

N09000001

Sis -- 1989: 3

STUDIER AV LYS- OG RØNTGENINDUSERTE
CELLESKADER. METODER OG INNLEDENDE
STUDIER.

Terje Christensen

Gunnar Kinn

Jon B. Reitan

Statens institutt for strålehygiene

SIS
RAPPORT

SIS -- 1989: 3

STUDIER AV LYS- OG RØNTGENINDUSERTE
CELLESKADER. METODER OG INNLEDENDE
STUDIER.

Terje Christensen
Gunnar Kinn
Jon B. Reitan

National Institute of Radiation Hygiene
Østerndalen 25
1345 Østerås
Norway

1989

SAMMENDRAG

Spektrofotometri og fluorometri er brukt i studier av DNA-skade induisert av stråling. Metodikken er basert på en forskjell i kvantutbyttet av fluorescens fra fargestoffet Hoechst 33258 når det er bundet til henholdsvis dobbelt- og enkelttrådet DNA. Metoden kan brukes til å detektere trådbrudd induisert av under 2 Gy røntgenstråling. Lysbehandling av TMG-1 humane glioblastomceller førte til DNA-skade ved blå (Philips 52) fototerapilamper, mens ingen signifikant økning i trådbrudd kunne detekteres etter bestråling med grønne (Sylvania grønn) fototerapilamper. Tilsats av bilirubin førte til en konsentrasjonavhengig økning i antall trådbrudd etter belysning av celler. Økningen var størst ved høye konsentrasjoner. Ved lavere konsentrasjoner ble det induisert flere trådbrudd i DNA ved blått lys enn ved grønt lys. Det dannes toksiske og gentoksiske produkter i bilirubinløsninger som bestråles i nærvær av albumin fra storfe. Tilsats til celler viste at toksisiteten av produktene var like stor etter bestråling med blått og grønt lys. Dette kan settes i sammenheng med foto-oksydasjon av bilirubin, som skjer med tilnærmet samme hastighet ved klinisk relevante bilirubinkonsentrasjoner. Implikasjoner for valg av fototerapilamper ved behandling av nyfødte blir diskutert. Hvis den terapeutiske effektiviteten av blått og grønt lys er like god, vil resultatene her være et argument for videre evaluering av grønne lamper.

SUMMARY

The use of photometric methods in studies of cellular damage induced by X-rays and visible light.

DNA-damage in cells has been studied by use of spectrophotometry and fluorometry. The method is based on the differential fluorescence quantum yield of the fluorochrome Hoechst 33258 when bound to single and double stranded DNA respectively. DNA-damage by doses of X-rays below 2 Gy was clearly detectable. Blue light from Philips 52 phototherapy lamps induced DNA-damage in human TMG-1 glioblastoma, but no significant effect could be observed after irradiation with green lamps (Sylvania green). In the presence of bilirubin the amount of DNA-damage was increased, notably at high bilirubin concentration and by blue light! The formation of long lived photoproducts that could cause toxicity when added to unirradiated cells was observed. Under the conditions used, the toxicity was similar whether blue or green light was used. It is probable that the photoproducts result from photooxidation.

The relevance of the present data is discussed in light of the proposed use of green light in phototherapy of hyperbilirubinemia.

INNLEDNING

I samarbeid med Helsefysisk avdeling, Rikshospitalet, er det nå etablert laboratoriefaciliteter i to rom som ledd i samarbeidsavtalen mellom SIS og Rikshospitalet. Laboratoriet er gradvis blitt utrustet for å gjøre studier av stråleskader i ulike biologiske systemer og også visse dosimetrifunksjoner. I denne rapporten vil bruk av fotometriske metoder i studier av lysinduserte skader i celler bli beskrevet spesielt grundig.

Innledningsvis skal det også nevnes at laboratoriet har konkret samarbeid med andre om to andre prosjekter hvor fotometriske metoder inngår. Sammen med Helsefysisk avdeling drives måling av stråledoser ved bruk av kopparsulfat dosimetri (Fricks). SIS deltar også i et prosjekt hvor man foretar målinger av graden av kollagendannelse etter bestråling av tarm.

Bruk av fototerapi ved hyperbilirubinemi hos nyfødte har vært beskrevet i SIS-rapport (Christensen og Reitan 1987), og i 2 vitenskapelige artikler (Christensen 1985, Christensen og medarbeidere 1988). Ett av målene med denne SIS-rapporten er å beskrive og diskutere de metoder som er tatt i bruk i fortsettelsen av dette arbeidet ved SIS' laboratorier på Rikshospitalet. Det vil bli presentert innledende data som viser DNA-skader induert av Røntgen- og lysbestråling. Innvirkning av ulike lysspektra vil bli viet særlig stor oppmerksomhet, siden innføring av fototerapilamper med lengre belgelengde kan være et aktuelt optimaliseringstiltak i fototerapi.

