

Lek. Piotr Rola

„Wpływ niskoenergetycznego promieniowania  
laserowego na funkcje agregacyjną płytek krwi w  
warunkach *in vitro*”

Niniejsze opracowanie jest rozprawą na stopień doktora nauk medycznych

Promotor: dr hab. n. med. Arkadiusz Derkacz

Promotor pomocniczy: dr n. med. Adrian Doroszko

Poznań 2015

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

### Dedykuję Rodzicom

Pragnę złożyć szczególne wyrazy wdzięczności i podziękowania dr hab. n. med. Arkadiuszowi Derkaczowi, dr n. med. Adrianowi Doroszko oraz mgr. Ewie Szahidewicz-Krupskiej za nieocenione wsparcie, poświęcony czas oraz inspirację do prowadzenia badań naukowych.

## SPIS TREŚCI

Wykaz stosowanych skrótów.....	5
1. Wstęp.....	8
1.1 Laser-wiadomości ogólne.....	8
1.2 Niskoenergetyczne promieniowanie laserowe.....	10
1.3. Wpływ promieniowania laserowego na procesy zachodzące w komórce.....	11
1.4. Niskoenergetyczne promieniowania laserowe jako metoda lecznicza.....	15
1.5. Płytki krwi.....	18
1.6. Tlenek azotu.....	24
1.7. Wpływ LLLT na funkcje płytek krwi.....	27
2. Założenia i cel pracy.....	31
3. Materiał i metody.....	32
3.1. Grupa badania.....	32
3.2. Procedura badana.....	33
3.3 Procedura poboru krwi .....	34
3.4. Źródło promieniowania laserowego .....	35
3.5. Zmiana temperatury w układzie badawczym.....	40
3.6. Procedura naświetlania .....	41
3.7. Badania agregometryczne.....	42
3.8. Oznaczanie parametrów aktywności płytek oraz osi syntezy NO.....	42
3.9 Analiza Statystyczna.....	44
4. Wyniki.....	45
4.1. Wyniki badań agregometrycznych.....	45
4.2. L-arginina, ADMA, SDMA.....	49
4.3. Osoczowe markery aktywności płytek krwi .....	50
4.4. Heterogenność odpowiedzi na promieniowanie .....	52
4.5. Analiza kontrastywna różnic w podgrupach.....	62
4.6. Ocena modulującej roli LLLT na mechanizm agregacji .....	64
5. Dyskusja.....	67
5.1. Model badawczy .....	67

5.2. Grupa badana .....	68
5.3. Parametry promieniowania i układ eksperymentalny.....	68
5.4. Efekt termiczny .....	70
5.5. Badania agregacyjne .....	71
5.6. Potencjalne mechanizmy oddziaływania LLLT .....	73
5.7. Ograniczenia pracy.....	75
6. Wnioski.....	76
7. Streszczenie.....	77
8. Summary (streszczenie w języku angielskim) .....	80
9. Piśmiennictwo.....	82
10. Załącznik 1- Zgoda Komisji Bioetycznej.....	101

## WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

$\Delta\Psi_m$	Błonowy potencjał mitochondrialny (ang. mitochondrial membrane potential)
ADMA	Asymetryczna dimetyloarginina (ang. asymmetric dimethylarginine)
ADP	Adenozyno-5'-difosforan
ATP	Adenozyno -5-trifosforan
AU	Jednostka agregacji (ang. aggregation unit)
bFGF	Zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (ang. basic fibroblast growth factor)
BMI	Wskaźnik masy ciała (ang. body mass index)
CAM	Molekuła adhezji komórkowej (ang. cell adhesion molecule)
CEM	Moduł elastyczności skrzepu (ang. clot elastic modulus)
cGMP	3',5'-cykliczny guanozynomonofosforan
COX-2	Cyklooksygenaza 2
DDAH	Dimetyloaminohydrolaza dimetyloarginylowa (ang. dimethylarginine dimethylaminohydrolase)
DIC	Zespół wewnątrznaczyniowego wykrzepiania (ang. disseminated intravascular coagulation)
DNA	Kwas deoksyrybonukleinowy (ang. deoxyribonucleic acid)
eNOS	Śródbłonkowa syntaza tlenku azotu (ang. endothelial nitricoxide synthase)
GSK3 $\beta$	Kinaza syntazy glikogenu 3 $\beta$ (ang. glycogen synthase kinase 3 beta)
HIF-1 $\alpha$	Indukowalny czynnik niedokrwienny 1 $\alpha$ (ang. Hypoxia-inducible factor 1-alpha)
HIT	Małopłytkowość indukowana heparyną (ang. heparin-induced trombocytopenia)
HSP70i	Białko szoku cieplnego 70i (ang. Heat shock protein 70 i)
IGFBP3	Białko wiążące insulinopodobny czynnik wzrostu I (ang. insulin-like growth factor-binding protein 3)
IGF-I	Insulinopodobny czynnik wzrostu I (ang. Insulin-like growth factor 1)
IL-1	Interleukina 1
IL-10	Interleukina 10
IL-6	Interleukina 6

iNOS	Indukowalna syntaza tlenku azotu (ang. inducible nitro oxide synthase)
L-Arg	L-arginina
LLLT	Terapia niskoenergetycznym promieniowaniem laserowym (ang. low-level laser therapy)
LMMA	Monometylo-L-arginina
LPR-1	Receptor lipoprotein o niskiej gęstości (ang. lipoprotein related receptor 1) -
miRNA	Mikro kwas rybonukleinowy (ang. micro Ribonucleic acid)
MMP-2	Metaloproteinaza macierzy 2 (ang. matrix metalloproteinase-2)
MPV	Średnia objętość płytek krwi (ang. mean platelet volume)
nNOS	Neuronalna syntaza tlenku azotu (ang. neuronal nitro oxide synthase)
NO	Tlenek azotu (ang. nitro oxide)
NOS1	Neuronalna syntaza tlenku azotu (ang. neuronal nitro oxide synthase)
NOS2	Indukowalna syntaza tlenku azotu (ang. inducible nitro oxide synthase)
NOS3	Śródbłonkowa syntaza tlenku azotu (ang. endothelial nitro oxide synthase)
PCF	Czynnik retrakcji płytek krwi (ang. platelet contraction factor)
PDGF	Płytkowo-pochodnego czynnika wzrostu (ang. platelet-derived growth factor)
PF4	Czynnik płytkowy 4 (ang. platelet factor 4)
PGE2	Prostaglandyna E2
PKA	Proteinowa Kinaza A (ang. protein kinase A)
PKG	Proteinowa kinaza G (ang. protein kinase G).
PRMT	Proteinowa metylotransferaza argininy (ang. protein arginine methyltransferases)
PRP	Osocze bogatopłytkowe (ang. platelet-rich plasma)
QCB	Waga kwarcowa (ang. quartz crystal balance)
QCM	Mikrowaga kwarcowa (ang. quartz crystal microbalance)
SDMA	Symetryczna dimetyloarginina (ang. symmetric dimethylarginine)
sGC	Rozpuszczalna cyklaza guanylowa (ang. soluble guanylyl cyclase)
sP-selektyna	Rozpuszczalna P selektyna (ang. soluble P-selectin )
TAFI	Aktywowany trombiną inhibitor fibrylizy (ang. thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor)

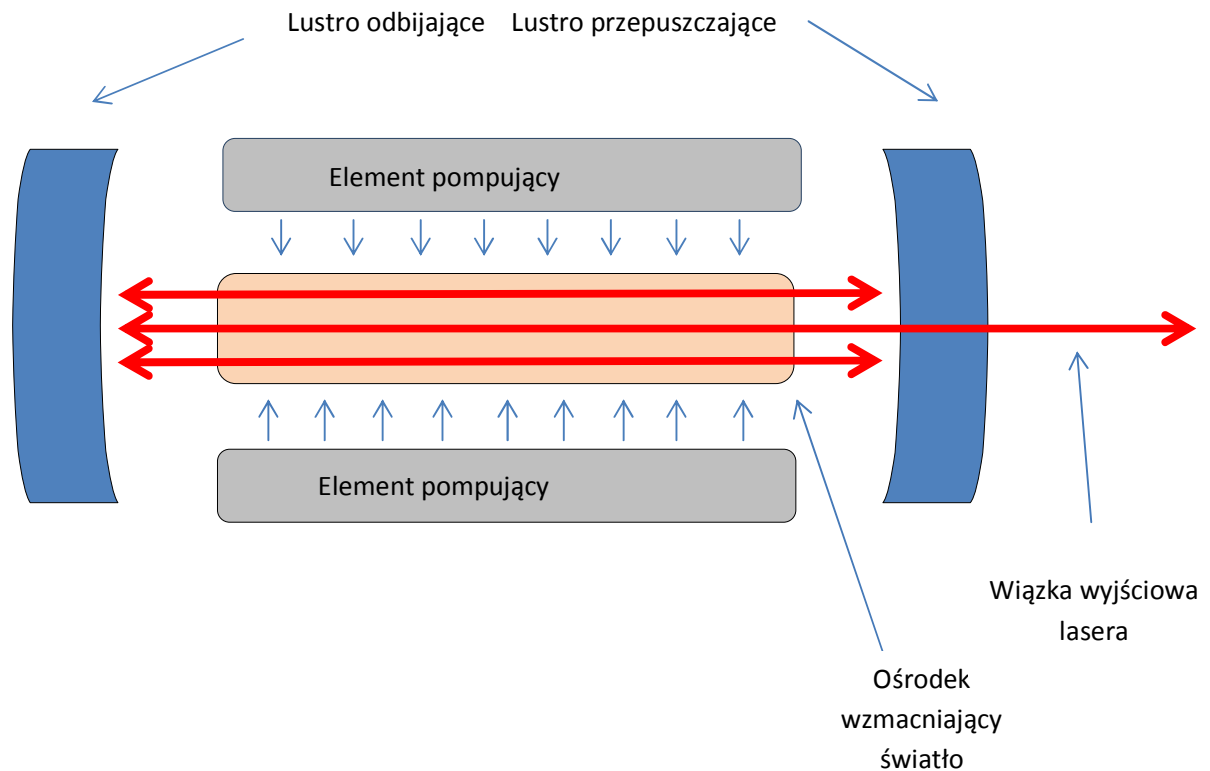
TEG	Trombelastografia (ang. thromboelastography)
TNF $\alpha$	Czynnik martwicy nowotworów $\alpha$ (ang. tumor necrosis factor alpha)
TPKR	Receptor kinazy tyrozynowej (ang. tyrosine protein kinase receptors)
TRAP	Peptydowy agonista receptorów trombinowych (ang. thrombin receptor activating peptide)
TR-LIFS	Czasowo-rozdzielcza spektroskopia fluorescencyjna (ang. time-resolved laser induced fluorescence spectroscopy)
VEGF	Czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego (ang. vascular endothelial growth factor)

## 1. Wstęp

### 1.1. Laser-wiadomości ogólne

Po raz pierwszy urządzenie laserowe zostało skonstruowane w 1960 r. przez Theodora Maimana w Malibu w USA <sup>1</sup>. Laser wytwarza promieniowanie elektromagnetyczne powstające dzięki zjawisku tzw. emisji wymuszonej. Jeżeli na atom będący w stanie wzbudzenia padnie kwant promieniowania, nastąpi samoistne przejście atomu do stanu podstawowego z jednoczasową spontaniczną emisją kwantu promieniowania, a zatem w procesie tym dochodzi do wypromieniania fotonów wskutek oddziaływania z kwantem światła inicjującym cały proces. Cechą charakterystyczną tego zjawiska jest fakt, iż foton inicjujący proces nie jest pochłaniany, a otrzymany kwant promieniowania jest identyczny z kwantem inicjującym proces - to znaczy, że ma taką samą częstotliwość, fazę, kierunek i zwrot prędkości. Dzięki takim właściwościom możliwe jest wzmocnienie określonych wiązek promieniowania. Aby zjawisko to było możliwe konieczna jest tak zwana „inwersja obsadzeń” energetycznych atomu. Oznacza to, iż wbrew naturalnemu porządkowi, dzięki energii dostarczonej z zewnątrz w danym ośrodku znajduje się więcej atomów w stanie wzbudzenia niż w stanie podstawowym. W urządzeniu laserowym dodatkowo znajduje się tak zwany rezonator optyczny. Tworzą go dwa ustawione do siebie równolegle zwierciadła, dzięki którym światło laserowe może wielokrotnie przechodzić przez ośrodek aktywny urządzenia. Należy zaznaczyć, iż zazwyczaj jedno ze zwierciadeł jest całkowicie odbijające, drugie natomiast częściowo transmisyjne, co umożliwia wyprowadzenie promieniowania laserowego poza urządzenie. Dzięki temu, poprzez sprzężenie zwrotne dodatnie, następuje wzmocnianie fal elektromagnetycznych tylko o wybranej długości i kierunku, co umożliwia powstanie akcji laserowej. Schemat lasera widoczny jest na rycinie 1. Sama nazwa laser wzięła się od wspomnianego wcześniej zjawiska emisji wymuszonej i jest akronimem angielskich słów *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*. Nieomal od początku swojego istnienia urządzenie to znalazło zastosowanie w medycynie.





Rycina 1. Schemat urządzenia laserowego.

Istnieje wiele sposobów klasyfikacji laserów, między innymi ze względu na widmo emitowanego promieniowania, ośrodek czynny (np. lasery: półprzewodnikowe, gazowe, na cieczy i na ciele stałym), charakter pracy (impulsowy bądź ciągły), czy zakres mocy emitowanych przez urządzenie. Ostatni spośród wymienionych sposobów podziału wydaje się być najodpowiedniejszy biorąc pod uwagę klasyfikację zastosowań medycznych promieniowania laserowego. W codziennej praktyce klinicznej stosuje się laser, który emituje promieniowanie z zakresu długości fal charakterystycznych dla światła widzialnego. Ze względu na wartości wypromieniowanej energii promieniowanie laserowe dzielimy na: nisko-, średnio- i wysokoenergetyczne. W praktyce klinicznej, jak i biomedycznych badaniach dawki: energii i mocy najczęściej podawane są zindeksowane na jednostkę powierzchni. I tak najczęściej wykorzystywaną w przypadku energii jednostką jest  $J/m^2$  (opcjonalnie w zależności od ilości przenoszonej energii  $J/cm^2$ ), która tak naprawdę jest miarą ekspozycji promieniowania zwanej też fluencją (z ang. Radiant Exposure albo Fluence). W przypadku mocy najczęściej stosowaną jednostką jest  $W/m^2$  lub  $mW/cm^2$ , która definiuje irradancję. Praktyka ta podyktowana jest kilkoma względami: obszary naświetlanych obiektów są bardzo różne i najprostszym sposobem

ujednolicenia ich jest określenie ich pola powierzchni. W części eksperymentów wykorzystuje się rozproszone światło laserowe, którego parametry mogą odbiegać od właściwości skupionej wiązki laser wobec powyższego indeksowanie względem pola powierzchni naświetlanych obiektów ułatwia porównywanie i interpretacje poszczególnych badań.

Dlatego też w niniejszej rozprawie, zgodnie z najczęściej wykorzystywaną w badaniach biomedycznych praktyką, energię promieniowania, która pochłaniał naświetlany obiekt określana będzie w jednostce  $J/cm^2$ , moc zaś w  $mW/cm^2$ . Jak już wcześniej zostało wspomniane rozróżniamy promieniowanie: niskoenergetyczne które zgodnie z przyjętą nomenklaturą mieści się z zakresem energii do kilkudziesięciu  $J/cm^2$ , średnioenergetyczne o energii w zakresie od kilkudziesięciu do kilkuset  $J/cm^2$  oraz promieniowania wysokoenergetyczne z wielkościami rzędu kilkuset  $J/cm^2$  i więcej.

### *1.2. Niskoenergetyczne promieniowanie laserowe*

Do różnych celów medycznych wykorzystywane jest pełne spektrum energii laserowej<sup>2</sup>. Szczególnie interesujący i stosunkowo mało poznany wydaje się być wpływ niskoenergetycznego promieniowania na organizm ludzki. Do klinicznej praktyki jako metodę leczniczą niskoenergetyczne promieniowanie laserowe (LLLT) wprowadził E. Master w drugiej połowie lat sześćdziesiątych XX wieku<sup>3</sup>. Wykorzystuje ona efekt fotobiostymulujący i fotobiomodulujący na organizm ludzki. Tak szeroko pojęte definicje procesów zachodzących pod wpływem niskoenergetycznego promieniowania dotyczą zarówno zmian zachodzących na poziomie komórkowym, jak i obserwowanych korzyści klinicznych tych działań. Zarówno zmiany w metabolizmie komórkowych (wzrost syntezy ATP, DNA, RNA) jak i kliniczne ich zastosowanie (np. przyspieszone gojenie owrzodzeń skórnych)<sup>4,5</sup> zostało omówione w dalszej części rozprawy. Do osiągnięcia wcześniej wspomnianego korzystnego oddziaływania biomedycznego stosowana jest długość fal mieszcząca się w zakresie: 500 – 1000 nm. Najmocniejszy biologiczny efekt oddziaływania obserwuje się przy długości fali z zakresu 620 – 680 nm oraz 812 – 870 nm<sup>4,5</sup>.

### *1.3. Wpływ promieniowania laserowego na procesy zachodzące w komórce*

Wpływ promieniowania laserowego na funkcje komórki jest wielokierunkowy i nie w pełni poznany. Najważniejsze i mające największe zastosowanie w medycynie modyfikacje aktywności życiowej komórki omówiono poniżej.

