

**Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego  
w Poznaniu**

**Iek. Radosław Gutherc**

**„Ocena wpływu niskoenergetycznego promieniowania laserowego na  
funkcję naczyń i wybrane parametry stanu zapalnego”**

**Rozprawa na stopień doktora medycyny**

**Promotor**

**dr hab. Arkadiusz Derkacz**

**Poznań 2014**

**Wrovasc – Zintegrowane Centrum Medycyny Sercowo – Naczyniowej**

**Projekt współfinansowany przez Unię Europejską ze środków Europejskiego Funduszu  
Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka na  
lata 2007-2013. POIG.01.01.02-02-001/08**

*Niniejszą pracę dedykuję mojej rodzinie*

*Składam podziękowania*

*Panu dr hab. Arkadiuszowi Derkaczowi*

*za pomoc w tworzeniu niniejszej pracy,*

*okazaną cierpliwość i wiele życzliwości*

## Spis treści:

1. WSTĘP.....	7
1.1 Zapalenie jako podłoże upośledzenia funkcji tętnic.....	7
1.2 Rola śródbłonka naczyniowego.....	9
1.3 Rola cząsteczek adhezji komórkowej.....	10
1.4 Rola P-selektyny w odpowiedzi zapalnej.....	12
1.5 Rola czynnika martwicy nowotworów (TNF- $\alpha$ ) w odpowiedzi zapalnej.....	13
1.6 Ocena diagnostyczna upośledzenia funkcji śródbłonka.....	14
1.7 Ultrasonografia dopplerowska w ocenie funkcji tętnic.....	15
1.8 Zastosowanie niskoenergetycznego promieniowania laserowego.....	19
1.9 Wykorzystanie właściwości LLLT w leczeniu schorzeń układu naczyniowego.....	23
2. CELE PRACY.....	26
3. MATERIAŁ I METODY.....	27
4. WYNIKI.....	37
4.1 Wpływ naświetlania LLLT na stężenie sVCAM-1 w surowicy krwi.....	39
4.2 Wpływ naświetlania LLLT na stężenie sICAM-1 w surowicy krwi.....	41
4.3 Wpływ naświetlania LLLT na stężenie TNF- $\alpha$ w osoczu.....	43
4.4 Wpływ naświetlania LLLT na stężenie P-selektyny w osoczu.....	45
4.5 Wpływ naświetlania LLLT na wartość RI w tętnicy promieniowej.....	47
4.6 Wpływ naświetlania LLLT na wartość PSV w tętnicy promieniowej.....	49
4.7 Wpływ naświetlania LLLT na wartość PI w tętnicy promieniowej.....	51
4.8 Korelacje pomiędzy badanymi parametrami.....	53
5. DYSKUSJA.....	56
6. WNIOSKI.....	66
7. STRESZCZENIE.....	67
8. ZAŁĄCZNIK.....	71
9. PIŚMIENNICTWO.....	72

## Wykaz skrótów:

**ADP** adenozyndifosforan

**AI** (*ang. augmentation index*) współczynnik wzmocnienia

**AT** (*ang. acceleration time*) czas akceleracji

**C** (*ang. compliance*) podatność naczyń

**CRP** (*ang. C-reactive protein*) białko C-reaktywne

**ECMs** (*ang. extracellular matrix proteins*) białka macierzy pozakomórkowej

**EDV** (*ang. end diastolic velocity*) prędkość końcowo-rozkurczowa

**ELISA** (*ang. enzyme linked immunosorbent assay*) immunoenzymatyczne testy fazy stałej

**FGF** (*ang. fibroblast growth factor*) czynnik wzrostu fibroblastów

**FMD** (*ang. flow mediated dilatation*) rozkurcz zależny od przepływu

**GM-CSF** (*ang. granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) czynnik stymulujący wzrost kolonii granulocytarnów i makrofagów

**HPL** (*ang. high-powered laser*) wysokoenergetyczne promieniowanie laserowe

**ICAM-1** (*ang. inter-cellular adhesion molecule-1*) międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna-1

**IFN- $\gamma$**  interferon gamma

**IL-1 $\beta$**  intereukina 1 $\beta$

**IL-2** interleukina 2

**IL-6** interleukina 6

**IL-8** interleukina 8

**IL-10** interleukina 10

**IMT** (*ang. intima media thickness*) grubość kompleksu błona wewnętrzna-środkowa

**LLL** (*ang. low-level laser therapy*) niskoenergetyczne promieniowanie laserowe

**LPS** lipopolischaryd

**MCP-1** (*ang. monocyte chemoattractant protein-1*) białko chemotaktyczne dla monocytów

**M-CSF** (*ang. macrophage colony-stimulating factor*) czynnik stymulujący wzrost kolonii makrofagów

**MIP-1 $\alpha$**  (*ang. macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$* ) białko zapalne makrofagów 1- $\alpha$

**MV** (*ang. mean velocity*) prędkość średnia

**NF- $\kappa$ B** (*ang. nuclear factor kappa B*) czynnik jądrowy kappa B

**p** poziom istotności

**PECAM-1** (*ang. platelet endothelial cell adhesion molecule*) płytkowo-śródbłonkowa cząsteczka przylegania komórkowego-1

**P-sel** selektyna P

**PI** (*ang. pulsatility index*) współczynnik pulsacyjności

**PSV** (*ang. peak systolic velocity*) prędkość szczytowo-skurczowa

**PWA** (*ang. pulse wave analysis*) analiza fali tętna

**PWV** (*ang. pulse wave velocity*) prędkość fali tętna

**RAR** (*ang. renal-aortic ratio*) współczynnik aortalno-nerkowy

**RI** (*ang. resistance index*) współczynnik oporowości

**SAA** (*ang. serum amyloid A*) amyloid surowiczy A

**TACE** (*ang. TNF  $\alpha$  converting enzyme*) enzym konwertujący TNF- $\alpha$

**TGF- $\beta$**  (*ang. transforming growth factor- $\beta$* ) transformujący czynnik wzrostu- $\beta$

**TNF- $\alpha$**  (*ang. tumor necrosis factor- $\alpha$* ) czynnik martwicy nowotworów- $\alpha$

**ULLLT** (*ang. ultra low level laser therapy*) ultraniskoenergetyczne promieniowanie laserowe

**WALT** (*ang. Word Association for Laser Therapy*) Światowa Organizacja Laseroterapii

**VCAM-1** (*ang. vascular cell adhesion molecule-1*) cząsteczka naczyniowej adhezji komórkowej-1

**VEGF** (*ang. vascular endothelial growth factor*) naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu naczyń

# 1. WSTĘP

## 1.1 Zapalenie jako podłoże upośledzenia funkcji tętnic

Obecnie, reakcja zapalna będąc składową odpowiedzi immunologicznej, uznawana jest za jeden z głównych mechanizmów upośledzenia funkcji tętnic. Szczególnie istotną rolę odgrywa ona w procesie zaburzenia funkcji śródbłonka, jako wewnętrznej warstwy naczyń tętnicznych. W dalszej konsekwencji powyższe zjawiska mogą stanowić podłoże dla rozwoju schorzeń sercowo–naczyniowych [1]. W rzeczywistości śródbłonek jest narządem wewnątrzwydzielniczym o ogromnej powierzchni, wytwarzającym szereg różnych substancji. Głównie są to czynniki naczynioaktywne. Pośrednio odpowiada również za hemostazę utrzymując równowagę pomiędzy procesami krzepnięcia a fibrylizacją. Zaburzenie funkcji wydzielniczej śródbłonka wiąże się także z upośledzeniem fizjologicznej bariery przeciwzapalnej [2]. Brak tej wieloczynnikowej równowagi, poza uszkodzeniem funkcji naczyń może być również podłożem rozwoju niewydolności serca oraz mikro- i makroangiopatii w przebiegu chorób metabolicznych [3]. W dalszej kolejności może inicjować szereg niekorzystnych procesów prowadzących do zwiększenia sztywności naczyń, co morfologicznie polega na przebudowie struktury ich ścian. Zjawisko to traktowane jest jako niezależny czynnik ryzyka powikłań sercowo-naczyniowych [4][5].

Nasilenie odpowiedzi zapalnej i upośledzenie funkcji śródbłonka naczyniowego może prowadzić także do rozwoju blaszki miażdżycowej w świetle tętnic. W tym przypadku zapalenie może być niezależne od obecności zaburzeń lipidowych, choć na ogół oba te zjawiska pojawiają się równolegle i w dużym stopniu są ze sobą patofizjologicznie powiązane. Wzmoczona reakcja zapalna sprzyja migracji komórek piankowatych. Towarzyszy temu wydzielanie cytokin prozapalnych, wzrost aktywności komórek układu odpornościowego oraz ich interakcje ze strukturami ściany naczyniowej [6].

Odpowiedź immunologiczna pośrednio może leżeć także u podłoża schorzeń sercowo-naczyniowych, co zostało udokumentowane w literaturze [7]. Zwiększoną odpowiedź zapalną opisano także w przypadku pacjentów z cukrzycą typu 2 oraz nadciśnieniem tętniczym [8]. Sugeruje się ponadto udział zapalenia w rozwoju niewydolności serca [9]. W szeregu opracowań dowodzi się także, iż zapalenie powinno być postrzegane jako niezależne zjawisko mogące warunkować elastyczność blaszki miażdżycowej, co wiąże

się z ryzykiem jej pęknięcia [1][10]. Poza bezpośrednim wpływem na proces uszkodzenia funkcji naczyń odpowiedź zapalna może odgrywać także rolę w patogenezie zaburzeń rytmu serca a zwłaszcza w rozwoju i powikłaniach zakrzepowo zatorowych w przebiegu migotania przedsionków [11].

Stopniowe poszerzanie wiedzy na temat roli zapalenia w chorobach tętnic stało się przyczynkiem do uformowania się nowych kierunków badań. Poza ich nadrzędnym celem, jakim było szczegółowe poznanie udziału odpowiedzi immunologicznej w chorobach naczyń, podejmowano także próby identyfikacji cząsteczek zapalnych, jako markerów uszkodzenia śródbłonna. Miały one także pełnić rolę prognostyczną przydatną dla oceny ryzyka rozwoju powikłań sercowo-naczyniowych. Dotyczyło to zwłaszcza wczesnych etapów rozwoju patologii naczyń, na ogół bez manifestacji klinicznej a więc trudnych do zidentyfikowania w oparciu o standardowe metody diagnostyczne. Prognostyczne wykorzystanie tych cząsteczek miało być uzupełnieniem dla stosowania klasycznych czynników ryzyka chorób naczyń [12]. Zidentyfikowanie takich markerów miało znaleźć zastosowanie dla wyodrębnienia grup pacjentów o podwyższonym ryzyku powikłań [13][14]. Inny kierunek stanowiły badania nad patofizjologią miażdżycy, zwłaszcza w kontekście zagadnienia destabilizacji blaszki miażdżycowej i udziału odpowiedzi zapalnej w tym zjawisku.

Do grupy markerów reakcji zapalnej można zaliczyć między innymi białka z rodziny selektyn, białka ostrej fazy a także cząsteczkę przylegania międzykomórkowego-1 (ICAM-1) oraz naczyniową cząsteczkę przylegania komórkowego-1 (VCAM-1). Należy jednocześnie podkreślić, iż jak dotychczas wymienione wyżej cząsteczki nie znalazły powszechnego zastosowania w praktyce jako czynniki określające ryzyko sercowo-naczyniowe. Przyczyną tego wydają się być duże rozbieżności w piśmiennictwie na ten temat, co należy tłumaczyć skomplikowanym mechanizmem odpowiedzi zapalnej. Z tego też powodu dotychczas nie udało się wykazać przewagi markerów zapalnych nad klasycznymi czynnikami ryzyka, co jednak nie wyklucza dalszych poszukiwań w przyszłości [15][16].



## 1.2 Rola śródbłonna naczyniowego

W pojęciu anatomicznym śródbłonek naczyniowy, stanowiąc wewnętrzną warstwę naczyń krwionośnych tworzy barierę pomiędzy ścianą naczyń a jego światłem. Niezależnie od tego, udowodniono jego dużą aktywność wydzielniczą oraz zdolność do syntetyzowania całego szeregu substancji regulujących funkcje naczyń. Poniekąd aktywność ta wynika z dużej powierzchni jaką łącznie obejmuje wewnętrzna warstwa naczyń.

Do wydzielanych substancji należą czynniki odpowiedzialne za angiogenezę takie jak: naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF), substancje naczyniozwężające (rodniki tlenowe, endotelina-1, tromboksan A<sub>2</sub>), naczyniorozszerzające (m.in. tlenek azotu, prostacyklina, natriuretyczny peptyd C), tlenek azotu (NO), transformujący czynnik wzrostu- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) i siarczan heparanu. Śródbłonek jest także miejscem syntezy stymulatorów wzrostu takich jak: endotelina-1, płytkowy czynnik wzrostu (PGF), interleukiny, czynniki prozakrzepowe (endotelina-1, inhibitor aktywatora plazminogenu 1) a także przeciwzakrzepowe (tlenek azotu, białko C, czynnik von Willebranda). Rola czynnościowa wyraża się ponadto poprzez wydzielanie czynników wazoaktywnych, ICAM-1, VCAM-1, P-selektyny, czynników chemotaktycznych, cytokin prozapalnych (IL-6, IL-2), czynnika martwicy nowotworów- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) jak również i wydzielanie odpowiedzialnej za hamowanie odpowiedzi immunologicznej, interleukiny-10. Aktywność powyższych czynników, odpowiedzialnych za szereg różnych, często przeciwstawnych do siebie procesów, podlega w warunkach fizjologicznych ustalonej, stabilnej równowadze. Jej utrzymanie gwarantuje prawidłową funkcję naczyń. Właściwości takie określane są jako homeostaza naczyniowa [17]. Zaburzenie tej równowagi może prowadzić do tworzenia się skrzepu i zaburzenia przepływu krwi, jak również stymuluje powstawanie blaszki miażdżycowej w świetle tętnic [17][18]. Pojawieniu się miażdżycy w naczyniach towarzyszy bowiem wzmożona synteza i ekspresja cytokin prozapalnych, naciekanie komórek układu odpornościowego a także nasiloną aktywność prozakrzepową.

Niezależnie od tego czy aktywacja układu immunologicznego jest pierwotna czy wtórna do zaburzeń lipidowych, nasilenie tego zjawiska w dalszej konsekwencji oznacza wzmożone ryzyko pęknięcia blaszki miażdżycowej, co w oczywisty sposób przekłada się na rokowanie kliniczne.

Obecne w błonie wewnętrznej naczyń cząsteczki adhezyjne biorą udział w aktywowaniu, migracji oraz adhezji limfocytów do śródbłonna [19][20]. Stymulują one także interakcję komórek

jednojądrzastych z białkami macierzy pozakomórkowej (kolagen, elastyna, fibronektyna), co odbywa się przy udziale obecnych na powierzchni śródbłonna integryn  $\beta$ -1 oraz  $\beta$ -2 [15][16][21]. Oddziaływania jednojądrzastych komórek krwi obwodowej w interakcjach z tymi białkami sugerowano już w opracowaniach z lat 80-tych ubiegłego stulecia [22].

W zmienionej zapalnie wewnętrznej błonie naczyń obserwuje się ponadto wzrost stężenia białek ostrej fazy: amyloidu surowiczego A (SAA), białka C-reaktywnego (CRP). Ta wzmożona aktywność dotyczy również cytokin prozapalnych a zwłaszcza interleukiny 2 (IL-2), interleukiny 6 (IL-6), interleukiny-8 (IL-8) oraz czynnika martwicy nowotworów- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Towarzyszy temu nasiloną ekspresją chemokin: białka zapalnego makrofagów 1- $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ) oraz białka zapalnego makrofagów 1- $\beta$  (MIP-1 $\beta$ ) [23][24].

Najwięcej informacji w literaturze na ten temat powstało w oparciu o badania nad białkiem C-reaktywnym. Jego rola ściśle powiązana jest z aktywnością IL-6, IL-1 oraz TNF- $\alpha$ . Można znaleźć opracowania potwierdzające wpływ CRP na ekspresję molekuł: międzykomórkowej cząsteczki adhezyjnej 1 (ICAM-1), cząsteczki naczyniowej adhezji komórkowej-1 (VCAM-1) oraz E-selektyny, co może prowadzić do wzmożenia odpowiedzi immunologicznej na wewnętrznej powierzchni naczyń krwionośnych [25]. Hodowane w warunkach *in vitro* komórki śródbłonna aktywowane rekombinowanym ludzkim CRP wykazywały na swojej powierzchni istotny wzrost ekspresji ICAM-1 a także VCAM-1, pomimo faktu, że jest ona molekułą o niskiej ekspresji na komórkach zdrowego śródbłonna [25][26].

### **1.3 Rola cząsteczek adhezji komórkowej**

Cząsteczki adhezyjne, określane także mianem adhezyn, odpowiedzialne są za interakcje pomiędzy komórkami oraz inicjowanie odpowiedzi immunologicznej. Regulują krążenie komórek odpornościowych pomiędzy układem krwionośnym a układem limfatycznym, odpowiadają za migrację oraz przyleganie leukocytów do śródbłonna i ognisk infekcji. W obrębie tej grupy wyróżniamy rodziny cząsteczek immunoglobulinopodobnych, integryn oraz selektyn [27]. Do rodziny selektyn zaliczane są: selektyna płytkowa (P), śródbłonkowa (E) oraz leukocytarna (L). Rodzinę adhezyn tworzą natomiast ICAM-1, VCAM-1 jak również płytkowo-śródbłonkowa cząsteczka przylegania komórkowego-1 (PECAM-1). Pod względem chemicznym mają one budowę zbliżoną do immunoglobulin [28]. Są one

glikoproteinami o zróżnicowanej budowie na ogół składającej się z kilku domen, które decydują o ich właściwościach. Poza aktywacją innych komórek układu odpornościowego, biorą też udział w aktywowaniu płytek krwi.

W obrębie blaszek miażdżycowych opisano zwiększoną aktywność cząsteczek adhezyjnych. Fakt ten tłumaczyć może wzmożona aktywność zarówno limfocytów jak i makrofagów w procesie aterogenezy [29][30]. Niezależnie od wpływu cząsteczek adhezyjnych na funkcję komórek jednojądrzastych krwi, sugeruje się także ich pośredni udział w uszkodzeniu śródbłonna naczyń poprzez działanie wazokonstrykcyjne a także w rozwoju nadciśnienia tętniczego [8]. Wydaje się, że właściwości te mogą mieć związek ze stymulowaniem syntezy cząsteczek adhezji komórkowej przez angiotensynę II [31].

W praktyce badawczej wykonuje się oznaczenia rozpuszczalnych form cząsteczek adhezji komórkowej. Podobnie jak ma to miejsce w przypadku tlenku azotu, endoteliny-1, surowiczego amyloidu-A, wolne frakcje niektórych adhezyn zaliczane są do grupy wskaźników uszkodzenia śródbłonna [18]. W piśmiennictwie można dotrzeć do prospektywnych badań przeprowadzonych u chorych z miażdżycą, w których potwierdzono, iż stężenie wolnej cząsteczki ICAM-1 oznaczanej w surowicy krwi wiąże się z wyższym ryzykiem powikłań sercowo-naczyniowych i śmiertelnością z tego powodu [29]. Związek z ekspresją molekuł zapalnych sugeruje się także w przypadku objawów choroby niedokrwiennej serca, udaru mózgu oraz niedokrwienia tętnic obwodowych. Ich wyższą aktywność stwierdzono u chorych z epizodami dławicy niestabilnej [32][33]. Jednocześnie u chorych z bólem wieńcowym stwierdzono w trakcie epizodu wzrost aktywności ICAM-1 oraz L-selektyny w porównaniu do okresów bez dolegliwości [29][30]. Podobnie w trakcie samego incydentu zawału mięśnia serca opisano wzrost stężenia ICAM-1 oraz E-selektyny w surowicy krwi [34]. Wskazuje się również, że mierzony w surowicy krwi poziom ICAM-1 może pozytywnie korelować z ryzykiem pojawienia się komorowych zaburzeń rytmu w przebiegu zawału serca [35]. U chorych z cukrzycą typu 2 stężenia ICAM-1 oraz VCAM-1 w surowicy zależne są od wyrównania glikemii. Taka obserwacja mogłaby sugerować udział układu immunologicznego w mechanizmie powstawania insulinooporności [29].

W piśmiennictwie można dotrzeć także do szeregu badań, w których nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic ekspresji cząsteczek adhezyjnych w surowicy krwi (ICAM-1, VCAM-1), co zostało zaobserwowane w przypadku pacjentów ze stabilną chorobą wieńcową [36]. Poza tym, w literaturze opisano też zależność pomiędzy ekspresją tych cząsteczek a

wiekami [37]. Dlatego też z klinicznego punktu widzenia interpretacja uzyskiwanych wyników na ten temat staje się utrudniona.

#### **1.4 Rola P-selektyny w odpowiedzi zapalnej**

Selektyna P określana również jako selektyna płytkowa, podobnie jak ICAM-1 i VCAM-1 jest cząsteczką adhezji komórkowej. Do tej grupy zaliczamy także selektynę śródbłonkową (E) oraz limfocytarną (L). Selektyna P zmagazynowana jest w ziarnistościach określanych jako ciała Weible'a-Palade'a. Spoczynkowo jej zasoby znajdują się w nieaktywnych komórkach śródbłonka oraz w ziarnistościach trombocytów [38]. Aktywacja cząsteczki selektyny związana jest z procesem uwalniania jej z wnętrza komórek, a następnie ekspresji na powierzchni śródbłonka. Równolegle do tego procesu ma miejsce aktywacja układu krzepnięcia. Proces ten stymulowany jest m. in. przez TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-4 oraz lipopolisacharyd. Najsilniejszymi kofaktorami uwalniania cząsteczek selektyny płytkowej jest histamina, trombina jak również reaktywne wolne rodniki tlenowe. Pod wpływem tych wszystkich czynników dochodzi do natychmiastowego uwalniania się cząsteczek selektyny z ziarnistości Weibla-Palade'a na powierzchni komórek śródbłonka. Dodatkowo cytokiny prozapalne mogą indukować syntezę P-selektyny *de novo*. Najsilniej jest to wyrażone w przypadku IL-6, właściwości takie posiada również IL-1 oraz TNF- $\alpha$ . Z uwagi na wielodomenową budowę cząsteczki P-selektyny proces aktywacji wymaga obecności glikoprotein oraz glikolipidów będących jej ligandami.

Poza wspomnianym już wcześniej udziałem P-selektyny w aktywacji układu krzepnięcia, wraz z cząsteczkami adhezji komórkowej, pełni ona rolę w procesie migracji limfocytów przez ścianę naczyń i ich oddziaływań z komórkami śródbłonka. Zjawisko to jest składową odpowiedzi komórkowej. W konsekwencji aktywacja limfocytów T oraz ich oddziaływanie z elementami śródbłonka prowadzą do nasilenia reakcji zapalnej w ścianie naczyń oraz ich uszkodzenia.

## 1.5 Rola czynnika martwicy nowotworów (TNF- $\alpha$ ) w odpowiedzi zapalnej

TNF- $\alpha$  określany w literaturze także jako kachektyna, jest błonowym białkiem uwalnianym przy udziale metaloproteinazy TACE (enzym uwalniający TNF- $\alpha$ ). Jego nazwa wywodzi się z obserwacji klinicznych przeprowadzonych w USA przez W. Coley'a na przełomie XIX i XX w. Do zidentyfikowania tego czynnika doprowadziła wówczas obserwacja występowania przypadków remisji u chorych z mięsakiem, którzy jednocześnie zostali zakażeni różą przy udziale szczepów *Streptococcus pyogenes* i *Serratia marcescens*. Jak się potem okazało głównym źródłem produkcji TNF- $\alpha$  były obecne w miejscu zakażenia limfocyty i makrofagi [38].

Synteza TNF- $\alpha$  jest stymulowana przez czynnik stymulujący wzrost kolonii granulocytarnów i makrofagów (GM-CSF), czynnik stymulujący wzrost koloni makrofagów (M-CSF), a w warunkach eksperymentalnych również przez lipopolisachryd (LPS). TNF- $\alpha$  jest przedstawicielem grupy kilkudziesięciu dotychczas poznanych cytokin prozapalnych, cząsteczek odgrywających rolę w odpowiedzi immunologicznej oraz w krwiotworzeniu. Może on pobudzać wspomnianą wcześniej syntezę białek ostrej fazy, jak również innych cytokin zapalnych, co w szczególności dotyczy IL-1 i IL-6. Czynnik ten wpływa na aktywację makrofagów, stymuluje resorpcję kości a także pobudza limfocyty typu B do produkcji przeciwciał pośrednio uczestnicząc w odpowiedzi humoralnej organizmu. Ponadto zmniejsza lipogenezę poprzez hamowanie ekspresji genu lipazy lipoproteinowej.

