza, S.: Effect of laser irradiation and immunosuppressive treatment on survival of mouse skin allotransplants. *Acta Chir. Acad. Sci. Hung.* **16**, 327–335 (1975)
2. Mester, E., Jászsági-Nagy, E., Hamar, M.: Der Einfluß von Laserstrahlung auf stimulierte menschliche Lymphocyten. *Radiobiol. Radiother.* **6**, 767–769 (1974)
3. Mester, E., Szende, B., Spiry, T., Scher, A.: Stimulation of wound healing by laser rays. *Acta Chir. Acad. Sci. Hung.* **13**, 315–324 (1972)
4. Mester, E., Jászsági-Nagy, É., Bácsy E., Korényi-Goth, A., Neményi, K., Kovács, I., Tisza, S.: Laser in Medizin – experimentelle und klinische Erfahrungen. In: *Med. Physik in Forschung und Praxis*, S. 117–137. Berlin-New York: Walter de Gruyter 1976
5. Mester, E., Nagylucskay, S., Döklen, A., Tisza, S.: Laser stimulation of wound healing II. Immunological tests. *Acta Chir. Acad. Sci. Hung.* **17**, 49–57 (1976)
6. Mester, E., Nagylucskay, S., Tisza, S., Mester, A.: Die Wirkung der direkten Laserbestrahlung auf die menschlichen Lymphocyten. *Acta Chir. Acad. Sci. Hung.* (in press)
7. Falk, R. E., Thorsby, E., Möller, E., Möller, G.: In vitro assay of cell-mediated immunity: the inhibition of migration of sensitized human lymphocytes by HL-A antigens. *Clin. Exp. Immunol.* **6**, 445 (1970)
8. Gergely, P., Szegedi, Gy., Szabó, G., Fekete, B., Petrányi, Gy.: Lymphocyte surface immunoglobulins in autoimmune diseases. *Lancet* **1**, 482 (1973)
9. Walford, R. L., Gallagher, R., Sjaarda, J. R.: Serologic typing of human lymphocytes with immune serum obtained after homografting. *Science* **144**, 868 (1964)
10. Nowotny, A.: Basic exercises in immunochemistry. In: *A laboratory manual*, pp. 35–36. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1969

Eingegangen am 3. Juli 1977