METODER

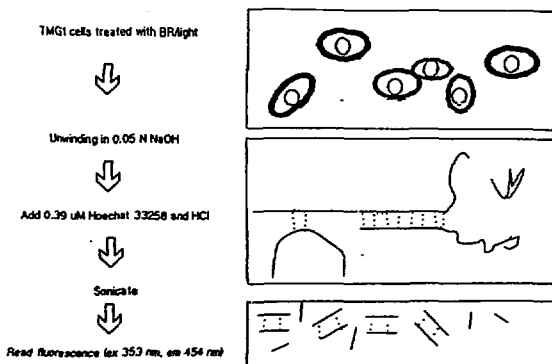
Apparatur og biologisk testavstem

Den sentrale apparaturen brukt i disse studiene er et Perkin-Elmer LS50 fluorescensspektrometer og et Perkin-Elmer lambda 2

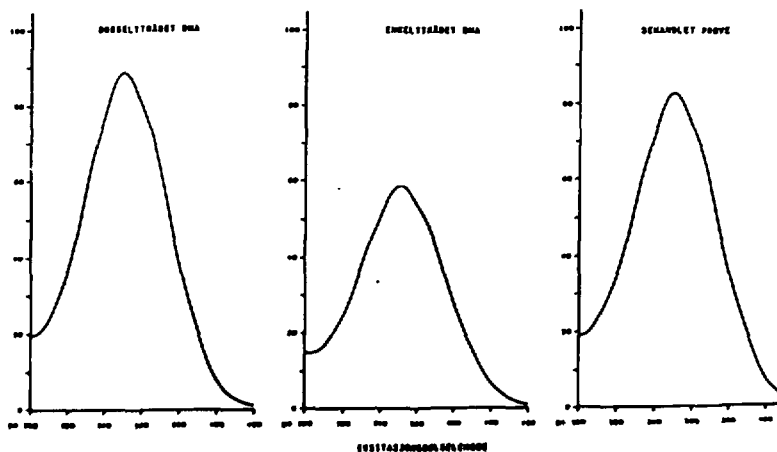
absorpsjonsspektrofotometer. Disse apparatene er koblet til en Copam PC 285 ved bruk av henholdsvis CFS og PECSS software fra Perkin-Elmer. Cellekulturer er blitt dyrket ved Inst. for Patologi på Rikshospitalet. Som modellcelle ble glioblastomceller av linjen TMG-1 valgt, hovedsakelig av praktiske grunner, men også med sideblikk til at de er isolert fra en svulst i nervesystemet. Nervevevet er særlig utsatt ved bilirubintoksisitet hos nyfødte, mens eventuelle senskader kanskje like godt kan tenkes å ramme andre vev.

Metode for måling av enkeltrådbrudd i DNA

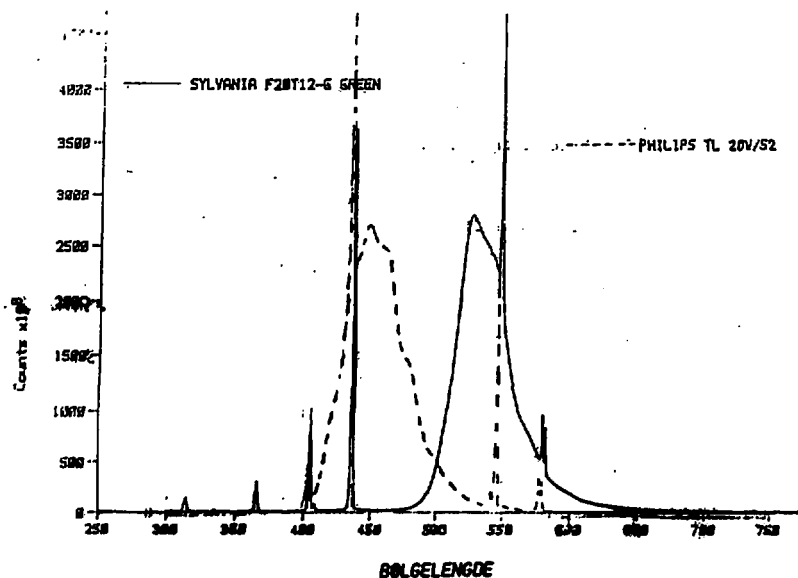
Denne metoden er vist i fig. 1 og er tilpasset etter Kvam (1988) og baserer seg på at DNA-strengene separeres gradvis i alkalisk løsning (Rydberg 1975). TMG-1 cellene ble behandlet med enten bilirubin eller lys (eller eventuelt røntgen). Etter behandling ved 0°C ble cellene utsatt for 0,05 NaOH i 30 min. Dette fører til at hydrogenbindingene mellom DNA-strengene gradvis brytes, og man får regioner av DNA som er enkeltrådede. Oppviklingen begynner også på punkter hvor det er brudd i DNA-strengene, slik at mengden enkeltrådet DNA har en sammenheng med antall skader langs DNA-strengen. Etter en oppviklingstid på 30 min. ble det fluorescerende fargestoffet Hoechst 33258 tilsatt sammen med saltsyre slik at løsningen ble nøytral. Deretter ble celleløsningen behandlet med ultralyd. Dette resulterte i en blanding av enkeltrådede og dobbeltrådede DNA-biter som i den aktuelle løsningen ble tilsatt en detergent for å hindre renaturering. Fargestoffet Hoechst 33258 bindes til DNA og fluorescerer med ulik kvanteeffektivitet avhengig om det er bundet til enkelt eller dobbeltrådet DNA. Fluorescensspektra av Hoechst 33258 bundet til henholdsvis enkelt og dobbeltrådet DNA er vist i fig. 2. Man kan se av figuren at fluorescensen er sterkere fra dobbeltrådet (ikke NaOH-behandlet) DNA enn fra enkeltrådet DNA. En belyst prøve viser fluorescens mellom disse ytterpunktene.