W badaniach na temat roli TNF- $\alpha$  w procesie uszkodzenia funkcji naczyń wykazano zależność pomiędzy jego wolnym stężeniem a stopniem zaawansowania zmian miażdżycowych w naczyniach. W poszczególnych opracowaniach potwierdzono, że wzrost aktywności TNF- $\alpha$  towarzyszy także rozwojowi niewydolności serca [39]. Sugeruje się ponadto niekorzystny wpływ tego czynnika na funkcję śródbłonna naczyniowego w mechanizmie zmniejszenia uwalniania tlenu azotu [40]. W latach 90-tych ubiegłego stulecia potwierdzono także hamowanie przez TNF- $\alpha$  jego syntezy [41].

Wiedza na temat roli tego czynnika w odpowiedzi zapalnej pozwoliła na podjęcie prób stworzenia nowych możliwości terapeutycznych. Potwierdzono korzystne działanie inhibitorów TNF- $\alpha$  na śródbłonek naczyniowy [42]. Dotychczas poza pozytywnymi rezultatami z wykorzystaniem przeciwnowotworowych właściwości TNF- $\alpha$  w niektórych nowotworach układu krwiotwórczego nie uzyskano zadawalających wyników w leczeniu

onkologicznym. Fakt ten tłumaczy się głównie jego wysoką toksycznością, zwłaszcza w wyższych dawkach i jednocześnie małą skutecznością w większości pozostałych przypadków. Równoległe z uwagi na to, że czynnik martwicy nowotworów jest jedną z głównych cytokin stymulujących zapalenie, pojawiły się próby klinicznego zastosowania jego inhibitorów w leczeniu schorzeń, u podłoża których leży odpowiedź zapalna. Dotychczas zastosowanie znalazły: infliksymab, adalimumab, golimumab oraz talidomid [43]. W chwili obecnej znajdują one zastosowanie w terapii reumatoidalnego zapalenia stawów, choroby Crohna, niektórych nowotworów oraz zwalczaniu reakcji przeszczep przeciwko gospodarzowi [44][45][46].

### **1.6 Ocena diagnostyczna upośledzenia funkcji śródbłonka**

Rozwój wiedzy na temat roli śródbłonka naczyniowego i zaburzenia jego funkcji w schorzeniach układu sercowo-naczyniowego pozwolił na uformowanie się nowych kierunków badań. Jednym z nich było stworzenie nowych metod oceny funkcji śródbłonka, które mogłyby znaleźć zastosowanie w praktyce klinicznej [47].

W przeszłości wykonywano głównie testy inwazyjne, bądź też badania w warunkach *in vitro* z wykorzystaniem fragmentów naczyń po zabiegach chirurgicznych bądź innych procedurach inwazyjnych [49].

Obecnie, głównie stosuje się metody biochemiczne najczęściej wykonując pomiar rozpuszczalnych cząsteczek będących markerami upośledzenia funkcji śródbłonka [18]. Rozwój diagnostyki laboratoryjnej umożliwia także pomiar obecności śródbłonkowych komórek prekursorowych we krwi obwodowej [48].

Metody badawcze stosowane w ocenie funkcji śródbłonka naczyniowego możemy sklasyfikować jako pośrednie lub bezpośrednie. Do tych pierwszych zaliczamy testy wykonywane użyciem z L-argininy, adenylozynodifosforanu (ADP) lub histaminy. Po podaniu powyższych substancji pomiarom podlega m. in. stężenie tlenu azotu, prostaglandyn, cząsteczek adhezyjnych lub czynników krzepnięcia.

W przypadku metod bezpośrednich ocena funkcji śródbłonka naczyniowego wykonywana jest zarówno w warunkach *in vivo*, jak i *in vitro*. W warunkach *in vitro* są to izolowane tętnice. W metodach inwazyjnych pod wpływem bodźców takich jak np.

noradrenalina lub inhibitory syntazy tlenku azotu ocenia się przepływ krwi. Zastosowanie sił ścinania pozwala natomiast zmierzyć współczynnik ścierania, co możliwe jest do wykonania zarówno w warunkach *in vivo*, jak i *in vitro*.

Ze względu na bezpieczeństwo i dostępność wykonywanych pomiarów coraz szersze zastosowanie znajdują testy nieinwazyjne. Celem obiektywizacji oceny fali przepływu przez tętnice wprowadzono szereg parametrów. W badaniu FMD czyli rozkurczu zależnego od przepływu, analizie podlega stopień rozkurczu tętnicy ramiennej po uprzednim zamknięciu przepływu przy użyciu mankietu ciśnieniomierza [50]. Także coraz częściej dokonuje się pomiarów prędkości fali tętna (PWV), która jest odbiciem prędkości rozchodzenia się odkształcenia naczyń w trakcie przepływu krwi [52]. Dysponując tonometrem piezoelektrycznym można dodatkowo dokonać analizy fali tętna (PVA) [53][54]. Umieszczając czujniki piezoelektryczne w przebiegu wybranych tętnic można ocenić prędkość przemieszczania się fali tętna. W warunkach fizjologicznych wynosi ona od kilku metrów na sekundę w przypadku naczyń dużych, nawet do kilkunastu metrów na sekundę w małych tętniczkach. W warunkach fizjologii parametry te zależą od anatomicznej budowy ściany naczynia, głównie zawartości włókien elastycznych i mięśni gładkich. Zastosowanie takiego urządzenia pozwala także na ocenę sztywności tętnic w spoczynku. Poza PWV ocenia się także współczynnik wzmocnienia (AI). Dzięki temu można wykryć upośledzenie funkcji naczyń tętnicznych już we wczesnych stadiach [54].

### **1.7 Ultrasonografia dopplerowska w ocenie funkcji tętnic**

Badanie ultrasonograficzne stanowi jedną z nieinwazyjnych metod diagnostycznych, która umożliwia uzyskanie obrazu naczyń oraz ocenę przepływu w ich świetle. Metoda ta wykorzystuje zjawisko rozchodzenia się, rozpraszania i odbicia fali ultradźwiękowej w strukturze tkanek. Na przełomie lat 60-tych i 70-tych ubiegłego wieku metodę badań ultrasonograficznych wzbogacono o techniki wykorzystujące znany od połowy XIX wieku tzw. efekt Dopplera, co przyczyniło się do poszerzenia możliwości oceny hemodynamiki przepływu przez naczynia.

Prędkość rozchodzenia się fali ultradźwiękowej w tkankach miękkich wynosi średnio 1504 m/s. W zależności od badanego obszaru ciała generowane są ultradźwięki w zakresie

częstotliwości od 2 do 50 MHz. Źródłem fali ultradźwiękowej jest piezoelektryczny przetwornik zamieniający prąd elektryczny w ultradźwięki. Na przestrzeni ostatnich lat coraz większe znaczenie w ultrasonografii zyskują techniki obrazowania wykorzystujące wspomniane obrazowanie *duplex doppler*. Obecnie ich wykorzystanie stało się już standardem diagnostycznym. W praktyce daje to możliwość uzyskania bardziej dokładnej wizualizacji badanego obszaru, jak i wykorzystania dodatkowych parametrów pozwalających na precyzyjną ocenę hemodynamiki przepływu krwi.

Dla oceny klinicznej najczęściej wykorzystywane są: metoda fali ciągłej, metoda fali pulsacyjnej, metoda kolorowego obrazowania, mapowanie przepływu jak również kombinacje powyższych metod. Stwarza to możliwość oznaczenia prędkości w poszczególnych fazach, kierunku przepływu krwi w naczyniach oraz kształtu fali przepływu będącej odzwierciedleniem podatności ścian naczyniowych. Dodatkowo można się wspomóc oceną oporu naczyniowego jako parametru warunkowanego budową tętnic i obecnością ewentualnej patologii. W tym przypadku zastosowanie znajduje współczynnik pulsacyjności (PI) oraz współczynnik oporowości naczyń (RI). Wartości obu tych parametrów z matematycznego punktu widzenia są ze sobą powiązane i zależą od maksymalnej prędkości szczytowo-skurczowej (PSV), prędkości późnorozkurczowej (EDV) oraz prędkości średniej (MV). W badaniach poza parametrami liczbowymi ocenia się także kształt fali napływu (odrębnie dla fazy skurczowej i rozkurczowej) oraz ewentualną obecność przepływu wstecznego, czyli odwrócenie kierunku fali przepływu w fazie rozkurczu w naczyniach o fizjologicznie wysokim oporze.

Postęp, jaki dokonał się technice obrazowania dopplerowskiego pozwala na znacznie bardziej precyzyjną ocenę wspomnianych parametrów hemodynamicznych oraz pomiary w trudniej dostępnych obszarach. Stworzył on też możliwości praktycznego wykorzystania poszczególnych pomiarów w diagnostyce chorób naczyń. Coraz większego znaczenia nabiera ocena parametrów bezpośrednio odnoszących się do funkcji śródbłonna naczyniowego, zarówno morfologii a także właściwości fizyko-mechanicznych. Wykorzystuje się pomiar kompleksu błona wewnętrzna-środkowa naczynia (IMT), badanie podatności naczyń krwionośnych oraz wspomniany już stopień rozszerzenia tętnicy ramiennej po wykonaniu okluzji tętnic przedramienia lub ramienia (FMD) [50][55][56]. W piśmiennictwie wskazuje się na istnienie zależności pomiędzy wartościami FMD tętnicy ramiennej a wielkością wskaźnika IMT tętnic szyjnych [56]. Opisany został ponadto związek pomiędzy grubością kompleksu



IMT a natężeniem reakcji zapalnej wyrażający się ekspresją markerów immunologicznych [57].

W praktyce klinicznej izolowane pomiary prędkości skurczowo-rozkurczowej przepływu przez tętnice nie znajdują powszechnego zastosowania. Przyczyną tego jest przede wszystkim zbyt duża zmienność tych parametrów, co nie pozwala na uzyskanie zadowalającej powtarzalności uzyskiwanych wyników. Wyjątkiem są ograniczone sytuacje kliniczne gdzie parametry prędkości przepływu znajdują zastosowanie w badaniach diagnostycznych. Przegląd piśmiennictwa dostarcza doniesień szczególnie w zakresie diagnostyki prenatalnej. Wykazano liniową zależność pomiędzy prędkością skurczową w tętnicy środkowej mózgu u płodu a wiekiem ciążowym [58]. Potwierdzono także, że w stanach niedotlenienia płodu wzrasta prędkość rozkurczowa tej tętnicy i jednocześnie obniża się współczynnik pulsacyjności [59]. W ocenie diagnostycznej zastosowanie znalazł także współczynnik mózgowo-pępowinowy, będący ilorzem współczynnika pulsacyjności (PI) w tętnicy środkowej mózgu i tętnicy pępowinowej [60][62].

Inne pomiary parametrów hemodynamicznych znajdują zastosowanie w diagnostyce chorób tętnic, jak dotąd najczęściej ocenie podlegają tętnice nerkowe. W ultrasonograficznej ocenie tętnicy nerkowej w pomiarach najczęściej wykorzystuje się czas akceleracji fali przepływu skurczowego (AT) oraz wymienione wcześniej współczynniki oporowości (RI) i pulsacyjności naczyń (PI) [63][64]. Powyższe parametry odnoszą się do właściwości hemodynamicznych przepływu przez naczynia tętnicze, co przekłada się na wnioski diagnostyczne. Sugeruje się bowiem, że wartości powyższych parametrów mogą korelować z wczesnym upośledzeniem przepływu w przebiegu zwężenia naczyń nerkowych. Wykazano także, iż odchylenia w zakresie tych wskaźników mogą wyprzedzać pojawienie się powikłań narządowych w grupie chorych z nadciśnieniem tętniczym [63][64][65]. W pojedynczych doniesieniach sugeruje się nawet zależność między mierzonymi wartościami tych parametrów a uszkodzeniem miąższu nerek i stopniem odwracalności tego procesu [63][64]. W tej samej grupie chorych zwiększenie się wartości zarówno RI, jak i PI w tętnicach nerkowych wiązało się nie tylko z pojawieniem się nefropatii nadciśnieniowej. W innych bowiem opracowaniach dowodzi się, iż wartości tych parametrów zależne są od stopnia jej zaawansowania, czasu trwania nadciśnienia tętniczego jak również obecności innych powikłań narządowych [63][65][66].

Sam współczynnik oporowości tętnic (RI) głównie wykorzystywany jest w ocenie dopplerowskiej tętnic niskooporowych. W przypadku naczyń nerkowych za prawidłowe uznaje się wartości RI 0,57-0,7 a PI 0,7-1,4. Uważa się, że obniżenie współczynnika oporowości i współczynnika pulsacyjności odpowiednio <0,45 i <0,7 może towarzyszyć istotnemu hemodynamicznie zwężeniu tętnic nerkowych [63]. Jest on definiowany jako iloraz pomiędzy różnicą prędkości szczytowo-skurczowej (PSV) i końcowo-rozkurczowej (EDV) a prędkością szczytowo-skurczową (PSV) według następującego wzoru:

$$RI = (PSV - EDV) : PSV$$

Warto w tym miejscu nadmienić, że choć potwierdzono możliwość diagnostycznego wykorzystania współczynnika oporowości, to nie należy zapominać, iż w pewnych sytuacjach interpretacja jego pomiarów może być utrudniona. Przyczyną takiego stanu rzeczy jest głównie spadek elastyczności ścian dużych naczyń w warunkach *in vivo*. Najczęściej dochodzi do tego w stanach związanych z obecnością patologii naczyń. Szczególnie nabiera to znaczenia w przypadkach zaawansowanej miażdżycy, gdzie wartości RI będą nieadekwatnie niskie w stosunku do rosnącego oporu naczyniowego. Założyć trzeba, iż związek pomiędzy rzeczywistym oporem w naczyniu tętnicznym a obliczanym RI ma charakter zależności liniowej jedynie w określonych przedziałach wartości. W skrajnych bowiem przypadkach poziom RI może być niski a nawet zbliżony do zera pomimo wysokiego oporu obwodowego. Z tego też powodu, dla obiektywizacji pomiarów wprowadzono pojęcie podatności naczyń (C), która jest ilorazem wzrostu objętości naczynia i ciśnienia krwi w jego świetle. Podatność obniża się np. w przypadku schorzeń układu tętniczego. Tak więc interpretacja wartości RI w pełni możliwa jest przy zachowanej odpowiedniej podatności naczynia [67]. Należy ponadto pamiętać, iż na wartości współczynnika oporowości naczyń może wpływać przyspieszona akcja serca, bradykardia oraz obecność wad zastawkowych [68].

Współczynnik pulsacyjności naczyń jest parametrem definiowanym jako iloraz pomiędzy różnicą prędkości szczytowo-skurczowej (PSV) i prędkości końcowo-rozkurczowej (EDV) a prędkością średnią przepływu (MV). Najczęściej wykorzystywany jest w ocenie tętnic wysokooporowych, gdzie obserwuje się przepływ trójfazowy [69]. Jest on obliczany na podstawie wzoru:

$$PI = (PSV - EDV) : MV$$

Pomimo wykazanych powyżej, pewnych ograniczeń w interpretacji tych parametrów, współczynniki oporowości i pulsacyjności naczyń należy uznać za wykładniki oporu naczyniowego, pośrednio świadczące też o podatności naczyń. Wartość obu tych parametrów determinowana jest budową ściany naczynia i ewentualną obecnością patologii zmieniającej jego podatność [69][70].

### **1.8 Zastosowanie niskoenergetycznego promieniowania laserowego w medycynie**

Lecznicze właściwości światła poznano przeszło 100 lat temu. W 1903 r. przyznano nagrodę Nobla duńskiemu lekarzowi N. Finsenowi, który wykazał lecznicze działanie światła w terapii niektórych schorzeń skóry. Niewiele ponad pół wieku później skonstruowano po raz pierwszy źródło światła laserowego. Promieniowanie laserowe jest promieniowaniem optycznym. Słowo „laser” jest akronimem określenia: *Light Amplification of Stimulate Emmision of Radiation* (wzmocnienie światła poprzez wymuszoną emisję promieniowania). Zakres tego promieniowania dotyczyć może zarówno części widzialnej jak i niewidzialnej dla oka ludzkiego (podczerwień, ultrafiolet). Samo działanie wiązki laserowej opiera się na zjawisku jednoczesnej absorpcji i emisji promieniowania i związane jest z naprzemienną zmianą poziomów energii atomów. Charakter promieniowania opisywany jest poszczególnymi parametrami fali. Głównie są to: amplituda, długość, prędkość, okres i częstotliwość fali. Z racji faktu, iż dla uzyskania żądanego efektu biologicznego w trakcie naświetlania laserem, do tkanek trzeba doprowadzić przyjętą dawkę energii promieniowania, stosuje się szereg parametrów opisujących właściwości wiązki laserowej, dzięki czemu można w precyzyjny sposób ustalić parametry naświetlania. W metodyce badań poza podawaną całkowitą dawką emitowanej energii najczęściej stosuje się parametry takie jak: powierzchniowa gęstość mocy oraz powierzchniowej gęstości energii. Definiuje się je odpowiednio jako iloraz mocy bądź energii i powierzchni naświetlania. Obliczane są one według wzorów:

**gęstość mocy= moc: naświetlana powierzchnia**

**gęstość energii= energia: naświetlana powierzchnia**

Powyższe parametry wyrażone są w odpowiednich jednostkach ( $W/cm^2$  i  $J/cm^2$ ) [71]. Do najważniejszych właściwości promieniowania laserowego zaliczyć należy koherentność (spójność czasowa i przestrzenna) oraz monochromatyczny charakter. Promieniowanie laserowe cechuje także mały stopień rozbieżności [71].

W latach 60-tych ubiegłego stulecia pojawiły się pierwsze konstrukcje umożliwiające emisję energii laserowej i niemal od razu zaczęto poszukiwania jej potencjalnych zastosowań w medycynie. Wynikało to z obecnej już wówczas wiedzy, iż wiązka laserowa generuje rozmaite, często odmienne od siebie efekty biologiczne na eksponowanych tkankach. Stworzyło to podstawy do szerokiego wykorzystania laserów w praktyce. Niskoenergetyczne promieniowanie laserowe mając udokumentowany wpływ na fizjologię komórek może w warunkach doświadczalnych regulować funkcję śródbłonna naczyniowego. Wykazano, że energia laserowa pobudza syntezę ATP, pobudza ruchliwość i proliferację komórek, stymuluje produkcję serotoniny i endorfin. Ponadto zwiększa angiogenezę oraz przebudowę macierzy pozakomórkowej. LLLT (niskoenergetyczne promieniowanie laserowe) moduluje również odpowiedź układu immunologicznego wykazując właściwości przeciwzapalne. Jest to zjawisko złożone, najprawdopodobniej pojawiające się już na poziomie molekularnym. Natomiast na poziomie oddziaływań komórkowych przeciwzapalne działanie LLLT dotyczy głównie modulowania funkcji limfocytów, makrofagów oraz mastocytów poprzez wpływ na procesy adhezji komórkowej. LLLT może także modyfikować poszczególne mechanizmy odpowiedzi immunologicznej, hamując ekspresję cytokin prozapalnych [72]. Niezależnie od tego wykazuje działanie antyagregacyjne, które podobnie jak w przypadku innych właściwości jest zależne od ładunku zastosowanej energii [73]. Powyższy szereg właściwości energii laserowej pozwala zatem spodziewać się korzystnego wpływu LLLT na funkcję śródbłonna naczyniowego.

Promieniowaniu laserowemu przypisuje się także zdolność stymulowania proliferacji komórek [74]. Opisano odpowiedź czynników wzrostu oraz właściwości bakteriostatyczne już w przypadku mocy 30 mW [75]. Zastosowanie wyższej emitowanej mocy (rzędu 200 mW) prowadzi natomiast do wzrostu uwalniania endorfin oraz serotoniny [75].

Niskoenergetyczne promieniowanie laserowe moduluje odpowiedź układu immunologicznego, co jest efektem wielokierunkowym. Wpływa zarówno na ekspresję cytokin, jak i oddziaływania komórek immunokompetentnych. Dotyczy to zwłaszcza limfocytów, makrofagów oraz mastocytów [72][75].

Działanie przeciwzapalne oraz stymulacyjne ma charakter głównie miejscowy, co może tłumaczyć jego pojawienie się przy zastosowaniu relatywnie niewielkich dawek mocy. Wyrazem tego są opisane w literaturze próby wykorzystania ultraniskoenergetycznego promieniowania (ULLLT), gdzie stosowane wartości mocy nie przekraczają 1 mW [76].

W przypadku LLLT najczęściej stosuje się dawki od kilku do kilkunastu J na sesję, a moc mieści się w rzędzie wartości kilkudziesięciu mW. W świetle danych literaturowych dolne wartości tego przedziału dają zadowalający efekt stymulacyjny i przeciwzapalny, a wartościom wyższym przypisuje się pobudzanie wzrostu komórek [77][83].

Dodatkowo, parametrem warunkującym efekt biologiczny LLLT poza gęstością dawki jest również gęstość mocy wiązki laserowej. Udowodniono pojawienie się korzystnych efektów dla wartości rzędu 50 mW/cm<sup>2</sup>. Wysokie wartości (powyżej 500 mW/cm<sup>2</sup>) mają natomiast destrukcyjny wpływ na tkanki, co zostało udokumentowane w piśmiennictwie [71]. Przedział pomiędzy powyższymi wartościami a zwłaszcza 200-400 mW/cm<sup>2</sup> daje natomiast optymalny efekt w przypadku leczenia bólu [75]. Większe od powyższych natężenia mocy stosuje się w przypadku wysokoenergetycznego promieniowania laserowego (HPL, *high-powered laser*).

Istnieją też przesłanki świadczące, iż efekt biologiczny LLLT może być zależny także od długości fali światła ze względu na różną wrażliwość biologiczną poszczególnych tkanek. Dlatego też w opisanym w literaturze modelu wielosondowym, gdzie emituje się jednocześnie kilka różnych długości fali światła laserowego obserwuje się znacznie większą aktywność czynników wzrostu na dużych obszarach. Taki model naświetlania promieniowaniem laserowym został wykorzystywany w leczeniu chorób skóry, zwłaszcza ran, owrzodzeń i zakażeń [75]. Poza emitowaną mocą i całkowitą dawką na uzyskane efekty, wpływ ma także gęstość emitowanej energii [71].

Z uwagi na szeroki wachlarz parametrów energii, promieniowanie laserowe dzielimy na nisko- średnio- i wysokoenergetyczne. Poza LLLT, zastosowanie w lecznictwie znalazły też lasery średnio i wysokoenergetyczne. Cechują się one dobrą ekspozycją energii i są wykorzystywane w dermatologii, ginekologii, okulistyce, leczeniu chorób i urazów narządu ruchu, leczeniu nowotworów - zwłaszcza raka sutka oraz guzów umiejscowionych powierzchownie. W dermatologii laseroterapia znalazła zastosowanie w leczeniu raka podstawnokomórkowego. Poza leczeniem onkologicznym zadowalające wyniki uzyskano w usuwaniu powierzchownej martwicy skóry. Wykorzystanie lasera opisano ponadto w

leczeniu kłykcin kończystych, naczynek skóry, znamion naczyniowych oraz teleangiektazji. Opisano także wykorzystanie lasera Nd:YAG w leczeniu zwężeń dróg oddechowych oraz zwężeń przewodu pokarmowego najczęściej w przebiegu schorzeń rozrostowych. Laseroterapia znalazła także miejsce w przypadku hamowania krwawień z przewodu pokarmowego, guzów jelit grubego oraz nowotworów żołądka [94].

Warunkiem uzyskania pożądanego efektu biologicznego jest zastosowanie lasera o odpowiedniej mocy, natężeniu energii a także długości fali zastosowanego światła. Stąd też w zależności od powyższych parametrów można uzyskać efekt biostymulacyjny jak i destrukcyjny w stosunku do naświetlanych tkanek. Wysokoenergetyczne promieniowanie laserowe wykorzystywane jest głównie w chirurgii do cięcia, odparowania oraz koagulacji tkanek [72][94].

Niskoenergetyczne promieniowanie laserowe (LLLT) wykazuje głównie działanie biostymulacyjne i przeciwzapalne. Takie właściwości wykazują urządzenia emitujące energię nieprzekraczającą kilku, maksymalnie kilkunastu  $J/cm^2$ . Ze względów bezpieczeństwa przyjmuje się, że maksymalna moc tych urządzeń nie powinna przekraczać 500 mW, a jej gęstość 5 mW/cm<sup>2</sup> [71]. Nie przekraczanie takiej mocy przy prawidłowo przeprowadzonych zabiegach jest bezpieczne. W przypadku leczenia ran powierzchniowych najczęściej stosuje się technikę przemiatańcia bezkontaktowego z odległości 2-15 cm od rany w czasie 2-15 min. Wykazano także spadek przyrostu stężenia CPK oraz mleczanów w mięśniach szkieletowych po zastosowaniu LLLT u sportowców [96].