#### *1.3.1. Zwiększenie potencjału proliferacyjnego*

Promieniowanie laserowe działa na podstawowe molekularne funkcje komórki żywego organizmu. Głównym, jednak nie jedynym, efektem tego oddziaływania jest tzw. fotobiostymulacja objawiająca się między innymi zwiększoną proliferacją komórek. Dokładny mechanizm tego zjawiska nie został do końca poznany<sup>6</sup>. U jego podstaw leży aktywacja łańcucha oddechowego poprzez niskoenergetyczne promieniowanie laserowe. Zostało udowodnione, iż naświetlanie niskoenergetycznym promieniowaniem laserowym wywołuje zwiększoną produkcję reaktywnych form tlenu (ROS), okazuje się, iż efekt ten jest zależny od dawki promieniowania<sup>7</sup>. Za główny punkt uchwytu tego zjawiska uważa się obecnie oksydazę cytochromu C<sup>8, 9, 10</sup>. Absorpcja fotonów przez oksydazę cytochromu C prowadzi do zwiększenia poziomu nie tylko ROS, ale również wzrost syntezy adenozylo trójfosforanu (ATP)<sup>11, 12, 13</sup> (między innymi poprzez przyspieszenie transportu elektronów), jak i zwiększenia błonowego potencjału mitochondrialnego ( $\Delta\Psi_m$ ). Konsekwencją tych zjawisk jest zwiększenie komórkowego poziomu energii dzięki nasileniu procesów syntezy ATP zachodzących w mitochondriach, jak również nasilenie wewnątrzkomórkowego szlaku przekazu sygnałów, skutkiem czego jest aktywacja polimeraz DNA<sup>14</sup>. Wiadomo, że elementy wstecznej sygnalizacji mitochondriów (ROS, ATP,  $\Delta\Psi_m$ , pH, tlenek azotu - NO) są ściśle powiązane z aktywacją bądź zahamowaniem kinaz znajdujących się w cytoplazmie, co powoduje dalsze zmiany kaskad sygnałowych, czego bezpośrednim skutkiem jest synteza DNA, RNA, produkcja białek i enzymów zarówno jądrowych, jak i cytoplazmatycznych lub zmiany w lipidowych błonach komórki<sup>15</sup>. Zostało udowodnione, iż mechanizm ten jest odpowiedzialny za pro-proliferacyjne działanie niskoenergetycznego promieniowania laserowego. Niskoenergetyczne promieniowanie laserowe najprawdopodobniej wskutek wcześniej wspomnianych zmian we wstecznej sygnalizacji mitochondriów<sup>15, 16</sup> powoduje fosforylację receptorów kinaz tyrozynowych (TPKR), wpływając pobudzająco na szlak kinaz MAPK/ERK, którego zwiększona aktywność

prowadzi z kolei do wzmożonej proliferacji komórkowej. ROS produkowane przez mitochondria w odpowiedzi na ekspozycję niskoenergetycznego promieniowania laserowego aktywują kinazę tyrozynową Src odpowiedzialną między innymi za proliferację komórek <sup>7</sup>. Wiadomo, iż aktywacja komórek, jak i wzrost aktywności enzymów łańcucha oddechowego nie odbywa się wyłącznie poprzez mechanizmy zależne od mitochondriów. W komórkach fagocytarnych niskoenergetyczne promieniowanie laserowe inicjuje poza-mitochondrialne procesy oddechowe (konsekwencją czego jest wzrost syntezy ROS). Związane jest to z aktywacją oksydazy NADPH zlokalizowanej na błonie komórkowej <sup>17</sup>.

### *1.3.2. Wpływ na kwasy nukleinowe*

Zaobserwowano również wzrost syntezy DNA i RNA pod wpływem naświetlania <sup>18, 19</sup>. Efekt ten jest osiągany między innymi poprzez aktywację syntezy ATP i zwiększenie wewnątrzkomórkowego poziomu wapnia. Zjawiska te inicjują szereg biologicznych procesów, których konsekwencją jest zwiększona synteza DNA <sup>20</sup>. Niskoenergetyczne promieniowanie laserowe wpływa również na aktywność komórek poprzez transkrypcyjną i post-transkrypcyjną regulację ekspresji genów. Zjawisko to zachodzi wskutek modulacji ekspresji mikro RNA <sup>20</sup> (miRNA) pod wpływem promieniowania laserowego. Cząsteczki miRNA są krótkimi, niekodującymi cząsteczkami RNA, które regulują ekspresję znacznej ilości genów <sup>20</sup>.

### *1.3.2. Wpływ na apoptozę*

Należy zaznaczyć, iż niskoenergetyczne promieniowanie laserowe nie tylko zwiększa metabolizm i proliferację komórek, ale również w wyższych dawkach może indukować apoptozę <sup>20, 21</sup>. Dokładny mechanizm, w jakim niskoenergetyczne promieniowanie laserowe indukuje apoptozę nie został do końca poznany. Wydaje się jednak, iż jest on silnie powiązany z produkcją reaktywnych form tlenu ROS (ang. reactive oxygen species) <sup>21, 22</sup>. Sugeruje się, iż promieniowanie laserowe aktywuje kinazę syntazy glikogenu 3β (GSK3β) <sup>21</sup>, która bierze udział w wyzwalaniu apoptozy <sup>23, 24</sup>. Dodatkowo poprzez wspomniany wcześniej mechanizm ROS - zależny następuje zahamowanie szlaku Akt/GSK3β <sup>21</sup>, który wpływa hamująco na aktywność samej GSK3β <sup>21, 24</sup>. Ponadto niskoenergetyczne promieniowanie laserowe może zarówno indukować proliferację (małe dawki energii - 0,8 J/cm<sup>2</sup>) jak i apoptozę (większe dawki energii--

60,0 J/cm<sup>2</sup>), poprzez zmianę aktywności tych samych kinaz, jak choćby kinazy C<sup>25</sup>. Wskazywać to może na bardziej ilościowy niż jakościowy charakter zmian pomiędzy procesami proliferacja/apoptoza komórki pod wpływem niskoenergetycznego promieniowania. Uważa się, iż bezpośrednim „efektorem”, poprzez który odbywa się indukowana niskoenergetycznym promieniowaniem laserowym apoptoza jest Kaspaza 3<sup>26</sup>. Proteaza ta jest kluczowym mediatorem programowanej śmierci komórki i bierze udział w rozkładzie wielu jej kluczowych białek<sup>27</sup>. Pomimo nie do końca poznanego mechanizmu apoptozy indukowanej niskoenergetycznym promieniowaniem laserowym, większość autorów jest zgodna, iż czynnikiem różnicującym pomiędzy działaniem pro-proliferacyjnym a apoptotycznym jest gęstość energii dostarczona przez laser<sup>26, 27, 28, 29</sup>. Jeśli jest ona odpowiednio wysoka - dominują procesy apoptozy. Co ciekawe, szlaki działające przeciw temu zjawisku (anty-apoptotycznie) dalej są aktywowane nawet w przypadku promieniowania o wysokiej gęstości energii tzw. wysoko gęstościowego promieniowania laserowego o małej mocy (z ang. high fluence low-power laser irradiation). Przykładem tego zjawiska jest szlak promieniowanie laserowe/ROS/Src/Stat3, który hamuje apoptozę<sup>23</sup>. Należy zaznaczyć, iż w przypadku różnych typów komórek granica, w której dochodzi do przewagi procesów apoptotycznych nad pro-proliferacyjnymi jest zmienna i swoista dla danej linii komórkowej.

### *1.3.3. Zmiany w stężeniach jonów*

Aktywacja i zwiększanie potencjału proliferacyjnego komórek nie jest jedynym oddziaływaniem niskoenergetycznego promieniowania laserowego na funkcje życiowe komórek. Zwiększa ono również aktywność pompy sodowo-potasowej<sup>30, 31</sup>, dokładny mechanizm tego zjawiska nie został do końca poznany, wnioskuje się natomiast, iż może mieć on wpływ na działanie przeciwbólowe promieni laserowych o niskiej energii<sup>32</sup>.

Udowodniono ponadto, iż niskoenergetyczne promieniowanie laserowe podnosi przepuszczalność błony komórkowej dla wapnia, co skutkuje zwiększeniem jego wewnątrzkomórkowego poziomu<sup>33, 34, 35</sup>. Efekt ten jest zauważalny dla różnego typu komórek, zarówno pobudliwych np. miocytów<sup>36</sup>, jak i niepobudliwych np. mastocytów<sup>37</sup>, fibroblastów<sup>38</sup>, plemników<sup>35</sup> i innych. W eksperymencie przeprowadzonym przez Lavi i wsp.<sup>36</sup> okazało się, że wzrost poziomu wapnia jest w pewnym zakresie wprost proporcjonalny do wzrostu energii

promieniowania mierzonej w J/cm<sup>2</sup>, jak i proporcjonalny do wzrostu generacji reaktywnych form tlenu, ROS. Autorzy wykazali również bezpośredni związek między poziomem wapnia wewnątrzkomórkowego, a poziomem ROS, przez co wnioskuje, że mechanizm aktywacji kanałów wapniowych wiąże się bezpośrednio z produkcją ROS pod wpływem widzialnego promieniowania elektromagnetycznego. Promieniowanie laserowe zwiększa poziom wewnątrzkomórkowego wapnia nie tylko poprzez mechanizm ROS zależny. Jak zostało wcześniej wspomniane pod wpływem niskoenergetycznego promieniowania laserowego zachodzi zwiększona produkcja ATP, która to pobudza wiele podtypów receptorów nukleotydowych P2, zwiększając tym samym poziom wewnątrzkomórkowego wapnia<sup>39, 40</sup>.

#### 1.3.4. Zmiany w stężeniu tlenku azotu

Pod wpływem niskoenergetycznego promieniowania laserowego nasila się produkcja NO zarówno w badawczych modelach *in vitro*<sup>41, 42, 43</sup>, jak i *in vivo*<sup>44, 45</sup>, w tym także w modelach ludzkich<sup>46</sup>. Dokładny mechanizm tego zjawiska nie został poznany. Sugeruje się jednak, że w efekt ten zaangażowanych jest kilka różnych procesów. Jak zostało wcześniej wspomniane, LLLT ma silne właściwości aktywujące enzymy mitochondrialnego łańcucha oddechowego. Okazuje się, że pod wpływem LLLT następuje zwiększenie produkcji przez oksydazę cytochromu C<sup>47</sup>. U podłoża tego zjawiska leży najprawdopodobniej fakt konkurencji pomiędzy O<sub>2</sub>, a NO o centrum aktywne w enzymach mitochondrialnego łańcucha oddechowego<sup>47</sup>. LLLT stymulując aktywność kompleksu oksydazy cytochromu C, zwiększa uwalnianie NO z miejsc aktywnych enzymu. Zjawisko to określane jest jako hipoteza NO działania LLLT<sup>10</sup>. Kolejnym z potencjalnych mechanizmów nasilenia produkcji NO pod wpływem niskoenergetycznego promieniowania laserowego jest indukcja ekspresji i aktywacja syntaz tlenku azotu. W piśmiennictwie można odnaleźć badania sugerujące, iż zjawisko to zachodzi zarówno dla izoformy iNOS, jak i eNOS. W przypadku syntazy eNOS sugeruje się, iż u podstawy tego procesu leży aktywacja szlaku kinazy PI3K/eNOS<sup>43</sup>. Należy jednak zaznaczyć, iż w części eksperymentów autorzy nie odnotowali wzrostu aktywności syntaz (pomimo tego zaobserwowano wzrost poziomu NO wiążąc to zjawisko z uwalnianiem jego komórkowych zapasów bez następczej aktywacji)<sup>48</sup>, bądź wręcz rejestrowano obniżenie ekspresji iNOS pod wpływem LLLT w przypadku obserwacji długoterminowej<sup>49</sup>. Innym, szczególnie ciekawym ze

względem możliwości bezpośredniego wpływu na aktywność płytek krwi mechanizmem zwiększania poziomu NO w organizmie jest jego uwalnianie z nitrozo-hemoglobiny (NO-Hb) <sup>50</sup>.

#### 1.4. Niskoenergetyczne promieniowania laserowe jako metoda lecznicza

Niejako naturalną konsekwencją działania niskoenergetycznego promieniowania laserowego na żywe organizmy jest fakt, iż aktualnie w literaturze naukowej można odnaleźć liczne doniesienia o skuteczności niskoenergetycznego promieniowania w praktyce klinicznej, jak i w eksperymentach leczniczych wykonywanych na modelach ludzkich lub zwierzęcych.

##### 1.4.1. Modyfikacja wzrostu kostnego

LLLT jest wykorzystywane między innymi do przyspieszania wzrostu kostnego <sup>51, 52, 53</sup>. Efekt ten potwierdziły zarówno badania *in vitro* na liniach komórkowych jak i badania *in vivo* na modelach zwierzęcych. W badaniu przeprowadzonym na ludzkich komórkach kostniakomięśaka (MG-63) <sup>54</sup> w modelu *in vitro* zanotowano zwiększoną, skorelowaną z dawką użytej energii, proliferację komórek naświetlanych względem kontrolnej, nie naświetlanej grupy (długości fali 940 nm; mocy 0,5 W - 2 W; energia 1 J - 5 J). Część badaczy <sup>55</sup> zjawisko to wiąże ze zwiększoną syntezą czynników wzrostu przez osteoblasty pod wpływem LLLT (długości fali 685 nm, mocy 25 mW, (3 mW/cm<sup>2</sup>) oraz energii: 2 J/cm<sup>2</sup> i 4 J/cm<sup>2</sup>) między innymi zasadowego czynnika wzrostu fibroblastów (bFGF), insulinopodobnego czynnika wzrostu I (IGF-I) oraz zwiększonej ekspresji białka wiążącego insulinopodobny czynnik wzrostu I (IGFBP3). Wyniki otrzymywane w badaniach na modelach *in vitro* przekładają się na rezultaty stosowania LLLT w eksperymentach na modelach zwierzęcych. Ribeiro i wsp. <sup>56</sup> poddali ocenie gojenie kości pod wpływem przezskórnej LLLT. Sugerują polepszenie gojenia się ubytków kostnych w grupach poddanych LLLT, co wiąże z nasileniem ekspresji cyklooksygenazy 2 (COX-2) w uszkodzonej strukturze kostnej. Inny mechanizm przyspieszonego gojenia ubytków kostnych postulowany jest przez J. Nissana i wsp. <sup>57</sup> oraz Liu X i wsp. <sup>53</sup>. Zjawisko to wiąże z zwiększonym transportem wapnia do miejsca tworzenia się zrostu kostnego.

#### *1.4.2. Wpływ na owrzodzenia*

Kolejnym z zastosowań leczniczych LLLT wykorzystującym zwiększenie potencjału proliferacyjnego komórek jest leczenie owrzodzeń żylnych<sup>58, 59, 60, 61</sup>. Z racji wielotorowego działania LLLT na komórki, postulowane są różne mechanizmy odpowiedzialne za ten efekt kliniczny. Silveira i wsp.<sup>62</sup> sugerują, obniżenie stresu oksydacyjnego mierzonego produktami peroksydacji lipidów pod wpływem LLLT (laser: o długości fali 660 nm, mocy 30 mW, oraz energii 1 J/cm<sup>2</sup> oraz 3 J/cm<sup>2</sup>; oraz drugi o długości fali 904 nm, mocy 0,4 W/cm<sup>2</sup> oraz energii 1 J/cm<sup>2</sup> i 3 J/cm<sup>2</sup>). Z kolei Usmez i wsp.<sup>63</sup> zanotowali zwiększone wydzielanie czynników wzrostowych (bFGF oraz płytkowo-pochodnego czynnika wzrostu - PDGF) podczas terapii z użyciem LLLT (użyto laserów o różnych długościach fal: 660 nm, 810 nm, 980 nm, 1064 nm i energii 8 J/cm<sup>2</sup>). Lácjaková i wsp.<sup>64</sup> uznali, że przyspieszenie gojenia wrzodów pod wpływem niskoenergetycznego promieniowania wiąże się z przyspieszeniem proliferacji fibroblastów, zwiększonym formowaniem nowych naczyń krwionośnych oraz zwiększonym odkładaniem włókien kolagenowych w zmianie chorobowej.

#### *1.4.3. Właściwości przeciwbólowe LLLT*

Jedną z najczęściej wykorzystywanych aplikacji LLLT w codziennej praktyce klinicznej jest zmniejszanie natężenia zespołów bólowych<sup>65, 66, 67</sup>. Dokładny mechanizm przeciwbólowego działania niskoenergetycznego promieniowania laserowego nie został w pełni poznany. Bjordal i wsp.<sup>68</sup> dokonali meta-analizy badań odnoszących się do potencjalnego mechanizmu przeciwbólowego działania LLLT. Okazało się, iż ten rodzaj terapii obniża poziom wykładników stanu zapalnego między innymi interleukiny 1 (IL-1), prostaglandyny 2 (PGE2), czynnika martwicy nowotworów  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) oraz aktywatora plazminogenu i COX-2, co wydaje się stać w opozycji do badań przeprowadzonych przez Ribeiro i wsp.<sup>69</sup>. Za potencjalny mechanizm działania autorzy uważają również zmniejszenie: obrzęku, wielkości formowanego krwiaka pourazowego, napływu neutrofilów, a także osłabienie apoptozy oraz poprawę w lokalnym mikrokrążeniu. Zakres schorzeń, w których są wykorzystywane analgetyczne właściwości promieniowania jest bardzo szeroki i obejmuje między innymi reumatoidalne zapalenie stawów, zapalenie kości, bóle stawów, bóle pleców, chorobę zwyrodnieniową. W terapii stosowane jest



szerokie spektrum parametrów promieniowania (zakres długości fal: od 632,8 nm do 904 nm; energii od: 0,9 J/cm<sup>2</sup> do 105 J/cm<sup>2</sup>; mocy od 9,8 mW do 500 mW) <sup>70</sup>.

#### 1.4.4. LLLT w kardiologii

LLLT z powodzeniem wykorzystywane jest w badaniach eksperymentalnych w prewencji nawrotu zwężenia po zabiegach angioplastyki tętnic wieńcowych <sup>71, 72</sup>. Derkacz i wsp. <sup>71</sup> opracowali metodę wewnątrznacyniowego naświetlanie tętnic wieńcowych podczas zabiegów angioplastyki. Wykazano, iż w grupie pacjentów poddanych śród-zabiegowej procedurze LLLT zanotowano zmniejszony odsetek nawrotu zwężenia w obserwacji 6 miesięcznej. Badacze efekt ten wiążą ze zmniejszoną aktywnością cytokin zapalnych (IL-1 $\beta$ , IL-6) oraz z wzrostem przeciwzapalnej IL-10. Kardiologia interwencyjna nie jest jedyną dziedziną, w której podejmowane są próby wykorzystania niskoenergetycznego promieniowania laserowego. W modelach zwierzęcych udało się udowodnić skuteczność LLLT (długość fali 803 nm, energia 1,08 J/cm<sup>2</sup>, moc mierzona na powierzchni serca wynosiła 6 mW/cm<sup>2</sup>) w zmniejszaniu rozległości blizny po zawale mięśnia sercowego <sup>73</sup>. Co ciekawe, efekt ten uzyskano nie tylko poprzez naświetlanie mięśnia sercowego. Tuby i wsp. <sup>74</sup>, po sztucznie wywołanym zawale serca u szczurów naświetlali szpik kostny zwierząt, stwierdzili znaczącą redukcję rozległości blizny pod wpływem tego zabiegu. Badacze efekt ten wiążą z aktywacją autologicznych mezenchymalnych komórek szpiku kostnego. Z kolei Yaakob i wsp. <sup>75</sup> skuteczność terapii LLLT przypisują zwiększonej angiogenezie oraz nasilonej syntezie białek szoku cieplnego (w szczególności HSP70i).