Figur 1. Skisse av den eksperimentelle metoden for måling av trådbrudd (Kvam 1988).



Figur 2. Fluorescens eksitasjonsspektre fra Hoechst 33258 i prøver med henholdsvis dobbeltrådet DNA, enkeltrådet DNA og lysbehandlet DNA.



Figur 3. Lampespektra fra grønn og blå fototerapilampe (modifisert etter Hannevik, SIS).

Bestråling

Cellene ble plassert i beger i isvann og satt over fototerapilampene. Lampene var av to typer, enten Sylvania F 20 T 12 grønn eller Philips TL 20 W/52 blå. Spektrene av disse lampene er vist i fig. 3. Irradiansen ble målt ved bruk av fotodioder (UDT eller Photodyne) og korrigert for detektorenes spektrale følsomhet. Cellene ble utsatt for 64 W/m^2 blått lys eller 32 W/m^2 grønt lys.

Dette tilsvarer henholdsvis 0,88 og 0,50 mol kvanter/m² . time (Einstein/m² . time).

Fotooksydasjonen av bilirubin ved bestråling ble målt som reduksjon i absorbans ved 454 nanometer.

Korreksjon for indre filtereffekt av bilirubin

Siden bilirubinet absorberer ved omkring 450 nanometer hvor Hoechst 33258 har sin emisjonsbølgelengde, vil økende konsentrasjoner av bilirubin forårsake en reduksjon i fluorescensavlesningen. Dette ble korrigeret for ved kjente tilsetninger av bilirubin til celleduspensjoner. En korreksjonskurve ble brukt i de forsøk hvor høyere konsentrasjoner av bilirubin ble kombinert med Hoechst-teknikken (fig. 4).

Metodediskusjon

Absorbans er brukt til konsentrasjonsbestemmelse gjennom alle de gjennomførte studier. Dette har ikke medført noen metodologiske problemer.

De innledende studiene ved bruk av fluorescensmetoden til å måle enkeltrådbrudd i DNA har vært opplytende. Metoden innebærer praktiske fordeler ved at man kan behandle et stort antall prøver på relativt kort tid. Metoden ser ut til å være pålitelig, og variasjonene fra forsøk til forsøk er innen akseptable rammer. Variasjonene fra forsøk til forsøk og mellom enkeltprøver er sannsynligvis mest influert av nøyaktigheten i gjennomføringen av forsøket. Nøyaktigheten i pipetteringer og fordelingen av et likt antall celler til hver prøve er det mest kritiske. Man vil i fremtiden gjøre et forsøk på å forenkle metoden ytterligere ved å kombinere den med et proteinassay for å korrigere for eventuelle variasjoner i celledtall mellom prøvene.

Bruk av fluorescensmetoden for å detektere DNA-skader har vært

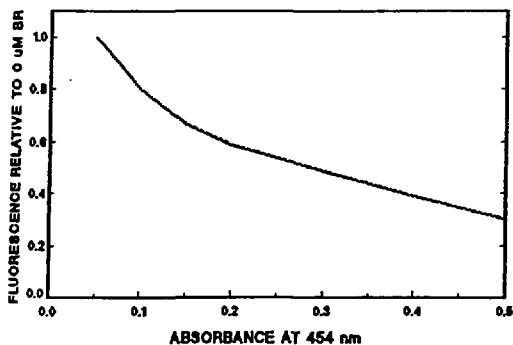
gjort for skader induisert av ioniserende stråling og fotosensibiliserte reaksjoner induisert ved bilirubin. Det er også blitt vist (Kvam 1988) at metoden virker bra for skader induisert av andre fotosensibiliserende stoffer. Antakelig vil metoden virke for alle typer agens som inducerer enkelttrådbrudd, dobbeltrådbrudd eller alkalilabile punkter i DNA. For å oppnå et kvantitativt mål for den totale mengde DNA-skader induisert, bør prøvene behandles ved lav temperatur slik at DNA-reparasjon unngås. Dette kan innebære begrensninger for in vivo bruk og bruk i nærvær av stoffer som krever metabolsk aktivering.