W badaniach nad efektem przeciwzapalnym niskoenergetycznego promieniowania laserowego uwzględnić trzeba, że poszczególne komórki układu odpornościowego wykazują różną wrażliwość na światło laserowe, największą w przypadku mononuklearów krwi obwodowej. Należy pamiętać, że w przypadku uzyskania pożądanego efektu dalsze zwiększanie mocy i ładunku energetycznego nie zawsze będzie wielokrotniało uzyskane działanie. W przypadku właściwości antyagregacyjnych LLLT sugeruje się nawet ich spadek po zwiększeniu dawki energii naświetlania [73]. Tłumaczy się to tym, że efekt biologiczny promieniowania laserowego tak jak i wrażliwość komórek na to promieniowanie ma charakter liniowej zależności jedynie w określonym przedziale poszczególnych parametrów (mocy, energii oraz długości fali) [71]. Wyrazem tego może być obserwacja, że w dostępnej literaturze można znaleźć dość szeroki zakres wartości opisujących parametry zastosowanych laserów.

Z uwagi na dość powszechne zastosowanie LLLT w fizjoterapii, szereg doniesień literaturowych na temat przeciwzapalnych właściwości LLLT odnosi się o badań z dziedziny ortopedii i urazów narządu ruchu. Sugeruje się, że silniejsze przeciwzapalne właściwości promieniowania laserowego niż diklofenaku oraz krioterapii w oparciu o pomiar ekspresji IL-1 $\beta$ , IL-10 oraz TNF- $\alpha$  u pacjentów z urazem mięśni [97].

Wykazano ponadto hamowanie zjawiska stresu oksydacyjnego oraz wpływ na syntezę tlenku azotu [98]. Podobnie spadek ekspresji TNF- $\alpha$  i wzrost IL-10 obserwowano z przypadku zastosowania LLLT w zapaleniu płuc [99]. W przypadku TNF- $\alpha$  efekt ten pojawiał się po godzinie od naświetlania i utrzymywał przez pełną dobę od ekspozycji. Hamownie odpowiedzi immunologicznej na poziomie odpowiedzi komórkowej wykazano także u chorych z zapaleniem kłębuszków nerkowych, w tym przypadku dotyczyło ono aktywności limfocytów CD8+ [100].

W medycynie wykorzystuje się także urządzenia laserowe wytwarzające promieniowanie o niższej długości fali (głównie 633 nm oraz 670 nm) emitujące jeszcze niższą gęstość mocy ok. 0,25 mW/cm<sup>2</sup>. Takie zastosowanie określane jest jako ultraniskoenergetyczne promieniowanie laserowe (ULLLT). Skuteczność tej metody ciągle jest przedmiotem badań, choć sugeruje się również wywoływanie efektu przeciwzapalnego także przy takiej mocy emitowanej energii [72][76].

### **1.9 Wykorzystanie właściwości LLLT w leczeniu schorzeń układu naczyniowego**

Już w latach 80-tych ubiegłego wieku zaczęto podejmować próby zastosowania średnioenergetycznego promieniowania laserowego w leczeniu zmian miażdżycowych w naczyniach wieńcowych. Doniesienia dotyczyły prób leczenia blaszek niestabilnych [79][80].

Jednak stałe powiększanie się wiedzy na temat roli odpowiedzi zapalnej w uszkodzeniu naczyń i jednocześnie odkrywanie właściwości promieniowania laserowego stały się źródłem prób szerszego wykorzystania LLLT w leczeniu schorzeń układu naczyniowego z uwagi na jego potwierdzoną skuteczność i bezpieczeństwo. Udowodniono udział cytokin prozapalnych w procesie restenozy po zabiegach angioplastyki tętnic wieńcowych [81][82]. Poza mechaniczną przyczyną uszkodzenia śródbłonna naczyniowego oraz zaburzeń profilu lipidowego u podłoża tego procesu leżało wydzielenie wspomnianych cytokin, czynników

wzrostu oraz syntezy białek macierzy pozakomórkowej w miejscu zwężenia. Powyższe obserwacje pozwoliły zatem podjąć próby wykorzystania przeciwzapalnych właściwości LLLT w terapii tych powikłań.

Już w latach 80-tych poprzedniego wieku pojawiły się badania sugerujące korzystne efekty po zastosowaniu LLLT u chorych z ostrymi zespołami wieńcowymi [78]. W dalszych próbach, emisja promieniowana odbywała się poprzez wprowadzane wewnątrznaczyniowo cewniki. W badaniach przeprowadzonych na zwierzętach potwierdzano ograniczenie strefy martwicy mięśnia sercowego [84]. Potwierdzono także ograniczenie odpowiedzi zapalnej w obrębie śródbłonna i migracji komórek mięśniówki gładkiej w modelach *in vitro* [101]. U chorych poddanych zabiegom angioplastyki tętnic wieńcowych zastosowanie LLLT zmniejszało ryzyko nawrotu zwężenia bądź też całkowicie mu zapobiegało [102]. Także w przypadku pacjentów z udarem niedokrwiennym mózgu zaobserwowano obniżenie deficytu neurologicznego po zastosowaniu LLLT [85]. Korzyści z działania przeciwzapalnego LLLT potwierdzono ponadto w przypadku chorych z niewydolnością serca, jak i istotnym zwężeniem naczyń wieńcowych [86][87].

Choć mechanizm, w jakim LLLT wykazywało korzystne właściwości wydaje się nie do końca poznany, założyć jednak można, że w głównym stopniu wynika on z efektu przeciwzapalnego. W badaniach z tego zakresu wskazuje się na hamowanie aktywności cytokin prozapalnych (IL-2, IL-6), migracji jednojądrzastych komórek krwi obwodowej oraz stymulację uwalniania przeciwzapalnej IL-10 [88]. Istotny udział w tym zjawisku ma też hamowanie procesów krzepnięcia [89]. Korzyści z zastosowania LLLT tłumaczy się ich antyagregacyjnymi właściwościami, które zostały potwierdzone w piśmiennictwie [90]. Natomiast wspomniany efekt ograniczający strefę martwicy mięśnia sercowego, gromadzenia się tkanki łącznej i powstawania blizny po przebyłym zawale mięśnia sercowego przypisuje się biostymulacyjnym właściwościom LLLT [78].

Odkrycie ochronnych właściwości LLLT w stosunku do śródbłonna naczyniowego stało się przyczynkiem do dalszych poszukiwań w celu wykorzystania promieniowania laserowego w leczeniu bądź prewencji chorób naczyń. Podjęto skuteczne próby stosowania LLLT do wewnątrznaczyniowego naświetlania tętnic wieńcowych oraz mięśnia sercowego. W tym przypadku na ogół wykorzystywano niskoenergetyczne promieniowanie o długości fali 808 nm o gęstości mocy nieprzekraczającej kilkudziesięciu, maksymalnie 100 mW/cm<sup>2</sup> i gęstości energii do 9 J/cm<sup>2</sup> u pacjentów podczas planowych procedur angioplastyki wieńcowej [88].



Wewnątrznaczyniowe naświetlanie promieniowaniem laserowym wiązało się obniżeniem ryzyka restenozy w miejscu poszerzonym w grupie naświetlanej w porównaniu do osób nie poddanych naświetlaniu. Jakkolwiek w analizie tych danych uwzględnić należy kilka udokumentowanych mechanizmów rozwoju tego powikłania, to uwagę zwraca zmniejszony poziom mediatorów stanu zapalnego po wykonaniu naświetlania. Efekt ten został potwierdzony w pracach doświadczalnych, choć nie wiadomo czy ochrona przed restenozą wynika bardziej z właściwości naczyniorozszerzających światła laserowego czy też jest wynikiem hamowania cytokin prozapalnych przez LLLT. Potwierdzone działanie przeciwzapalne wyrażało się głównie hamowaniem ekspresji cytokin: IL-6 oraz IL-1 $\beta$  [88]. W przypadku tych cytokin dodatkowo sugeruje się ich wpływ na proliferację mięśniówki gładkiej, a także pośredni udział w zjawisku restenozy [88]. Przeciwzapalny mechanizm ochronny LLLT przed restenozą mógłby tłumaczyć fakt, że uzyskany efekt utrzymywał się nawet kilka tygodni po przeprowadzonym zabiegu [91]. W tych samych badaniach, równoległe po zastosowaniu naświetlania, obserwowano wzrost poziomu IL-10 mającej właściwości przeciwzapalne, co także należy uznać za zjawisko korzystne [91].

Istnieją pojedyncze doniesienia dotyczące badań nad chorymi z niewydolnością serca, u podłoża której może leżeć również odpowiedź immunologiczna. W tym przypadku zastosowanie LLLT w natężeniu 3-21 J/cm<sup>2</sup> znamienne hamowało ekspresję IL-6 oraz TNF- $\alpha$  jednocześnie stymulując wydzielanie IL-10 [86]. W ostatnim czasie pojawiły się także próby szczegółowego wyjaśnienia wpływu LLLT na wybrane parametry funkcji płytek krwi. Prawdopodobne właściwości antygregacyjne promieniowania laserowego mogłyby sugerować badanie, w którym obserwowano zmniejszenie ekspresji P-selektyny na powierzchni płytek krwi w warunkach in vitro [90].

Choć działanie przeciwzapalne niskoenergetycznego promieniowania laserowego samo w sobie należy uznać za niepodważalne, to warto zauważyć, że dostępna literatura na ogół dotyczy badań nad pacjentami, u których rozpoznano schorzenia mające udokumentowany związek z uszkodzeniem śródbłonna lub/i aktywacją układu immunologicznego. Jednocześnie brak jest kompleksowych danych mogących odpowiedzieć na pytanie jak zastosowanie LLLT wpływa na śródbłonek w innych obszarach niż tętnice wieńcowe w przypadku osób bez patologii naczyniowych.

## 2. CELE PRACY

Odpowiedź zapalna odgrywa kluczową rolę w patogenezie upośledzenia funkcji śródbłonna naczyniowego. Dlatego też potwierdzone przeciwzapalne właściwości niskoenergetycznego promieniowania laserowego skłoniły badaczy do poszukiwania możliwości jego wykorzystania w leczeniu schorzeń, u podłoża których leży dysfunkcja śródbłonna. Potwierdzenie korzystnego wpływu przeciwzapalnego działania LLLT na parametry określające funkcję śródbłonna naczyniowego mogłoby zatem sugerować szansę zastosowania jego w praktyce klinicznej. Wobec powyższego w wykonanych badaniach przyjęto następujące cele:

1. Ocena wpływu naświetlania LLLT na stężenie badanych parametrów zapalnych we krwi obwodowej osób zdrowych.
2. Ocena wpływu promieniowania laserowego na szczytowo-skurczową prędkość przepływu krwi przez tętnicę promieniową u osób zdrowych w oparciu o ocenę ultrasonograficzną.
3. Ocena wpływu LLLT na wartości współczynnika oporowości oraz współczynnika pulsacyjności w tętnicy promieniowej u osób zdrowych.

### 3. MATERIAŁ I METODY

#### Kwalifikacja ochotników do badania

Grupę badaną stanowili zdrowi ochotnicy, którzy nie ukończyli 40 r.ż. Rekrutację ochotników przeprowadzono po uzyskaniu zgody właściwej Komisji Bioetycznej na wykonanie badań (załącznik). Kwalifikacja została przeprowadzona w oparciu o wywiad przeprowadzony z ochotnikami.

Do udziału w badaniach zgłosiło się 50 osób. Spośród tej grupy zakwalifikowano 30 osób (16 kobiet i 14 mężczyzn). Pierwszy etap badania polegający na naświetlaniu dawką energii 20 J wykonano w całej zakwalifikowanej do badań grupie 30 osób.

Drugi etap badania obejmował naświetlanie dawkami 40 J oraz 70 J. Po zastosowaniu kryteriów wykluczających do udziału w tym etapie zakwalifikowano 20 osób, u których przeprowadzono naświetlanie.

W obu etapach badania do kryteriów wykluczających udział w badaniu zaliczono obecność schorzeń: cukrzycy typu 1 oraz 2, jakichkolwiek chorób podłożu autoagresji, nadciśnienia tętniczego, choroby niedokrwiennej serca, tachykardii bądź bradyarytmii, przebytych zabiegów na naczyniach, sympatektomii, schorzeń skóry uniemożliwiających naświetlanie, zespołów uciskowych, zespołu górnego otworu klatki piersiowej, przewlekłych schorzeń zapalnych oraz przebytych infekcji w okresie ostatnich 3 tygodni. Z badania wykluczono także osoby, które w okresie ostatnich 3 miesięcy uczestniczyły w innych badaniach lub zabiegach fizykoterapii z zastosowaniem LLLT. Kryterium eliminującym z badania były także dane z wywiadu dotyczące: palenia papierosów, stosowania antykoncepcji hormonalnej, stosowania antybiotyków, leków mających właściwości immunomodulujące lub niesteroidowych leków przeciwzapalnych w okresie 2 tygodni przed wykonywanym badaniem. Na godzinę przed wykonaniem oznaczeń badane osoby poproszono o unikanie forsownego wysiłku fizycznego i niespożywanie posiłków.

W obydwu etapach główną przyczyną wykluczenia z badań było stosowanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych zarówno w przypadku kobiet jak i mężczyzn oraz antykoncepcji hormonalnej w przypadku kobiet. W dalszej kolejności była to obecność jednego z wymienionych powyżej schorzeń. W przypadku jednej osoby przyczyną

wykluczenia z badań były trudności w uzyskaniu zadowalającego obrazowania tętnicy promieniowej w badaniu ultrasonograficznym. W żadnym z przypadków powodem wykluczenia z kolejnych etapów badania nie były efekty niepożądane po zastosowaniu niskoenergetycznego promieniowania laserowego.

### Izolacja materiału

Pobranie krwi wykonano przy użyciu zamkniętego systemu aspiracyjno - próżniowego do pobierania krwi (*S-Monovette*<sup>®</sup>, *SARSTEDT Germany*<sup>®</sup>). Bezpośrednio przed pobraniem krwi badane osoby poproszone zostały o niestosowanie intensywnego wysiłku fizycznego.

W celu izolacji surowicy materiał pobierano do strzykawki z aktywatorem krzepnięcia. Uzyskiwano skrzep w czasie ok. 20-30 min. Przed upływem 30 minut od tego momentu, próbki wirowano przy 1000 x g przez 15 min. Uzyskaną surowicę rozpipetowano w odpowiednich objętościach do probówek typu eppendorf i przechowywano w temperaturze -20°C do czasu wykonania analiz.

Do uzyskania osocza wykorzystano probówko-strzykawki z EDTA jako antykoagulantem. W ciągu 30 min. od pobrania próbki wirowano przy 1000 x g przez 15 min. Uzyskane osocze rozpipetowano odpowiednich objętościach (200-500 µl) do probówek typu eppendorf i przechowywano w -20°C aż do czasu wykonania analiz.

### Pobieranie krwi obwodowej

Przedstawione powyżej parametry zostały oznaczone w materiale z krwi obwodowej u każdej z badanych osób. W pierwszym etapie badania wszyscy byli codziennie naświetlani dawką 20 J przez 3 dni kalendarzowe. Krew pobrano przed rozpoczęciem i po zakończeniu cyklu. W drugim etapie przeprowadzono dwa cykle naświetlania: dawka energii wynosiła odpowiednio 40 J i 70 J. Analogicznie przed rozpoczęciem i po zakończeniu każdego cyklu w tym etapie ponownie pobierano krew do badań w wszystkich osób

## Badanie biochemiczne- metodyka oznaczeń

Dobór badanych parametrów odpowiedzi zapalnej uwzględniał uzyskanie wysokiej powtarzalności pomiarów oraz możliwości zastosowania precyzyjnych metod oznaczeń. W projekcie badane były stężenia wolnych cząsteczek. W surowicy oznaczono stężenie sICAM-1 oraz sVCAM-1. Stężenia P-selektyny oraz TNF- $\alpha$  były natomiast oznaczane w osoczu.

Celem wykonania oznaczeń zastosowane zostały metody immunoenzymatyczne. Wykorzystane zostały testy komercyjne ELISA (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*). Są to testy immunoenzymatyczne, jedne z pierwszych i najbardziej powszechnych w oznaczeniach laboratoryjnych. Zastosowany został test podwójny (tzw. kanapkowy ang. *Sandwich test*) z wykorzystaniem dwóch przeciwciał. W tym przypadku 96 dołkowa płytka wyjściowo jest powleczona przeciwciałem swoistym dla badanego antygeny. Na płytkę dodawana jest surowica zawierająca poszukiwany antygen. Celem wykrycia jego obecności w surowicy w następnym kroku nanoszone zostają przeciwciała połączone z enzymem. Ich nadmiar jest wypłukiwany. Na pozostałej po wypłukaniu warstwie tworzony jest kompleks antygen – przeciwciało - enzym. W ostatnim etapie do tego kompleksu dodany zostaje odpowiedni dla enzymu substrat, katalizator reakcji barwnej. Efekt barwny badany jest metodą spektrofotometrii [103].

Immunoenzymatyczne testy fazy stałej są popularną techniką oznaczeń dającą możliwość oznaczenia antygeny w przypadku jego małych stężeń uniemożliwiających jego precipitację z przeciwciałem. Jest to możliwe dzięki unieruchomieniu antygeny na podłożu będących tzw. *fazą stałą*. Zastosowane przeciwciała znakowane są substancją chemiczną, której ilość następnie jest mierzona. Wybór ELISA daje możliwość wykrycia antygenów o stężeniach w przedziale  $10^{-7}$ - $10^{-10}$  mol/l. W praktyce wykorzystywane są metody nanoszenia przeciwciał i antygenów. W metodzie bezpośredniej na płytkę nanosi się antygen, który następnie jest wychwytywane przez przeciwciało znakowane badaną substancją. Celem zwiększenia czułości oznaczeń stosuje się metodę pośrednią, w której do naniesionego antygeny wykorzystuje się układ podwójnego przeciwciała detekcyjnego. Dodatkowy wzrost czułości oznaczeń uzyskuje się w testach kanapkowych z wykorzystaniem dwóch przeciwciał rozpoznających różne determinanty antygeny, jedno z nich obecne jest na powierzchni płytki. Taki układ redukuje ryzyko konkurencji antygeny z innymi białkami badanego

materiału o miejsca wiążące na płytce oraz reakcji krzyżowej z innymi antygenami o podobnej strukturze. Wykonywane są również testy konkurencyjne gdzie detekcji podlega znakowany antygen [103].

#### Pomiar stężenia rozpuszczalnej cząsteczki adhezji międzykomórkowej-1 (sICAM-1)

Do pomiaru cząsteczki sICAM-1 użyto zestawu do ilościowego oznaczenia ludzkiej rozpuszczalnej międzykomórkowej cząsteczki adhezyjnej-1 (*human soluble intercellular adhesion molecule-1*). Materiałem stosowanym do oznaczeń była surowica. Był to test kanapkowy z przeciwciałem wychwytyjącym i detekcyjnym. Czułość tego testu wynosiła 0,254 ng/ml. Producent: *R&D Systems Europe Ltd., Abingdon OX14 3NB, UK*. Pomiar wykonywano za pomocą czytnika mikroplótek Elx800™ (*BioTek Instruments Inc, Winooski, VT 05404, United States*) z oprogramowaniem KC4, przy długości fali 450 nm, stosując jako referencyjną falę o długości 570 nm. Stężenie sICAM-1 w badanych próbkach określano na podstawie krzywej wzorcowej.

#### Pomiar rozpuszczalnej cząsteczki naczyniowej adhezji komórkowej-1 (sVCAM-1)

Do przeprowadzenia pomiarów sVCAM-1 wykorzystano zestaw do ilościowego oznaczenia sVCAM-1 (*Soluble Vascular Cell Adhesion Molecule- 1*) produkcji *R&D Systems Europe Ltd., Abingdon OX14 3NB, UK*. Był to kanapkowy z przeciwciałem wychwytyjącym i detekcyjnym. Czułość powyższego testu wyniosła 1,26 ng/ml. Pomiar absorbancji przeprowadzono przy długości fali 450 nm. W tym celu zastosowano jako referencyjną falę o długości 570 nm. Do oceny długości fali światła wykorzystano czytnik mikroplótek Elx800™ (*BioTek Instruments Inc, Winooski, VT 05404, United States*) z oprogramowaniem KC4. Stężenie sVCAM-1 w badanych próbkach określano na podstawie krzywej wzorcowej. Materiałem wykorzystanym do analizy była surowica każdej z badanych osób.

### Pomiar stężeń czynnika martwicy nowotworów- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )

W celu oznaczeń TNF- $\alpha$  wykorzystano wysokoczuły zestaw do ilościowego oznaczenia ludzkiego czynnika martwicy nowotworów alfa (*Tumor Necrosis Factor- $\alpha$* ). Oznaczenia wykonano w osoczu z EDTA. Zastosowano test kanapkowy z podwójnym układem przeciwciał- przeciwciałem wychwytyjącym i detekcyjnym. Czulość tego testu wynosiła 0,191 pg/ml. Wykorzystano test produkcji: *R&D Systems Europe<sup>®</sup> Ltd., Abingdon OX14 3NB, UK*. Detekcja absorpcji wykonana została dla długości fali 490 nm. Zastosowano jako referencyjną falę o długości 650 nm, na spektrofotometrze mikroplótkowym Epoch<sup>™</sup> (*BioTek Instruments<sup>®</sup> Inc, Winooski, VT 05404, United States*) z oprogramowaniem Gen5.

### Pomiar stężeń P-selektyny

P-selektynę oznaczano w osoczu. W tym celu wykorzystano zestaw do ilościowego oznaczania rozpuszczalnej P selektyny (*soluble P-Selectin*) *Human sP-Selectin/CD62P*, Nr kat. BBE6. Oznaczenia wykonano w osoczu EDTA. Był to test kanapkowy z podwójnym układem- przeciwciałem wychwytyjącym i detekcyjnym (producent: *R&D Systems Europe Ltd., Abingdon OX14 3NB, UK*). Oznaczenia wykonywano za pomocą spektrofotometru mikroplótek Epoch<sup>™</sup> (*BioTek Instruments Inc, Winooski, VT 05404, United States*) z oprogramowaniem Gen5 przy długości fali 450 nm, stosując jako referencyjną falę o długości 620 nm. Stężenie P-selektyny w badanych próbkach określano na podstawie krzywej wzorcowej. Czulość zastosowanej metody wyniosła 0,5 ng/ml.

### Ocena ultrasonograficzna

Badanie ultrasonograficzne przeprowadzono przed- i po naświetleniu dawką 20 J i 70 J. Do pomiarów dopplerowskich wykorzystano aparat *Aloka ProSound 6<sup>®</sup>*. Użyto głowicy liniowej (38 mm; 4-14 MHz). Badaniu podlegał dystalny odcinek tętnicy promieniowej, który był tożsamy z odcinkiem naświetlanym. Przyjmuje się, iż najbardziej powierzchowny przebieg tego naczynia ma miejsce w jego 1/3 dalszej jego długości. Przyjęto, iż na tym odcinku jest

najlepsza dostępność naczyń i pochłanianie przez nie energii naświetlania laserem. Dodatkowo wykonano badania pilotażowe, w których zewnętrzną ścianę tętnicy promieniowej mierzono na głębokości 5,2-8,6 mm od powierzchni skóry. W trakcie badań ultrasonograficznych brzeg głowy ustawiono 3 cm proksymalnie od linii nadgarstka i 2 cm proksymalnie od linii wyrostka rylcowatego kości promieniowej. Ultrasonograficzna ocena naczyń na tym odcinku znajduje potwierdzenie w pracach doświadczalnych [95].

Kryterium wyboru do badania pomiędzy prawą a lewą tętnicą promieniową zakładało uzyskanie optymalnego zobrazowania naczyń przed rozpoczęciem naświetlania. Mając na uwadze wiarygodność uzyskiwanych pomiarów projekcje ustalano z zachowaniem kąta insonacji nieprzekraczającego  $60^{\circ}$ , co wynika z powszechnie stosowanych ustaleń w metodyce badań ultrasonograficznych. Zarówno w pierwszym cyklu naświetlania, jak i w kolejnych po zastosowaniu wyższych dawek energii ocenie podlegała tętnica promieniowa poddana naświetlaniu. W pierwszym cyklu badań przed i po naświetleniu dawką 20 J oznaczenia zostały wykonane u każdej z badanych osób. W tym etapie grupę badaną stanowiło łącznie 30 osób. W drugim etapie badania pomiary ultrasonograficzne wykonano dla grupy 20 osób. Badanie przeprowadzono przed i po naświetleniu dawką 70 J. Oceny dopplerowskiej nie wykonano po przeprowadzeniu naświetlania dawką 40 J.

Pomiar wykonany był bezpośrednio po zakończeniu danego cyklu naświetlania. W wykonanych na wstępie badaniach pilotażowych obserwowano bowiem brak jakiegokolwiek zmienności badanych parametrów po czasie większym niż 60 minut.

Wykonane pomiary uwzględniały prędkości przepływu przez tętnicę promieniową. Na podstawie obrysu fali tętna dokonano wyliczeń prędkości szczytowo-skurczowej (PSV), prędkości średniej (MV), prędkości końcowo-rozkurczowej (EDV), współczynnika pulsacyjności (PI) oraz współczynnika oporowości (RI).