Podejmowane są próby zastosowania niskoenergetycznego promieniowania laserowego w diagnostyce zmian miażdżycowych naczyń, ze szczególnym uwzględnieniem tzw. "niestabilnej blaszki miażdżycowej", której obecność jest trudna do wychwycenia w klasycznych metodach obrazowania tętnic. W tym celu wykorzystywana jest czasowo-rozdzielcza spektroskopia fluorescencyjna (TR-LIFS) <sup>76, 77</sup>. Bazuje ona na zdolności indukcji fluorescencji własnej poszczególnych struktur naczynia przez niskoenergetyczne promieniowania laserowe.

#### 1.4.5. Zastosowanie w pozostałych dziedzinach medycyny

Wiadomo, iż LLLT powoduje przyspieszenie regeneracji tkanek <sup>66</sup>. Niskoenergetyczne promieniowanie laserowe polepsza gojenie się blizn formujących się po zabiegach chirurgicznych. Poprawia również odległy efekt kosmetyczny ostatecznie uformowanych blizn <sup>78, 79</sup>. Dzięki promocji angiogenezy, LLLT poprawia żywotność przeszczepów skórnych <sup>80</sup>. Efekt ten łączony jest ze zwiększoną ekspresją: indukowalnego czynnika niedokrwiennego (HIF-1 $\alpha$ ), czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF) oraz zmniejszoną aktywnością metaloproteinazy macierzy (MMP-2). Ponadto wykazano zdolność LLLT do zmniejszania obrzęku limfatycznego występującego u pacjentek poddanych mastektomii, w ramach terapii raka sutka <sup>81</sup>. Badania Hirschl'a i wsp. <sup>82</sup> potwierdziły jego skuteczność w zmniejszaniu dolegliwości u pacjentów z chorobą Raynauda.

LLLT wykorzystywane jest również w łagodzeniu jatrogennych zapaleń jamy ustnej związanych z terapią przeciwnowotworową <sup>83, 84</sup>. Przeprowadzone dotychczas badania pozwoliły na wykonanie meta-analiz <sup>85, 84</sup>, których efektem są rekomendacje dotyczące zastosowanie LLLT w tej grupie pacjentów. Co ważne, w żadnym z badań włączonych do wspomnianych wcześniej meta-analiz nie zaobserwowano efektów ubocznych tego typu terapii. Nie jest to jedyne zastosowanie niskoenergetycznego promieniowania laserowego w stomatologii. Obiecujące efekty kliniczne zauważano u pacjentów z przewlekłym, zaawansowanym zapaleniem przyzębia <sup>86</sup>, jak również z tak zwanym syndromem piekającej jamy ustnej (burning mouth syndrome) <sup>87</sup>. Liczne badania <sup>88, 89, 90</sup> potwierdzają skuteczność LLLT w przyspieszaniu gojenia implantów zębowych. Efekt ten występuje również w przypadku implantów kostnych innych okolic ciała <sup>91, 92</sup>.

#### 1.5. Płytki krwi

##### 1.5.1. Morfologia i funkcja

Trombocyty są morfotycznymi składnikami krwi pozbawionymi jądra komórkowego. Powstają one w szpiku kostnym i produkowane są przez megakariocyty. Orientacyjny czas przeżycia tych komórek (które *de facto* są fragmentami cytoplazmy megakariocytów) wynosi 6 - 8 dni. Posiadają one dyskooidalny kształt, a ich rozmiar stanowi około ¼ rozmiaru dojrzałego erytrocyta (2-3  $\mu$ m) <sup>93</sup>. Za prawidłowe utrzymanie kształtu płytek krwi (pomimo oddziaływania

na nie znacznych sił podczas przemieszczania się w krwioobiegu) odpowiedzialny jest cytoszkielet. Zbudowany jest on z trzech podstawowych struktur: błon szkieletowych, filamentów aktynowych oraz mikrotubuli. Należy zaznaczyć, iż struktury te nie są odpowiedzialne jedynie za statykę tych komórek, uczestniczą także aktywnie w zmianach kształtu trombocytów. Ponadto komórki te posiadają zdolność do zmiany swojej morfologii oraz zwiększania rozmiarów, co jest wykorzystywane do oceny ich aktywności. Płytki krwi posiadają również organelle komórkowe. W ich cytoplazmie można odnaleźć: peroksosomy (uczestniczące w gospodarce lipidami), mitochondria (odpowiedzialne za tlenowy metabolizm), lizosomy (struktury wytwarzane z endosomalnych błon odpowiedzialne za transport wewnątrzkomórkowy i egzocytozę) jak również ziarnistości gęste oraz  $\alpha$  (biorące udział w hemostazie). Błona komórkowa płytek krwi jest klasyczną fosfolipidową strukturą, w skład, której dodatkowo wchodzi glikoproteiny oraz mukopolisacharydy. Bierze ona aktywny udział w podstawowej fizjologicznej funkcji płytek krwi tj. utrzymaniu prawidłowej hemostazy. W wyniku interakcji błony komórkowej trombocytów oraz poszczególnych jej struktur z różnymi rozpuszczalnymi agonistami (noradrenalina lub ADP), białkami macierzy komórkowej (między innymi lamininą czy kolagenem) jak również ciałami obcymi (np. biomateriałami stosowanymi w medycynie) inicjowane są zmiany w poszczególnych wewnątrzkomórkowych efektorowych enzymach. Wzbudza to aktywację trombocytów i przyczynia się do powstawania skrzepów. Ponadto płytki krwi uczestniczą w modyfikacji funkcji układu odpornościowego. Odpowiedzialne są również za dostarczanie niektórych czynników wzrostu. Należy zaznaczyć, iż są również istotnymi czynnikami uczestniczącymi w etiopatogenezie licznych schorzeń<sup>94</sup>.

Trombocyty odgrywają szczególną rolę w patogenezie schorzeń układu sercowo-naczyniowego, które są główną przyczyną zgonów w Polsce i na świecie. Modyfikacja aktywności płytek krwi pod wpływemiskoenergetycznego promieniowania laserowego może nieść za sobą istotne implikacje kliniczne. Potencjalnie możliwe jest otwarcie nowych pozafarmakologicznych opcji terapeutycznych w zakresie wspomnianych schorzeń (między innymi: zawałów mięśnia sercowego, udarów mózgu). W przypadku niekorzystnej (z klinicznego punktu widzenia) modyfikacji zmiany aktywności płytek przeprowadzone badania *in vitro* pozwolą na bezpieczne i nieobciążające dla pacjenta zamknięcie tego rodzaju prób klinicznych.

### *1.5.2. Mierniki funkcji płytek krwi*

W związku z udanymi próbami wykorzystania niskoenergetycznego promieniowania laserowego u pacjentów z chorobami układu sercowo-naczyniowego<sup>71, 95, 96</sup> istotnym wydaje się jego wpływ na funkcje płytek krwi. Niestety wciąż pozostaje on niejasny. Na wstępie należy zaznaczyć, iż ocena funkcji płytek krwi nastrocza pewnych trudności. Do dnia dzisiejszego nie udało się stworzyć jednego uniwersalnego skринingowego testu pozwalającego mierzyć funkcjonalność trombocytów. W praktyce klinicznej powszechnie wykorzystuje się trzy sposoby określania funkcji płytek krwi<sup>97</sup>. Jest to badanie tzw. „czasu krwawienia” (ta metoda wydaje się mieć znaczenie historyczne), testy agregacyjne w klasycznych agregometrach oraz badanie czasu okluzji w krwi pełnej (np. PFA-100 albo analizator Multiplate). Spośród wymienionych testów diagnostycznych jedynie dwa ostatnie badania zapewniają należyłą standaryzację metody. W testach tych metodą optyczną bądź impedancyjną, badana jest zdolność agregacji płytek w krwi pełnej lub pod postacią osocza bogatopłytkowego - PRP (z ang. platelet rich plasma) w odpowiedzi na zadanych agonistów (np. kolagen, ADP, peptydowy agonista receptorów trombinowych -TRAP, epinefryna, kwas arachidonowy).

Poza wspomnianymi wcześniej testami wykorzystywanymi w praktyce klinicznej istnieją również inne metody oceny funkcji i aktywacji płytek wykorzystywane głównie w badaniach naukowych. Ze względu na parametry oceniane przez nie, można dokonać teoretycznego podziału na kilka podstawowych podgrup.

Pierwszą z nich jest grupa badająca produkty uwalniane przez płytki podczas aktywacji. Przykładami markerów tego typu są:  $\beta$ -tromboglobulina, P-selektyna, PF4 (platelet factor 4) oraz ADP. Są to stosunkowo proste testy laboratoryjne pozwalające na mierzenie systemowej odpowiedzi płytek. Słabym punktem tej metody jest stosunkowo duża podatność na artefakty<sup>98</sup>.

Następną grupą są testy pozwalające określić parametry formującego się skrzepu. Do metod tych należy zaliczyć między innymi: tromboelastografię (TEG) oraz Hemodyne Hemostasis Analysis System określający sztywność powstającego skrzepu (CEM). Stosunkowo nowym i ciekawym sposobem pomiaru parametrów formującego się skrzepu, jak i klasycznej odpowiedzi płytek na agonistów (alternatywa dla agregometrów optycznych) jest mikrowaga kwarcowa (Quartz Crystal Microbalance - QCM lub rzadziej QCB) wykorzystująca zjawisko rezonatorów kwarcowych. Przykładem komercyjnego systemu wykorzystującego tą technologię

jest system Q-sense, który poza badaniem samej mechanicznej agregacji uwzględnia również pewne reologiczne aspekty formującego się skrzepu.

Aktywację płytek krwi można badać poprzez ekspresje antygenów na ich powierzchni np. antygen CD62 (P-selektyna) czy kompleksu receptorowego GP IIb/IIIa. Do oceny aktywacji płytek wykorzystywane są tzw. mikrocząsteczki płytkowe (z ang. platelet microparticles) powstające z megakariocytów, ale również z aktywowanych trombocytów<sup>98</sup>.

Kolejną grupą parametrów ocenianych przy analizie funkcji płytek może być ich morfologiczno-strukturalny charakter określany w mikroskopii elektronowej. Funkcjonalność płytek można badać również na wiele innych sposobów, jednak omówienie ich wszystkich przekracza ramy niniejszego opracowania. W badaniu postanowiono zbadać zmienność wybranych osoczowych markerów aktywności płytek. W tym celu oznaczono stężenie sP-selektyny oraz PF4.

### 1.5.3. P-selektyna

W organizmie ludzkim P-selektyna jest glikoproteiną należącą do rodziny selektyn, które są jednym z elementów układu cząsteczek adhezji komórkowej (CAM od ang. Cell adhesion molecule). Uczestniczy ona wspólnie z innymi białkami z rodziny selektyn w wiązaniu białych krwinek do powierzchni śródbłónka, bądź płytek krwi<sup>99</sup>. Dzięki wspomnianym właściwościom molekula bierze udział w procesach odpowiedzi immunologicznej, jak i w zachowaniu prawidłowej hemostazy. U ludzi wyróżniamy dwie frakcje tego białka: pierwszą, związaną z błonami lipidowymi znajdującą się między innymi w trombocytach, megakariocytach czy komórkach śródbłónka oraz frakcję rozpuszczalną (sP-selektyna od ang. soluble P selectin) występującą w osoczu. P-selektyna znajdującą się w trombocytach zmagazynowana jest w ziarnistościach  $\alpha$  oraz w ciałkach Weibel-Palade'a i w wyniku aktywacji płytek przesuwana jest na powierzchnię błony komórkowej trombocytów<sup>100, 101, 102</sup>. Dzięki temu oznaczanie poziomu jej ekspresji na powierzchni płytek krwi wykorzystywane jest jako jeden z markerów aktywacji tych komórek. Bliźniacza sP-selektyna jest mniejszym białkiem, powstającym w wyniku post-transkrypcyjnej obróbki genów (wycinania intronów - tak zwanego „alternatywnego splicingu”)<sup>103</sup>, pozbawiona jest domeny transbłonowej<sup>104</sup>. Płytki krwi są głównym źródłem sP-selektyny znajdującej się w osoczu<sup>105</sup>. Narastanie jej poziomu w osoczu

obserwowane jest w przypadku zwiększonej aktywacji trombocytów. Przez co wykorzystywana jest w celu oceny aktywności płytek krwi <sup>106</sup>. Ponadto postuluje się, iż sP-selektyna jest jedną z kluczowych molekuł związanych z hemostazą i trombogenezą. Uczestniczy w zmianie kształtu trombocytów, aktywuje wytwarzanie pro-koagulacyjnych płytkowych mikrocząstek oraz przyczynia się do nasilonego odkładania się fibrynogenu <sup>107</sup>. Wiadomo, iż zwiększona jej ekspresja potrafi korygować hemostazę w mysich modelach Hemofilii typ A <sup>108</sup>. Kaufmann i wsp. <sup>109</sup> sugerują, iż poziom sP-selektyny w krwi koreluje z odpowiedzią płytek krwi na kwas arachidonowy w klasycznym agregometrze optycznym. Dzięki temu może być stosowana w ocenie odpowiedzi płytek na terapię kwasem acetylosalicylowym. Co ważne na poziom sP-selektyny nie ma wpływu, ani sposób preparacji płytek krwi, ani rodzaj użytego antykoagulantu <sup>110</sup>. Liczne badania kliniczne potwierdzają zwiększenie jej poziomu w krwi w stanach chorobowych związanych z patologiczną nadmierną aktywacją płytek krwi. Zwiększony poziom sP-selektyny jest notowany u pacjentów z zakrzepicą żył głębokich niepowikłaną, jak i z towarzyszącą zatorowością płucną. Ponadto postuluje się, iż podniesiony jej poziom ma znaczenie w diagnostyce i może być wykorzystywany w rozpoznaniu różnicowym we wspomnianych wyżej schorzeniach <sup>107</sup>. Podwyższony poziom sP-selektyny obserwowany jest także u pacjentów z zawałem serca <sup>111, 112</sup>. Jak pokazują badania Chen i wsp. <sup>113</sup>, poziom sP-selektyny może mieć właściwości prognostyczne, dotyczące ryzyka nagłych zdarzeń sercowych u pacjentów z podejrzeniem choroby naczyń wieńcowych oraz z zachowaną prawidłową funkcją skurczową lewej komory. Właściwości sP-selektyny jako predyktora choroby próbuje się wykorzystać w przypadku oceny ryzyka nawrotu zwężenia po zabiegach angioplastyki w zakresie tętnic wieńcowych <sup>114</sup>. Użyteczność oceny sP-selektyny jako markera aktywności płytek postuluje się w diagnostyce, rozpoznaniu i leczeniu udarów <sup>115, 116</sup>, zespołu wewnątrznaczyniowego wykrzepiania (DIC) <sup>117</sup> oraz rzucawki u ciężarnych <sup>118, 119</sup>.

Z przytoczonych powyżej przykładów można wnioskować, iż sP-selektyna jest istotnym markerem aktywności płytek. Potencjalne zmiany jej poziomu w surowicy, będące konsekwencją naświetlania niskoenergetycznym promieniowaniem laserowym, mogą nieść ze sobą poważne implikacje kliniczne. Nie bez znaczenia jest, iż sP-selektyna jest niewybiórczą płytkową glikoproteiną. Wraz z oznaczeniem pozostałych badanych markerów aktywacji płytek,

może to pozwolić na różnicowanie potencjalnych przyczyn zmian w zakresie agregacji pod wpływem LLLT.

#### *1.5.3.1. Czynniki płytkowy 4*

Czynnik płytkowy 4 (z ang. Platelet factor 4 - PF4) jest chemokiną specyficzną dla płytek. Syntezowany jest głównie przez megakariocyty, a jego składowanie odbywa się w ziarnistościach  $\alpha$  trombocytów. Degradowany jest on natomiast przez hepatocyty<sup>120</sup>. Jego uwalnianie do surowicy następuje podczas aktywacji płytek. Oznaczanie jego poziomu wykorzystywane jest do oceny stopnia aktywacji trombocytów. Poza tym, iż PF4 jest wydzielany w stanach aktywacji płytek krwi, przez co jego podwyższony poziom w surowicy winno kojarzyć ze stanami zwiększonej gotowości pro-agregacyjnej. Wpływa on na procesy krzepliwości. Zjawisko to zachodzi dzięki trombomodulinie (PF4 działa jako kofaktor aktywacji białka C w obecności trombomoduliny), która wpływa na zależną od trombiny aktywację białka C. Aktywne białko C jest natomiast jednym z głównych czynników obniżających krzepliwość krwi w organizmie. Białko C ma właściwości proteazy serynowej dzięki czemu inaktywuje aktywny czynnik V i VII<sup>121</sup>. Wykazuje ono również działanie cytoprotekcyjne, przeciwzapalne i anty-apoptotyczne<sup>122</sup>. Co ciekawe, PF4 ma również przeciwstawne działanie na krzepliwość krwi. Jest on zdolny do hamowania aktywowanego, trombiną inhibitora fibrynolizy (TAFI), który w obecności trombomoduliny i trombiny hamuje fibrynolizę powstającego zakrzepu<sup>121</sup>.

PF4 wykazuje silne powinowactwo do heparyny<sup>123, 124</sup>. Właściwości te powodują, iż podejmowane są próby kliniczne w zastosowaniu rekombinowanego PF4 jako alternatywy terapeutycznej dla siarczanu protaminy<sup>125</sup>. Ponadto proteina ta (o niskiej masie cząsteczkowej) wykazuje zdolność do łączenia się z komórkami nabłonka w miejscach wiążących heparynę, przez co wlew dożylny tej substancji może wywołać uwolnienie puli PF4 związanej ze śródbłonkiem<sup>126</sup>. Wspomniane wcześniej kompleksy PF4-heparyna posiadają właściwości immunizujące i są uważane za jeden z głównych mechanizmów predestynujących do powstania II typu małopłytkowości indukowanej heparyną (HIT)<sup>123, 127</sup>. HIT nie jest jedyną jednostką chorobową, w etiopatogenezie której bierze udział PF4. Zwiększony poziom PF4 w surowicy obserwuje się między innymi w: infekcyjnym zapaleniu wsierdza<sup>128</sup>, gruźlicy płuc<sup>129</sup>, atopowym zapaleniu skóry<sup>130</sup>, aseptycznej martwicy głowy kości udowej<sup>131</sup>, w przypadkach

występowania skórnych zapaleń naczyń w przebiegu reumatoidalnego zapalenia stawów<sup>132</sup> oraz guzach jelita grubego<sup>133</sup>. Spośród wymienionych schorzeń, a w szczególności tych przebiegających z okresami remisji i zaostrzeń, PF4 jest postulowany jako wczesny marker nawrotu choroby. Ponadto PF4 obniża megakariocytopoezę przez co w stanach trombocytopenii (np. po radioterapii) wpływa na spowolnienie pełnej regeneracji szpiku<sup>134</sup>. Pomimo nie do końca poznanego mechanizmu, uważa się, iż PF4 może mieć swój udział w rozwoju miażdżycy<sup>135, 136</sup>. Czynniki płytkowy czwarty uczestniczy również w modyfikacji odpowiedzi immunologicznej ustroju między innymi poprzez wpływ na funkcje neutrofilów<sup>137</sup>. Przyczynia się również do bezpośredniej eliminacji niektórych drobnoustrojów. Dzieje się tak na przykład w infekcji zarodźcem malarii<sup>138</sup>. PF4 wpływa również na angiogenezę osłabiając jej nasilenie. Postuluje się wiele potencjalnych mechanizmów tego zjawiska. Jako niektóre z możliwych wymienia się: bezpośrednie interakcje z czynnikami angiogenezy, wpływ na wiązanie czynników wzrostu i integryn oraz interakcje z białkiem związanym z receptorem lipoprotein o niskiej gęstości (LPR-1)<sup>136</sup>. Działanie PF4 polegające na osłabieniu angiogenezy jest wykorzystywane w próbach klinicznych związanych z terapią antynowotworową między innymi w szpiczaku mnogim<sup>139</sup>.