Følsomheten ser ut til å være relativt god for in vitro forsøk. Man kan detektere DNA-skader av stråledoser ned til noen meget få Gy med stor sikkerhet. Noen metode for bruk i virkelig lavdoseproblematikk er det likevel ikke. Det kan her nevnes at vi har arbeid på gang med andre fluorescerende stoffer som muligens kan gi et større fluorescensutbytte (eller fosforescensutbytte) og dermed øke metodens sensitivitet.

Til slutt må det bemerkes at det kan forekomme lesjoner i DNA som denne metoden ikke kan detektere. DNA-skader etter ultrafiolett lys er et eksempel på slike skadetyper. Man kan ikke vente å se thymidin dimere og andre fotoprodukter i DNA ved bruk av denne fluorescenssteknikken. DNA-protein addukter og andre typer kjemiske bindinger til DNA vil også være vanskelig å detektere. Antakelig er metoden for lite følsom til å detektere DNA-trådbrudd som dannes av endonukleaser aktive ved reparasjon av disse typene skader. Avslutningsvis kan det nevnes at vi er på sporet etter fluorescensmetoder som kan supplere med informasjon om graden av andre typer DNA-skader.

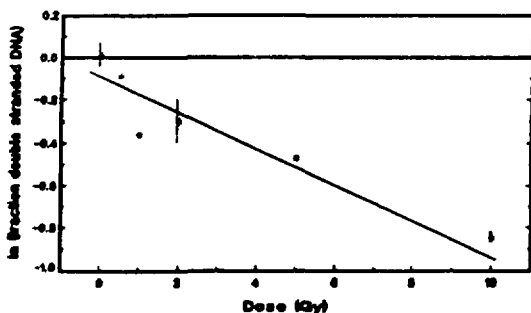
INNER FILTER EFFECT OF BILIRUBIN

RELATIVE FLUORESCENCE OF H33258, EX. 353nm, EM. 454 nm.



Figur 4. Reduksjon i fluorescens fra Hoechst 33258 etter tilsats av bilirubin.

250 kV X-rays



Figur 5. Resultat fra pilotforsøk med Røntgenbestrålte ce. ler (250 kV, 2 mm Al). Naturlig logaritme av dobbeltstråddfraksjon fremstilt som funksjon av stråledose. Usikkerheter er standardavvik fra 3-4 observasjoner. punkter uten usikkerhet er middel av to observasjoner.

RESULTATER

Innledende forsøk med røntgenstråling

For å korrelere bruken av denne metoden med tidligere publiserte resultater vedrørende enkeltrådbrudd ble det gjort bestrålingsforsøk med røntgen. Resultatet av disse forsøkene var oppløftende og man oppnådde en god lineær sammenheng mellom den naturlige logaritmen av dobbeltrådfraksjonen og dosen. Dette er vist på fig. 5. I tillegg var sensitiviteten på metoden som forventet siden man kunne registrere økt trådbruddsfrekvens allerede ved doser på under 2 Gy.

Innledende studier av lysbestråling

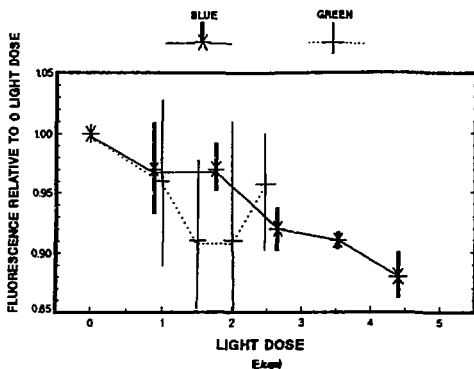
Effekter av lysbestråling av TMG-1 celler

En av problemstillingene var som nevnt å sammenligne effekter av blått og grønt lys brukt i fototerapi. Cellene ble oppløst i fosfatbufret saltvann og belyst uten noen som helst tilsats. Indre, naturlige kromoforer kan forårsake biologisk skade. Dette er vist i fig. 6 hvor sammenhengen mellom lysdose og Hoechst fluorescens er vist. Det kan trekkes den konklusjonen at blått lys forårsaker signifikant senkning i Hoechst- fluorescensen, mens ingen signifikant senkning ble observert etter bestråling med grønt lys innen praktiske bestrålingstider. I begge de nevnte tilfellene ble cellene bestrålt maksimum 5 timer.

Variansen i fluorescensen ved grønt lys, er adskillig større enn variansen ved blått lys (fig. 6). Dette ser ut til å være et gjennomgående trekk i våre forsøk, og kan tenkes forklart ved at det grønne lyset har en relativt dårlig overlappning med absorpsjonsspektret til viktige biologiske kromoforer. Dette er spesielt tydelig i forhold til bilirubinspektret (se under). Ved et dårlig overlapp vil små variasjoner i eksperimentelle forhold kunne gi store variasjoner i resultatene fra forsøk til forsøk.

EFFECTS OF LIGHT ALONE ON CELLS
H33258-FLUORESCENCE VS. LIGHT DOSE

11



Figur 6. Fluorescens fra Hoechst 33258 i celler belyst ved 0° C suspendert i saltvann uten tilsetninger. Usikkerheter er standardavvik fra 4-6 observasjoner.