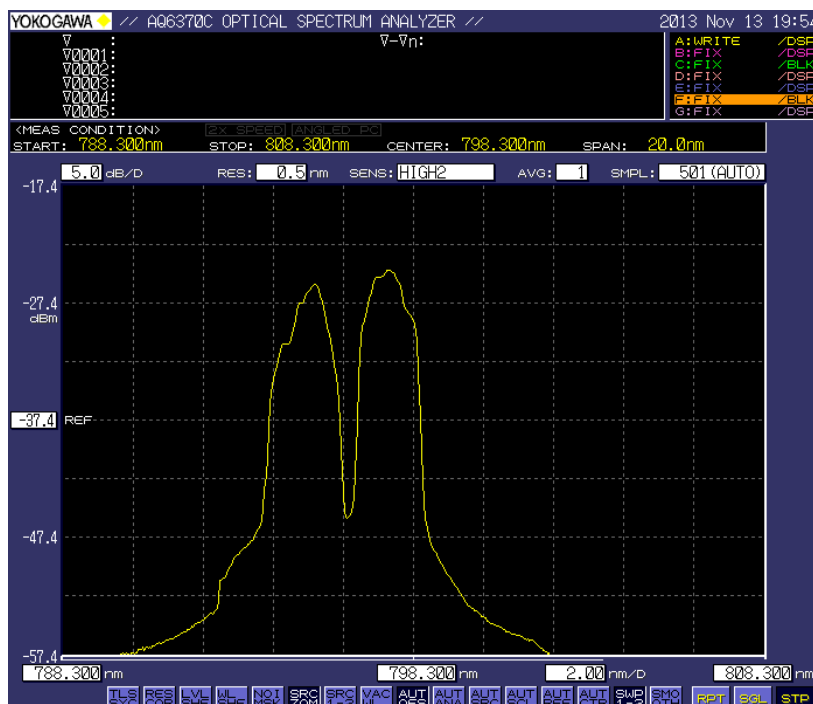


## Naświetlanie niskoenergetycznym promieniowaniem laserowym



Rycina 1. Urządzenie LT 808/2000

Do realizacji projektu wykorzystano urządzenie LT 808/2000 (firmy Laser Secura Polska) (Rycina 1). Dla zastosowanego promieniowania laserowego wykonano pomiar zależności długości fali (w przedziale 788-808 nm) od mocy wyrażony w postaci logarytmicznej jednostki miary mocy w odniesieniu do 1 mW (dBm). Moc wyrażona w dBm mówi, o ile decybeli moc różni się od mocy 1 mW (Rycina 2).



Rycina 2. Zależność pomiędzy długością fali laserowej a logarytmiczną jednostką miary mocy odniesioną do 1 mW- (dBm).

Dawka energii naświetlania została ustalona w oparciu o dostępne dane literaturowe [71][72]. Założono, iż rzeczywiste dawki emitowanej energii mogą odbiegać od wartości zadanych dla urządzenia. W tym celu przed rozpoczęciem cyku naświetlania wyznaczano krzywą kalibracji dawek.

### I cykl naświetlania

W pierwszym etapie badania przeprowadzono I cykl naświetlania, w którym pojedyncza dawka energii w każdym z trzech dni naświetlania wyniosła 20 J. Zastosowano stałą moc lasera 20 mW. Naświetlono 30 osób.

### II cykl naświetlania i III cykl naświetlania

W drugim etapie badania wykonano cykl II oraz III naświetlania LLLT. W cyklu II zastosowano moc lasera 30 mW. Dawka energii naświetlania wyniosła 40 J. Celem wyeliminowania ryzyka pojawienia się efektu termicznego związago ze wzrostem emitowanej energii wydłużono także czas każdej sesji. Analogicznie jak w przypadku pierwszego każdy kolejny cykl polegał naświetlaniu przez 3 następujące po sobie dni kalendarzowe. W III cyklu naświetlania zastosowano moc ekspozycji 60 mW oraz dawkę energii 70 J. Cykl ten wykonano bezpośrednio po zakończeniu poprzednich sesji naświetlania.

W przyjętym modelu badawczym nie przekraczano mocy emisyjnej 100 mW z uwagi na ryzyko niekorzystnych efektów biologiczne w przypadku wyższych dawek, zwłaszcza pojawienia się niepożądanego efektu biologicznego i miejscowych powikłań [71].

### Układ emisyjno-światłowodowy

Układ emisyjno-światłowodowy stanowiło urządzenie LT 808/2000 firmy Laser Secura Polska (Rycina 1). Długość fali promieniowania, jako zasadniczy parametr opisujący jej

właściwości mieściła się w zakresie tzw. okna optycznego obejmującego zakres 550-1000 nm i pozwalającego na optymalny efekt biostymulacyjny. Promieniowanie o długości fali poniżej dolnej granicy tego przedziału w istotnym stopniu zostaje pochłonięte przez hemoglobinę, co ogranicza jego oddziaływanie na elementy ściany naczyniowej. Natomiast przypadku długości fali powyżej 1000 nm analogicznie promieniowanie jest pochłanianie przez wodę, co również byłoby niekorzystną anomalią w założonym modelu doświadczalnym. Dlatego też maksymalny efekt biologiczny oddziaływania LLLT na ścianę naczyń uzyskano dla promieniowania o długości fali zbliżonej do zastosowanej w badaniach własnych mieszczącej się w tzw. *oknie optycznym* (812-870 nm) [71].

Przezskórnemu naświetlaniu zostały poddane odcinki tętnicy promieniowej o długości 3-4 cm i odpowiadały fragmentom tętnicy poddawanych badaniu ultrasonograficznemu. Wyznaczony do tego obszar skóry ustalano indywidualnie w zależności od warunków anatomicznych i przebiegu tętnicy promieniowej w oparciu o uprzednio wykonaną ocenę ultrasonograficzną. Naświetlanie miało charakter punktowy, odbywało się metodą przemiatań bezkontaktowego by zminimalizować ryzyko powikłań miejscowych. Zakończenie światłowodu umieszczone zostało w odległości 3-5 cm od skóry. Wybór powyższej techniki naświetlania miał na celu uniknięcie strat energii spowodowanych ekspozycją energii na tkanki i struktury otaczające tętnicę promieniową. Przyjęto, iż metoda przemiatań pozwala na bardziej precyzyjną emisję energii do tętnicy promieniowej, a także zmniejsza ryzyko pojawienia się niepożądanego efektu termicznego. Sondę przesuwano nad naświetlanym obszarem z prędkością 0,5-1 cm/s celem równomiernej ekspozycji energii.

### Analiza statystyczna

Normalność danych została zbadana przy pomocy testu D'agostino-Pearsona. Ze względu na brak normalności rozkładu do analizy użyto testów nieparametrycznych. Analiza istotności zmian w poziomach badanych parametrów pod wpływem dawek energii została zbadana przy zastosowaniu testu Friedmana dla danych sparowanych wraz z analizą post-hoc metodą wielokrotnych powtórzeń. Korelacja pomiędzy poszczególnymi parametrami została zbadana przy pomocy współczynnika korelacji Spearmana. Analiza porównująca średni spadek poszczególnych parametrów po naświetlaniach została wykonana testem

Manna-Whitney'a. Za poziom istotności wszystkich testów uznano  $p < 0,05$ . Analiza statystyczna została wykonana w pakiecie statystycznym R for windows (wersja 3.1.2, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

## 4. WYNIKI

### Charakterystyka badanej grupy:

Naświetlanie wykonano w całej grupie badanych 30 osób. Badania ekspresji parametrów stanu zapalnego oraz ocenę ultrasonograficzną wykonano w pierwszym etapie w całej wyjściowej grupie 30 zdrowych ochotników (16 kobiet, 14 mężczyzn). Średnia wieku w badanej grupie wyniosła w przypadku kobiet 31,57 lat ( $\pm 5,13$  roku) oraz 28,82 lat ( $\pm 4,5$  roku) w przypadku badanych mężczyzn. Obliczono wzrost, masę ciała oraz wartości BMI (Tabela 1).

Tabela 1. Średnie wartości wzrostu, masy ciała oraz BMI w badanej grupie

	Wzrost (cm)		Masa ciała (kg)		BMI	
	K	M	K	M	K	M
Średnia wartość	168,37	181,00	61,06	75,143	21,45	22,96
	$\pm 6,91$	$\pm 5,12$	$\pm 6,37$	$\pm 7,01$	$\pm 2,04$	$\pm 2,51$

Po zastosowaniu cyklu naświetlenia u 14 osób obserwowano wzrost stężenia TNF- $\alpha$ , u 17 osób wzrost stężenia sVCAM-1 w surowicy krwi, u 14 osób wzrost stężenia sICAM-1, u 15 osób wzrost P-selektyny w osoczu (Tabela 2).

Tabela 2. Liczebność podgrup na podstawie zmian badanych parametrów stanu zapalnego po zastosowaniu LLLT.

		kobiety (n=16)	Mężczyźni (n=14)
TNF- $\alpha$	spadek po LLLT	8	8
	wzrost po LLLT	8	6
sICAM-1	spadek po LLLT	10	6
	wzrost po LLLT	7	7
sVCAM-1	spadek po LLLT	7	6
	wzrost po LLLT	9	8
P-selektyna	spadek po LLLT	7	8
	wzrost po LLLT	9	6

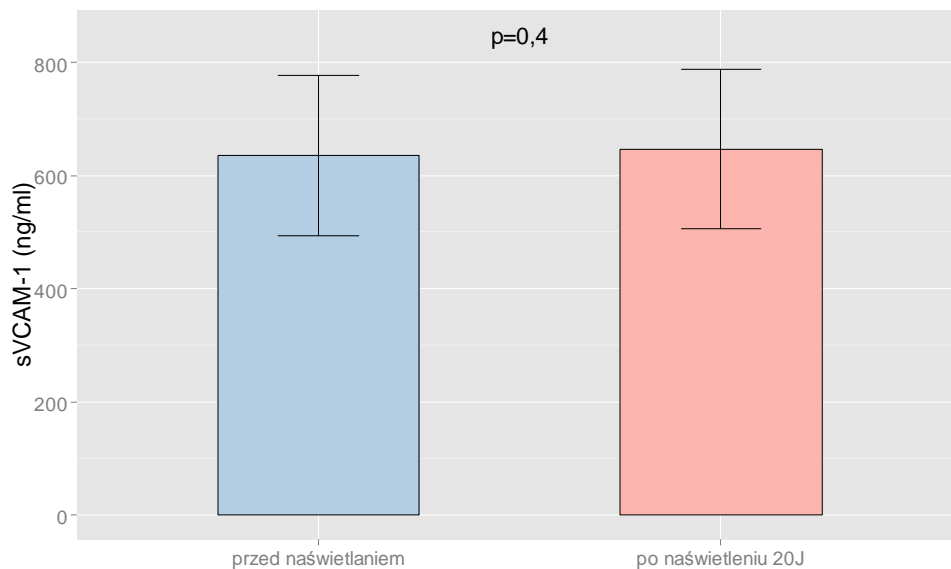
Po zastosowaniu naświetlania u 29 badanych osób obserwowano spadek prędkości szczytowo-skurczowej (PSV). U 16 osob obserwowano wzrost RI, u 17 osób zaobserwowano wzrost współczynnika PI (Tabela 3).

Tabela 3. Liczebność podgrup na podstawie zmian badanych parametrów badania ultrasonograficznego po zastosowaniu LLLT.

		Kobiety (n=16)	Mężczyźni (n=14)
PSV	spadek po LLLT	15	14
	wzrost po LLLT	1	0
PI	spadek po LLLT	7	6
	wzrost po LLLT	8	9
RI	spadek po LLLT	7	7
	wzrost po LLLT	9	7

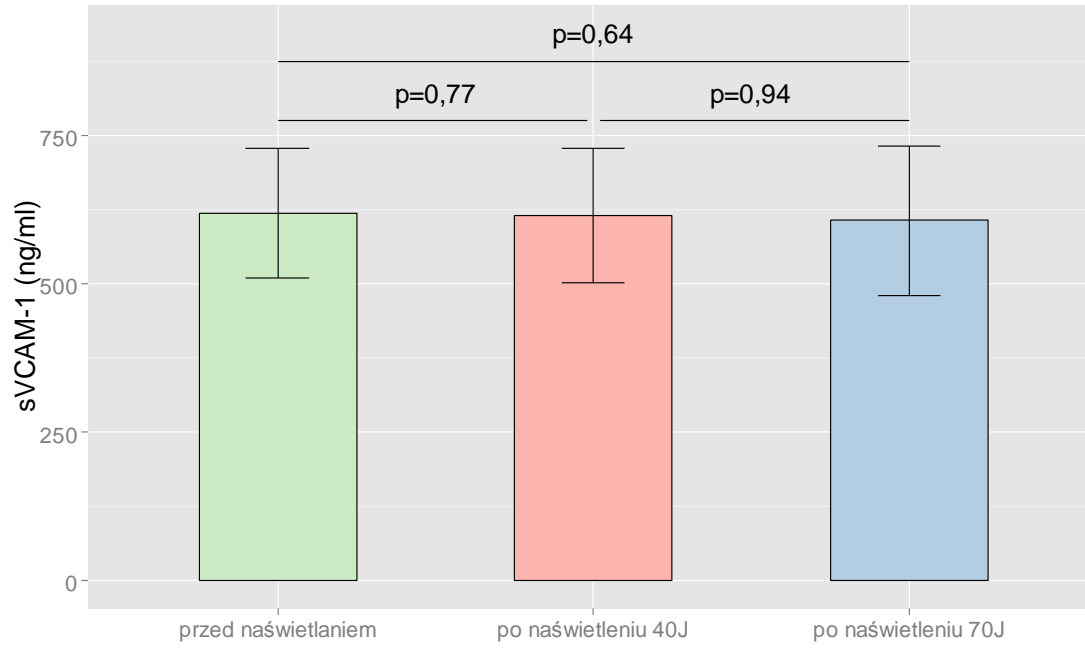
#### 4.1 Wpływ naświetlania LLLT na stężenie sVCAM-1 w surowicy krwi

Po przeprowadzeniu naświetlania dawką 20 J mierzono średnie wartości sVCAM-1: 646,44 ±140,87 ng/ml wobec 636,02 ±141,62 ng/ml wyjściowo przed naświetleniem. Nie uzyskano zmienności istotnej statystycznie po zastosowaniu LLLT (Rycina 3).



Rycina 3. Wpływ dawki 20 J LLLT na stężenie sVCAM-1 w surowicy badanych osób.

Po przeprowadzeniu naświetlania dawką 40 J w II cyklu naświetlania uzyskano średnie wartości VCAM-1: 615,38 ±113,64 ng/ml vs. 618,71 ±109,03 ng/ml wyjściowo przed naświetleniem. Nie obserwowano istotnych statystycznie różnic pomiędzy mierzonymi stężeniami po zastosowaniu LLLT ( $p=0,77$ ). Po przeprowadzeniu naświetlania dawką 70 J w III cyklu w surowicy badanych zmierzono średnie wartości sVCAM-1: 607,09 ±125,91 ng/ml vs. 618,72 ±109,03 ng/ml przed naświetleniem. Zarówno w przypadku dawki 40 J jak i dawki 70 J nie uzyskano różnicy istotnej statystycznie w stosunku do wartości wyjściowych ( $p=0,64$ ). Nie obserwowano także różnic istotnych statystycznie pomiędzy dawkami 40 J oraz 70 J ( $p=0,94$ ) (Rycina 4).

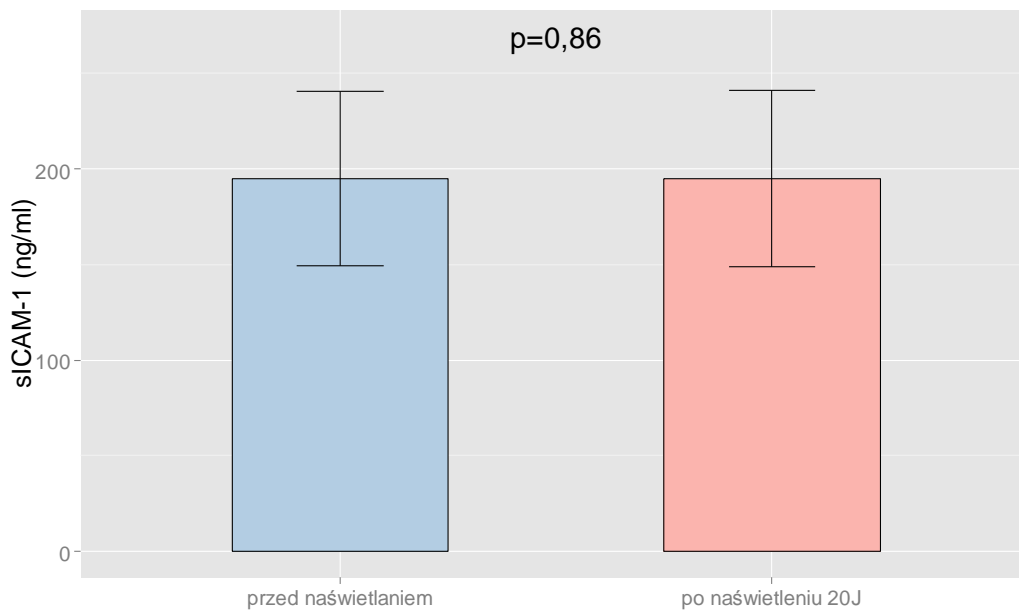


Rycina 4. Wpływ dawki 40 J oraz 70 J LLLT na stężenie sVCAM-1 w surowicy badanych osób.



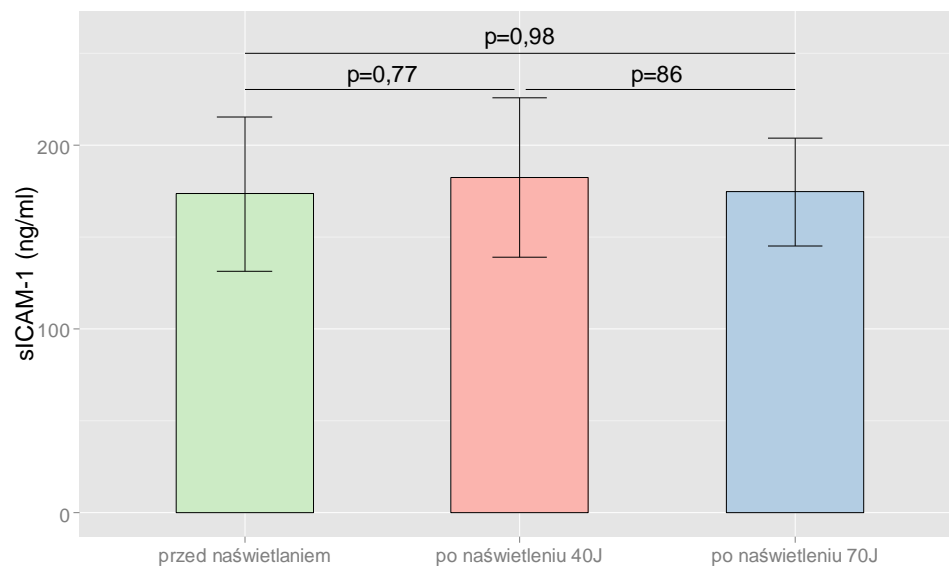
#### 4.2 Wpływ naświetlania LLLT na stężenie sICAM-1 w surowicy krwi

Po przeprowadzeniu naświetlania dawką 20 J uzyskano średnie wartości sICAM-1:  $195,05 \pm 46,28$  ng/ml wobec  $195,11 \pm 45,74$  ng/ml w oznaczeniach wyjściowych. Po naświetleniu LLLT mierzone wartości sICAM-1 nie różniły się w sposób istotny statystycznie od wartości wyjściowych ( $p=0,86$ ) (Rycina 5).



Rycina 5. Wpływ dawki 20 J LLLT na stężenie sICAM-1 w surowicy badanych osób.

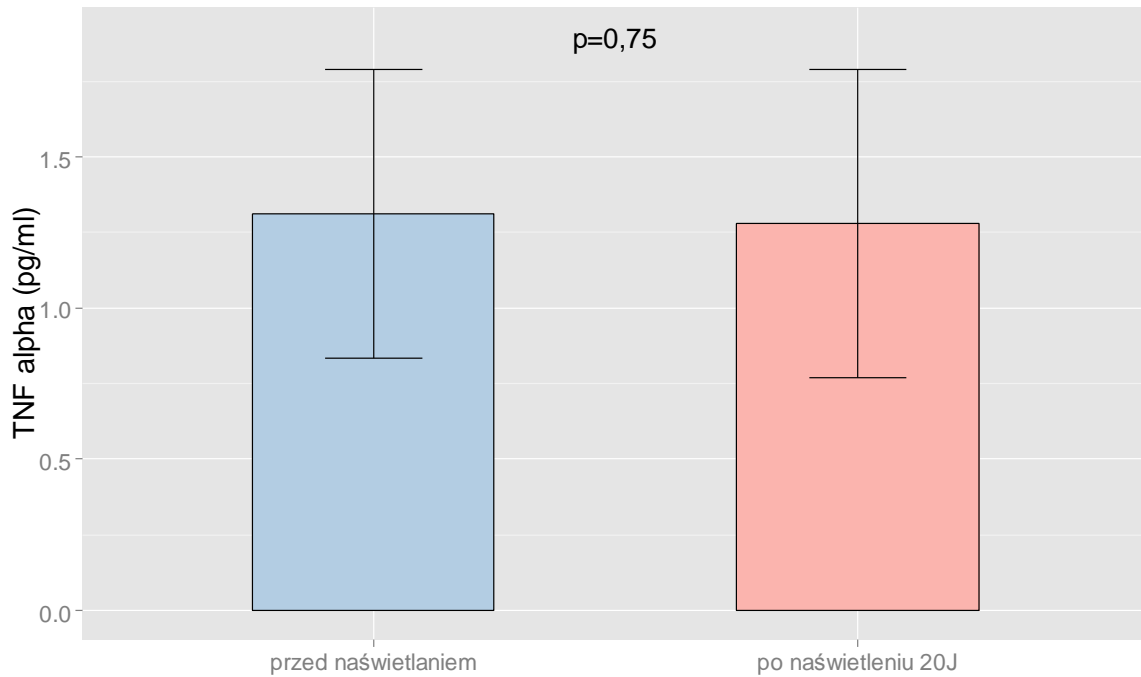
Po przeprowadzeniu naświetlania dawką 40 J mierzono średnie wartości sICAM-1:  $182,15 \pm 43,37$  ng/ml w porównaniu do  $173,27 \pm 42,17$  ng/ml przed naświetleniem ( $p=0,77$ ). Po zastosowaniu 70 J w III cyklu naświetlania mierzono średnie wartości sICAM-1:  $174,35 \pm 29,35$  ng/ml w porównaniu do  $173,27 \pm 42,17$  ng/ml wyjściowo przed naświetleniem. Zarówno po naświetleniu dawką energii 40 J jak i 70 J nie uzyskano zmienności istotnej statystycznie w stosunku do oznaczeń wyjściowych ( $p=0,98$ ). Nie obserwowano także zmienności istotnej statystycznie pomiędzy dawkami 40 J oraz 70 J ( $p=0,86$ ) (Rycina 6).



Rycina 6. Wpływ dawki 40 J oraz 70 J LLLT na stężenie sICAM-1 w surowicy badanych osób.

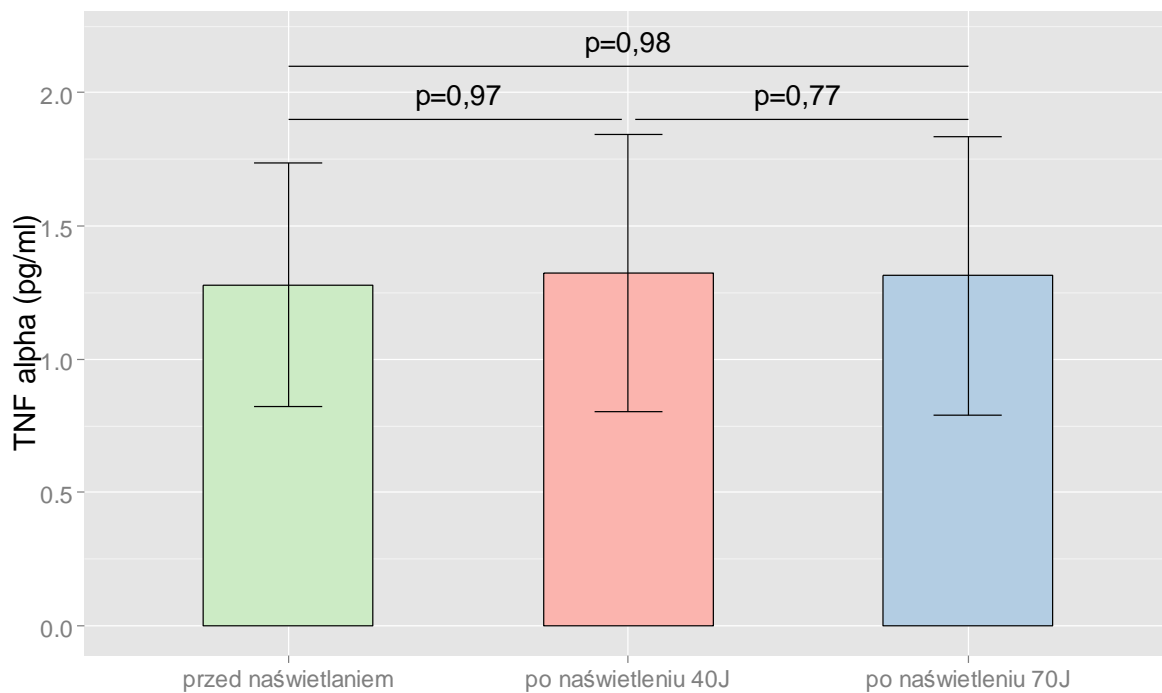
#### 4.3 Wpływ naświetlania LLLT na stężenie TNF- $\alpha$ w osoczu

Po przeprowadzeniu naświetlania dawką energii 20 J mierzono średnie wartości TNF- $\alpha$ :  $1,279 \pm 0,509$  pg/ml w porównaniu do  $1,311 \pm 0,478$  pg/ml przed wykonaniem naświetlania. Nie obserwowano różnic istotnych statystycznie ( $p=0,75$ ) (Rycina 7).