Jak zostało przedstawione interakcje pomiędzy PF4 a układem krzepnięcia mają wielokierunkowy charakter. Modyfikacje w osoczym poziomie PF4 mogą za sobą nieść również inne, potencjalnie istotne klinicznie implikacje. Wydaje się więc konieczne określenie ewentualnych zmian w tym zakresie funkcjonalności płytek pod wpływem LLLT. W związku z tym, iż PF4 jest chemokiną specyficzną wyłącznie dla płytek krwi oraz obrazuje ona stan aktywności trombocytów, oznaczenie jego poziomu przed i po naświetlaniu pozwoli na zobrazowanie oraz przybliżenie ewentualnych mechanizmów sprawczych zmiany funkcji agregacyjnej krwi pod wpływem LLLT.

## *1.6. Tlenek azotu*

### *1.6.1. Źródła tlenu azotu*

W organizmie ludzkim zasadniczo występują trzy główne podtypy syntazy NO. Pierwszym z nich jest neuronalna syntaza NO (nNOS lub NOS1), występująca w układzie



nerwowym, zarówno centralnym jak i obwodowym. Drugim podtypem jest śródbłonkowa syntaza tlenu azotu (eNOS lub NOS3) spotykana głównie w śródbłonku oraz w płytkach krwi. Ostatnio pojawiły się sugestie, iż eNOS znajduje się również w innych elementach morfotycznych krwi np. w erytrocytach. Co więcej K. Wood i wsp.<sup>140</sup> sugerują, iż NO pochodzący z syntazy znajdującej się w czerwonych krwinkach, ma wpływ na ciśnienie krwi oraz uczestniczy w istotny sposób w ustrojowej homeostazie nitratów. Okazuje się również, iż aktywność eNOS może korelować z występowaniem choroby wieńcowej u ludzi<sup>141</sup>. Obecność dwóch wcześniej wymienionych syntaz ma charakter konstytutywny. Ostatnia natomiast jako jedyna jest indukowalna (iNOS lub NOS2), spotykana głównie w komórkach układu immunologicznego, aczkolwiek obecność jej opisywano również w mięśniach gładkich czy hepatocytach<sup>142</sup>.

#### 1.6.2. Wpływ tlenu azotu na funkcje płytek krwi

Od dawna wiadomo, iż tlenek azotu obniża aktywację, zdolność adhezji oraz odpowiedź agregacyjną płytek krwi<sup>143, 144, 145</sup>. Jego bezpośrednie działanie na funkcje trombocytów objawia się poprzez aktywację rozpuszczalnej cyklazy guanylowej (sGC), która zwiększa syntezę cGMP. Efektem tego jest aktywacja proteinowej kinazy G (PKG) oraz pośrednio Proteinowej Kinazy A (PKA)<sup>146</sup>. Szlak przekazu sygnału sGC/cGMP/PKG/PKA wywołuje szereg zmian w kolejnych szlakach kinaz, poziomach syntezy niektórych białek, jak i modyfikacji aktywności niektórych receptorów błonowych płytek. Końcowym efektem szeregu tych przemian jest obniżona gotowość pro-agregacyjna płytek krwi. Należy nadmienić, iż mechanizm zależny od cGMP nie jest jedynym, który wpływa na aktywność płytek krwi pod wpływem tlenu azotu. NO powoduje nitrozylację oraz nitrowanie niektórych białek komórkowych, efektem czego jest zmniejszenie uwalniania zawartości ziarnistości wydzielniczych trombocytów<sup>146</sup>. Jakkolwiek wpływ egzogenego tlenu azotu na funkcję płytek krwi jest powszechnie znany, to wpływ syntezywanego w warunkach fizjologicznych endogenego NO jest tematem licznych badań. Ewentualny wpływ NO wytwarzanego przez poszczególne podtypy syntaz tlenu azotu na aktywność płytek krwi w warunkach *in vivo* jak i *in vitro* jest przedmiotem wielu badań. Wyniki poszczególnych doświadczeń są niejednoznaczne, a w niektórych przypadkach sprzeczne<sup>146, 147, 148</sup>. C. Moore i wsp.<sup>147</sup> w swoich badaniach dowodzą, iż śródbłonkowa NOS ma kluczowe

znaczenie w regulacji funkcji agregacyjnej płytek krwi. Na podstawie badań przeprowadzonych na mysich modelach sugerują oni również, iż tlenek azotu znajdujący się we krwi pochodzący z pozostałych źródeł praktycznie nie wpływa na właściwości zakrzepowe krwi. Co ciekawe, badania te wykazują różnice w wpływie eNOS na agregację krwi u poszczególnych płci. Sugerują, iż u osobników płci żeńskiej aktywność eNOS ma większy wpływ na agregację, przez co ewentualne upośledzenie funkcji tego enzymu ma istotniejsze implikacje kliniczne niż u osobników męskich. W opozycji do wyniku tego badania zdaje się być praca zespołu C. Tymviosa<sup>148</sup>, w której to autorzy na podstawie eksperymentów przeprowadzonych na modelach mysich sugerują, iż wpływ na funkcję płytek ma tlenek azotu syntezowany przez inne podtypy syntazy niż eNOS (ich obserwacja dotyczy zarówno frakcji znajdujące się w płytkach jak i w śródbłonku naczyń). Również Ozuyaman i wsp.<sup>149</sup> w swoich badaniach sugerują, iż aktywność eNOS nie ma wpływu na agregację płytek krwi *in vivo*. Należy nadmienić, iż same trombocyty są źródłem tlenu azotu. W płytkach odnajdywano dotychczas głównie formy eNOS i to ona uważana jest za główne źródło tlenu azotu w trombocytach. Sugeruje się jednak, iż w płytkach krwi ekspresji może ulegać iNOS<sup>150</sup>. Rola NO produkowanego przez trombocyty pozostaje niejasna. Część autorów dowodzi, iż płytkowy tlenek azotu bierze udział w hamowaniu rekrutacji płytek krwi w proces krzepnięcia krwi oraz zmniejszaniu wydzielania sekrecji z ziarnistości  $\alpha$ <sup>151, 152, 153, 154</sup>. Niektórzy sugerują natomiast, że NO syntezowane w płytkach krwi nie ma wpływu na procesy krzepnięcia<sup>149, 155</sup>. Ostatnio opublikowane dane<sup>156</sup> wskazują na możliwość uczestnictwa frakcji NO, powstającej przy udziale eNOS, w płytkach krwi na występowanie zjawiska aspirynooporności oraz udział w plejotropowym protekcyjnym działaniu statyn w chorobach układu sercowo-naczyniowego<sup>157</sup>.

### 1.6.3. Ocena syntezy tlenu azotu

W związku z faktem, iż syntezowany *de novo* tlenek azotu w organizmie ludzkim jest niestabilny i szybko ulega przemianie, ocena aktywności syntaz tlenu azotu poprzez ilościowe oznaczenie NO nastręcza znaczne trudności. Analizę aktywności NOS można dokonać pośrednio poprzez ocenę głównych związków biorących udział w reakcji syntezy NO czyli L-argininę oraz asymetryczną dimetyloargininę (ADMA) (dokładniej chodzi o ocenę aktywności osi : PRMT-L-Arg/ADMA-DDAH). L-Arg jest podstawowym substratem wykorzystywanym przez NOS do

syntezy tlenku azotu <sup>158</sup>. W organizmie ludzkim bierze również udział choćby w cyklu mocznikowym. Natomiast ADMA jest naturalnie występującym analogiem L-arg, a zarazem najaktywniejszym (spośród wszystkich pozostałych analogów) kompetencyjnym inhibitorem NOS <sup>159</sup>. Z występujących w organizmie ludzkim pozostałych analogów L-arg, : monometylo L-arg (LMMA) wykazuje właściwości inhibitora kompetencyjnego, natomiast symetryczna dimetyloarginina (SDMA) nie przejawia takiej aktywności. ADMA, LMMA, SDMA powstają w wyniku rozpadu (hydrolizy) metyloowanych białek <sup>160, 161</sup>. Grupą enzymów katalizujących te reakcje są różne podtypy proteinowej metylotransferazy argininy (PRMT). PRMT I jest głównie źródłem ADMA natomiast w wyniku aktywności PRMT II powstaje SDMA. Metylowe analogi L-arg w pewnym stopniu wydalane są w postaci nie zmienionej w moczu, jednak główna ich część ulega przemianie w cytrulinę i metyloaminy poprzez dimetyloaminohydrolazę dimetyloarginylową (DDAH). Postuluje się, iż podniesiony poziom ADMA w surowicy występuje w wielu rodzajach schorzeń, między innymi: hiperlipidemii, nadciśnieniu tętniczym, stanie przedzrzucaawkowym, nadczynności tarczycy i innych. Jej udział postulowany jest w etiopatogenezie dysfunkcji śródbłonna oraz w rozwoju chorób sercowo-naczyniowych <sup>162</sup>. Wydaje się, iż określenie stężeń (przed jak i po naświetlaniu) L-arg, ADMA, SDMA może być użyteczne w określeniu potencjalnej aktywności NOS po zastosowaniu LLLT. Pokazanie zaś zmian w zakresie markerów stresu oksydacyjnego, a zwłaszcza nitrozacyjnego pozwoli wykazać, czy są one wtórne do zmiany syntezy, czy też nasilenia degradacji NO. Pomiaru te stanowiąc będą pierwszą próbę określenia zmian zachodzących w osi PRMT-L-Arg/ADMA-DDAH pod wpływem niskoenergetycznego promieniowania laserowego, gdyż w literaturze próżno szukać badań na ten temat.

### 1.7. Wpływ LLLT na funkcje płytek krwi

W piśmiennictwie można odnaleźć różne prace dotyczące wpływu niskoenergetycznego promieniowania laserowego na agregację płytek krwi. W zdecydowanej większości są to eksperymenty przeprowadzane *ex vivo*. Brakuje natomiast rzetelnych badań, które pozwalałyby określić funkcję płytek krwi po naświetlaniu niskoenergetycznym promieniowaniem w warunkach *in vivo*. Rezultaty przeprowadzanych badań dotyczących modeli *ex vivo* są niejednokrotnie sprzeczne: część sugeruje zmniejszenie ich aktywności <sup>163, 164, 165</sup>, w opozycji do

nich są natomiast inne publikacje<sup>166, 167, 168, 169</sup>. Niestety ocena i porównanie wyników tych prac są trudne. Wynika to z faktu występowania znaczących różnic w zakresie metodologii wykonywanych eksperymentów. Wykorzystują one różne: długości fal, moce promieniowania jak i techniki naświetlania (ciągłe bądź przerywane). Krew naświetlana jest w naczyniach o różnych kubaturach i wykonanych z tworzyw o różnej gęstości optycznej, co niejednokrotnie komplikuje prawidłową analizę i ocenę wyników. Stosunkowo często w badaniach wykorzystywane są również parametry mierzące aktywność płytek, nie wykorzystywane w codziennej praktyce klinicznej, co utrudnia wyciągnięcie właściwych wniosków.

### *1.7.1. Badania sugerujące zwiększoną aktywację płytek*

Część z dotychczas przeprowadzonych badań sugeruje zwiększoną aktywność płytek pod wpływem niskoenergetycznego promieniowania laserowego. W badaniu Hoffman`a i Monroe<sup>169</sup> płytki były poddawane promieniowaniu laserowemu o energii 12 J/cm<sup>2</sup> i długości fali 650 nm. Po zabiegu naświetlania PRP wykazano wzrost wytrzymałości i sztywności powstającego skrzepu (CEM – clot elastic modulus) oraz wzrost intensywności kurczenia się płytek podczas formowania skrzepu (PCF). W tym samym badaniu okazało się, że naświetlanie płytek niskoenergetycznym promieniowaniem laserowym nie zwiększa ich odpowiedzi na aktywator jakim jest trombina, ani nie modyfikuje ekspresji markera aktywacji płytek-CD62 (P-selektyna). Wykazano natomiast zwiększone wiązanie na powierzchni płytek aktywowanego VII czynnika krzepnięcia, z czym autorzy wiążą szybsze gojenie owrzodzeń żylnych pod wpływem LLLT w mysich modelach hemofilii.

W kolejnym badaniu<sup>166</sup> okazało się, że naświetlanie niskimi dawkami promieniowania (tj. 18 J i 54 J) powoduje zwiększoną aktywację płytek mierzoną ekspresją kompleksu GP IIb/IIIa na powierzchni płytek w krwi pełnej. Zwiększone było również powstawanie płytkowych mikrocząstek oraz agregatów płytkowych, zarówno w spoczynku jaki i po aktywacji ADP. Co ciekawe, efekt ten nie był zauważalny dla płytek aktywowanych kolagenem. Warty podkreślenia jest fakt, iż autorzy stwierdzają obniżenie aktywności płytek podczas naświetlania większymi dawkami promieniowania (108 J).

Niektóre badania sugerują również wzrost produkcji reaktywnych form tlenu oraz zwiększenie uwalniania protein płytkowych i nukleotydów adeninowych, jako konsekwencji

naświetlania trombocytów. Potwierdza to efekt biostymulacyjny niskoenergetycznego promieniowania laserowego na płytki krwi oraz pośrednio świadczy o zwiększonej aktywacji tych komórek<sup>167</sup>.

### *1.7.2. Badania sugerujące zmniejszoną aktywację płytek*

Ram Mohan i wsp.<sup>164</sup> w swoim badaniu naświetlali PRP promieniowaniem laserowym (o długości fali 1060 nm, mocy 10 W, energii 10 J - 50 J). Zauważyli oni spadek odpowiedzi agregacyjnej płytek krwi dla trzech agonistów tj. kolagen, ADP, ristocetynę. Efekt ten nasilał się, wraz ze wzrostem pochłoniętej energii. Należy jednak zaznaczyć, iż w eksperymencie tym następował również spadek ilości płytek jak i średniej objętości płytek (MPV), wraz ze wzrostem pochłoniętej dawki. W przypadku tego badania należy brać pod uwagę możliwość występowania efektu termicznego promieniowania laserowego. Proces ten mógł uszkadzać płytki i wpływać na otrzymane wyniki, aczkolwiek należy zaznaczyć, że nawet przy najwyższych energiach promieniowania laserowego nie wystąpiła spontaniczna agregacja płytek.

Do podobnych wyników doszli Eldar i wsp.<sup>165</sup>. Ciekawym aspektem tego eksperymentu jest fakt, iż dodatkowo zbadano w nim odpowiedź agregacyjną płytek krwi pod wpływem LLLT u pacjentów przyjmujących kwas acetylosalicylowy. Również, w tym badaniu zauważono spadek odpowiedzi na agonistów (ADP, kolagen, epinefryna, ristocetyna) wraz ze wzrostem energii pochłoniętej przez płytki. Spadek był wyższy w grupie, która była naświetlana większą mocą w krótszym czasie. W grupie pacjentów, którzy przyjmowali aspirynę stwierdzono brak spadku, a nawet łagodny wzrost agregacji płytek poddanych napromienianiu niskimi dawkami energii (5J, 10J), w porównaniu do nie naświetlanej grupy kontrolnej. Co ciekawe w przypadku wyższych dawek promieniowania następował spadek odpowiedzi agregacyjnej na zadanych agonistów.

Brill i wsp.<sup>163</sup> wykazali zmniejszoną agregację naświetlanych płytek (długość fali w tym badaniu wyniosła 632,8 nm, użyta energia 0,4 – 4,2 J) w odpowiedzi na TRAP w klasycznym agregometrze optycznym. W tym samym badaniu naświetlane płytki wykazały zmniejszoną ekspresję P-selektyny oraz zdolność do wiązania fibrynogenu.

Jak wynika z przytoczonych przykładów jednoznaczny wpływ niskoenergetycznego promieniowania laserowego na parametry agregacyjne krwi pozostaje niewyjaśnionym

problemem badawczym. Konieczne wydają się zatem próby ustalenia potencjalnych mechanizmów oddziaływania LLLT na krew i jej elementy morfotyczne w tym zakresie. Z racji znacznych rozbieżności w zakresie parametrów fizycznych promieniowania laserowego używanego dotychczasowych badaniach, słusznym wydaje się użycie możliwie najszerszego spektrum promieniowania z szczególnym uwzględnieniem różnych dawek energii jako parametru wykazującego istotne implikacje kliniczne.

## 2. Założenia i cele pracy

Terapia niskoenergetycznym promieniowaniem laserowym (LLLT), dzięki swojemu wpływowi na organizmy żywe poprzez zjawiska: fotostymulacji, fotobiomodulacji, od blisko 60 lat znajduje zastosowanie w codziennej praktyce klinicznej oraz w badaniach podstawowych z zakresu funkcjonowania organizmów żywych. W związku z coraz częstszymi próbami wykorzystywania niskoenergetycznego promieniowania laserowego w leczeniu schorzeń układu sercowo-naczyniowego, istotnym wydaje się zbadanie wpływu LLLT na właściwości płytek krwi. Wyniki dotychczas przeprowadzonych badań w tej tematyce są często sprzeczne i w niedostateczny sposób wyjaśniają potencjalne mechanizmy wpływu LLLT na krzepliwość krwi.

Biorąc pod uwagę problematykę poruszaną w dostępnej literaturze, a także postulowane istnienie mechanizmu modulującego właściwości płytek krwi przez LLLT, sformułowano następujące cele niniejszej rozprawy:

1. Określenie wpływu niskoenergetycznego promieniowania laserowego na właściwości agregacyjne płytek krwi w modelu *in vitro*.
2. Opracowanie i wdrożenie procedury naświetlania krwi w modelach *in vitro*, która umożliwi precyzyjne opisanie parametrów promieniowania, jakiemu poddana była krew.
3. Wyznaczenie charakterystyki promieniowania, dla której potencjalna odpowiedź biologiczna jest największa.
4. Dokonanie oceny wpływu LLLT na stężenia markerów aktywacji trombocytów uwalnianych do osocza.
5. Przeprowadzenie analizy wpływu LLLT na osoczowy szlak biotransformacji tlenu azotu.