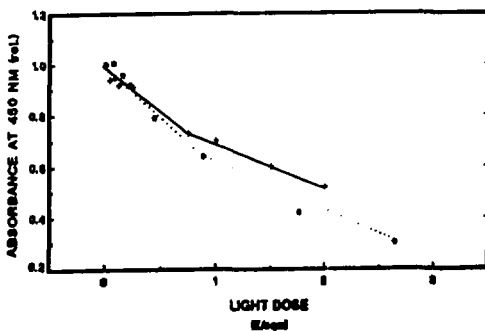
PHOTBLEACHING OF BILIRUBIN

160 uM BR, BR:alb = 3:1

TYPE OF LAMP:

BLUE

GREEN



Figur 7. Reduksjon i absorbansen av bilirubinløsninger ved 450 nm ($\pm 5\text{nm}$) som funksjon av lysdose.

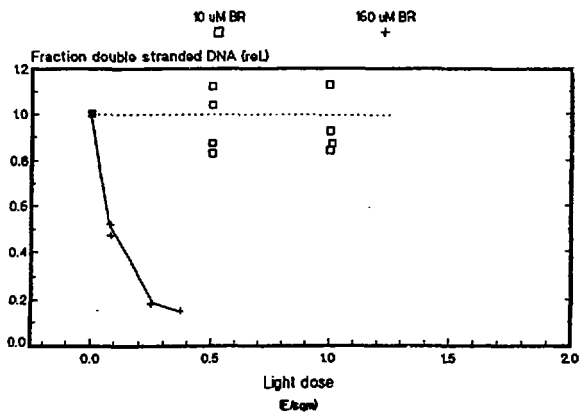
Fotoreaksjoner i nærvær av bilirubin

Det ble foretatt et studium av fotooksydasjon eller bleking av bilirubin ved de to anvendte lampetyperne. Bakgrunnen for at dette studiet ble foretatt, var at man tidligere har observert fototoksiske effekter kun ved lysdoser som gir en tydelig fotooksydasjon av bilirubin (Christensen 1986, 1988). I fig. 7 er absorbanse ved 450 nanometer angitt som funksjon av lysdose. Man kan se liten forskjell i fotooksydasjonshastighet ved blått og grønt lys.

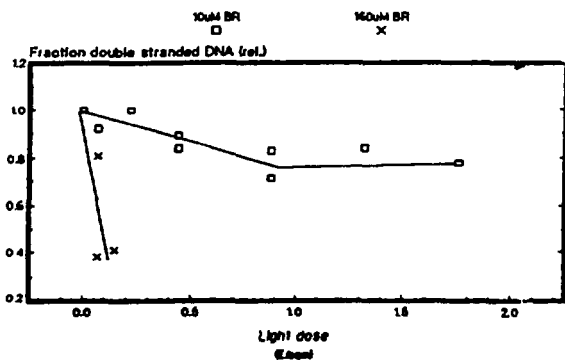
DNA-skaden i celler som har vært belyst i nærvær av bilirubin, var sterkt konsentrasjonsavhengig (fig. 8). Derimot ser det ikke ut til å være noen store prinsipielle forskjeller mellom blått og grønt lys. Den eneste forskjellen mellom blått og grønt lys er at det ble induisert noe DNA-skade ved 10 μM bilirubin når cellene var belyst med blått lys. Ved denne lave konsentrasjonen mått man opp i såpass høye lysdoser at økningen i DNA-skade ikke nødvendigvis kan tilskrives noen bilirubineffekt, men kan ha vært en effekt kun av lysreaksjoner på naturlige kromoforer i cellene. Ved høy konsentrasjon derimot, ble DNA tydelig skadd både ved blått og grønt lys og man kan ikke ut fra de presenterte data påstå at det ene er mer skadelig enn det andre.

I figur 8 er det vist ytterpunkter for konsentrasjoner av bilirubin. Den laveste konsentrasjonen ble valgt som den minimumskonsentrasjon som ga utslag i pilotforsøkene, og den høyeste ligger rundt den serumkonsentrasjon som barna kan nå før fotobehandling blir satt i gang (dette gjelder fullbårne barn). For å studere konsentrasjonsavhengigheten nærmere ble en fast lysdose anvendt ved ulike bilirubinkonsentrasjon. Konklusjonen er at det foregikk en gradvis økning i DNA-skaden med konsentrasjonen (figur 3). I fravær av bilirubin kan det observeres en minket fraksjon dobbeltrådet DNA etter blått lys, i tråd med dataene for Hoechst-fluorescens vist i figur 6. Kurvene i figur 9 starter derfor på ulike nivåer på grunn av en ren lyseffekt på cellene. DNA-skaden økte raskere med økende bilirubinkonsentrasjon etter blått lys enn etter grønt lys.