Rycina 7. Wpływ naświetlania dawką 20 J LLLT na stężenie TNF- $\alpha$  w osoczu badanych osób.

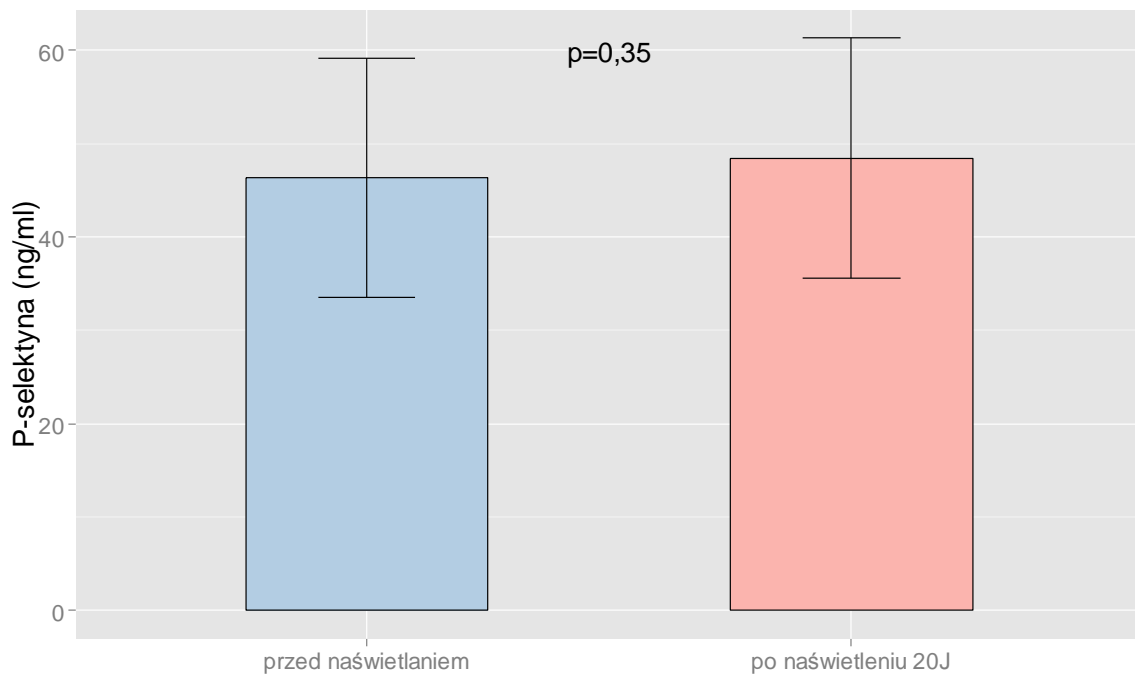
Po przeprowadzeniu naświetlania dawką 40 J w II cyklu naświetlania mierzono średnie wartości TNF- $\alpha$ :  $1,325 \pm 0,521$  pg/ml w porównaniu do  $1,280 \pm 0,458$  pg/ml przed naświetleniem ( $p=0,97$ ). W III cyklu naświetlania po naświetleniu dawką 70 J mierzono średnie stężenia TNF- $\alpha$  w osoczu:  $1,314 \pm 0,522$  pg/ml vs.  $1,280 \pm 0,458$  pg/ml wyjściowo. Nie obserwowano różnic istotnych statystycznie ( $p= 0,98$ ). Nie obserwowano także zmienności istotnej statystycznie pomiędzy dawkami 40 oraz 70 J ( $p=0,77$ ) (Rycina 8).



Rycina 8. Wpływ naświetlania dawką 40 J oraz 70 J LLLT na stężenie TNF- $\alpha$  w osoczu badanych osób.

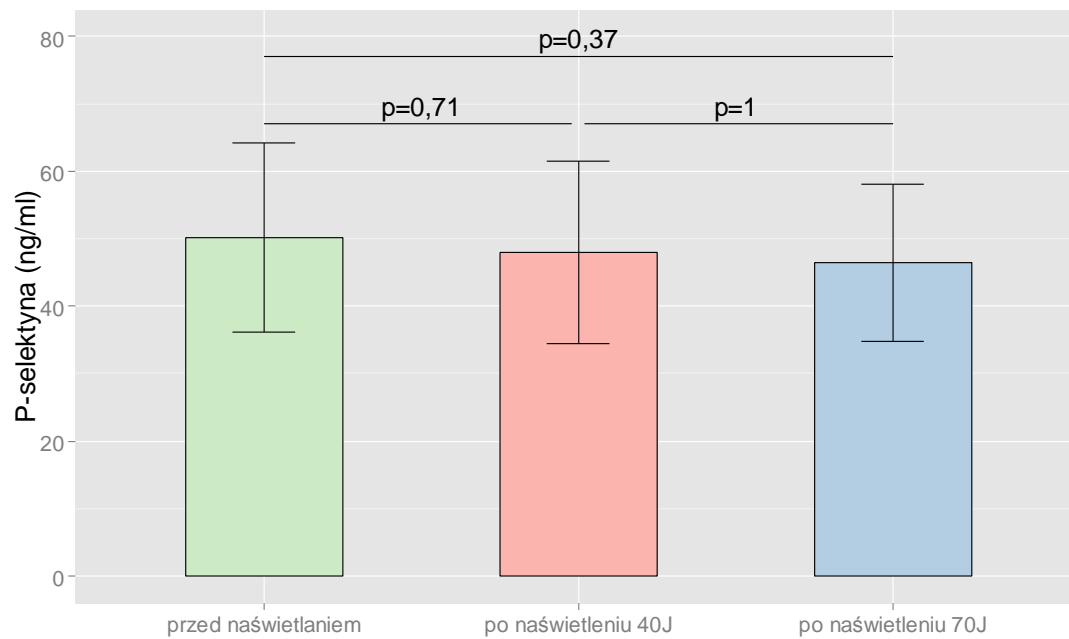
#### 4.4 Wpływ naświetlania LLLT na stężenie P-selektyny w osoczu

Po przeprowadzeniu naświetlania dawką 20 J mierzono średnie stężenia P-selektyny w osoczu  $48,45 \pm 12,83$  ng/ml. W oznaczeniach wyjściowych przed wykonaniem naświetlania obserwowano średnio  $46,32$  ng/ml  $\pm 12,84$  ng/ml. Nie uzyskano zmienności istotnej statystycznej po naświetleniu ( $p=0,35$ ) (Rycina 9).



Rycina 9. Wpływ naświetlania dawką 20 J LLLT na stężenie P-selektyny w osoczu badanych osób.

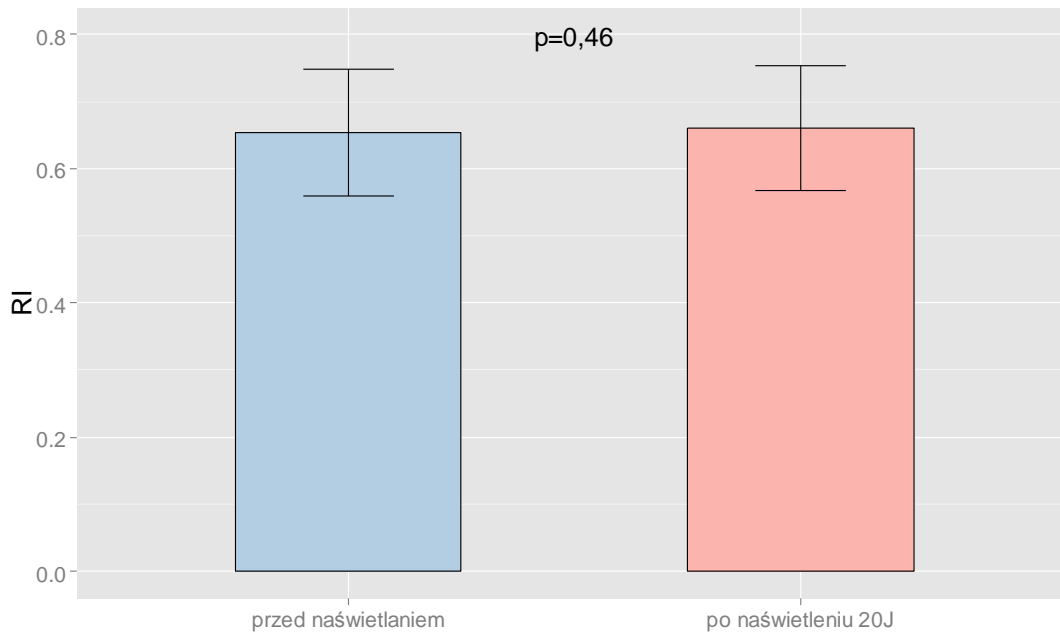
Po zwiększeniu dawki energii w kolejnym etapie naświetlania do 40 J mierzono średnie stężenia P-selektyny w osoczu:  $47,96$  ng/ml  $\pm 13,53$  ng/ml w porównaniu do  $50,18 \pm 14,05$  ng/ml wyjściowo przed naświetleniem LLLT ( $p=0,71$ ). Po zastosowaniu dawki energii 70 J w kolejnym trzecim cyklu naświetlania uzyskano średnie stężenia P-selektyny w osoczu  $46,44 \pm 11,64$  ng/ml w porównaniu do  $50,18 \pm 14,05$  ng/ml wyjściowo przed naświetleniem. Także w przypadku dawki 70 J nie obserwowano istotnych statystycznie różnic po zastosowaniu naświetlania LLLT w stosunku do wartości wyjściowych ( $p=0,37$ ). Nie obserwowano także statystycznie istotnych różnic pomiędzy dawkami 40 J i 70 J ( $p=1$ ) (Rycina 10).



Rycina 10. Wpływ naświetlania dawką 40 J oraz 70 J LLLT na stężenie P-selektyny w osoczu badanych osób.

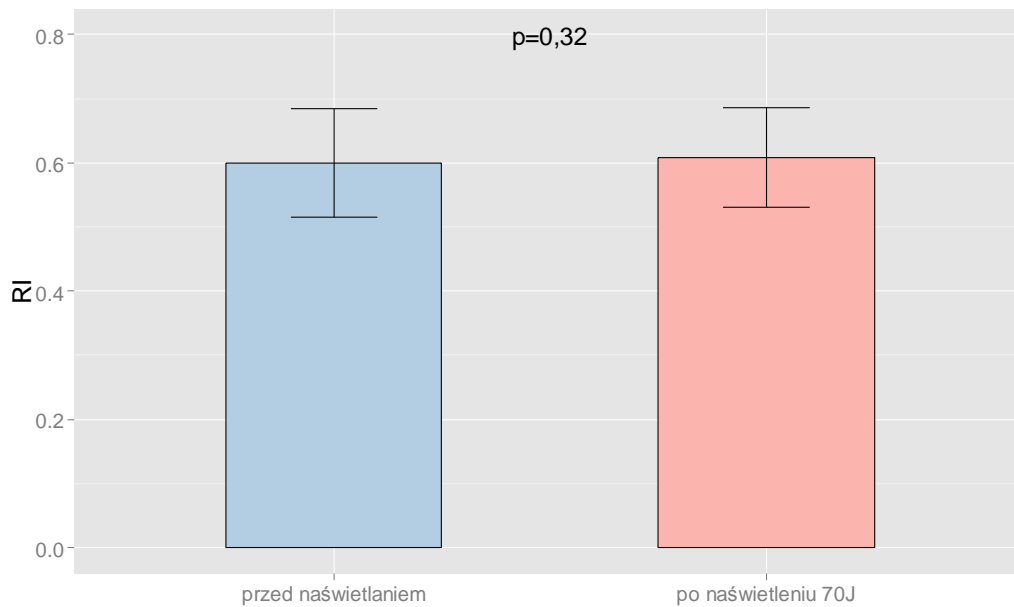
#### 4.5 Wpływ naświetlania LLLT na wartość RI w tętnicy promieniowej

Po przeprowadzeniu naświetlania dawką energii 20 J uzyskano średnie wartości współczynnika oporowości (RI)  $0,66 \pm 0,092$ . W oznaczeniach wyjściowych mierzono średnio  $0,65 \pm 0,094$ . Wartości te nie różniły się w sposób statystycznie istotny ( $p=0,46$ ) (Rycina 11).



Rycina 11. Wpływ naświetlania dawką 20 J LLLT na wartości RI w tętnicy promieniowej badanych osób.

Po przeprowadzeniu naświetlania dawką energii 70 J obserwowano średnie wartości RI  $0,608 \pm 0,078$ . Wyjściowo przed wykonaniem naświetlenia mierzono wartości  $0,6 \pm 0,084$ . Nie obserwowano różnic istotnych statystycznie po zastosowaniu naświetlania ( $p=0,32$ ) (Rycina12).

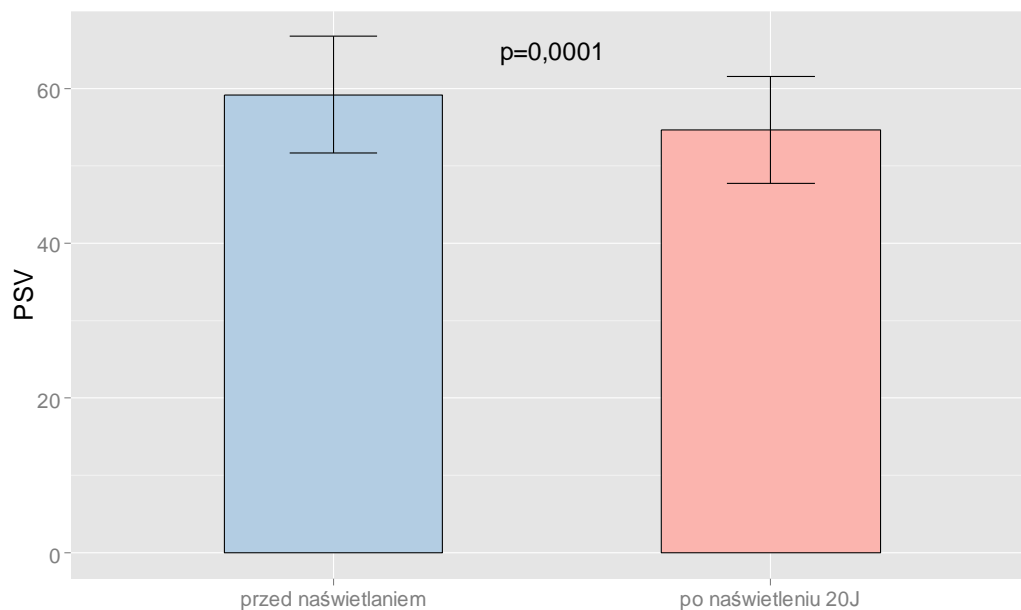


Rycina 12. Wpływ naświetlania dawką 70 J LLLT na wartości RI w tętnicy promieniowej badanych osób.



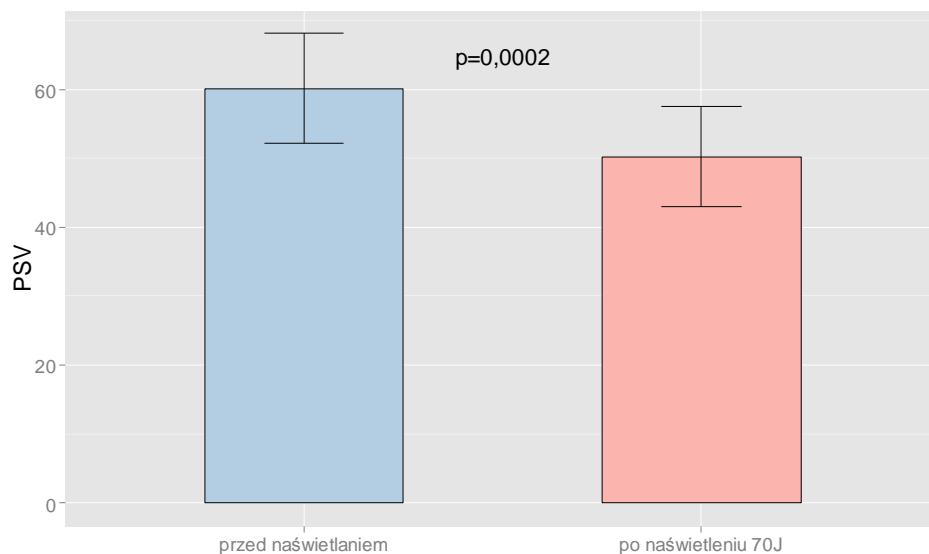
#### 4.6 Wpływ naświetlania LLLT na wartość PSV w tętnicy promieniowej

Po przeprowadzeniu naświetlania dawką energii 20 J mierzono średnie wartości prędkości szczytowo-skurczowej (PSV):  $54,631 \pm 6,90$  cm/s. Przed wykonaniem naświetlania mierzono wartości:  $59,174 \pm 7,50$  cm/s. Oznaczone po naświetlaniu LLLT prędkości różniły się w sposób statystycznie istotny ( $p=0,0001$ ). Uzyskano spadek szczytowej prędkości skurczowej po przeprowadzeniu naświetlania (Rycina 13).



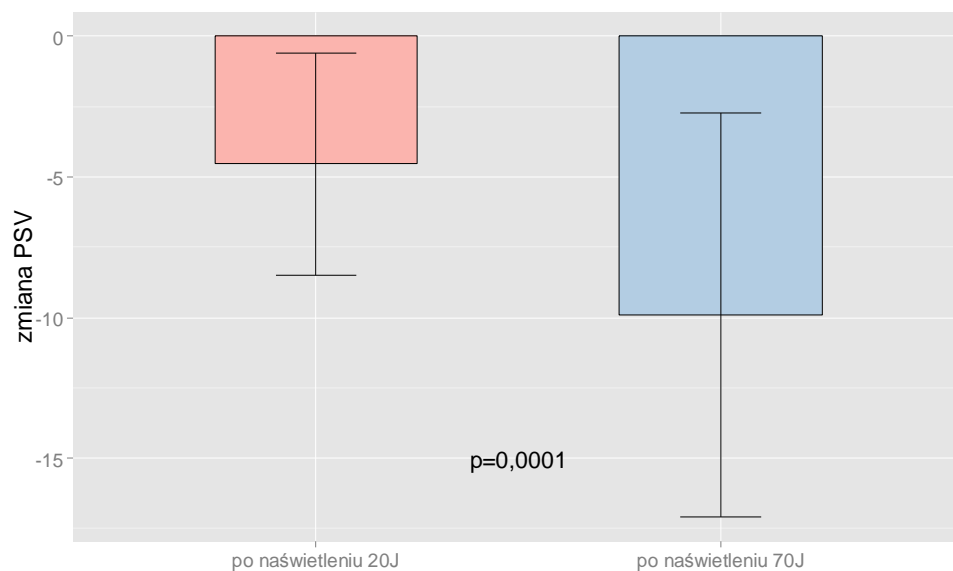
Rycina 13. Wpływ naświetlania dawką 20 J LLLT na wartość PSV w tętnicy promieniowej badanych osób.

Po przeprowadzeniu naświetlania dawką 70 J mierzono średnie wartości PSV  $50,215 \pm 7,27$  cm/s. Wyjściowo zmierzono średnio  $60,125 \pm 7,93$  cm/s. Wartości te różniły się między sobą w sposób statystycznie istotny ( $p=0,0002$ ) (Rycina 14).



Rycina 14. Wpływ naświetlania dawką 70 J LLLT na wartość PSV w tętnicy promieniowej badanych osób.

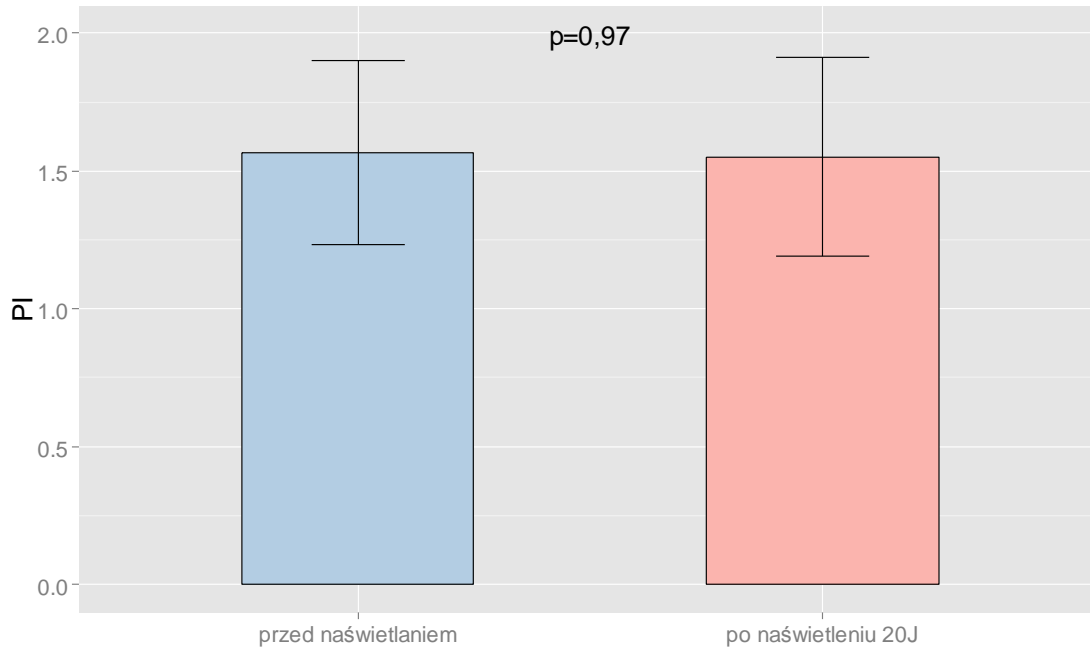
Po zastosowaniu naświetlania dawką energii 70 J obserwowano spadek PSV wynoszący średnio  $9,91 \pm 7,18$  cm/s wobec spadku wynoszącego  $4,54 \pm 3,95$  cm/s po naświetleniu dawką 20 J LLLT. Różnice te były statystycznie istotne (Rycina 15).



Rycina 15. Porównanie zmian wartości PSV w tętnicy promieniowej w zależności od dawki energii naświetlania LLLT.

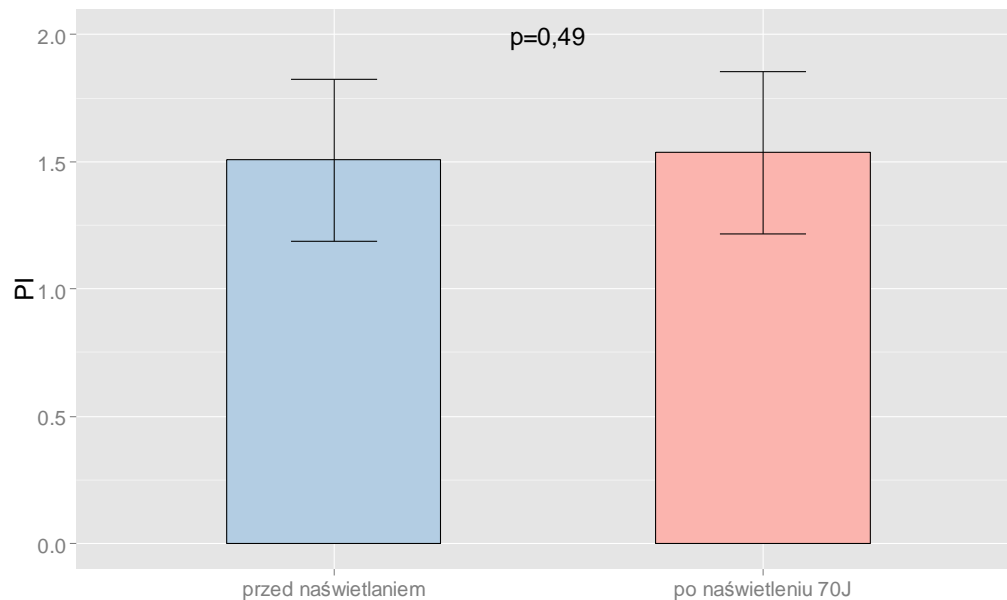
#### 4.7 Wpływ naświetlania LLLT na wartość PI w tętnicy promieniowej

Po przeprowadzeniu naświetlania dawką 20 J mierzono średnie wartości współczynnika pulsacyjności (PI)  $1,55 \pm 0,35$ . Wyjściowo mierzono średnio  $1,56 \pm 0,33$ . Wartości te nie różniły się w sposób statystycznie istotny ( $p=0,97$ ) (Rycina16).