### 3. Materiał i metody

#### 3.1. Grupa badana

Do badania kwalifikowano osoby w przedziale wieku od 21 do 45 lat. Warunkiem włączenia do badania był brak schorzeń przewlekłych, ze szczególnym uwzględnieniem chorób hematologicznych, czy stwierdzanych wcześniej zaburzeń krzepnięcia krwi. Wykluczano także osoby z przebytymi w ostatnim okresie (do 14 dni przed pobraniem krwi) ostrymi schorzeniami infekcyjnymi. Pacjenci włączeni do badania nie mogli stosować leków potencjalnie wpływających na otrzymywane wyniki. Dotyczyło to kwasu acetylosalicylowego i innych niesteroidowych leków przeciwzapalnych - dla tych leków okres karencji wynosił 10 dni, a także doustnej antykoncepcji hormonalnej (okres karencji wynosił 3 miesiące). Wykluczenie z badania powodowało również zażywanie leków wpływających na metabolizm NO czyli: inhibitorów fosfodiesterazy, suplementów diety zawierających L-argininę oraz wszystkich leków z grupy nitratów (okres karencji wyniósł 7 dni).

Badanie przeprowadzono w Katedrze i Klinice Chorób Wewnętrznych, Zawodowych i Nadciśnienia Tętniczego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Wszyscy uczestnicy wyrazili pisemną zgodę na badanie, a na jego przeprowadzenie uzyskano uprzednio akceptację właściwej komisji bioetycznej UM we Wrocławiu oraz komisji bioetycznej projektu WroVasc.

Protokół badawczy zakładał istnienie dwóch etapów badania. Pierwszy etap badania przeprowadzono na dziesięciu ochotnikach, jednak że z względu na stwierdzenie *ex post* zaistnienia kryteriów wykluczających (stosowanie leków niedozwolonych z punktu widzenia protokołu badawczego), etap ten ukończyło dziewięciu badanych pacjentów (4 kobiety i 5 mężczyzn).

Do kolejnego etapu badania ostatecznie zakwalifikowano 41 uczestników - 20 kobiet oraz 21 mężczyzn. Najważniejsze konstytucjonalne wskaźniki grupy badanej zamieszczono w tabeli 1.



Tabela 1. Konstytucjonalne wskaźniki grupy badanej

	I Etap badań	II Etap badań	p
Liczebność grupy	9	41	-
Mężczyźni	5	21	-
Kobiety	4	20	-
Średni wiek ogółem [lata]	28,9 ± 4,7	27,5 ± 7,2	Ns
Średni wiek mężczyzn [lata]	27,4 ± 3,8	28,0 ± 6,6	Ns
Średni wiek kobiety [lata]	30,3 ± 5,3	27,1 ± 7,8	Ns
Średni BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	24,3 ± 5,7	23,4 ± 3,9	Ns

BMI= masa ciała/ (wzrost ciała)<sup>2</sup>, wiek podano jako średnią arytmetyczną ± odchylenie standardowe

### 3.2. Procedura badania

Głównym celem pierwszego etapu było określenie dawki promieniowania wywołującej największy efekt biologiczny, oceniany zmianą agregacji krwi pełnej. Drugi etap miał na celu potwierdzenie wyników na większej grupie badanych niż w pierwszej części eksperymentu oraz ocenę wpływu niskoenergetycznego promieniowania laserowego na poziom stężeń wybranych osoczowych markerów aktywności płytek, jak i substratów szlaku syntezy NO, mogących stanowić potencjalny mechanizm, za pośrednictwem którego promieniowanie laserowe moduluje agregację.

#### 3.2.1. I etap

W badaniu użyto 5 różnych dawek promieniowania, które rosły zgodnie z zasadą ciągu geometrycznego ( $q=2$ ). Na początku, na podstawie przeprowadzonego uprzednio studium literaturowego, zaplanowano zastosowanie następujących dawek promieniowania: 2 J/cm<sup>2</sup>, 4 J/cm<sup>2</sup>, 8 J/cm<sup>2</sup>, 16 J/cm<sup>2</sup>, 32 J/cm<sup>2</sup>. Krew pełną do oznaczeń agregometrycznych pobierano do probówki-strzykawki zawierającej hirudynę jako antykoagulator. Analizy przeprowadzono w ciągu 1 godziny od pobrania, stosując adenozy-5-difosforan (ADPtest), kolagen (COLtest) i TRAP-6 (TRAPtest). Przed wykonaniem testów agregometrycznych krew naświetlano stosując 5 różnych dawek promieniowania. Krew pobrana, od każdego z badanych ochotników, poddana

była działaniu wszystkich wytypowanych dawek promieniowania. Napromieniane próbki krwi oraz próbę kontrolną (nienaświetlaną krew) agregowano z zastosowaniem trzech wymienionych uprzednio agonistów. Do tego etapu badania pacjentów rekrutowano w 10 osobowych grupach. Po każdej przebadanej grupie wyniki poddawano analizie statystycznej. Za moment zakończenia tej części badania przyjęto chwilę, w której otrzymane wyniki (potencjalne różnice w poziomie agregacji względem kontrolnej, nie naświetlanej grupy) osiągnęły różnice istotne statystycznie. Głównym celem tego etapu badania było wyznaczenie najbardziej efektywnej biologicznie dawki promieniowania.

### 3.2.2. II etap

Drugi etap miał na celu potwierdzenie wcześniej otrzymanych wyników na większej grupie badanej (n=41) oraz wyjaśnienie mechanizmu modulacji odpowiedzi agregacyjnej przez LLLT. W tej części badania w procedurze naświetlania stosowano jedną dawkę promieniowania laserowego, wyznaczoną w poprzednim etapie badania, przy której efekt oddziaływania był największy. Podobnie jak w pierwszym etapie badania, oceniono odpowiedź agregacyjną krwi dotyczącą trzech agonistów. Ponadto przeprowadzono analizy biochemiczne mające potencjalnie wyjaśnić mechanizm działania LLLT. Dokonano pomiarów stężeń markerów aktywacji trombocytów przed, jak i po naświetlaniu krwi (sP-selektyna, PF-4). Oznaczono także stężenie: L-Arg, ADMA, SDMA w kontrolnej jak i naświetlanej próbce krwi. Dzięki temu możliwa była ocena zmiany aktywności wybranych osoczowych składowych osi: PRMT-L-Arg/ADMA-DDAH, mającej ścisły związek z metabolizmem NO.

### 3.3. Procedura pobrania krwi

W obu częściach badania obowiązywały odrębne procedury pobrania krwi. W pierwszym etapie eksperymentu, krew pobierano na czczo z żyły odłokciowej, w ilości około 10 ml (do 4 probówko-strzykawkę 2,7 ml, S-Monovette®, SARSTEDT, Niemcy, zawierających hirudynę jako antykoagulator). Niezwłocznie po pobraniu, uzyskaną krew pełną poddawano naświetlaniu stosując 5 różnych dawek. Następnie wykonywano *ad hoc* badania agregometryczne z wykorzystaniem aparatu Multiplate® Platelet Function Analyzer, Dynabyte GmbH (Niemcy) i zastosowaniem odczynników: TRAPtest (numer katalogowy: 6675883190),

ADPtest (numer katalogowy: 6675794190) i COLtest (numer katalogowy: 6675832190), jako agonistów inicjujących reakcję agregacji. Producentem wykorzystywanych w badaniu odczynników była firma Roche Diagnostics (Szwajcaria). W celu wykluczenia znaczenia efektu termicznego (wzrost temperatury wskutek ekspozycji na promieniowanie laserowe, a także zmian proporcji pomiędzy elementami morfotycznymi a osoczem w badanych próbkach zależnie od naświetlania), wykonano we współpracy z Pracownią Światłowodową Katedry Teorii Pola, Układów Elektronicznych i Optoelektroniki Wydziału Elektroniki Politechniki Wrocławskiej badania mające za zadanie dokonanie oceny istotności zmian temperatury wskutek zastosowanej procedury naświetlania (patrz punkt 3.5). Przeprowadzono także badania analizatorem hematologicznym próbek naświetlanych i nienaświetlanych nie wykazując znamienych różnic zarówno w aspekcie ilościowym, jak i proporcji pomiędzy poszczególnymi elementami morfotycznymi krwi a osoczem, wykluczając tym samym znaczące odparowanie próbek naświetlanych.

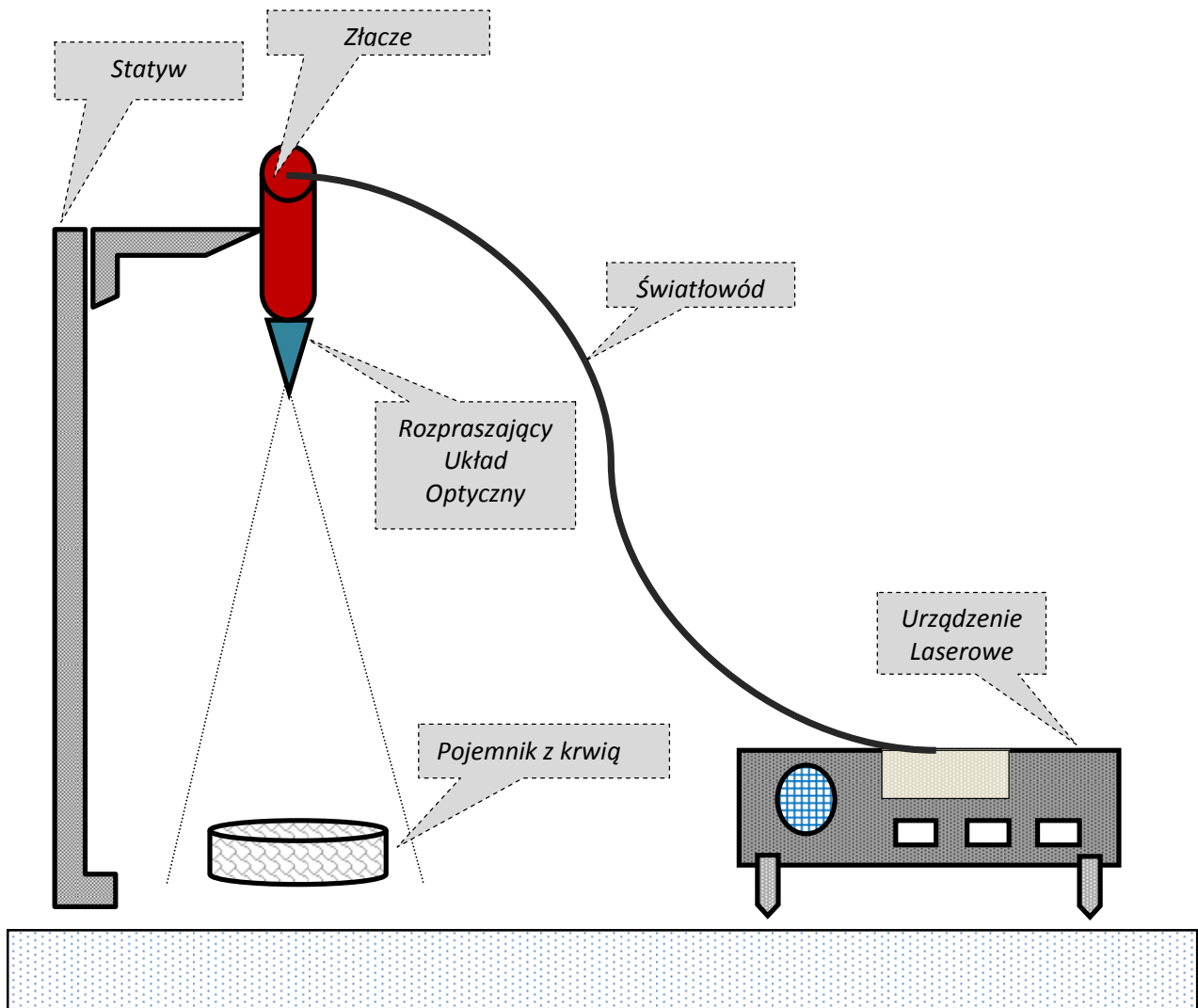
W drugim etapie badania od każdego z ochotników pobierano na czczo z żyły odłokciowej 15 ml krwi, stosując 2 probówko-strzykawki zawierające hirudynę jako antykoagulator (jak w pierwszym etapie) oraz jedną probówko-strzykawkę 9 ml S-Monovette®, SARSTEDT (Niemcy), zawierającą 1,6 mg EDTA/ml krwi, jako antykoagulator. Podobnie jak w I etapie badania, krew pobraną do próbek, zawierających hirudynę, poddawano badaniom agregometrycznym (porównywano kontrolną, nienaświetlaną krew z poddaną naświetlaniu). Część krwi pobranej na EDTA stanowiła nienaświetlaną grupę kontrolną, natomiast pozostała część poddana była procedurze naświetlania. W tym celu wykorzystano dawkę promieniowania wytypowaną w I etapie badania. Zarówno kontrolną, jak i badaną krew odwirowywano w temperaturze 4 °C, w czasie 10 minut przy obciążeniu 1000 x g przez 15 min. Uzyskane osocze rozpipetowano w odpowiednich objętościach do próbek typu eppendorf i przechowywano w -20°C do czasu wykonania analiz biochemicznych.

### 3.4. Źródło promieniowania laserowego

Do naświetleń wykorzystano laser o ciągłym charakterze pracy, klasy 4 (o generowanej maksymalnej mocy 500mW) (rycina 2) wyprodukowany przez przedsiębiorstwo Optel (Polska). Nominalna długość fali emitowanej przez urządzenie wynosiła 662 nm, a maksymalna moc 750 mW. W urządzeniu źródło światła laserowego było na stałe optycznie połączone (z ang. pig-tailed) ze światłowodem, zakończonym uniwersalnym złączem typu SMA. Wspomniane złącze posłużyło do połączenia światłowodu z rozpraszającym układem optycznym (stworzonym w współpracy z pracownikami Pracowni Światłowodowej Katedry Teorii Pola, Układów Elektronicznych i Optoelektroniki Wydziału Elektroniki Politechniki Wrocławskiej), pozwalającym na naświetlanie pełnej powierzchni próbek krwi. Układ optyczny umieszczono na statywie w odległości 15 cm od pojemników z krwią, a parametry rozpraszającego układu optycznego dobrano w ten sposób, aby promieniowanie laserowe obejmowało całą płytkę wraz z krwią i 1 cm marginesu poza płytkę. Schemat układu do naświetlania przedstawia rycina 3. Urządzenie laserowe wyposażono w elektroniczne układy stabilizujące temperaturę (thermocooler) oraz umożliwiające precyzyjne ustawienie czasu, mocy oraz łącznej dawki promieniowania.



Rycina 2. Urządzenie laserowe wykorzystywane w badaniu



Rycina 3. Schemat układu do naświetlania krwi.

#### 3.4.1. Wyznaczenie parametrów promieniowania użytego w badaniu

Przed rozpoczęciem właściwych naświetlań krwi, przeprowadzono kontrolę parametrów promieniowania laserowego, docierającego do badanych próbek w skonstruowanym na potrzeby eksperymentu układzie badawczym.

W celu pomiaru mocy i energii promieniowania użyto miernika PMD100D firmy Thorlabs Ltd. (USA), widocznego na rycinie 4. Wyniki uzyskane podczas pomiarów zestawiono w tabeli 2. Aby dokładniej opisać model badawczy wszystkie wartości energii oraz mocy mierzono w odniesieniu do jednostki powierzchni.



Rycina 4. Miernik mocy promieniowania laserowego PMD100D firmy Thorlabs.

Tabela 2. Parametry promieniowania laserowego, któremu poddawana była krew

		Dawka promieniowania laserowego					
		Kontrola	1	2	3	4 *	5
Energia	[J/cm <sup>2</sup> ]	0	2,43	4,93	9,91	<b>19,77</b>	39,54
Moc	[W/cm <sup>2</sup> ]	0	0,053	0,053	0,053	<b>0,053</b>	0,053
Czas naświetlania	[s]	0	46	93	187	<b>373</b>	746

\* Dawka użyta w II etapie badań

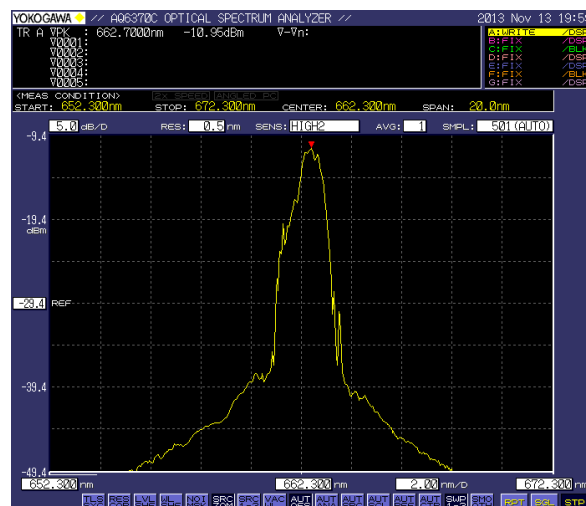
Otrzymane wyniki potwierdziły celowość wykonania pomiarów walidujących właściwości promieniowania docierającego do próbek krwi. Na podstawie parametrów nastawionych na urządzeniu laserowym oraz teoretycznych obliczeń (iloraz energii emitowanej do pola powierzchni przekroju poprzecznego wiązki lasera) w badaniu zakładano wykorzystanie następujących energii promieniowania laserowego: 2 J/cm<sup>2</sup>, 4 J/cm<sup>2</sup>, 8 J/cm<sup>2</sup>, 16 J/cm<sup>2</sup>, 32 J/cm<sup>2</sup>. Dzięki wykorzystaniu wspomnianej aparatury pomiarowej, możliwe było precyzyjne określenie właściwości promieniowania docierającego do badanego materiału. Rzeczywiste dawki promieniowania laserowego docierające do próbek krwi okazały się wyższe (tabela 2). Moc promieniowania w przypadku wszystkich dawek promieniowania była jednakowa i wyniosła

0,053 W/cm<sup>2</sup>. Należy zaznaczyć, iż wartość energii dostarczanej na powierzchnię wykorzystywanej do naświetleń krwi płytki, była jednorodna.

W celu sprawdzenia długości fali promieniowania emitowanego przez element półprzewodnikowy użyto analizatora spektrum promieniowania - Yokogawa aq 6370c Optical Spectrum Analyzer (Japonia) widocznego na rycinie 5. Wynik pomiaru widać na rycinie 6.



Rycina 5. Analizator Yokogawa aq 6370c Optical Spectrum Analyzer.



Rycina 6. Wykres analizy spektrum długości promieniowania lasera użytego w badaniu.