DNA damage in cells irradiated with green light
 Bilirubin:albumin = 3:1



DNA damage in cells irradiated with blue light
 Bilirubin:albumin = 3:1

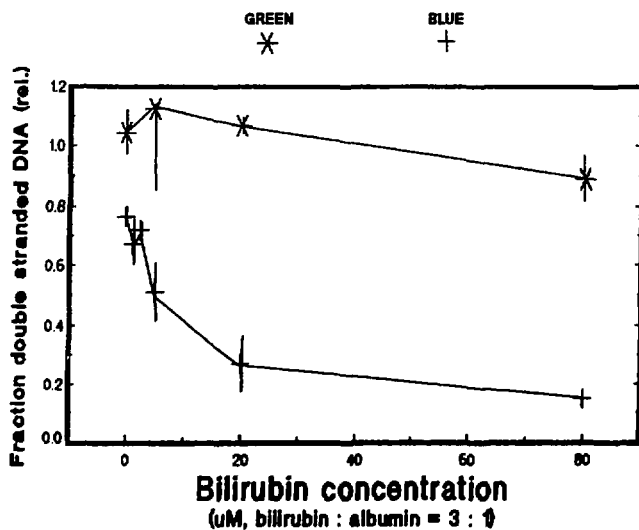


Figur 8. DNA skade i celler belyst i nærvær av bilirubin ved 0° C. Fraksjon dobbeltrådet DNA er målt relativt til celler behandlet med den aktuelle bilirubinkonsentrasjon i merke.

Kurvene i figur 9 er tegnet i konsentrasjonsintervallet 0 μM - 80 μM . Belysningen av celler med grønt lys i nærvær av 160 μM bilirubin ga mer variable resultater. I de fleste forsøkene observerte man en tydelig økning i DNA-skaden etter doser av grønt lys i området 0,25 - 1,5 E/m^2 . Variabiliteten er som diskutert over, antakelig forårsaket av små ulikheter i de eksperimentelle forholdene i ulike forsøk.

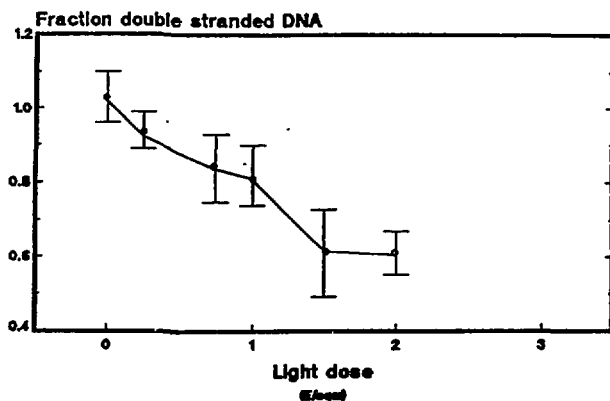
Det er tidligere vist av forfatterne (Christensen 1984, 1986) og av Rosenstein og medarbeidere (1983) at belysning av bilirubin kan føre til dannelse av langlivede fotoprodukter. Den neste type forsøk var derfor en sammenligning av toksisiteten til langlivede fotoprodukter dannet ved henholdsvis blått og grønt lys. Hele bestrålingen ble fullført før den bestrålte bilirubinløsningen ble tilsatt til cellene. Cellene ble så inkubert ved 4°C i en time sammen med den bestrålte bilirubinløsning. Resultatene ble korrigert for indre filtereffekten av bilirubin og eventuelt mørketoksisitet og er presentert i fig. 10. Utviklingen av DNA-skade med dosen var i dette tilfellet helt lik ved blått og grønt lys. Det er også interessant å legge merke til at dannelsen av DNA-skader viste økende tendens opp til et sted rundt $1/2 \text{E}/\text{m}^2$ for deretter å flate ut. Det er fristende å foreslå at dette kan være forårsaket av at en stor del (ca. 50%) av bilirubinet var fotooksydert ved den dosen. Effektiv konsentrasjon av bilirubin var derfor lavere, og det er naturlig å forestille seg at hastigheten for dannelsen av fotoprodukter ble nedsatt.

Effects of different concentrations of BR (0.88 E/sqm, blue or green)

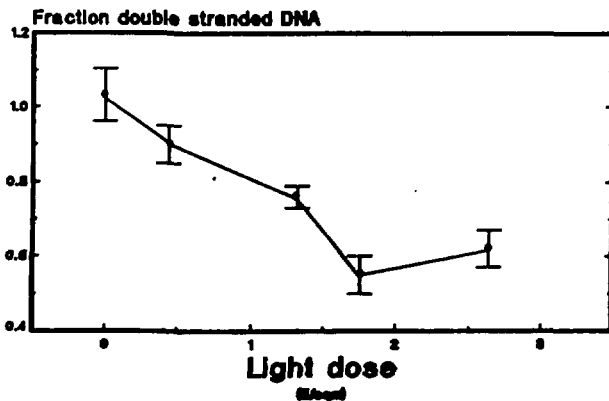


Figur 9. Variasjon i DNA skaden etter en fast lysdose ved variabel bilirubinkonsentrasjon ved 0° C. Fraksjon dobbeltrådet DNA er målt relativt til celler uten bilirubin i mørke.