Rycina 16. Wpływ dawki 20 J LLLT na wartości współczynnika pulsacyjności w tętnicy promieniowej badanych osób.

Po przeprowadzeniu naświetlania dawką 70 J mierzono średnie wartości współczynnika PI  $1,53 \pm 0,31$ . W oznaczeniach wyjściowych przed naświetleniem mierzono średnio  $1,507 \pm 0,31$ . Po zastosowaniu LLLT nie obserwowano różnic istotnych statystycznie ( $p=0,49$ ) (Rycina 17).



Rycina 17. Wpływ naświetlania dawką 70 J LLLT na wartości współczynnika pulsacyjności w tętnicy promieniowej badanych osób.

## 4.8 Korelacje pomiędzy badanymi parametrami

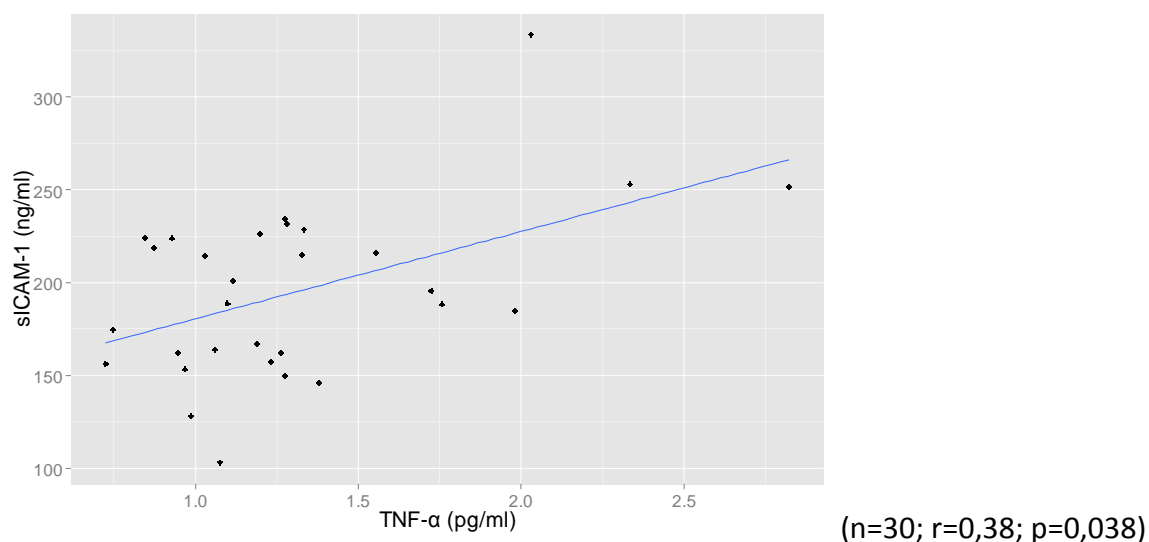
### Korelacje pomiędzy wartościami wyjściowymi badanych parametrów przed naświetlaniem

Testy korelacji wykonano metodą rang Spearmana. W grupie wyjściowej przed wykonaniem naświetlań obserwowano słabą dodatnią korelację pomiędzy TNF- $\alpha$  a ICAM-1 (istotne statystycznie korelacje zaznaczono pogrubioną czcionką). Pozostałe parametry nie korelowały ze sobą w sposób istotny statystycznie (Tabela 4).

Tabela 4. Korelacje pomiędzy wybranymi parametrami przed wykonaniem naświetlania LLLT.

		sVCAM-1	sICAM-1	P-selektyna	TNF- $\alpha$
sVCAM-1	R		0,173	0,153	-0,101
	P	-----	0,361	0,420	0,597
sICAM-1	R	0,173		0,204	<b>0,380</b>
	P	0,361	-----	0,281	<b>0,038</b>
P-selektyna	R	0,153	0,204		0,218
	P	0,420	0,281	-----	0,248
TNF- $\alpha$	R	-0,101	<b>0,380</b>	0,218	
	P	0,597	<b>0,038</b>	0,248	-----

R- współczynnik korelacji P- poziom istotności statystycznej



Rycina 18. Korelacja pomiędzy stężeniem TNF- $\alpha$  w osoczu a stężeniem sICAM-1 w surowicy badanych osób przed naświetlaniem.

Korelacje pomiędzy wybranymi parametrami po zastosowaniu dawki naświetlania 20 J.

Po zastosowaniu naświetlania dawką 20 J LLLT badane parametry nie korelowały ze sobą w sposób istotny statystycznie (Tabela 5).

Tabela 5. Korelacje pomiędzy badanymi parametrami po naświetleniu dawką 20 J LLLT.

		sVCAM-1	sICAM-1	P-selektyna	TNF- $\alpha$
sVCAM-1	R	-----	0,205	0,091	-0,259
	P		0,277	0,632	0,167
sICAM-1	R	0,205	-----	0,175	0,346
	P	0,277		0,354	0,061
P-selektyna	R	0,091	0,175	-----	0,199
	P	0,632	0,354		0,292
TNF- $\alpha$	R	-0,259	0,346	0,199	-----
	P	0,167	0,061	0,292	

R- współczynnik korelacji P- poziom istotności statystycznej

Korelacje pomiędzy wybranymi parametrami po zastosowaniu dawki naświetlania 40 J.

Po zastosowaniu naświetlania dawką 40 J LLLT badane parametry nie korelowały ze sobą w sposób istotny statystycznie (Tabela 6).

Tabela 6. Korelacje pomiędzy badanymi parametrami po naświetleniu dawką 40 J LLLT.

		sVCAM-1	sICAM-1	P-selektyna	TNF- $\alpha$
sVCAM-1	R	-----	0,214	0,239	-0,093
	P		0,443	0,390	0,742
sICAM-1	R	0,214	-----	0,143	0,296
	P	0,443		0,611	0,283
P-selektyna	R	0,239	0,143	-----	0,150
	P	0,390	0,611		0,593
TNF- $\alpha$	R	-0,093	0,296	0,150	-----
	P	0,742	0,283	0,593	

R- współczynnik korelacji P- poziom istotności statystycznej

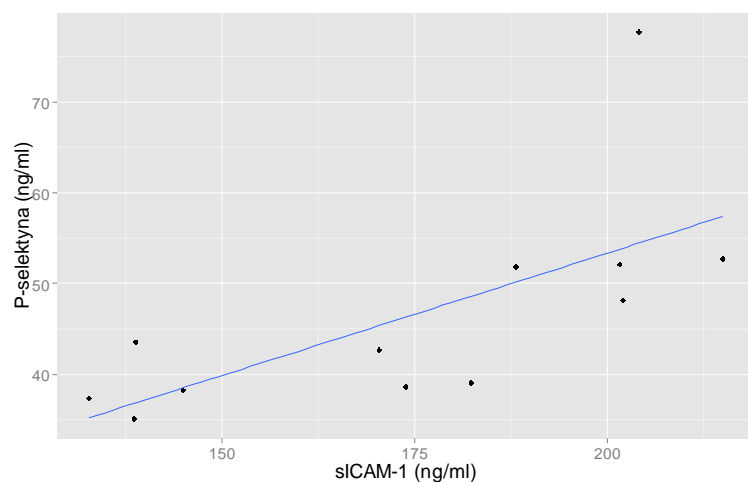
## Korelacje pomiędzy badanymi parametrami po zastosowaniu dawki naświetlania 70 J

Testy korelacji wykonano metodą rang Spearmana podobnie jak w przypadku oznaczeń wyjściowych przed wykonaniem naświetlania oraz po naświetleniu 20 i 40 J. Po zastosowaniu najwyższej dawki promieniowania obserwowano dodatnią korelację pomiędzy P-selektyną a ICAM-1. Pozostałe parametry nie korelowały ze sobą istotnie statystycznie (Tabela 7).

Tabela 7. Korelacje pomiędzy badanymi parametrami w grupie po naświetleniu dawką 70 J.

		sVCAM-1	sICAM-1	P-selektyna	TNF- $\alpha$
sVCAM-1	R		0,133	0,280	-0,336
	P	-----	0,680	0,378	0,286
sICAM-1	R	0,133		<b>0,874</b>	-0,014
	P	0,680	-----	<b>0,0002</b>	0,965
P-selektyna	R	0,280	<b>0,874</b>		-0,056
	P	0,378	<b>0,0002</b>	-----	0,862
TNF- $\alpha$	R	-0,336	-0,014	-0,056	
	P	0,286	0,965	0,862	-----

R- współczynnik korelacji P- poziom istotności statystycznej



Rycina 19. Korelacje pomiędzy stężeniem P-selektyny w osoczu a stężeniem sICAM-1 w surowicy badanych osób po naświetleniu energią 70 J.

## 5. Dyskusja

### Charakterystyka przeprowadzonych badań

Badania przeprowadzono z zastosowaniem energii 20, 40 oraz 70 J w kolejnych cyklach naświetlania. Taki dobór dawek zakładał uzyskanie optymalnego efektu biologicznego i możliwość przeprowadzenia analizy porównawczej dla poszczególnych cykli. W przyjętej metodyce uwzględniono powszechnie stosowaną w dziedzinie fizjoterapii regułę Arndta-Schulza (zmodyfikowanego przez Oshiro) [71]. Zakłada ona, że bodźce słabe jedynie podtrzymują badane procesy biologiczne, bodźce średnie je stymulują, zaś bodźce silne działają niekorzystnie. Zastosowanie zbyt silnego bodźca hamuje funkcje życiowe organizmu, wywołuje reakcje paradoksalne bądź też działa destrukcyjne. Górny limit dawki energii jak i zastosowanej mocy nie przekraczał odpowiednio 100 J i 100 mW/cm<sup>2</sup>. Zapobiegało to pojawieniu się istotnego efektu termicznego. W przypadku zastosowania wyższych dawek energii rośnie ryzyko pojawienia się tego efektu. Potwierdzono, iż wzrost temperatury tkanek powyżej 45<sup>0</sup>C po zastosowaniu energii laserowej prowadzi do ich uszkodzenia [105].

W wykonanych korelacjach dla poszczególnych parametrów wykazano istotną statystycznie zależność pomiędzy stężeniem P-selektyny a ICAM-1 po przeprowadzeniu naświetlania najwyższą z zastosowanych dawek energii 70 J. Taką korelację należy uznać za zgodną ze stanem wiedzy na temat odpowiedzi układu odpornościowego, z uwagi na zbieżne role tych czynników i ich udział w aktywacji komórek jednojądrzastych [106]. Wszystkie badane cząsteczki adhezyjne, zarówno ICAM-1, VCAM-1 jak i P-selektyna biorą udział w procesie aktywacji komórek jednojądrzastych, a pośrednio odpowiadają także za ich oddziaływanie ze strukturami ściany naczyniowej [106].

Dawki energii naświetlania były zgodne z danymi zawartymi w badaniach, w których wykazano wpływ LLLT na ekspresję cytokin. Najsilniejsze przeciwzapalne działanie wyrażające się takim efektem opisuje się w zakresie od kilku, kilkunastu J/cm<sup>2</sup> co zostało potwierdzone w szeregu doniesień [51][61][99]. Dolne wartości z tego przedziału dają zadowalający efekt stymulacyjny i przeciwzapalny, a wartości wyższe charakteryzują się pobudzaniem wzrostu komórek [113]. Zastosowanie takiego rzędu dawek energii wydaje się



być na ogół wystarczające do uzyskania znamiennego efektu przeciwzapalnego, co również znajduje odzwierciedlenie w piśmiennictwie [119]. Także wybór długości fali uwzględniał istniejące w literaturze dane na ten temat, potwierdzające skuteczność przeciwzapalną LLLT [107].

W przypadku badań własnych moc lasera użytego do naświetlania mieściła się w rzędzie wartości kilkudziesięciu miliwatów, co także znajduje odniesienie w informacjach literaturowych [72].

Także sposób ekspozycji był umotywowany dostępnymi danymi z piśmiennictwa. Potwierdzono bowiem spadek stężenia czynników prozapalnych po przezskórnym zastosowaniu LLLT [104]. Analogicznie dotyczyło to cyklu czasowego. Ilości zastosowanych naświetlań w badaniach własnych były zbieżne z danymi literaturowymi, dotyczącymi badań wykonanych w warunkach *in vivo* [125].

#### Wpływ LLLT na ekspresję parametrów stanu zapalnego

Niskoenergetyczne promieniowanie laserowe wykazuje ochronny wpływ na komórki śródbłonna hamując migrację komórek zapalnych [122]. Efekt ten może wyrażać się poprzez hamowanie ekspresji cytokin prozapalnych, co znajduje potwierdzenie w bazie literaturowej. Spośród badanych parametrów, najwięcej doniesień dotyczy TNF- $\alpha$  [86][109][110]. Podobne efekty po zastosowaniu LLLT opisano w przypadku P-selektyny [90] jak i pozostałych badanych cząsteczek adhezji komórkowej (ICAM-1, VCAM-1) [111].

W badaniach własnych nie uzyskano znamienych różnic w ekspresji badanych markerów zapalnych po wykonanych naświetlaniach, w stosunku do oznaczeń wyjściowych. Uwzględniając przedstawione powyżej informacje, taki rezultat trzeba uznać za zaskakujący w świetle doniesień na ten temat [72][86][90]. Wynik ten powinien być przedmiotem analizy, zwłaszcza, że w piśmiennictwie właściwości przeciwzapalne LLLT sugeruje się w przypadku już znacznie niższych dawek energii [76]. W przeglądzie literatury należy także odnieść się do danych sugerujących zależność pomiędzy ładunkiem energii a wielkością efektu przeciwzapalnego, którą opisuje się już w przypadku dawek nie przekraczających kilku J [112]. W badaniach własnych zastosowano trzy różne dawki energii wobec czego można uznać, że uzyskane wyniki również w tym zakresie nie są zbieżne z powyższymi obserwacjami. Krew obwodowa do badania pobierana była następnego dnia po zakończeniu

naświetlania. W założeniu nie miało to istotnego wpływu na uzyskane wyniki badań, gdyż utrzymywanie się efektu przeciwzapalnego opisywano w piśmiennictwie przez kilka tygodni po naświetleniu [91].

Obecnie w literaturze brak jest kompleksowych informacji na temat rezultatów badań z zastosowaniem przezskórnego naświetlania LLLT krótkich fragmentów naczyń. Z tego powodu zestawienie uzyskanych wyników z wcześniejszymi doniesieniami na ten temat wymaga uwzględnienia istniejących różnic w stosunku do modelu doświadczalnego w badaniach własnych. W założeniu niniejszej pracy stosowano miejscowe oddziaływanie wiązki laserowej na ograniczony fragment naczynia tętniczego przy jednoczesnej ocenie systemowej odpowiedzi układu odpornościowego.

Przegląd piśmiennictwa na ten temat pozwala jednak na stworzenie także innych hipotez mogących tłumaczyć uzyskane wyniki. Z jednej strony można założyć, iż brak wpływu LLLT na ekspresję badanych parametrów zapalnych może być konsekwencją także innych różnic w metodyce badań pomiędzy zastosowanym modelem doświadczalnym a opisywanymi w literaturze. W szczególności uwagę zwraca fakt, że szereg publikowanych eksperymentów z zastosowaniem LLLT przeprowadzono w warunkach *in vitro*. Analiza metodyki opisanych badań potwierdza ich stosowanie na ogół na modelach zwierzęcych, wykorzystanie których niewątpliwie daje większą dowolność w ustalaniu parametrów doświadczalnych, co może wpływać na uzyskiwane wyniki [86][100][125].

Należy zaznaczyć, iż wcześniejsze eksperymenty z zastosowaniem niskoenergetycznego promieniowania laserowego wykonywano w warunkach wzmożonej odpowiedzi zapalnej. Stanowi to istotną różnicą w porównaniu do założeń własnych badań. Zabiegi naświetlania często były wykonywane w stanach chorobowych [99]. Alternatywnie stosowano także modele doświadczalne, gdzie zapalenie sztucznie indukowano bodźcami zewnętrznymi na potrzebę prowadzonych badań [51][77]. Obserwowane rozbieżności dotyczą także czasu, przez jaki było stosowane naświetlanie LLLT. W poszczególnych przypadkach był znacznie dłuższy niż w badaniach własnych i wynosił od 7 dni nawet do 14 tygodni [109][129].

W przypadku badań nad przeciwzapalnym działaniem LLLT prowadzonych w warunkach *in vivo*, zwrócić trzeba z kolei uwagę, iż wiele eksperymentów wykonywano z naświetlaniem tkanek litych bądź narządów [108]. Na ogół naświetlaniu podlegały elementy narządu ruchu a informacje literaturowe dotyczyły badań nad zastosowaniem LLLT w

fizjoterapii [96][97]. W innych natomiast przypadkach badania te prowadzone były na zwierzętach, co jak wspomniano już wcześniej należy potraktować jako w istotnym stopniu odmienny model badawczy [92].

Przedstawione powyżej, różnice jak i też brak w piśmiennictwie kompleksowych informacji z zakresu oddziaływania LLLT na naczynia obwodowe, wydają się argumentować trudność precyzyjnego zestawienia uzyskanych wyników badań z danymi literaturowymi na ten temat.

Analiza piśmiennictwa z zakresu wpływu energii laserowej na ekspresję cytokin uprawnia do stwierdzenia, że zjawisko to jest wielokierunkowe, często odmienne w przypadku poszczególnych cząsteczek zapalnych. Wyrazem tego mogą być opracowania, w których obserwowano spadek ekspresji TNF- $\alpha$  przy jednoczesnym braku wpływu na ekspresję IL-6 [118]. Można znaleźć także doniesienia, w których zgodnie z własnymi obserwacjami nie stwierdzono zmian ekspresji TNF- $\alpha$  po zastosowaniu energii laserowej. W tych samych badaniach wykazano jednocześnie wzrost aktywności przeciwzapalnej IL-10 [127]. Ta ostatnia nie była oznaczana w badaniach własnych, podobnie jak IL-6 i IL-1 $\beta$ , których zmiana ekspresji przez LLLT także została potwierdzona doświadczalnie [128].

Wyjaśnieniem własnych obserwacji w zakresie ekspresji badanych cytokin po zastosowaniu LLLT może być także fakt, że ich stężenia zmieniają się (wzrastają) wraz z wiekiem, co zaobserwowano w badaniach na zwierzętach [104]. Brak spadku ekspresji badanych parametrów w tym przypadku wynikałby z pierwotnie niewielkiego nasilenia reakcji zapalnej w obrębie naświetlanego śródbłonna a zatem niskiej wyjściowej ekspresji tych cząsteczek. Poza czynnikiem wiekowym, niskie nasilenie reakcji zapalnej w badanej grupie sugerować może brak w wywiadzie schorzeń sercowo–naczyniowych oraz innych chorób mogących istotnie modulować funkcję śródbłonna bądź ogólnoustrojową odpowiedź zapalną w tej grupie. Usankcjonowaniem tej hipotezy mogłyby być wyniki badań poszerzonych o inną grupę wiekową i zakwalifikowanie do nich osób z potwierdzoną dysfunkcją śródbłonna. Mogłoby to dostarczyć istotnych informacji na temat odmierności odpowiedzi zapalnej pomiędzy różnymi grupami.

Należy także uznać, iż niewielka liczebność badanej grupy oznacza ograniczoną możliwość statystycznej interpretacji uzyskanych wyników. Spośród wyjściowej grupy 50 ochotników, po uwzględnieniu kryteriów wykluczających do udziału w badaniach zakwalifikowano 30 osób.

Mając na uwadze powyższe rozbieżności należy stwierdzić, że przyjęty model doświadczalny w istotnym stopniu różnił się od opisywanych w literaturze. Można także sformułować przypuszczenie, że wpływ LLLT na zmienność ekspresji cytokin poza parametrami fizycznymi energii laserowej może zależeć od szeregu innych czynników w istotny sposób wpływających na wyniki badań.

Zalecenia dotyczące leczenia laseroterapią ustalane są przez Światową Organizację Laseroterapii (WALT). Ponadto w literaturze można znaleźć około 2500 doniesień, w których na podstawie prac eksperymentalnych podjęto próby stworzenia protokołów terapeutycznych z uwagi na często pojawiający się brak wiarygodnych danych na temat parametrów zastosowanego promieniowania laserowego [75]. Sugeruje się, że nawet w 30 % przeprowadzonych naświetlań laserem nie uzyskano założonego celu z powodu złego doboru parametrów promieniowania laserowego [75].

W ocenie uzyskanych wyników badań własnych należy uwzględnić obserwacje, że w układzie *in vivo*, z uwagi na obecność tkanek otaczających naświetlane obszary dochodzi do znacznych strat energii. Uważa się, że w przypadku przezskórnego modelu naświetlania energią laserową, do tkanki podskórnej przenika 20 % emitowanej mocy a w przypadku skóry i głębszych warstw jest to już tylko 5 % emitowanych wartości [75]. W założonym modelu badawczym wyjściowa moc w pierwszym cyklu naświetleń wyniosła 20 mW a emitowana dawka energii 20 J. Przy wspomnianych stratach na poziomie powłok ciała strata ta mogła osiągnąć kilkanaście J, co wyjaśniałoby brak znamiennej różnicy w ekspresji ocenianych parametrów. Udowodnione dostateczne przenikanie energii do tkanek na głębokości 3-4 cm opisano dopiero przy zastosowaniu mocy 200mW, a więc znacznie większej niż zastosowana w badaniach własnych [75]. Głębokość tętnicy promieniowej na naświetlanym odcinku mieściła się w przedziale ok. 6-9 mm. Niewątpliwie wiązało się to z istotną stratą energii, która docierała do światła naczynia, można przyjąć, iż była to strata rzędu kilkunastu procent, podobnie jak tkanki podskórnej.

Wszystkie te spostrzeżenia mogłyby rodzić sugestię, iż zwiększenie emitowanej dawki energii do wartości zbliżonych do progu bezpieczeństwa być może pozwoliłoby na uzyskanie statystycznie istotnych różnic po naświetlaniu. Jednak wątpliwości co do celowości takiego projektu budzi kwestia progu bezpieczeństwa wykonywanych badań.

W opisanych dość szeroko w piśmiennictwie badaniach nad chorymi poddawany mi zabiegom przezskórnej angioplastyki wieńcowej obserwowano spadek ekspresji TGF- $\beta$ 1 oraz

FGF-2 przy użyciu lasera o długości fali 808 nm i mocy 100 mW przy gęstości emitowanej energii  $9 \text{ J/cm}^2$  na naświetlanym obszarze  $1,6\text{-}2,5 \text{ cm}^2$  [88]. Były to zatem parametry podobne do zastosowanych w badaniach własnych. W innych opracowaniach opisano także spadek ekspresji TNF- $\alpha$  po użyciu podobnych dawek energii [51]. Nie tylko parametry energii promieniowania laserowego były zbliżone do zastosowanych. Także długość fali mieściła się w zakresie tzw. *okna optycznego* [116]. Należy jednak zwrócić uwagę, iż w tych przypadkach naświetlanie wykonano wewnątrznaczyniowo, co niewątpliwie oznaczało większą absorpcję energii, silniejsze działanie przeciwzapalne i może być przekonującym wyjaśnieniem obserwowanych rozbieżności w wynikach [88][123]. Potwierdza to zatem istotny wpływ start energii przy naświetlaniu przezskórnym, co zostało powyżej podkreślone.

Jak wiadomo biologiczna wrażliwość poszczególnych tkanek uzależniona jest także od długości fali promieniowania. Największe przenikanie energii ma miejsce w zakresie długości fali 600-1000 nm, czyli tzw. *oknie optycznym*. W tym przedziale penetracja do naświetlanych obszarów rośnie wraz długością fali. Z uwagi na dość szeroki zakres wartości ciekawym projektem wydawałoby się zbadanie zależności pomiędzy długością fali a obserwowanym efektem biologicznym. Wymagałoby to porównania uzyskanych efektów z naświetlaniem laserem o innej długości fali (np. 650 nm), którego przeciwzapalna skuteczność także została potwierdzona w literaturze [124]. Być może przeprowadzenie takiego porównania dostarczyłoby informacji mogących stanowić wyjaśnienie wyników uzyskanych w badaniach własnych. Uzasadnieniem takiej koncepcji mogą być również prace sugerujące najsilniejsze efekty przeciwzapalne LLLT w przypadku wielosondowego modelu doświadczalnego, umożliwiającego równoczesne emitowanie energii o różnych długościach fali światła [75].