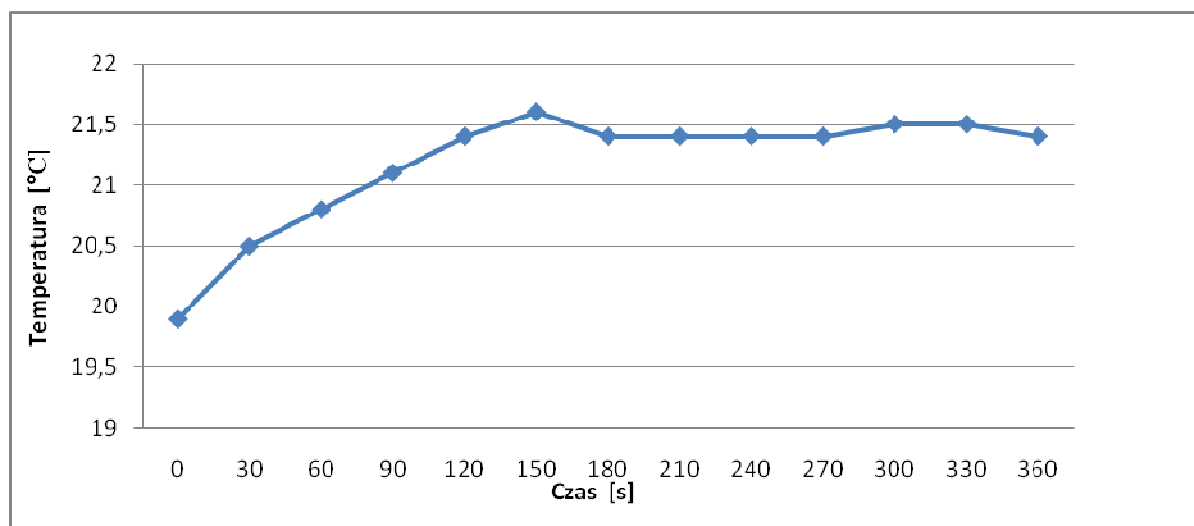
Analiza spektrum długości fali, którą wykonano na potrzeby eksperymentu, wykazała monochromatyczny charakter promieniowania laserowego (ze szczytem dla długości fali równej 662,3 nm), emitowanego poprzez urządzenie wykorzystane do eksperymentu.

### 3.5. Zmiana temperatury w układzie badawczym

Dokonano pomiarów zmiany temperatury naświetlanej krwi, w zależności od czasu oraz pochłoniętej dawki promieniowania. Pomiarów dokonano przy użyciu miernika temperatury AX 5002 Temp firmy Axiomet (Szwecja) widocznego na rycinie 7. Wyniki zestawiono na wykresach 1 i 2.

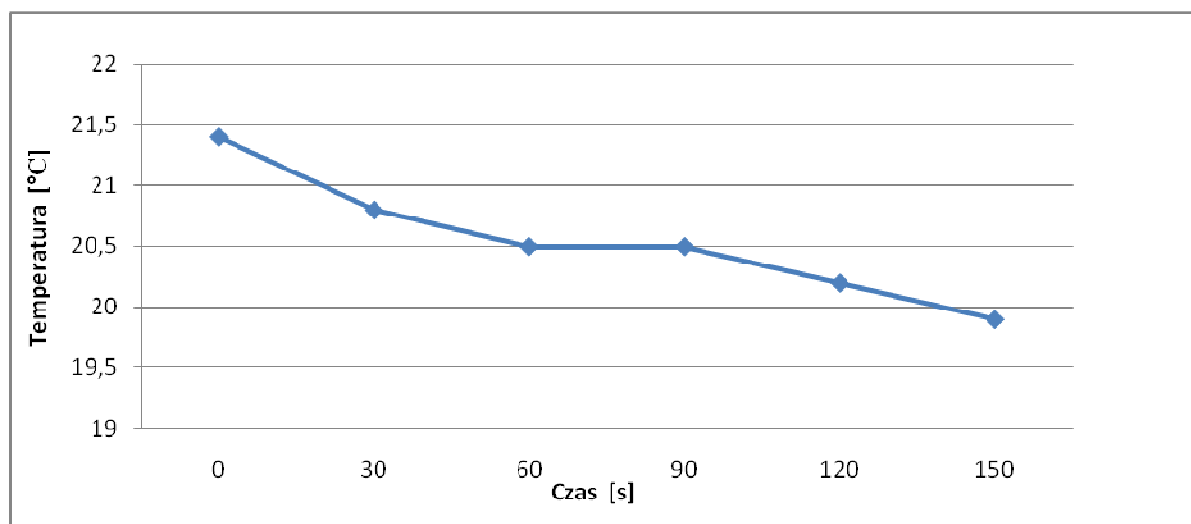


Rycina 7. Miernik temperatury AX 5002 Temp firmy Axiomet (dokładnością pomiaru  $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ ).



Wykres 1. Analiza zmiany temperatury krwi względem czasu naświetlania.





Wykres 2. Zmiana temperatury krwi po zaprzestaniu naświetlania promieniowaniem o mocy  $0,053 \text{ W/cm}^2$  i energii  $19,77 \text{ J/cm}^2$ .

W przypadku dawki promieniowania wykorzystanej w drugim etapie badania ( $19,77 \text{ J/cm}^2$ ), bezwzględny przyrost temperatury krwi wyniósł  $1,5 \text{ }^\circ\text{C}$ . Wróciła ona do wartości sprzed naświetlania po 150 sekundach.

### 3.6. Procedura naświetlania

Zarówno w etapie I jak i II, krew pełną ( $0,5 \text{ ml}$ ) naświetlano w płytkach (dołkach) z tworzywa sztucznego firm Seroplastes (Niemcy). Tego typu płytki są powszechnie wykorzystywane w bankach krwi do wykonywania prób krzyżowych. Tworzywo sztuczne, z którego są wykonane, nie powoduje aktywacji płytek krwi, ani spontanicznej agregacji. Dodatkowo kształt i kubatura płytek pozwalała na pełną i równomierną penetrację promieniowania laserowego w głąb badanej próbki. Aby zapobiec ewentualnemu wpływowi płytek Seroplastes na wyniki badania, zarówno krew poddana naświetlaniu, jak i nienaświetlana przenoszona była na powierzchnię dołków i pozostawała w nich ten sam okres czasu.

Dawki zastosowane w etapie I i II zawiera tabela 2.

### 3.7. *Badania agregometryczne.*

Badania agregometryczne podzielone były na dwa etapy. W obu etapach badania pomiary przeprowadzane były w modelu *in vitro* a wykorzystywano krew pochodząca od ochotników. Krew pełną pobrano do próbek zawierających hirudynę i dzielono na porcje po 500  $\mu$ l, które poddawano naświetlaniu. Następnie w przedziale od 3 do 5 minut po zakończeniu naświetlania krew poddano badaniom agregometrycznym (czas ten niezbędny był do powrotu temperatury krwi do stanu wyjściowego patrz wykres 2). Jako kontrolę przyjęto krew nienaświetlaną. Badania wykonane były w agregometrze impedancyjnym Multiplate pozwalającym na ocenę funkcji płytek krwi z wykorzystaniem krwi pełnej. Metoda pomiaru stosowana w urządzeniu opiera się na monitorowaniu zmian w impedancji, które związane są z adhezją agregatów płytkowych na powierzchni elektrod. W agregometrze wykorzystuje się tzw. wielokrotną agregację elektrodową. Podczas badania każdy pomiar wykonywany jest podwójnie na niezależnych elektrodach zanurzonych w próbce krwi. W czasie procesu agregacji, płytki krwi osiadają na elektrodach, efektem czego jest zmiana ich impedancji. Pomiar zakresu zmiany impedancji pozwala ustalić nasilenie procesu agregacji. Podczas każdego z pomiarów 300  $\mu$ l 0.9% NaCl o temperaturze 37 °C i 300  $\mu$ l krwi pełnej inkubowane jest w temperaturze 37 °C, przez co najmniej 3 minuty. Następnie rozpoczyna się pomiar agregacji, trwający 6 min (przeprowadzany jest w podobnych warunkach termicznych). Odpowiedź agregacyjną krwi pełnej dla każdej dawki promieniowania badano przy użyciu trzech różnych agonistów: adenozyno-5`-difosforanu (ADP) w stężeniu końcowym 3,2  $\mu$ M, kolagenu w stężeniu końcowym 1,05  $\mu$ g/ml i proteiny aktywującej receptor trombinowy (TRAP-6) w stężeniu końcowym 10,5  $\mu$ M. W badaniu wykorzystano odczynniki firmy, Roche Diagnostics (Szwajcaria).

### 3.8. *Oznaczanie parametrów aktywności płytek oraz osi syntezy NO.*

Oznaczanie markerów aktywności płytek krwi tj. sP-selektyny oraz PF-4 wykonano metodą immunoenzymatyczną (ELISA). W tym celu wykorzystano wcześniej przygotowane i zamrożone osocze. Pomiaru stężenia selektyny P dokonano przy użyciu komercyjnego testu Human sP-Selectin/CD62P Immunoassay (o numerze katalogowym BBE6) firmy R&D Systems, (Wielka Brytania) o czułości 0,5 ng/ml, zgodnie z instrukcją producenta. Wykorzystano technikę

kanapkową metody immunoenzymatycznej, gdzie do fazy stałej z przeciwciałami mysimi skierowanymi przeciwko ludzkiej P-selektynie dodawano standard i próbki badane. Następnie dodawano koniugat peroksydazy chrzanowej i poliklonalnych przeciwciał owczych skierowanych przeciwko P-selektynie i po godzinnej inkubacji całość przemywano trzykrotnie z wykorzystaniem płuczki automatycznej Elx 50 firmy BioTek (USA). Do przemytych i osuszonych dołków płytki dodawano następnie roztwór tetrametylobenzydyny, celem rozwinięcia reakcji kolorymetrycznej, którą przerywano po 15 min. roztworem kwasu. W ciągu 30 min. od przerywania reakcji mierzono gęstość optyczną przy  $\lambda$  450 nm z zastosowaniem filtra korekcyjnego 620 nm, wykorzystując spektrofotometr mikropłytek wraz z oprogramowaniem Epoch firmy BioTek Instruments (USA).

Do pomiaru stężenia PF-4 w osoczu wykorzystano komercyjny test Human PF-4 ELISA firmy RayBiotech Inc, (USA) o czułości 20 pg/ml, zgodnie z instrukcją producenta. Zastosowano technikę kanapkową gdzie do dołków opłaszczonych monoklonalnymi przeciwciałami skierowanymi przeciwko PF-4 dodawano standard i próbki badane. Po 2,5 godzinnej inkubacji do 4-krotnie przemytych i osuszonych dołków dodawano przeciwciało związane kowalencyjnie z biotyną (biotynylowane) i inkubowano 1 godzinę. Po powtórzeniu przemywania i osuszania dołków dodawano następnie roztwór streptawidyny i prowadzono inkubację przez 45 min. Dołki ponownie płukano a następnie dodano roztwór tetrametylobenzydyny, celem rozwinięcia reakcji kolorymetrycznej. Przerywano ją po 30 min. 0,2 M roztworem kwasu siarkowego i mierzono gęstość optyczną przy  $\lambda=450\text{nm}$ , wykorzystując czytnik mikropłytek wraz z oprogramowaniem Elx800UV firmy BioTek Instruments (USA).

Ocenę syntezy tlenu azotu dokonano pośrednio poprzez analizę osi PRMT-L-Arg/ADMA-DDAH. Do oznaczeń L-argininy i jej metylowych pochodnych, wykorzystano technikę wysokosprawnej chromatografii cieczowej – HPLC. Badanie wykonano na sterowanym komputerowo przez oprogramowanie Star Chromatography Workstation (wersja 6.3) - aparacie firmy Varian (USA), w następującej konfiguracji: pompa Pro Star 240, automatyczny podajnik próbek z funkcją mieszania reagentów Pro Star 410, detektor spektrofluorescencyjny Pro Star 360, kolumna chromatograficzna Symmetry C 18 150 x 4,6 mm, 5 $\mu$  firmy Waters Co. (USA) termostатовana w 35°C. Dla ochrony kolumny właściwej zastosowano przedkolumnę ze złożem

tego samego typu. Przed rozdziałem chromatograficznym, do próbek badanych i wzorcowych, dodano L- homoargininy jako standardu wewnętrznego, w ilości 10  $\mu\text{mol/l}$ . Następnie, po rozcieńczeniu, odbiałczeniu i odwirowaniu, uzyskane roztwory poddano ekstrakcji do fazy stałej - SPE na kolumnkach SCX – 50 firmy Varian Inc. (USA). Otrzymane eluaty, po przeprowadzeniu reakcji derywatywacji z odczynnikiem OPA - zadozowano na kolumnę chromatograficzną. Faza ruchoma, którą stanowił 50 Mm bufor fosforanowy (pH 6,6) z dodatkiem 12 % acetonitrylu v/v, podawana była w systemie izokratycznym przy przepływie 1,1 ml/min. Detekcję fluorescencyjną rejestrowano odpowiednio przy długości fali wzbudzenia 340 nm i emisji 450 nm. Stężenia oznaczanych parametrów wyliczono przez porównanie współczynników: L-argininy/L-homoargininy, ADMA/L-homoargininy i SDMA/L-homoargininy ze współczynnikami próbek wzorcowych o znanych stężeniach.

### 3.9. *Analiza Statystyczna*

Wyniki badań poddano szczegółowej analizie statystycznej. Do tego celu wykorzystano oprogramowanie Statistica 10.0 firmy StatSoft (Polska). Obliczono średnią arytmetyczną ( $\bar{x}$ ) i odchylenie standardowe (SD). Normalność rozkładu wyników weryfikowana była testem Shapiro-Wilka, natomiast jednorodność wariancji zmiennych i analizę homoscedastyczności dystrybucji zmiennych ciągłych - testem Levene'a. W przypadku występowania zmiennych ilościowych zależnych o rozkładzie normalnym wykorzystywano statystyki parametryczne - test T-Studenta, odpowiednio dla zmiennych, niepowiązanych lub zmiennych zależnych, zgodnie ze specyfiką prowadzonych analiz. W przypadku zmiennych o rozkładzie innym niż normalny, stosowano dla zmiennych niezależnych testy nieparametryczne - U Manna-Whitheya. Dla zmiennych powiązanych (próbki krwi od danego pacjenta naświetlane różnymi dawkami promieniowania) stosowano odpowiednio test Wilcoxon lub - w przypadku zmiennych o normalnej dystrybucji rozkładu i jednorodnej wariancji - test T dla zmiennych zależnych). Korelację obliczono wykorzystując współczynnik Spearmana lub Pearsona, w zależności od charakteru analizowanych zmiennych. Za istotne statystycznie uznawano wyniki na poziomie  $p < 0,05$ .

## 4. Wyniki

### 4.1. Wyniki badań agregometrycznych

#### 4.1.1. I etap badań

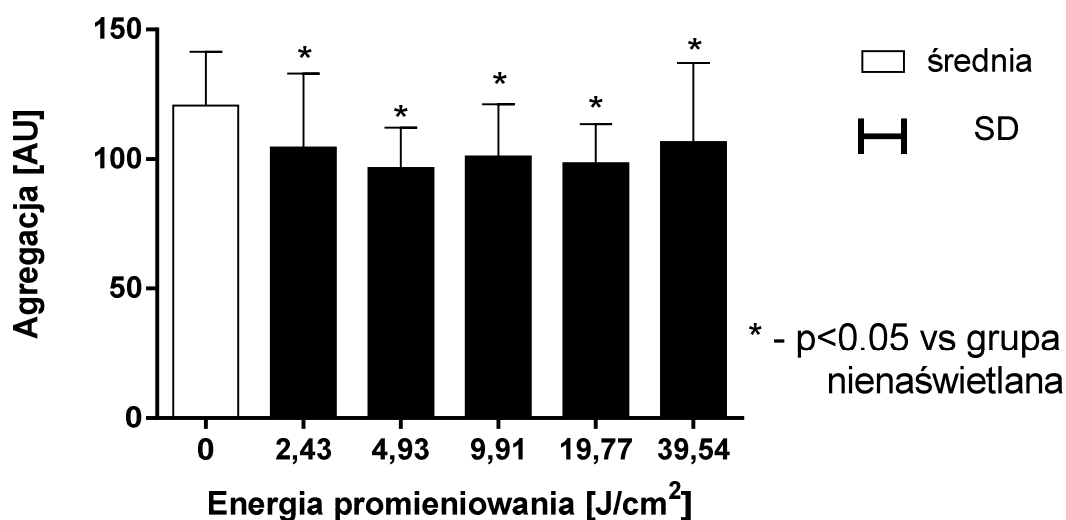
Celem uchwycenia maksymalnej zmiany agregacji płytek krwi pod wpływem niskoenergetycznego promieniowania laserowego przeprowadzono pierwszy etap badań. Na wykresach: 3, 4, 5 przedstawiono wyniki badań agregometrycznych, kolejno dla TRAP, kolagenu i ADP jako agonistów wywołujących agregację. Za próbę kontrolną przyjęto krew nienaświetlaną (na wykresach zobrazowaną jako dawka  $0 \text{ J/cm}^2$ ). W tabelach: 3, 5, 7 zestawiono wyniki pomiarów agregometrycznych z pierwszego etapu badania. Każdą z naświetlanych grup porównano względem kontrolnej nienaświetlanej próby. Dla każdej z zastosowanych dawek promieniowania laserowego, odnotowano statystycznie znamienne spadki wartości agregacji w stosunku do wartości wyjściowych.

#### 4.1.2. TRAP

W badanej grupie ( $n=9$ ) największą redukcję agregacji uzyskano w wyniku naświetlania dawką równą  $4,93 \text{ J/cm}^2$  średnio  $96,6 \pm 15,6 \text{ AU}$  (jednostek agregacji od ang. aggregation unit), natomiast dla grupy nienaświetlanej wynik wyniósł średnio  $120,6 \pm 20,7 \text{ AU}$ ,  $p=0,0076$ . Podobnie, znamienne statystycznie redukcję agregacji uzyskano dla dawek,  $2,43 \text{ J/cm}^2$ ,  $9,91 \text{ J/cm}^2$  oraz  $19,77 \text{ J/cm}^2$  ze średnimi wartościami agregacji wynoszącymi odpowiednio:  $96,6 \pm 15,6 \text{ AU}$ ;  $101 \pm 20,2 \text{ AU}$ ;  $98,4 \pm 15,0 \text{ AU}$ .

W przeprowadzonych w pierwszym etapie badania pomiarach nie występowały istotne statystycznie różnice w agregacji pomiędzy próbkami naświetlanymi różnymi dawkami promieniowania.