DNA damage in cells incubated with irradiated BR
Green light, 160uM BR, BR:alb = 3:1



DNA damage in cells incubated with irradiated BR
Blue light, 160uM BR, BR:alb = 3:1



Figur 10. Gentoksiske effekt av bilirubinløsninger bestrålt med ulike lysdoser ved 0° C. Løsningene ble tilsatt cellene og fjernet etter 1 time ved 4° C. Usikkerheter er standardavvik fra 3-8 observasjoner.

DISKUSJON

Lysinduserte trådbrudd i DNA

Det er klart ut fra de presenterte dataene at fototerapilamper, selv i fravær av bilirubin, kan ha en viss gentoksisk effekt in vitro. Når bilirubin er til stede under in vitro forhold, øker den gentoksiske effekten. Dette trenger nødvendigvis ikke å bety at fototerapi in vivo er gentoksisk og dermed kan føre til f.eks. kreftutvikling i huden. På den annen side er langtidseffekter av bilirubin og lys ikke mulig å utelukke fullstendig. Til å utelukke en langtidseffekt er det foretatt altfor få langtidsstudier.

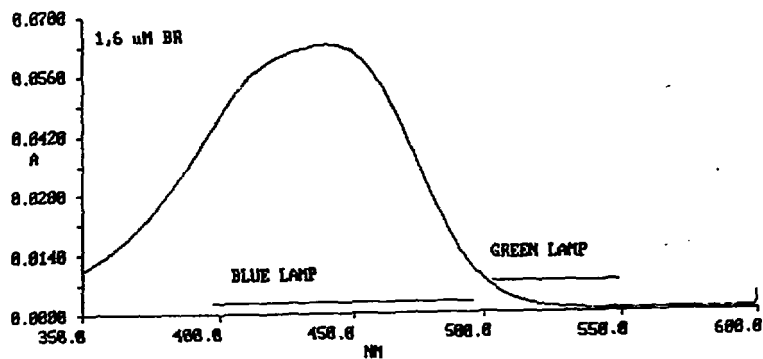
I dagens situasjon er det derfor naturlig å foreslå at oppfølgingsstudier av langtidseffekter blir satt i gang, og at man ikke for fremtiden bør overdosere bruken av fototerapi, men bruke den der den er indisert og med en viss forsiktighet. Det kan være ønskelig at det innføres et ALARA-prinsipp for bruk av lys i fototerapi. Det er påvist ut fra en rekke kliniske studier at fototerapi har sin absolutte berettigelse, men likevel må terapiformen ikke betraktes som fullstendig bivirkningsfri på lang sikt før tilstrekkelige oppfølgingsstudier eventuelt har påvist dette. De aktuelle bivirkningene slik man kjenner dem i dag, er derimot bagatellmessige i forhold til det terapeutiske utbyttet.

Bilirubinforøkene viser også andre ting som gir grunnlag for oppfølging i eksperimentelle studier. Det er en relativt høy frekvens av påvisbare trådbrudd ved høye konsentrasjoner av bilirubin. Det er neppe grunnlag for å trekke altfor vidtrekkende konklusjoner av en sammenligning med trådbruddsfrekvensen for rentgenstråling, men en sammenligning kan likevel være på sin plass. Typen DNA-skader er helt sikkert forskjellig etter rentgenstråling og lysbestråling. Likeledes kan ikke metoden skille mellom såkalte alkali-labile punkter og virkelige trådbrudd i DNA. Det er en stor gentoksisk effekt ved 160 μM

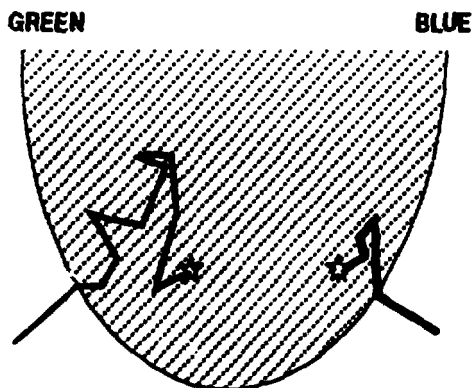
bilirubin (fig. 8 og 10) og denne er på samme nivå eller overgår dataene for 10 Gy røntgenbestråling (fig. 5). Det må imidlertid tas med i betraktningen at studiene av røntgenbestrålte celler var de innledende forsøk med metoden. Forsøkene ble gjort i ulike perioder og trenger derfor ikke å være direkte sammenlignbare. En sammenligning med Kvams arbeid (1988) gir likevel grunn til å påstå at våre data ikke er mye forskjellige fra det han fant ved røntgenbestråling av NHIK 3025-celler. Forskjellen synes å være at Kvam observerte ca. 20- 30% høyere bruddfrekvens enn i våre pilotforsøk.