#### Wpływ LLLT na hemodynamikę przepływu krwi przez naczynia

W badaniach dopplerowskich dokonano pomiarów prędkości szczytowo-skurczowej (PSV), współczynnika oporowości (RI) oraz współczynnika pulsacyjności (PI). W badaniach własnych zanotowano spadek prędkości skurczowej po zastosowaniu naświetlania LLLT zarówno dla dawki 20 jak i 70 J. Dla dawki 70 J efekt ten obserwowany był u 29 badanych osób. W przypadku dawki 20 J spadek wartości PSV uzyskano u większości osób. Także

średnie obniżenie się prędkości przepływu krwi przez badaną tętnicę zależało od zastosowanej energii i było większe dla dawki 70 J.

Można założyć, iż obserwowany efekt najprawdopodobniej wynika z nacyniorozszerzającego działania światła laserowego. Takie właściwości zostały opisane w literaturze [61][117]. Różnice pomiędzy spadkiem PSV dla obu zastosowanych dawek pozwalają stwierdzić, że w tym zakresie energii efekt ten zależny jest od dawki promieniowania.

Analizując spadek skurczowej prędkości przepływu nie można też całkowicie wykluczyć pojawienia się niewielkiego efektu termicznego. Jednak ze względu na pochłanianie energii przez skórę i tkankę podskórną i wspomniane już starty przy naświetlaniu przezskórnym można założyć, że efekt termiczny był zjawiskiem marginalnym. Z punktu widzenia przyjętych celów badawczych pojawienie się istotnego wzrostu ciepła byłoby zjawiskiem niekorzystnym. W wykonanym projekcie nie było możliwości szczegółowej oceny efektu termicznego w warunkach *iv vivo*.

W badaniach własnych nie obserwowano statystycznie istotnej różnicy pomiędzy wartościami PI oraz RI przed- i po naświetlaniu. Odnosząc się do bazy literaturowej stwierdzić należy, że liczba doniesień dotyczących zmienności parametrów oporu naczyniowego po zastosowaniu LLLT jest skąpa. W świetle nielicznych danych uzyskane wyniki badań wydają się zbieżne z obserwacjami na ten temat [114]. Choć w tym przypadku, analogicznie jak w badaniach własnych nie obserwowano wpływu naświetlania LLLT na wartości RI, trzeba mieć na uwadze, że badania dotyczyły naczyń tarczycy różniących się budową ścian i fizjologiczną oporowością od tętnicy promieniowej.

W literaturze opisano związek pomiędzy wartościami współczynnika oporowości a uszkodzeniem śródbłonna [115]. Sugeruje się także wzrost wartości współczynnika pulsacyjności w przebiegu rozwoju angiopatii u pacjentów z cukrzycą [65]. Uwzględniając wymienione na wstępie pracy ograniczenia w interpretacji współczynnika oporowości naczyń można uznać, że zarówno PI jak i RI pośrednio świadczą o podatności tętnic. W innych doniesieniach, podobnie jak w przypadku badanych cząsteczek odpowiedzi zapalnej, potwierdzono zależność pomiędzy wartościami PI a wiekiem [120][121]. Wobec powyższego interpretacja tych danych mogłaby być pomocna w wyjaśnieniu braku istotnych statystycznie różnic w zakresie PI oraz RI po naświetleniu. Należałoby uznać, że brak zmienności tych parametrów po naświetleniu wynikał z wyjściowo niskich wartości w badanej grupie

młodych osób. Oczywiście, dla weryfikacji tej hipotezy należałoby przeprowadzić badania na grupie ze schorzeniami naczyń obwodowych i wykonać analizę porównawczą. Z tego też punktu widzenia celowe byłoby wykonanie dodatkowych badań z LLLT i zastosowaniem innych parametrów naświetlania np. wydłużenia czasu, liczby sesji zwiększenia mocy lub dawki energii. W piśmiennictwie brak jest kompleksowych informacji, na podstawie których można by stworzyć wzorzec dla wykonania takiego projektu. Wspomniane standardy tworzone przez WALT dotyczą jedynie procedur leczniczych.

Obserwowany brak zmienności RI oraz PI po przeprowadzonych naświetlaniach należy traktować jako zjawisko korzystne. Może to świadczyć o bezpieczeństwie stosowania LLLT jako procesu niemodulującego w istotnym stopniu oporu naczyniowego. Być może uzyskanie zmian wartości tych współczynników byłoby możliwe po modyfikacji parametrów naświetlania lub przeprowadzeniu badań na innej grupie osób. Z racji, iż dobór ochotników zakładał wyeliminowanie schorzeń mogących wpływać na funkcję śródbłonna naczyniowego, podobnie jak w przypadku poprzednio opisanych parametrów, uzasadnione wydaje się poszerzenie badań i wykonanie ich dodatkowo na populacji osób z dysfunkcją śródbłonna.

Cykle naświetlania były krótkie, zaledwie trzydniowe, co niewątpliwie mogło wpłynąć na uzyskane wyniki. Potwierdzenie tej tezy sugerowałoby małą zmienność tych parametrów pod wpływem krótkotrwałego oddziaływania LLLT, analogicznie jak w przypadku badanych cytokin. Nie można też wykluczyć istotnego wpływu na uzyskane wyniki długiego ucisku głowicy, co wynikało z trudnej wizualizacji badanej tętnicy u części badanych osób. Efekt taki określany jest mianem zjawiska Valsalvy [126].

#### Ograniczenia wykonywanych badań

Zakres wykonywanych badań był ograniczony do kilku parametrów podlegających ocenie, zarówno w przypadku badań biochemicznych, jak i w badaniu dopplerowskim tętnicy promieniowej. Materiałem była krew obwodowa, wobec czego analiza dotyczyła systemowej odpowiedzi zapalnej.

W badaniach własnych nie wykonano także testów czynnościowych naczyń, co było spowodowane brakiem odpowiedniej aparatury. Natomiast poszerzenie badań w celach porównawczych o naświetlanie wewnątrznaczyniowe nie było natomiast możliwe z przyczyn

bioetycznych, gdyż wykonano je na zdrowych ochotnikach. Z tego samego powodu nie zastosowano inwazyjnych metod oceny funkcji tętnic. Przeprowadzenie części z powyższych technik wymagałoby przeprowadzenia badań w warunkach *in vitro*. Alternatywnie wymagałoby to przeprowadzenia badań na zwierzętach, bądź wykonania ich na grupie osób ze schorzeniami sercowo-naczyniowymi.

### Kierunki dalszych badań

Wykonanie badań na populacji zdrowych ochotników, następnie poszerzonych o grupy osób ze schorzeniami naczyń, mogłoby dostarczyć cennych informacji na temat roli niskoenergetycznego promieniowania laserowego na funkcje śródbłonka. Wyniki takich analiz mogłyby być źródłem odpowiedzi na hipotetyczne pytanie: czy LLLT może pełnić rolę ochronną w stosunku do „zdrowego” śródbłonka i czy hamuje odpowiedź zapalną o nasileniu właściwym chorobowo niezmiennemu śródbłonkowi? Jak wspomniano wcześniej, istnieje szereg mechanizmów bądź schorzeń modulujących w różnych zakresach ogólnoustrojową odpowiedź układu immunologicznego. Mogą one więc pośrednio wpływać na ekspresję badanych cząsteczek. Bardziej wiarygodne wydaje się być zatem wykonywanie badań na jednorodnej grupie ochotników bez obciążeń chorobowych i w dalszym kroku odniesienie uzyskanych wyników do badań przeprowadzonych na grupie osób ze schorzeniami skutkującymi uszkodzeniem śródbłonka. Dotychczas nie wykonano takich analiz, co skutkuje brakiem informacji literaturowych, na podstawie których można byłoby stworzyć protokoły przezskórnego naświetlania dające gwarancję uzyskania powtarzalnych wyników.

Brak jest także wyczerpującej wiedzy na temat wpływu naświetlania energią laserową na parametry hemodynamiczne przepływu w naczyniach obwodowych. Cenne mogłyby być kompleksowe badania nad LLLT z wykorzystaniem tonometru piezoelektrycznego bądź rejestratora podczerwieni celem wykonania analizy prędkości i kształtu fali tętna jak również jej cyfrowej rejestracji [130][131][132]. Uzasadnione wydaje się także wykonanie badań nad zmiennością FMD pod wpływem promieniowania laserowego.

Przeprowadzenie powyższych analiz wymaga opracowania odpowiedniej metodyki naświetlania energią laserową. Ocena powyższych parametrów powinna odbywać się w



znacznie dłuższym od zaprezentowanego interwale czasowym i być może przy innych dawkach energii.

Przeciwzapalne właściwości LLLT mogą być podstawą do badań w grupie pacjentów ze schorzeniami naczyń obwodowych. Potwierdzenie korzystnego wpływu promieniowania laserowego na funkcję śródbłonna lub poprawa parametrów hemodynamicznych po naświetleniu tętnic mogłoby stanowić podstawę dla dalszych badań mających na celu opracowanie nowych metod leczenia schorzeń obejmujących naczynia obwodowe.

## 6. WNIOSKI

1. Przeskórne naświetlanie LLLT tętnicy promieniowej wydaje się nie wpływać na stężenie cząsteczek zapalnych we krwi obwodowej zdrowych osób.
2. Naświetlanie niskoenergetycznym promieniowaniem laserowym powoduje spadek szczytowo-skurczowej prędkości przepływu (PSV) w tętnicy promieniowej, który jest zależny od zastosowanej dawki energii.
3. Niskoenergetyczne promieniowanie laserowe wydaje się nie wpływać na wartości współczynnika oporowości oraz współczynnika pulsacyjności w naświetlanej tętnicy promieniowej zdrowych osób.

## 7. STRESZCZENIE

**Wprowadzenie:** Wiele badań wskazuje na kluczową rolę upośledzenia funkcji śródbłonka w patogenezie schorzeń układu krążenia. Wpływa na to szereg zjawisk prowadzących do zaburzenia funkcji wydzielniczej wewnętrznej błony naczyń, zaburzeń hemostazy, co prowadzi do dysfunkcji śródbłonka. Podłożem tych zjawisk w istotnym stopniu jest aktywacja układu odpornościowego i nasilenie reakcji zapalnej w ścianie naczyń tętniczych. Liczne doniesienia literaturowe wskazują na oddziaływanie przeciwzapalne niskoenergetycznego promieniowania laserowego, co może znaleźć zastosowanie w leczeniu schorzeń chorób naczyń.

**Materiał i metody:** W grupie 30 zdrowych ochotników (16 kobiet i 14 mężczyzn), bez schorzeń upośledzających funkcję śródbłonka zastosowano naświetlanie LLLT tętnicy promieniowej. Przeprowadzono 3 cykle naświetlania o energii odpowiednio 20 J, 40 J, 70 J. Po każdym cyklu oznaczono w osoczu bądź surowicy badanych poziom TNF- $\alpha$ , ICAM-1, VCAM-1 oraz selektyny P. Równoległe wykonano analizę dopplerowską przepływu przez naświetlaną tętnicę promieniową. Uzyskane wartości porównano z wartościami wyjściowymi.

**Wyniki:** Wykazano dodatnią korelację pomiędzy TNF- $\alpha$  i P-selektyną z zakresie wartości wyjściowych przed przeprowadzeniem naświetleń oraz ICAM-1 i P-selektyną po zastosowaniu naświetlania dawką 70 J. Po przeprowadzeniu naświetlania dawkami 20 J, 40 J i 70 J uzyskano stężenia:

sVCAM-1: 646,44 ng/ml ( $\pm$  140,87 ng/ml) vs. 636,02 ng/ml ( $\pm$  141,62 ng/ml) ( $p=0,4$ ); 615,38 ng/ml ( $\pm$  113,64 ng/ml) vs. 618,71 ng/ml ( $\pm$  109,03 ng/ml) ( $p=0,77$ ); 607,09 ng/ml ( $\pm$  125,91 ng/ml) vs. 618,72 ng/ml ( $\pm$  109,03 ng/ml) ( $p= 0,64$ ).

sICAM-1: 195,05 ng/ml ( $\pm$  46,28 ng/ml) vs. 195,11 ng/ml ( $\pm$  45,74 ng/ml) ( $p=0,86$ ); 182,15 ng/ml ( $\pm$  43,37 ng/ml) vs. 173,27 ng/ml ( $\pm$  42,17 ng/ml) ( $p=0,77$ ); 174,35 ng/ml ( $\pm$ 29,35 ng/ml) w porównaniu do 173,27 ng/ml ( $\pm$  42,17 ng/ml) ( $p= 0,98$ ).

TNF- $\alpha$ : 1,279 pg/ml ( $\pm$  0,509 pg/ml) vs. 1,311 pg/ml ( $\pm$ 0,478 pg/ml) ( $p=0,75$ ); 1,325 pg/ml ( $\pm$  0,521 pg/ml) vs. 1,280 pg/ml ( $\pm$  0,458 pg/ml) ( $p=0,97$ ); 1,314 pg/ml ( $\pm$ 0,522 pg/ml) vs. 1,280 pg/ml ( $\pm$  0,458 pg/ml) ( $p= 0,98$ ).

P-selektyny 48,45 ng/ml ( $\pm$  12,83 ng/ml) vs. 46,32 ng/ml ( $\pm$  12,84 ng/ml) ( $p=0,35$ ); 47,96 ng/ml ( $\pm$  13,53 ng/ml) vs. 50,18 ng/ml ( $\pm$  14,05 ng/ml) ( $p=0,71$ ); 46,44 ng/ml ( $\pm$  11,64 ng/ml) vs. 50,18 ng/ml ( $\pm$  14,05 ng/ml) ( $p= 0,37$ ).

W analizie dopplerowskiej zaobserwowano spadek szczytowo-skurczowej prędkości przepływu krwi przez tętnicę promieniową po naświetleniu. Nie obserwowano znamienych statystycznie różnic w zakresie pozostałych parametrów.

**Podsumowanie:** W badaniach własnych nie uzyskano statystycznie istotnych zmian w ekspresji badanych parametrów stanu zapalnego. Obserwowano spadek szczytowo-skurczowej prędkości przepływu przez tętnicę promieniową bez wpływu naświetlania na parametry oporu naczyniowego. Uzyskane wyniki nie wykluczają wpływu LLLT na systemową odpowiedź zapalną. Wymaga to dalszych badań z zastosowaniem innych parametrów naświetlania.

## ABSTRACT

**Introduction:** Series of researches show the key role of endothelial function impairment in pathogenesis of the circulatory system disorders. This is influenced by a series of phenomena leading to secretion dysfunction of the vessels tunica intima, haemostasis disorders, what leads to endothelial dysfunction. The basis for the phenomena is, to a significant extent, activation of the immunologic system and intensified inflammatory reaction in the arterial vessels walls. Numerous literature reports show anti-inflammatory low-energy laser radiation, which may be taken advantage of when curing vascular diseases.

**Material and methods:** In a group of 30 healthy volunteers (16 females and 14 males), without conditions impairing the endothelial function, LLLT therapy of the radial artery was applied. 3 radiation cycles with energy dose being adequately 20 J, 40 J and 70 J were conducted. After each cycle NF- $\alpha$ , ICAM-1, VCAM-1 and P-selectin levels were marked in the volunteers' blood plasma or serum. The obtained values were compared to the control ones.

**Results:** A positive correlation between TNF  $-\alpha$  and P-selectin, ICAM-1 and P-selectin was proved after radiation was applied. After radiation sessions with 20 J, 40 J and 70 J were conducted, the following results were obtained:

sVCAM-1: 646,44 ng/ml ( $\pm$  140,87 ng/ml) vs. 636,02 ng/ml ( $\pm$  141,62 ng/ml) ( $p=0,4$ ); 615,38 ng/ml ( $\pm$  113,64 ng/ml) vs. 618,71 ng/ml ( $\pm$  109,03 ng/ml) ( $p=0,77$ ); 607,09 ng/ml ( $\pm$  125,91 ng/ml) vs. 618,72 ng/ml ( $\pm$  109,03 ng/ml) ( $p= 0,64$ ).

sICAM-1: 195,05 ng/ml ( $\pm$  46,28 ng/ml) vs. 195,11 ng/ml ( $\pm$  45,74 ng/ml) ( $p=0,86$ ); 182,15 ng/ml ( $\pm$  43,37 ng/ml) vs. 173,27 ng/ml ( $\pm$  42,17 ng/ml) ( $p=0,77$ ); 174,35 ng/ml ( $\pm$  29,35 ng/ml) w porównaniu do 173,27 ng/ml ( $\pm$  42,17 ng/ml) ( $p= 0,98$ ).

TNF- $\alpha$ : 1,279 pg/ml ( $\pm$  0,509 pg/ml) vs. 1,311 pg/ml ( $\pm$  0,478 pg/ml) ( $p=0,75$ ); 1,325 pg/ml ( $\pm$  0,521 pg/ml) vs. 1,280 pg/ml ( $\pm$  0,458 pg/ml) ( $p=0,97$ ); 1,314 pg/ml ( $\pm$  0,522 pg/ml) vs. 1,280 pg/ml ( $\pm$  0,458 pg/ml) ( $p= 0,98$ ).

P-selectin 48,45 ng/ml ( $\pm$  12,83 ng/ml) vs. 46,32 ng/ml ( $\pm$  12,84 ng/ml) ( $p=0,35$ ); 47,96 ng/ml ( $\pm$  13,53 ng/ml) vs. 50,18 ng/ml ( $\pm$  14,05 ng/ml) ( $p=0,71$ ); 46,44 ng/ml ( $\pm$  11,64 ng/ml) vs. 50,18 ng/ml ( $\pm$  14,05 ng/ml) ( $p= 0,37$ ).

In the Doppler analysis a decrease in the peak systolic velocity of blood flowing through the radial artery was observed after radiation while statistical significance regarding the remaining parameters (PI and RI) was not noticed.

**Summary:** In own researches statistically significant changes in expression of the tested parameters of inflammatory condition were not obtained. A decrease was observed in the peak systolic velocity of blood flowing through the radial artery, without the radiation impact on parameters of vascular resistance. The obtained results do not exclude the LLLT impact on the systemic inflammatory reaction. This requires further examinations and application of other radiation parameters.

## 8. ZAŁĄCZNIK

**OPINIA KOMISJI BIOETYCZNEJ**  
przy Wojewódzkim Szpitalu Specjalistycznym we Wrocławiu  
Ośrodek Badawczo-Rozwojowy  
51-124 Wrocław ul. Kamieńskiego 73A tel. (071) 32 70 125

KB/nr 19/2014

Działając na podstawie art. 29 ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodzie lekarza (Dz. U. z 1997 r. Nr 28 poz. 152 wraz ze zm.), Zarządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1990 r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i funkcjonowania oraz trybu działania Komisji Bioetycznych (Dz. U. Nr 47 poz. 480) oraz zgodnie z zasadami zawartymi w GCP (Good Clinical Practice) oraz Deklaracji Helsińskiej.

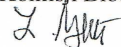
Komisja Bioetyczna przy Wojewódzkim Szpitalu Specjalistycznym we Wrocławiu Ośrodek Badawczo-Rozwojowy na posiedzeniu w dniu **20.05.2014r.** przeanalizowała wniosek, który złożył **Radosław Gutherc** w sprawie badania: **Wpływ niskoenergetycznego promieniowania laserowego na ekspresję wybranych parametrów stanu zapalnego.**

Po zapoznaniu się ze złożonym wnioskiem i w wyniku przeprowadzonej dyskusji oraz tajnego głosowania Komisja Bioetyczna podjęła uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu tego wniosku.

Kierownik badania zobowiązany jest do przechowywania wszystkich dokumentów dotyczących badania przez okres 20 lat od chwili zakończenia badania.

Od niniejszej uchwały można się odwołać do Odwoławczej Komisji Bioetycznej przy Ministrze Zdrowia, za pośrednictwem Komisji Bioetycznej przy Wojewódzkim Szpitalu Specjalistycznym we Wrocławiu Ośrodek Badawczo-Rozwojowy, w terminie 14 dni od daty otrzymania niniejszej opinii.

Przewodniczący Komisji Bioetycznej

  
**Prof. dr hab. Zdzisława Bem**

Otrzymują:

1. Wnioskodawca projektu
2. Kierownik jednostki organizacyjnej, w której projekt będzie realizowany

## 9. PIŚMIENNICTWO

- [1] Fathi R, Haluska B, Isbel N, Short L et al.: The relative importance of vascular structure and function in predicting cardiovascular events. *J Am Col Cardiol.* 2004; 43(4): 616-23.
- [2] Doroszko A, Andrzejak R, Szuba A: Dysfunkcja śródbłonna i ADMA w patogenezie nadciśnienia tętniczego. *Arterial Hypertens.* 2008; 12,(3): 224–37.
- [3] Guerci B, Kearney-Schwartz A, Böhme P, Zannad F et al.: Endothelial dysfunction and type 2 diabetes. Part 1: physiology and methods for exploring the endothelial function. *Diabetes Metab.* 2001; 27(4 Pt 1): 425-3.
- [4] Willeumts HJ, Staessen JA, Torp-Pedersen C, Rasmussen S et al.: Prognostic value of aortic pulse wave velocity as index of arterial stiffness in the general population. *Circulation.* 2006; 113(5): 664-70.
- [5] Henry RM, Kostense PJ, Spijkerman AM, Dekker JM et al.: Hoorn Study: Arterial stiffness increases with deteriorating glucose tolerance status: the Hoorn Study. *Circulation.* 2003; 107(16): 2089-95.
- [6] Libby P: Mechanisms of acute coronary syndromes. *N Engl J Med.* 2013; 369(9): 883-4.
- [7] Poręba R, Derkacz A, Andrzejak R, Poręba R i wsp.: Badania stężeń cytokin o działaniu prozapalnym i przeciwzapalnym oraz sICAM-1 u chorych na pierwotne nadciśnienie tętnicze. *Adv Clin Exp Med.* 2005; (14): 153–8.
- [8] Baszczuk A, Kopczyński Z, Deręgowska P: Ocena wybranych laboratoryjnych parametrów stanu zapalnego u chorych na pierwotne nadciśnienie tętnicze. *Nadciśnienie Tętnicze.* 2011; 15, (4): 251–57.
- [9] Boulanger CM: Secondary endothelial dysfunction: hypertension and heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 1999; 31(1): 39-49.
- [10] Libby P: History of Discovery: Inflammation in Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012; 32(9): 2045–51.
- [11] Guo Y, Lip GY, Apostolakis S: Inflammatory biomarkers and atrial fibrillation: potential role of inflammatory pathways in the pathogenesis of atrial fibrillation-induced thromboembolism. *J Am Coll Cardiol.* 2012; 22(60): 2263-70.
- [12] Zamani P, Schwartz GG, Olsson AG: Inflammatory biomarkers, death, and recurrent nonfatal coronary events after an acute coronary syndrome in the MIRACL study. *J Am Heart Assoc.* 2013; 2(1): e003103. DOI: 10.1161/JAHA.112.003103.



- [13]** Koenig W: High-sensitivity C-reactive protein and atherosclerotic disease: from improved risk prediction to risk-guided therapy: *Int J Cardiol.* 2013; 168(6): 5126-34.
- [14]** Gokce N, Keaney JF, Hunter LM, Watkins MT al.: Risk stratification for postoperative cardiovascular events via noninvasive assessment of endothelial function: a prospective study. *Circulation.* 2002; 105(13): 1567-72.
- [15]** Hong SN, Gona P, Fontes JD, Oyama N et al.: Atherosclerotic biomarkers and aortic atherosclerosis by cardiovascular magnetic resonance imaging in the Framingham Heart Study. *J Am Heart Assoc.* 2013; 2(6): e000307.
- [16]** Koenig W, Lowel H, Baumert J, Meisinger C: C-reactive protein modulates risk prediction based on the Framingham Score: implications for future risk assessment: results from a large cohort study in southern Germany. *Circulation.* 2004; 109(11): 1349-53.
- [17]** Prasad A, Halcox JP, Waclawiw MA, Quyyumi AA: Angiotensin type 1 receptor antagonism reverses abnormal coronary vasomotion in atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 2001; 38(4): 1089-95.
- [18]** Verma S, Arikawa E, Lee S, Dumont AS et al.: Exaggerated coronary reactivity to endothelin-1 in diabetes: reversal with bosentan. *Can J Physiol Pharmacol.* 2002; 80(10): 980-6.
- [19]** Hershkoviz R, Miron S, Cahalon L, Lider O: The beta 1-integrin (CD29) receptors: mediators of T lymphocyte-extra- cellular matrix recognition that affect adhesion, activation and lymphokine secretion. *Isr J Med Sci.* 1993; 29(5): 321-5.
- [20]** Hillyer P, Mordélet E, Flynn G, Male D: Chemokines, chemokine receptors and adhesion molecules on different human endothelia: discriminating the tissue-specific functions that affect leucocyte migration. *Clin Exp Immunol.* 2003; 134(3): 431-41.
- [21]** Noutsias M, Seeberg B, Schultheiss HP, Köhl U: Cell adhesion molecules in dilated cardiomyopathy evidence for endothelial activation in inflammatory cardiomyopathy. *Circulation.* 1999; 99(16): 2124-31.
- [22]** Hansson GK: Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis.* 1986; 6(2): 131-8.
- [23]** Hansson GK, Jonasson L, Seifert PS, Stemme S: Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arteriosclerosis.* 1989; 9(5): 567-78.
- [24]** Rose R: Atherosclerosis an infalmmatory disease. *N Engl Med.* 1999; 340(2): 115-26.