### Agregacja indukowana peptydem aktywującym receptor trombiny (TRAP)

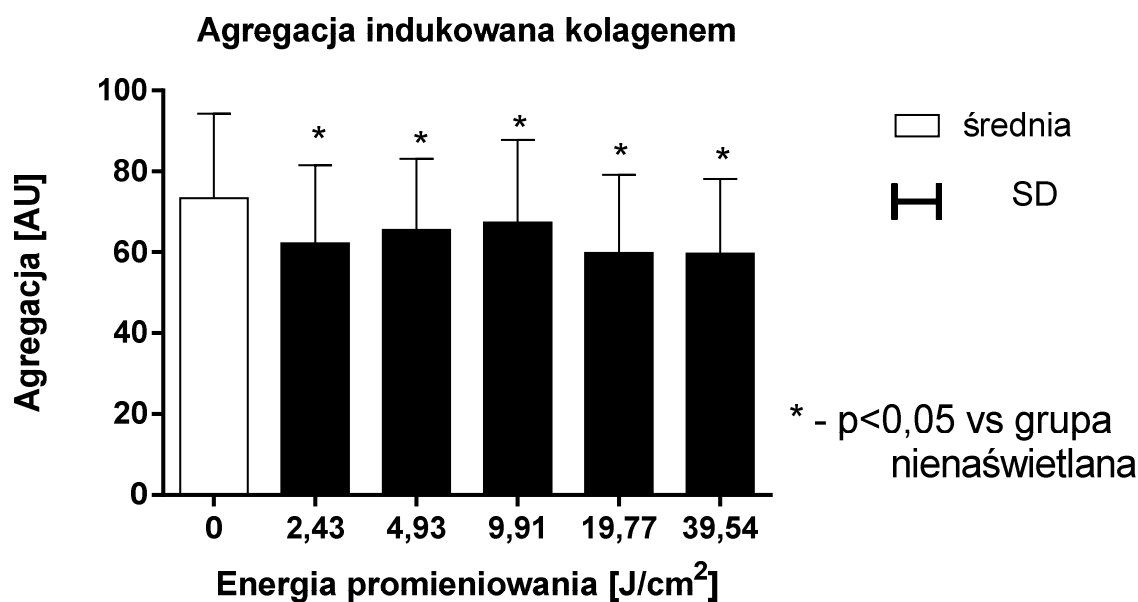


Wykres 3. Odpowiedź agregacyjna płytek krwi na TRAP jako agonistę względem różnych dawek promieniowania.

#### 4.1.1.2. Kolagen

Nieco odmienne wyniki otrzymano w przypadku próbek krwi, w której substancją wyzwalającą reakcję agregacji był kolagen. Najniższe średnie wartości współczynnika agregacji uzyskano w grupach poddanych promieniowaniu o gęstości energii równej 19,77 J/cm<sup>2</sup> (59,9 ± 19,3 AU) oraz 39,54 J/cm<sup>2</sup> (59,7 ± 18,5 AU);  $p=0,0072$  w obu przypadkach. Również dla pozostałych dawek energii, różnice pomiędzy grupą kontrolną (nienaświetlaną) a grupami poddanymi promieniowaniu, były istotne statystycznie ze współczynnikiem  $p$  odpowiednio: 0,0117 dla gęstości energii: 9,91 J/cm<sup>2</sup> (67,3 ± 20,4 AU);  $p=0,02$  dla 2,43 J/cm<sup>2</sup> (średnio 62,2 ± 19,3 AU) oraz 4,93 J/cm<sup>2</sup> (średnio 65,6 ± 17,6 AU).

Jedynie pomiędzy krwią naświetlaną dawką 9,91 J/cm<sup>2</sup>, a dawką 39,54 J/cm<sup>2</sup>, występowały istotne różnice ( $p=0,011$ ) w agregacji pomiędzy próbkami naświetlanymi różnymi dawkami promieniowania.

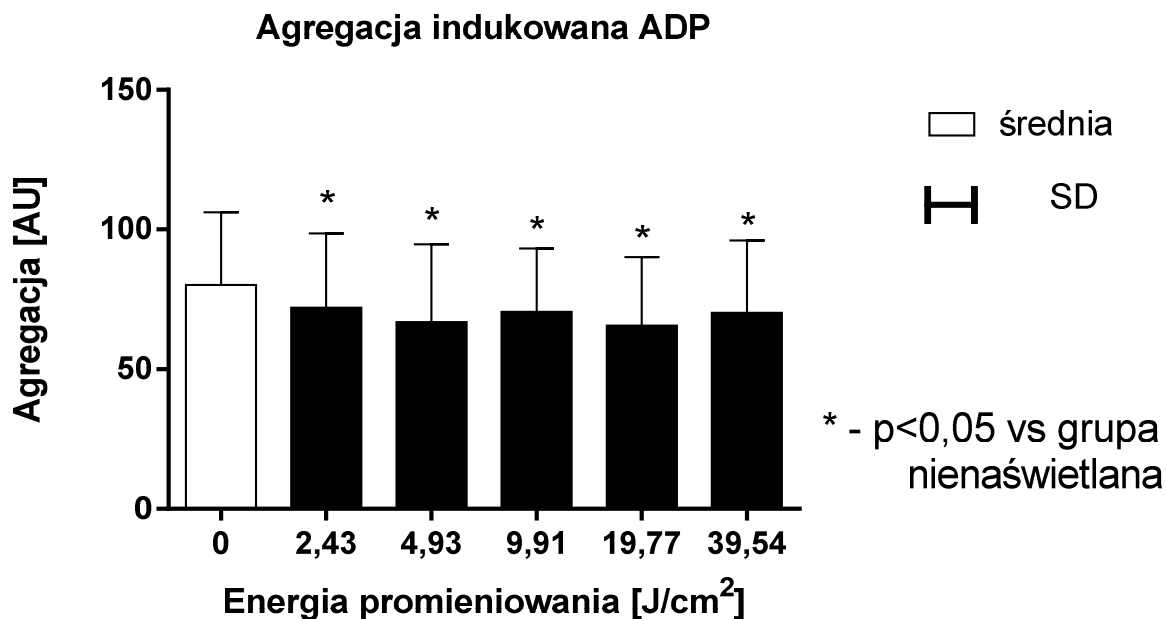


Wykres 4. Odpowiedź agregacyjna płytek krwi na kolagen jako agonistę względem różnych dawek promieniowania.

#### 4.1.1.3. ADP

W przypadku wykorzystania ADP jako agonisty, najniższą odpowiedź agregacyjną dała grupa naświetlana dawką promieniowania równą 19,77 J/cm<sup>2</sup>, ze średnią 65,6 ± 24,5 AU, z poziomem istotności statystycznej względem nienaświetlanej grupy, wynoszącym  $p=0,0108$ . Średnia dla grupy nienaświetlanej wyniosła 80,2 ± 26,0 AU. W przypadku dawki promieniowania: 2,43 J/cm<sup>2</sup> agregacja wyniosła 72,1 ± 26,5 AU ( $p=0,0117$ ); 4,93 J/cm<sup>2</sup> agregacja wyniosła 68,4 ± 29,4 AU ( $p=0,0151$ ); 9,91 J/cm<sup>2</sup> agregacja wyniosła 70,6 ± 22,6 AU ( $p=0,0128$ ) oraz dla dawki 39,54 J/cm<sup>2</sup> średnia agregacja wyniosła 70,2 ± 25,8 AU ( $p=0,0284$ ).

Nie występowały istotne statystycznie różnice w wartościach agregacji w odpowiedzi na ADP pomiędzy poszczególnymi dawkami promieniowania użytego w I etapie badania.



Wykres 5. Odpowiedź agregacyjna płytek krwi na ADP jako agonistę względem różnych dawek promieniowania.

#### 4.1.2. II etap badań agregometrycznych

Na podstawie przeprowadzonych w I etapie badań agregacyjnych i analizy statystycznej ich wyników, do kolejnej części badania użyto promieniowania o gęstości energii 19,77 J/cm<sup>2</sup> (jedyna dawka promieniowania spośród badanych, która wykazała najniższy współczynnik istotności statystycznej ( $p$ ) dla wszystkich badanych agonistów). Do grupy badanej włączono 41 osób. Dla wszystkich użytych agonistów (ADP, TRAP, kolagen) uzyskano wyniki istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ) względem kontrolnych nienaświetlanych grup. Wyniki zestawiono w tabeli 3.



Tabela 3. Wyniki agregacji płytek krwi z II etapu badania dla TRAP jako agonisty oraz ocena ich wzajemnej istotności statystycznej.

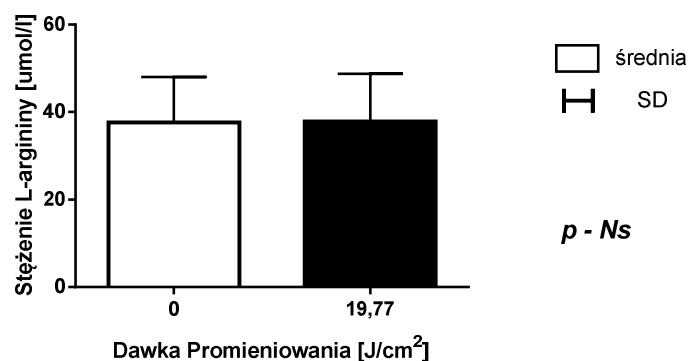
Dawka Promieniowania [J/cm <sup>2</sup> ]	Średnie agregacji ± SD w odpowiedzi na TRAP [AU]	Średnie agregacji ± SD w odpowiedzi na kolagen [AU]	Średnie agregacji ± SD w odpowiedzi na ADP [AU]
0	105,0 ± 23,5	64,7 ± 22,3	72,9 ± 22,7
vs	vs	vs	vs
19,77	91,5 ± 21,9 <i>p</i> <0,0001	57,7 ± 19,6 <i>p</i> =0,0001	66,8 ± 22,2 <i>p</i> =0,0004

#### 4.2. L-arginina, ADMA, SDMA

Biorąc pod uwagę dostępne w piśmiennictwie dane wskazujące na szlak metaboliczny tlenku azotu jako potencjalny mechanizm odpowiedzialny za zmianę reaktywności płytek krwi pod wpływem LLLT, w kolejnym etapie badań podjęto próbę falsyfikacji hipotezy badawczej o braku różnic w zakresie syntezy NO pomiędzy grupą kontrolną i naświetlaną.

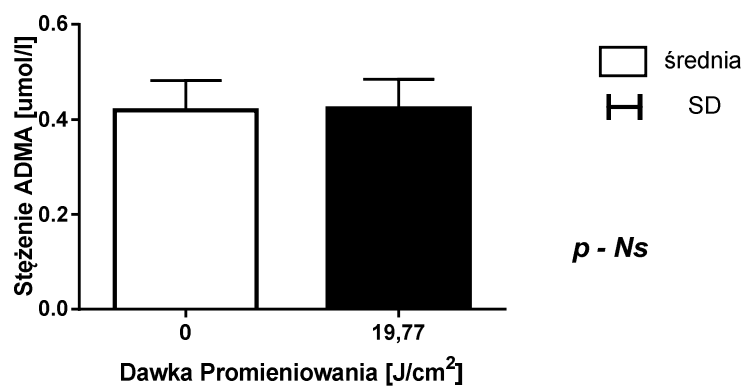
W celu oznaczenia wpływu aktywności LLLT na zmiany stężeń substratów reakcji syntezy NO, użyto kontrolnej, nienaświetlanej krwi oraz poddanej działaniu LLLT o energii 19,77 J/cm<sup>2</sup>. Nie występowały istotne statystycznie różnice w zakresie stężeń L-argininy, ADMA i SDMA pomiędzy obiema grupami.

Poziom L-argininy w grupie kontrolnej i naświetlanej.



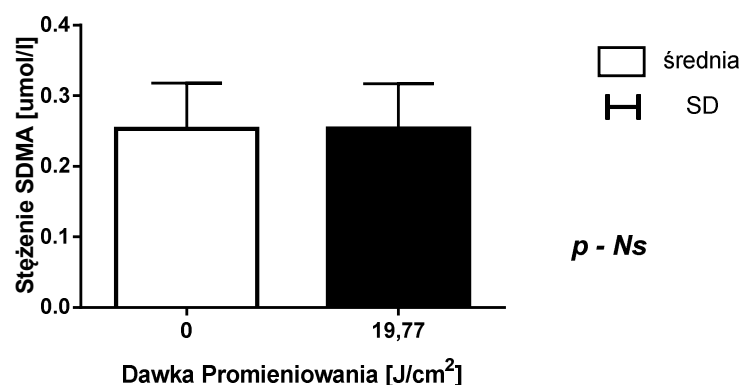
Wykres 6. Stężenie L-argininy w grupie kontrolnej i naświetlanej.

#### Poziom ADMA w grupie kontrolnej i naświetlanej.



Wykres 7. Stężenie ADMA w grupie kontrolnej i naświetlanej.

#### Poziom SDMA w grupie kontrolnej i naświetlanej.



Wykres 8. Stężenie SDMA w grupie kontrolnej i naświetlanej.

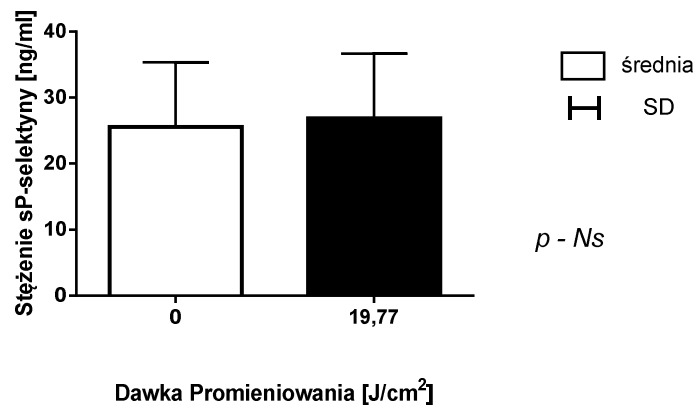
#### 4.3. Osoczowe markery aktywności płytek krwi

W kolejnym etapie badania podjęto próbę falsyfikacji hipotezy badawczej o braku wpływu LLLT na markery aktywacji płytek jakimi są: sP-selektyna oraz PF4. Poziom osoczowych markerów aktywności płytek zbadano w kontrolnych próbkach krwi oraz w krwi naświetlanej dawką niskoenergetycznego promieniowania laserowego wytypowaną w pierwszym etapie badań agregometrycznych.

#### 4.3.1. sP-selektyna

Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w stężeniu sP-selektyny w osoczu krwi kontrolnej i naświetlanej.

Poziom sP-selektyny w grupie kontrolnej i naświetlanej.



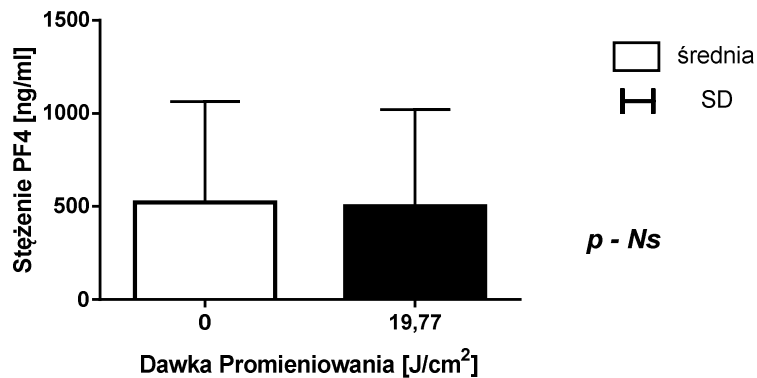
Wykres 9. Stężenie sP-selektyny w grupie kontrolnej oraz grupie naświetlanej.

Poziom sP-selektyny w krwi naświetlanej dodatnio koreluje z wartościami sP-selektyny w grupie kontrolnej ( $R= 0,88$ ;  $p<0,05$ ) oraz wynikami agregacji w odpowiedzi na TRAP zarówno w grupie naświetlanej ( $R= 0,53$ ;  $p<0,05$ ), jak i nie poddanej działaniu lasera ( $R= 0,43$ ;  $p<0,05$ ). Istnieje zależność pomiędzy stężeniem sP-selektyny w nienaświetlanych próbkach, a aktywnością agregacyjną na TRAP w kontrolnej ( $R= 0,52$ ;  $p<0,05$ ) i naświetlanej grupie ( $R= 0,60$ ;  $p<0,05$ ).

#### 4.3.2. PF4

Nie odnotowano istotnych różnic w stężeniu PF4, w obu badanych grupach. Wykazano natomiast, iż poziom PF4 w kontrolnej grupie koreluje dodatnio ( $R= 0,67$ ;  $p<0,05$ ) z poziomem PF4 w próbkach naświetlanych LLLT.

Poziom PF4 w grupie kontrolnej i naświetlanej.



Wykres 10. Stężenie PF4 w grupie kontrolnej oraz grupie naświetlanej.

#### 4.4. Heterogenność odpowiedzi na promieniowanie

Z uwagi na brak homogenności odpowiedzi agregacyjnej płytek na niskoenergetyczne promieniowanie laserowe, zdecydowano o poddaniu szczegółowej analizie statystycznej poszczególnych podgrup.

##### 4.4.1. Współczynnik zmiany agregacji

Obliczono współczynnik zmiany agregacji  $\beta$  (dla wszystkich trzech wykorzystanych w II etapie badania agonistów), za którego wartość przyjęto iloraz wartości agregacji po naświetlaniu i agregacji w grupie kontrolnej.

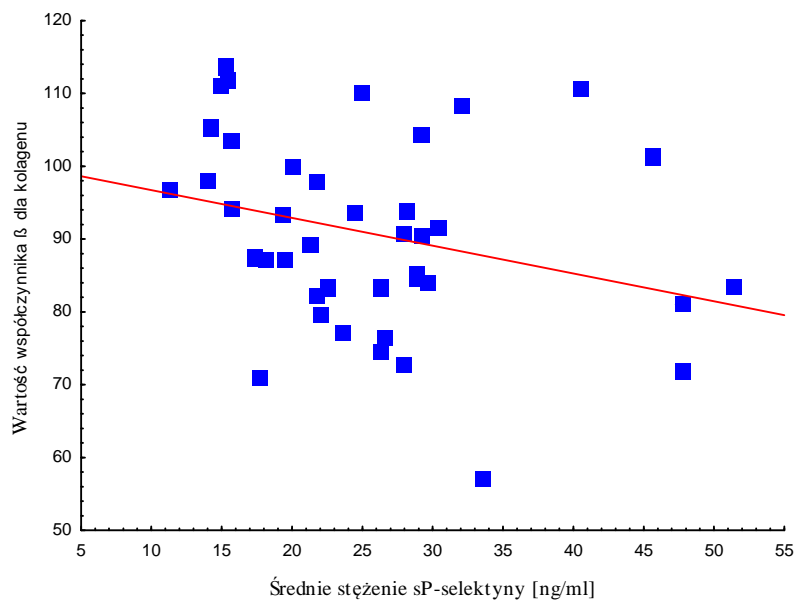
$\beta = (\text{średnia wartość agregacji po naświetlaniu laserem}) / (\text{średnia wartość agregacji w warunkach wyjściowych})$

Tabela 4. Średnie wartości współczynnika zmiany agregacji.