Bilirubins absorpsjonsspektrum og aksjonsspektrum

I fig. 1' er bilirubins absorpsjonsspektrum vist. Emisjonsspektrene for de to lampetypene (som vist i fig. 3) er også antydnet. Det kan se ut som et paradoks at bilirubins fotoreaksjoner i en del av forsøkene er omtrent av samme styrke ved blått og grønt lys. Man ville ventet langt sterkere reaksjoner ved blått lys siden den blå lampen overlapper bedre med absorpsjonsspektret for bilirubin. På fig. 7, 8 og 10 er det motsatte vist; fotoreaksjonene er omtrent like sterke. Det har etterhvert blitt klart at man i vurderingen av dette fenomenet må ta den optiske penetrasjonsdybden med i betraktningen. De løsningene som stort sett er anvendt i de nevnte forsøk, inneholder 160 μM bilirubin. I fig. 11 er absorpsjonsspektret av 1,6 μM bilirubin vist. En omregning av de oppgitte absorpsjonsverdiene i fig. 11 antyder at 160 μM bilirubin har en absorpsjon på omkring 6 ved 450 nanometer og omkring 1 ved 500 nanometer. Bilirubinløsningen som er blitt bestrålt, har hatt dimensjoner av størrelsesorden $1 \times 1 \text{ cm}$. Når cellene er til stede i bilirubinløsningen (ca. $0,3 - 1 \times 10^8$ celler pr. milliliter), vil det være en sterk lysspredning i løsningen. Et stort flertall av fotonene i de aktuelle spektralområdene vil derfor bli absorbert i bilirubinløsningen, uansett farge. Den eneste forskjellen vil være at et "grønt" foton vil ha en lenger midlere veilengde gjennom løsningen før absorpsjonen skjer. Dette er forsøkt antydnet på fig. 12.



Figur 11. Absorbsjonsspekteret til bilirubin med antydning av hovedtoppen til de to lampene.



Figur 12. Illustrasjonen av transmisjon av grønt og blått lys i en collesuspensjonen med høy bilirubinkonsentrasjon.

Ved lavere bilirubinkonsentrasjoner ser det ut til at man oppnår den forventede forskjellen mellom blått og grønt lys (fig. 8 og 9). De eksperimentelle løsningene vil da absorbere en lavere andel av fotonene ved grønt lys. Det må likevel bemerkes at konsentrasjoner på over 160 μM er klinisk relevante.

Hvis antagelsen over er riktig, ser det ut til at effektiviteten av blått og grønt lys med hensyn på bilirubiroksydasjon in vivo er lik. Det må her presiseres at kvante-effektiviteten for andre fotoprosesser kan være forskjellig (Agati 1989, McDonagh og medarbeidere 1989). Det kan se ut til at fotoner i det grønne området fremmer den strukturelle isomeriseringen av bilirubin. Dannelsen av den strukturelle isomeren lumirubin er sannsynligvis vesentlig for den terapeutiske effekten av fototerapi.

KONKLUSJON

Det kan konkluderes at blått lys kan forårsake gentoksiske effekter i celler. Den samme konklusjonen kan ikke trekkes for grønt lys ut fra våre data, og litteraturen antyder at grønt lys ser ut til å være mindre gentoksiske i de fleste biologiske systemer enn blått lys. I nærvær av bilirubin kan man ikke se noen vesentlige forskjeller mellom fotoreaksjoner på blått og grønt lys ved høye og klinisk relevante bilirubinkonsentrasjoner. Ved lavere konsentrasjoner av bilirubin hvor den optiske tettheten av de eksperimentelle løsningene er mindre, ser man en forventet større gentoksiske virkning av blått i forhold til grønt lys. Når man videre har evidens for at grønt lys kan være effektivt i terapien, er det grunn til å forfølge tanken om at fototerapi av hyperbilirubinemi kan gjøres mer optimal ved lenger belgelengde enn dagens blå lysere. Det skulle ikke være nødvendig å nevne her at man også bør gjøre andre optimaliseringstiltak f.eks. bedring av dosimetrien og oppfølging av klinisk praksis rundt bruken av fototerapi. Penetrasjonen av lys gjennom vev hos nyfødte, er også en viktig parameter ved valg av lysfarge. Nærmere studier av dette er satt igang.

REFERANSER

- Agati G., Third Congress of the European Society for Photobiology (1989) Book of Abstracts.
- Christensen, T., Photochem. Photobiol. 39S (1984) 39 D
- Christensen, T., Photobiochem. Photobiophys. 10 (1986) 253-260.
- Christensen, T. og Reitan J.B., SIS-rapport 1987:6.
- Christensen, T., Støttum, A., Brunborg G. og Reitan J.B. Light in biology and medicine, vol. I (Plenum Publishing Corporation, 1988) 153-159.
- Kvam, E., Hovedoppgave, Universitetet i Oslo, 1988.
- McDonagh, A.F., Agati, G., Fusi, F. and Pratesi, R., Photochem. Photobiol. 50 (1988) 305-319.
- Rosenstein, B.S., Ducore, J.M. and Cummings S.W., Mutation Res. 112 (1983) 397-406.
- Rydberg, B., Rad. Res. 61 (1975) 274-287.

We regret that some of the pages in the microfiche copy of this report may not be up to the proper legibility standards, even though the best possible copy was used for preparing the master fiche.