- [25]** Pesceri V, Willerson JT, Yeh ET: Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation*. 2000; (18): 2165-8.
- [26]** Kaptoge S, Di Angelantonio E, Pennells L, Wood AM et al.: C-reactive protein, fibrinogen, and cardiovascular disease prediction. *N Engl J Med*. 2012; 367(14): 1310-20.
- [27]** Żerdziński M, Rychlik M, Partyka R: Rola selektyn w rozwoju odpowiedzi zapalnej. *J Diagn Lab*. 2012; 48 (3): 347-51.
- [28]** Penberthy TW, Jiang Y, Graves DT: Leukocyte adhesion molecules. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1997; 8(4): 380–88.
- [29]** Jude EB, Douglas JT, Andeson SG, Young MJ et al.: Circulating cellular adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, P and E- selctin in prediction of cardiovascular disease in diabetes mellitus. *Eur J Intern Med*. 2002; 13(3): 185-89.
- [30]** Ghaisas NK, Shahi CN, Foley B, Goggins M et al.: Elevated levels of circulating adhesion molecules in peripheral blood of patients with unstable angina. *Am J Kardiol*. 1997; 80(5): 617-9.
- [31]** Zulli A, Hare DL, Buxton BF, Widdop RE: Vasoactive role for angiotensin II type 2 receptors in human radial artery. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2014; 27(1): 79-85.
- [32]** Siminiak T, Smielecki J, Dye JF, Balinski M et al.: Increased release of the soluble adhesion molecules L-selectin and ICAM-1 but not E-selectin during attacks of angina pectoris. *Heart Vessels*. 1998; 13(4): 189-94.
- [33]** Mulvihill NT, Foley JB, Walsh MA, Crean PA: Relationship between intracoronary and peripheral expression of soluble cell adhesion molecules. *Int J Cardiol*. 2001; 77(2-3): 223-9.
- [34]** Pellagatta F, Pizetti G, Lu Y, Radaelli A et al.: Soluble E-selctin and intracellular adhesion molecule plasma levels increase during acute myocardial infarction. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1997; 30(4): 455-60.
- [35]** Murohara T, Kamijikkoku S, Honda T: Increased circulating soluble intercellular adhesion molecule-1 in acute myocardial infarction: a possible predictor of reperfusion ventricular arrhythmias. *Crit Care Med*. 2000; 28(6): 1861-4.
- [36]** Mizia-Stec K, Zahorska-Mazurkiewicz B, Mandecki T, Jankowska J et al.: Serum levels of selected adhesion molecules in patients with coronary artery disease. *Int J Kardiol*. 2002; 83(2): 143-50.
- [37]** Miles EA, Thies F, Wallance FA, Powell JR et al.: Influence of age and dietary fish oil on plasma soluble adhesion molecule concentrations. *Clin Sci (Lond)*. 2001; 100(1): 91-100.

- [38] Lasek W, Gołąb J, Jakóbiński M, Stokłosa T: Immunologia. Warszawa. PWN. 2012.
- [39] Nakagomi A, Seino Y, Noma S, Kohashi K et al.: Relationships between the Serum Cholesterol Levels, Production of Monocyte Proinflammatory Cytokines and Long-term Prognosis in Patients with Chronic Heart Failure. Intern Med. 2014; 53(21): 2415-24.
- [40] Zhang H, Park Y, Wu J, Chen Xp, Lee S et al.: Role of TNF-alpha in vascular dysfunction. Clin Sci (Lond). 2009; 116(3): 219-30.
- [41] Yoshizumi M, Perrella MA, Burnett JC, Lee ME: Tumor necrosis factor downregulates an endothelial nitric oxide synthase mRNA by shortening its half-life. Circ Res. 1993; 73(1): 205-9.
- [42] Murdaca G, Spanò F, Cagnati P, Puppo F: Free radicals and endothelial dysfunction: potential positive effects of TNF- $\alpha$  inhibitors. Redox Rep. 2013; 18(3): 95-9.
- [43] Lories RJ, de Vlam K: Tumour necrosis factor inhibitors in the treatment of psoriatic arthritis: a view on effectiveness, clinical practice and toxicity. Expert Opin Biol Ther. 2014; 14(12): 1825-36.
- [44] Van Sijl AM, Van Eijk IC, Peters MJ, Serné EH et al.: Tumour necrosis factor blocking agents and progression of subclinical atherosclerosis in patients with ankylosing spondylitis. Ann Rheum Dis. 2015; 74(1): 119-23.
- [45] Tam LS, Kitis GD, González-Gay MA: Can suppression of inflammation by anti-TNF prevent progression of subclinical atherosclerosis in inflammatory arthritis? Rheumatology (Oxford). 2014; 53(6): 1108-19.
- [46] Choi SW, Reddy P: Current and emerging strategies for the prevention of graft-versus-host disease. Nat Rev Clin Oncol. 2014; 11(9): 536-47.
- [47] Zozulińska-Ziółkiewicz D: Przydatność kliniczna oceny funkcji śródbłonna. Kardiologia Polska. 2007; 65: 10; 1207.
- [48] Sibal L, Aldibbiat A, Agarwal SC: Circulating endothelial progenitor cells, endothelial function, carotid intima-media thickness and circulating markers of endothelial dysfunction in people with type 1 diabetes without macrovascular disease or microalbuminuria. Diabetologia. 2009; 52(8): 1464-73.
- [49] Karasu C, Soncul H, Altan VM: Effects of non-insulin dependent diabetes mellitus on the reactivity of human internal mammary artery and human saphenous vein. Life Sci. 1995; 57(2): 103-12.

- [50]** Neubauer-Geryk J, Bieniaszewski L: Metody oceny funkcji śródbłonna. Wazodylatacja tętnicy ramiennej po niedokrwieniu. *Choroby Serca i Naczyń*. 2007; 4(4): 190–96.
- [51]** Aimbire F, Albertini R, Pacheco MT: Low-level laser therapy induces dose-dependent reduction of TNF-alpha levels in acute inflammation. *Photomed Laser Surg*. 2006; 24(1): 33-7.
- [52]** Cruickshank K, Riste L, Anderson SG, Wright JS et al.: Aortic Pulse-Wave Velocity and Its Relationship to Mortality in Diabetes and Glucose Intolerance. An Integrated Index of Vascular Function? *Circulation*. 2002; 106(16): 2085-90.
- [53]** Kitamura K, Takeuchi R, Ogai K, Xin Z et al.: Development of a novel pulse wave velocity measurement system: using dual piezoelectric elements. *Med Eng Phys*. 2014; 36(7): 927-32.
- [54]** McLaughlin J, McNeill M, Braun B, McCormack PD: Piezoelectric sensor determination of arterial pulse wave velocity. *Physiol Meas*. 2003; 24(3): 693-702.
- [55]** Laurent S, Cockcroft J, Van Bortel L, Boutouyrie P et al.: Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications. *Eur Heart J*. 2006; 27(21): 2588-605.
- [56]** Hashimoto M, Eto M, Akishita M, Kozaki K et al.: Correlation between flow-mediated vasodilatation of the brachial artery and intima-media thickness in the carotid artery in men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999; 19(11): 2795-800.
- [57]** Ciccone MM, Scicchitano P, Zito A, Cortese F et al.: Correlation between Inflammatory Markers of Atherosclerosis and Carotid Intima-Media Thickness in Obstructive Sleep Apnea. *Molecules*. 2014; 19(2): 1651-62.
- [58]** Sherer DM: Prenatal ultrasonographic assessment of the middle cerebral artery: a review. *Obstet Gynecol Surv*. 1997; 52(7): 444-55.
- [59]** Vyas S, Nicolaidis KH, Bower S, Campbell S: Middle cerebral artery flow velocity waveforms in fetal hypoxaemia. *Br J Obstet Gynaecol*. 1990; 97(9): 797-803.
- [60]** Salihagić-Kadić A, Medić M, Jugović D: Fetal cerebrovascular response to chronic hypoxia--implications for the prevention of brain damage. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2006; 19(7): 387-96.
- [61]** Plass CA, Loew HG, Podesser BK, Prusa AM: Light-induced vasodilation of coronary arteries and its possible clinical implication. *Ann Thorac Surg*. 2012; 93(4): 1181-6.
- [62]** Bartkowiak R: Badania dopplerowskie naczyń płodowych w diagnostyce niedotlenienia okołoporodowego. *Nowa Medycyna* 1999; 6: 14-16.

- [63]** Chudek J: Diagnostyka ultrasonograficzna nadciśnienia naczyniowo-nerkowego. *Choroby Serca i Naczyń*. 2008, 5(1): 31–36.
- [64]** Krumme B. Renal Doppler sonography — update in clinical nephrology. *Nephron Clin Pract*. 2006; 103(2): c24–c28.
- [65]** Ohta Y, Fujii K, Arima H, Matsumura K et al.: Increased renal resistive index in atherosclerosis and diabetic nephropathy assessed by Doppler sonography. *J Hypertens*. 2005; 23(10): 1905–11.
- [66]** Husberg M, Land D Barenbrock M, Kosch M: What do Doppler indices of renal perfusion tell us for the evaluation of renal disease? *J Hypertens*. 2005; 23(10): 1795-7.
- [67]** Bude RO, Rubin JM: Relationship between the resistive index and vascular compliance and resistance. *Radiology*. 1999; 211(2): 411-7.
- [68]** Mostbeck GH, Kain R, Mallek R, Derfler K et al.: Duplex Doppler sonography in renal parenchymal disease. Histopathologic correlation. *J Ultrasound Med*. 1991; 10(4): 189-94.
- [69]** Lindegaard K-F. Indices of pulsatility. In: Newell DW, Aaslid R, eds. *Transcranial Doppler*. New York, NY: Raven Press Publisher. 1992: 67–82.
- [70]** Pindzola RR, Yonas H: The xenon-enhanced computed tomography cerebral blood flow method. *Neurosurg*. 1998; 43(6): 1488-92.
- [71]** Kochel B, Łukowiak E : Biostymulacyjna terapia laserowa, RES Inco-Laser, Wrocław 1994.
- [72]** Kwolek A, Zwolińska J, Weres A: The influence of the therapeutic dose on the efficacy of the low and High Intensity Laser Therapy (HILT). *Acta Bio-Optica et Informatica Medica*. 2011; 3(17): 171-8.
- [73]** Brill' GE, Budnik IA, Gasparian LV, Shenkman B et al.: Influence of laser radiation of the whole blood in vitro on adhesion and aggregation of blood platelet. *Vopr Kurortol Fizioter Lech Fiz Kult*. 2008; (1): 15-8.
- [74]** Gao X, Xing D: Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low power laser irradiation. *J Biomed Sci*. 2009; 16:4. DOI: 10.1186/1423-0127-16-4.
- [75]** Van Coevorden RS: Zastosowanie niskoenergetycznego promieniowania laserowego w opiece paliatywnej. *Medycyna Paliatywna w Praktyce* 2010; 4(1): 18–22.
- [76]** Baratto L, Calza L, Capra R, Gallamini M et al.: Ultralow level laser therapy. *Lasers Med Sci*. 2011; 26(1): 103-12.
- [77]** Agaiby AD, Ghali LR, Wilson R, Dyson M: Laser modulation of angiogenic factor production by T-lymphocytes. *Lasers Surg Med*. 2000; 26(4): 357-63.

- [78]** Oron U, Yaakobi T, Oron A, Mordechovitz D et al.: Low-Energy Laser Irradiation Reduces Formation of Scar Tissue After Myocardial Infarction in Rats and Dogs. *Circulation*. 2001; 103(2): 296-301.
- [79]** Dartsch PC, Ischinger T, Betz E: Responses of cultured smooth muscle cells from human nonatherosclerotic arteries and primary stenosing lesions after photoradiation: implications for photodynamic therapy of vascular stenoses. *J Am Coll Cardiol*. 1990; 15(7): 1545-50.
- [80]** Spears JR, Serur J, Shropshire D, Paulin S: Fluorescence of experimental atheromatous plaques with hematoporphyrinderivative. *J Clin Invest*. 1983; 71(2): 395-9.
- [81]** Kazmierczak E, Grajek S, Kowal J, Chmara E et al.: Prognostic usefulness of IL-6 and VEGF for the occurrence of changes in coronary arteries of patients with stable angina and implanted stents. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2014; 18(15): 2169-75.
- [82]** Libby P: Restenosis : Involvement of growth factors and cytokines In: *Textbook of interventional cardiology*. Ed: Topol E. W. B. Saunders Company , Philadelphia, 1994 ed, 207-224.
- [83]** Torres-Silva R, Lopes-Martins RA, Bjordal JM, Frigo L et al.: The low level laser therapy (LLLT) operating in 660 nm reduce gene expression of inflammatory mediators in the experimental model of collagenase-induced rat tendinitis. *Lasers Med Sci*. 2014. DOI: 10.1007/s10103-014-1676-3.
- [84]** Whittaker P, Rakusan K, Kloner RA: Transmural channels can protect ischemic tissue. Assessment of long-term myocardial response to laser- and needle-made channels. *Circulation*. 1996; 93(1): 143-52.
- [85]** Oron A, Oron U, Chen J, Eilam A et al.: Low-level laser therapy applied transcranially to rats after induction of stroke significantly reduces long-term neurological deficits. *Stroke*. 2006; 37(10): 2620-4.
- [86]** Hentschke VS, Jaenisch RB, Schmeing LA, Cavinato PR al.: Low-level laser therapy improves the inflammatory profile of rats with heart failure. *Lasers Med Sci*. 2013; 28(3): 1007-16.
- [87]** Das TS: Excimer laser-assisted angioplasty for infrainguinal artery disease. *J Endovasc Ther*. 2009; 16(2 Suppl 2): 98-104.
- [88]** Derkacz A, Protasiewicz M, Rola P, Podgorska K et al.: Effects of intravascular low-level laser therapy during coronary intervention on selected growth factors levels. *Photomed Laser Surg*. 2014; 32(10): 582-7.

- [89]** Le Breton H, Plow EF, Topol EJ: Role of platelets in restenosis after percutaneous coronary revascularization. *J Am Coll Cardiol.* 1996; 28(7): 1643-51.
- [90]** Brill AG, Shenkman B, Brill GE: Blood irradiation by He-Ne laser induces a decrease in platelet responses to physiological agonists and an increase in platelet cyclic GMP. *Platelets.* 2000; 11(2): 87-93.
- [91]** Derkacz A, Protasiewicz M, Kipshidze N, Biały D et al.: Endoluminal phototherapy for prevention of restenosis: preliminary results at 6-month follow-up. *Photomed Laser Surg.* 2005; 23(6): 536-42.
- [92]** Cressoni MD, Dib Giusti HH, Casarotto RA, Anaruma CA: The effects of a 785-nm AlGaInP laser on the regeneration of rat anterior tibialis muscle after surgically-induced injury. *Photomed Laser Surg.* 2008; 26(5): 461-6.
- [93]** Karu T, Afanasyeva N, Kolyakov S: Changes in absorbance of monolayer of living cells induced by dye laser radiation at 633, 670 and 820 nm. *IEEE J Sel. Top. Quantum Electron* 2001,7, 982-8.
- [94]** Fiodor P, Kęćik T, Niechoda Z, Nowakowski W i wsp. *Zarys klinicznych zastosowań laserów.* Dom Wydawniczy Anka. Warszawa 1995.
- [95]** Beniwal S, Bhargava K, Kausik SK: Size of distal radial and distal ulnar arteries in adults of southern Rajasthan and their implications for percutaneous coronary interventions. *Indian Heart J.* 2014; 66(5): 506-9.
- [96]** Dos Reis FA, da Silva BA, Laraia EM, de Melo RM et al.: Effects of pre- or post-exercise low-level laser therapy (830 nm) on skeletal muscle fatigue and biochemical markers of recovery in humans: double-blind placebo-controlled trial. *Photomed Laser Surg.* 2014; 32(2): 106-12.
- [97]** de Almeida P, Lopes-Martins RÁ, Tomazoni SS, Albuquerque-Pontes GM et al.: Low-level laser therapy and sodium diclofenac in acute inflammatory response induced by skeletal muscle trauma: effects on muscle morphology and mRNA gene expression of inflammatory markers. *Photochem Photobiol.* 2013; 89(2): 501-7.
- [98]** Ahn KB, Kang SS, Park OJ, Kim T: Irradiation by gallium-aluminum-arsenate diode laser enhances the induction of nitric oxide by *Porphyromonas gingivalis* in RAW 264.7 cells. *J Periodontol.* 2014; 85(9): 1259-65.

- [99] Oliveira MC, Greiffo FR, Rigonato-Oliveira NC, Custódio RW et al.: Low level laser therapy reduces acute lung inflammation in a model of pulmonary and extrapulmonary LPS-induced ARDS. *J Photochem Photobiol B*. 2014; 134: 57-63.
- [100] Yamato M, Kaneda A, Kataoka Y: Low-level laser therapy improves crescentic glomerulonephritis in rats. *Lasers Med Sci*. 2013; 28(4): 1189-96.
- [101] Deckelbaum LI, Scott JJ, Stetz ML, O'Brien KM et al.: Photoinhibition of smooth muscle cell migration: potential therapy for restenosis. *Lasers Surg Med*. 1993; 13(1): 4-11.
- [102] Kipshidze N, Sahota H, Komorowski R, Nikolaychik V et al.: Photoremodeling of arterial wall reduces restenosis after balloon angioplasty in an atherosclerotic rabbit model. *J Am Coll Cardiol*. 1998; 31(5): 1152-7.
- [103] <http://www.abdserotec.com/an-introduction-to-elisa.html>
- [104] De Melo Rambo CS, Silva JA Jr, Serra AJ, Ligeiro AP et al.: Comparative analysis of low-level laser therapy (660 nm) on inflammatory biomarker expression during the skin wound-repair process in young and aged rats. *Lasers Med Sci*. 2014; 29(5): 1723-33.
- [105] Wolska A, Głogowski P: Promieniowanie Laserowe. *Podstawy i Metody Oceny Środowiska Pracy* 2001; 1(63): 5-78
- [106] Woltmann G, McNulty CA, Dewson G, Symon FA et al.: Interleukin-13 induces PSGL-1/P-selectin-dependent adhesion of eosinophils, but not neutrophils, to human umbilical vein endothelial cells under flow. *Blood*. 2000; 95(10): 3146-52.
- [107] Pallotta RC, Bjordal LM, Frigo L, Leal Junior EC et al.: (810-nm) Low-level laser therapy on rat experimental knee inflammation. *Lasers Med Sci*. 2012; 27(1): 71-8.
- [108] Imaoka A, Zhang L, Kuboyama N, Abiko Y: Reduction of IL-20 Expression in Rheumatoid Arthritis by Linear Polarized Infrared Light Irradiation. *Laser Ther*. 2014; 23(2): 109-14.
- [109] Mantineo M, Pinheiro JP, Morgado AM: Low-level laser therapy on skeletal muscle inflammation: evaluation of irradiation parameters. *J Biomed Opt*. 2014; 19(9): 98002. DOI: 10.1117/1.JBO.19.9.098002.
- [110] Oliveira RG, Ferreira AP, Côrtes AJ, Aarestrup BJ et al.: Low-level laser reduces the production of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , and IL-10 induced by OVA. *Lasers Med Sci*. 2013; 28(6): 1519-25.
- [111] Hoving S, Heeneman S, Gijbels MJ, Te Poele JA et al.: Irradiation induces different inflammatory and thrombotic responses in carotid arteries of wildtype C57BL/6J and atherosclerosis-prone ApoE(-/-) mice. *Radiother Oncol*. 2012; 105(3): 365-70.



- [112]** Dos Santos SA, Alves AC, Leal-Junior EC, Albertini R et al.: Comparative analysis of two low-level laser doses on the expression of inflammatory mediators and on neutrophils and macrophages in acute joint inflammation. *Lasers Med Sci.* 2014; 29(3): 1051-8.
- [113]** Asai T, Suzuki H, Kitayama M, Matsumoto K et al.: The long-term effects of red light-emitting diode irradiation on the proliferation and differentiation of osteoblast-like MC3T3-E1 cells. *Kobe J Med Sci.* 2014; 60(1): E12-8.
- [114]** Höfling DB, Chavantes MC, Juliano AG, Cerri GG et al.: Assessment of the effects of low-level laser therapy on the thyroid vascularization of patients with autoimmune hypothyroidism by color Doppler ultrasound. *ISRN Endocrinol.* DOI: 10.5402/2012/126720.
- [115]** Lippera S, Gregorio F, Ceravolo MG, Lagalla G et al.: Diabetic retinopathy and cerebral hemodynamic impairment in type II diabetes. *Eur J Ophthalmol.* 1997; 7(2): 156-62.
- [116]** Gupta A, Keshri GK, Yadav A, Gola S et al.: Superpulsed (Ga-As, 904 nm) low-level laser therapy (LLLT) attenuates inflammatory response and enhances healing of burn wounds. *J Biophotonics.* 2014; 9999(9999). DOI: 10.1002/jbio.201400058.
- [117]** Plass CA, Wieselthaler GM, Podesser BK: Low-level-laser irradiation induces photorelaxation in coronary arteries and overcomes vasospasm of internal thoracic arteries. *Lasers Surg Med.* 2012; 44(9): 705-11.
- [118]** Fukuda TY , Tanji MM, Silva SR, Sato MN et al.: Infrared low-level diode laser on inflammatory process modulation in mice: pro- and anti-inflammatory cytokines. *Lasers Med Sci.* 2013; 28(5): 1305-13.
- [119]** Derkacz A, Poręba R, Doroszko A, Andrzejak R: Effect of the intravascular low energy laser illumination during percutaneous coronary intervention on the inflammatory process in vascular wall. *Lasers Med Sci.* 2013; 28(3): 763-8.
- [120]** Martin PJ, Evans DH, Naylor AR: Transcranial color-coded sonography of the basal cerebral circulation. Reference data from 115 volunteers. *Stroke.* 1994; 25(2): 390-6.
- [121]** Krejza J, Mariak Z, Walecki J: Transcranial color Doppler sonography of basal cerebral arteries in 182 healthy subjects: age and sex variability and normal reference values for blood flow parameters. *Am J Roentgenol.* 1999; 172(1): 213-8.
- [122]** Bouma MG, Buurman WA, van den Wildenberg FA: Low energy laser irradiation fails to modulate the inflammatory function of human monocytes and endothelial cells. *Lasers Surg Med.* 1996; 19(2): 207-15.

- [123]** Beres –Pawlik E, Derkacz A: Intravascular low-power laser illumination through special fiber diffusers. *Bulletin of The Polish Academy of Sciences Technical Sciences*. 2011; 59, (4): 441-43.
- [124]** De Scheerder IK, Wang K, Zhou XR, Verbeken E et al.: Intravascular Low Power Red Laser Light as an Adjunct to Coronary Stent Implantation Evaluated in a Porcine Coronary Model. *J Invasive Cardiol*. 1998; 10(5): 263-8.
- [125]** Guo H, Luo Q, Zhang J, Lin H, Xia L et al.: Comparing different physical factors on serum TNF- $\alpha$  levels, chondrocyte apoptosis, caspase-3 and caspase-8 expression in osteoarthritis of the knee in rabbits. *Joint Bone Spine*. 2011; 78(6): 604-10.
- [126]** Takano R, Ando Y, Taniguchi N, Itoh K et al.: Power Doppler sonography of the kidney: effect of Valsalva's maneuver. *J Clin Ultrasound*. 2001; 29(7): 384-8.
- [127]** Silva GB, Sacono NT, Othon-Leite AF, Mendonça EF et al.: Effect of low-level laser therapy on inflammatory mediator release during chemotherapy-induced oral mucositis: a randomized preliminary study. *Lasers Med Sci*. 2014 DOI: 10.1007/s10103-014-1624-2.
- [128]** Lima AA, Spínola LG, Baccan G, Correia K et al.: Evaluation of corticosterone and IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 and TNF- $\alpha$  expression after 670-nm laser photobiomodulation in rats. *Lasers Med Sci*. 2014; 29(2): 709-15.
- [129]** Leal-Junior EC, de Almeida P, Tomazoni SS, de Carvalho P et al.: Superpulsed low-level laser therapy protects skeletal muscle of mdx mice against damage, inflammation and morphological changes delaying dystrophy progression. *PLoS One*. 2014; 9(3): e89453. DOI: 10.1371/journal.pone.0089453.
- [130]** Chowienczyk PJ, Kelly RP, Mac Callum H, Millasseau SC et al.: Photoplethysmographic assessment of pulse wave reflection: blunted response to endothelium dependent beta2-adrenergic vasodilation in type II diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol*. 1999; 34(7): 2007-14.
- [131]** Westerbacka J, Vehkavaara S, Bergholm R, Wilkinson I et al.: Marked resistance of the ability of insulin to decrease arterial stiffness characterizes human obesity. *Diabetes*. 1999; 48(4): 821-7.
- [132]** Kitamura K, Takeuchi R, Ogai K: Development of a novel pulse wave velocity measurement system: using dual piezoelectric elements. *Med Eng Phys*. 2014; 36(7): 927-32.