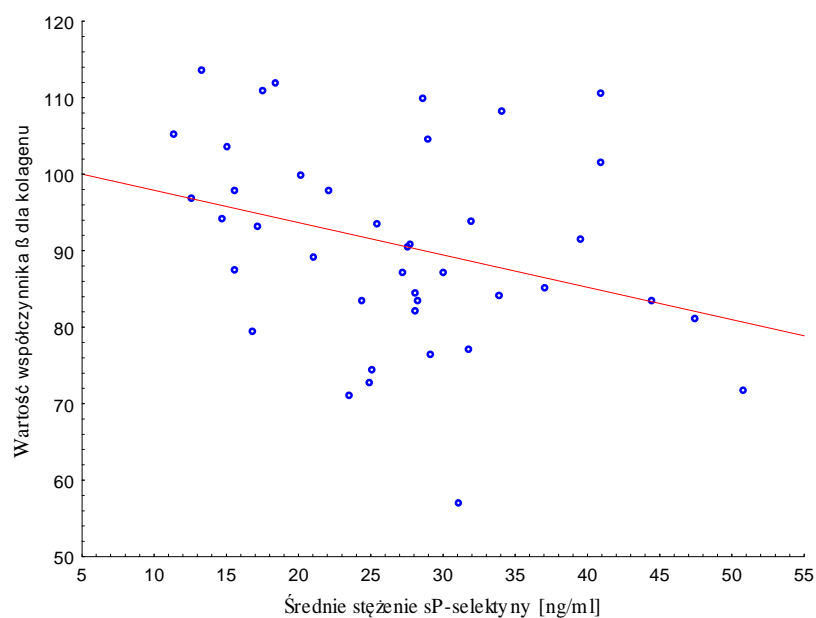
Wartość $\beta$ dla TRAP $\pm$ SD	Wartość $\beta$ dla kolagenu $\pm$ SD	Wartość $\beta$ dla ADP $\pm$ SD
87,5 $\pm$ 11,0	90,8 $\pm$ 13,1	92,0 $\pm$ 13,1

Okazało się, iż współczynnik zmiany dla kolagenu w sposób ujemny koreluje ze stężeniami s-P selektyny zarówno w próbkach naświetlanych ( $R = -0,31$ ;  $p < 0,05$ ) co widać na

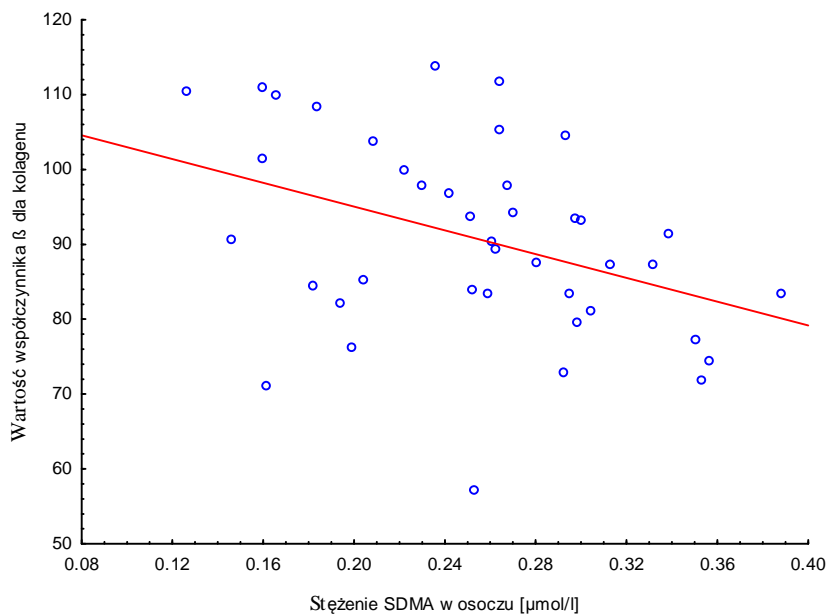
wykresie 12, jak i nie naświetlanych ( $R=-0,34$ ;  $p<0,05$ ) co przedstawiono na wykresie 11 oraz z poziomem SDMA w naświetlanej surowicy ( $R= -0,38$ ;  $p<0,05$ ) dane z wykresu 13.



Wykres 11. Korelacja poziomu s-Pselektyny oznaczonej w warunkach wyjściowych w osoczu ze współczynnikiem zmiany agregacji ( $\beta$ ) indukowanej kolagenem ( $R= -0,34$ ;  $p<0,05$ ).



Wykres 12. Korelacja poziomu sP-selektyny oznaczonej po naświetlaniu promieniowaniem laserowym ze współczynnikiem zmiany agregacji indukowanej kolagenem ( $R= -0,31$ ;  $p<0,05$ ).



Wykres 13. Korelacja poziomu SDMA oznaczonej po naświetlaniu promieniowaniem laserowym ze współczynnikiem zmiany agregacji indukowanej kolagenem ( $R = -0,34$ ;  $p < 0,05$ )

#### 4.4.2. Różnicowanie odpowiedzi agregacyjnej

Ze względu na heterogenną odpowiedź agregacyjną w podgrupach po naświetlaniu promieniowaniem laserowym dla wszystkich zadanych agonistów, dokonano podziału próbek na dwie podgrupy w zależności od kierunku odpowiedzi agregacyjnej na zastosowane promieniowanie.

Zgodnie z zastosowanym podziałem odnotowano: spadek średniej wartości agregacji ( $n=35$ ), brak zmiany lub wzrost agregacji ( $n=6$ ) dla TRAP. Analogicznego podziału dokonano dla kolagenu: spadek obserwowano w przypadku 30 próbek, przeciwny kierunek zmian zanotowano w przypadku 11 próbek. Dla ADP liczebność grupy, w której odnotowano spadek wyniosła 29, wzrost bądź brak zmiany odpowiedzi agregacyjnej zanotowano dla 12 próbek. Dla podgrup tych wyliczono średnie wartości agregacji w warunkach wyjściowych dla każdego agonisty oraz po naświetlaniu laserem, co przedstawiono w tabeli 5.

Tabela 5. Średnie wartości agregacji w zależności od odpowiedzi na zadanych agonistów.

Dawka promieniowania [J/cm <sup>2</sup> ]	Kierunek zmiany agregacji pod wpływem LLLT	Średnie agregacji ± SD zależna od TRAP [AU]	Średnie agregacji ± SD zależna od kolagenu [AU]	Średnie agregacji ± SD zależna od ADP [AU]
0	Spadek	106,3 ± 23,1 n=35	69,3 ± 19,9 n=30	75,1 ± 22,3 n=29
	Wzrost	98,0 ± 28,0 n=6	51,2 ± 23,7 n=11	67,4 ± 23,7 n=12
19,77	Spadek	90,2,3 ± 20,9 n=35	59,7 ± 18,0 n=30	67,3 ± 24,3 n=29
	Wzrost	100,0 ± 30,0 n= 6	54,4 ± 23,9 n=11	72,2 ± 25,1 n=12

#### 4.4.2.1. Różnicowanie odpowiedzi względem kolagenu

Przyjmując za dyskryminator kierunek zmian wartości agregacji indukowanej kolagenem w odpowiedzi na naświetlanie w stosunku do wartości wyjściowej, wyodrębniono dwie rozłączne podgrupy. Jedenastoosobową, w której odnotowano wzrost lub brak zmiany agregacji po naświetlaniu oraz trzydziestoosobową, w której naświetlanie zmniejszało agregację. W tak wyodrębnionych podgrupach, dokonano porównania stężeń metabolitów szlaku tlenu azotu, markerów aktywacji płytek, zarówno w warunkach wyjściowych, jak i po naświetlaniu. Chcąc w ten sposób podjąć próbę powiązania mechanizmów modulacji agregacji przez promieniowanie laserowe z ww. parametrami, a także spróbować wyjaśnić częściową heterogenność odpowiedzi. Predyktorem zmiany okazała się wyjściowa wartość agregacji indukowanej kolagenem. W grupie, w której odnotowywano spadek agregacji w odpowiedzi na naświetlanie była ona znacząco niższa w porównaniu do grupy z odnotowanym wzrostem lub brakiem zmiany agregacji w odpowiedzi na naświetlanie ( $54,4 \pm 24,0$  AU vs  $58,8 \pm 18,1$  AU;  $p=0,007$ ). Ponadto

grupa ze spadkiem agregacji w odpowiedzi na naświetlanie, cechowała się statystycznie istotnie wyższym średnim stężeniem SDMA po naświetlaniu w porównaniu do grupy, której odpowiedź była przeciwna ( $0,27 \pm 0,06 \mu\text{mol/l}$  vs  $0,21 \pm 0,05 \mu\text{mol/l}$ ;  $p=0,007$ ).

Tabela 6. Heterogenność badanych parametrów biochemicznych względem odpowiedzi agregacyjnej na kolagen.

Rodzaj badanego parametru		Średnie stężenie $\pm$ SD w grupie ze wzrostem agregacji	Średnie stężenie $\pm$ SD w grupie ze spadkiem agregacji	<i>p</i>
L-Arg po LLLT	[ $\mu\text{mol/l}$ ]	$35,6 \pm 10,3$	$38,3 \pm 10,5$	Ns
		<i>vs</i>	<i>vs</i>	
L-Arg kontrolna	[ $\mu\text{mol/l}$ ]	$38,0 \pm 12,1$	$38,0 \pm 11,5$	Ns
		<i>p=Ns</i>	<i>p=Ns</i>	
ADMA po LLLT	[ $\mu\text{mol/l}$ ]	$0,41 \pm 0,06$	$0,43 \pm 0,06$	Ns
		<i>vs</i>	<i>vs</i>	
ADMA kontrola	[ $\mu\text{mol/l}$ ]	$0,41 \pm 0,06$	$0,42 \pm 0,06$	Ns
		<i>p=Ns</i>	<i>p=Ns</i>	
SDMA po LLLT	[ $\mu\text{mol/l}$ ]	$0,21 \pm 0,05$	$0,27 \pm 0,06$	0,007
		<i>vs</i>	<i>vs</i>	
SDMA kontrola	[ $\mu\text{mol/l}$ ]	$0,22 \pm 0,06$	$0,27 \pm 0,06$	Ns
		<i>p=Ns</i>	<i>p=Ns</i>	
sP-selektyna po LLLT	[ng/ml]	$24,5 \pm 10,8$	$27,7 \pm 9,4$	Ns
		<i>vs</i>	<i>vs</i>	
sP-selektyna kontrolna	[ng/ml]	$24,3 \pm 11,1$	$26,0 \pm 9,4$	Ns
		<i>p=Ns</i>	<i>p=Ns</i>	
PF4 po LLLT	[ng/ml]	$530 \pm 375$	$528 \pm 597$	Ns
		<i>vs</i>	<i>vs</i>	
PF4 kontrolna	[ng/ml]	$440 \pm 482$	$524 \pm 539$	Ns
		<i>p=Ns</i>	<i>p=Ns</i>	



Tabela 7. Heterogenność agregacji względem odpowiedzi agregacyjnej na kolagen.

Agregacja w odpowiedzi na		Średnie stężenie ± SD w grupie ze wzrostem agregacji	Średnie stężenie ± SD w grupie ze spadkiem agregacji	<i>p</i>
TRAP po LLLT	[AU]	99,4 ± 23,4	107,2 ± 23,9	Ns
		<i>vs</i>	<i>vs</i>	
TRAP kontrola	[AU]	85,3 ± 26,3 <i>p</i> =0,026	94,0 ± 20,4 <i>p</i> <0,001	Ns
kolagen po LLLT	[AU]	54,4 ± 24,0	58,8 ± 18,1	0,007
		<i>vs</i>	<i>vs</i>	
kolagen kontrola	[AU]	51,2 ± 23,7 <i>p</i> =0,004	69,6 ± 19,9 <i>p</i> <0,001	Ns
ADP po LLLT	[AU]	58,2 ± 21,4	69,9 ± 22,0	Ns
		<i>vs</i>	<i>vs</i>	
ADP kontrola	[AU]	61,9 ± 21,7 <i>p</i> =Ns	76,4 ± 21,9 <i>p</i> =0,009	Ns
Współczynnik β dla TRAP		85,3 ± 14,6	88,4 ± 9,6	Ns
Współczynnik β dla kolagenu		107,3 ± 4,5	84,7 ± 9,3	<0,001
Współczynnik β dla ADP		94,3 ± 14,1	91,2 ± 12,8	Ns

#### 4.4.2.2. Różnicowanie odpowiedzi względem TRAP

Kolejnym krokiem było analogiczne rozdzielenie badanej populacji na dwie podgrupy, zależnie od kierunku zmiany agregacji indukowanej peptydem aktywującym receptor trombiny (TRAP), w odpowiedzi na promieniowanie laserowe. W ten sposób wyodrębniono trzydziestopięciosobową grupę, w której naświetlanie laserem powodowało spadek agregacji oraz sześćciosobową podgrupę, gdzie promieniowanie laserowe powodowało wzrost, bądź brak zmiany agregacji w odpowiedzi na tego agonistę. Analogicznie do analiz przeprowadzonych dla agregacji indukowanej kolagenem, dokonano porównania stężeń metabolitów szlaku tlenu azotu, markerów aktywacji płytek zarówno w warunkach wyjściowych, jak i po naświetlaniu, chcąc w ten sposób podjąć próbę powiązania mechanizmów modulacji agregacji przez

promieniowanie laserowe z ww. parametrami, a także podjąć próbę wyjaśnienia częściowej heterogenności odpowiedzi.

Tabela 8. Heterogenność parametrów biochemicznych względem odpowiedzi agregacyjnej na TRAP.

Rodzaj badanego Parametru		Średnie stężenie ± SD w grupie ze wzrostem agregacji	Średnie stężenie ± SD w grupie ze spadkiem agregacji	<i>p</i>
L-Arg po LLLT	[μmol/l]	35,8 ± 10,8	38,3 ± 10,4	Ns
		<i>vs</i>	<i>vs</i>	
L-Arg kontrolna	[μmol/l]	37,2 ± 11,2	38,5 ± 11,7	Ns
		<i>p</i> =Ns	<i>p</i> =Ns	
ADMA po LLLT	[μmol/l]	0,41 ± 0,07	0,42 ± 0,06	Ns
		<i>vs</i>	<i>vs</i>	
ADMA kontrolna	[μmol/l]	0,42 ± 0,06	0,41 ± 0,08	Ns
		<i>p</i> =Ns	<i>p</i> =Ns	
SDMA po LLLT	[μmol/l]	0,22 ± 0,08	0,26 ± 0,06	Ns
		<i>vs</i>	<i>vs</i>	
SDMA kontrolna	[μmol/l]	0,23 ± 0,07	0,26 ± 0,06	Ns
		<i>p</i> =Ns	<i>p</i> =Ns	
sP-selektyna po LLLT	[ng/ml]	32,7 ± 10,4	25,8 ± 9,2	Ns
		<i>vs</i>	<i>vs</i>	
sP-selektyna kontrolna	[ng/ml]	31,7 ± 10,4	24,6 ± 9,3	Ns
		<i>p</i> =Ns	<i>p</i> =Ns	
PF4 po LLLT	[ng/ml]	793 ± 824	475 ± 480	Ns
		<i>vs</i>	<i>vs</i>	
PF4 kontrola	[ng/ml]	793 ± 785	451 ± 457	Ns
		<i>p</i> =Ns	<i>p</i> =Ns	

Tabela 9. Heterogenność agregacji względem odpowiedzi agregacyjnej na TRAP.

Agregacja w odpowiedzi na		Średnie stężenie $\pm$ SD w grupie ze wzrostem agregacji	Średnie stężenie $\pm$ SD w grupie ze spadkiem agregacji	<i>p</i>
TRAP po LLLT	[AU]	100,0 $\pm$ 30,0	90,2 $\pm$ 20,9	Ns
		<i>vs</i>	<i>vs</i>	
TRAP kontrola	[AU]	98,0 $\pm$ 28,2	106,3 $\pm$ 23,2	Ns
		<i>p</i> =Ns	<i>p</i> <0,001	
kolagen po LLLT	[AU]	48,2 $\pm$ 23,0	59,3 $\pm$ 18,8	Ns
		<i>vs</i>	<i>vs</i>	
kolagen kontrola	[AU]	54,8 $\pm$ 26,1	66,4 $\pm$ 21,6	Ns
		<i>p</i> =Ns	<i>p</i> =0,003	
ADP po LLLT	[AU]	65,2 $\pm$ 22,1	67,1 $\pm$ 22,5	Ns
		<i>vs</i>	<i>vs</i>	
ADP kontrola	[AU]	65,3 $\pm$ 21,7	74,2 $\pm$ 22,6	Ns
		<i>p</i> =Ns	<i>p</i> =0,001	
Wartość $\beta$ dla TRAP		101,9 $\pm$ 2,2	85,1 $\pm$ 10,0	<0,001
Wartość $\beta$ dla kolagenu		90,2 $\pm$ 17,0	90,8 $\pm$ 12,6	Ns
Wartość $\beta$ dla ADP		102,2 $\pm$ 13,9	90,3 $\pm$ 12,3	0,004

W przypadku TRAP nie odnotowano statystycznie znamienych różnic w zakresie metabolitów szlaku tlenu azotu, zarówno pomiędzy podgrupami, jak i dokonując porównania przed i po naświetlaniu. Nie wykazano statystycznie istotnych różnic dla markerów aktywacji płytek. W przeciwieństwie do kolagenu, w omawianej analizie, wyjściowa agregacja indukowana TRAP, nie okazała się predyktorem odpowiedzi na naświetlanie. Ciekawą obserwacją jest natomiast odnotowanie statystycznie znamiennej różnicy w zakresie współczynnika zmiany agregacji  $\beta$  indukowanej ADP.

#### 4.4.2.3. Różnicowanie odpowiedzi względem ADP

Następnie dokonano analogicznych analiz dla agregacji indukowanej ADP. W wyodrębnionych podgrupach pierwszej, o  $n=29$  ze spadkiem agregacji indukowanej ADP w odpowiedzi na naświetlanie i drugiej, o  $n=12$  ze wzrostem agregacji bądź brakiem zmiany w zakresie agregacji indukowanej ADP w odpowiedzi na naświetlanie. Podobnie jak w przypadku agregacji indukowanej TRAP, nie odnotowano znamienych różnic pomiędzy metabolitami szlaku tlenu azotu oraz markerami aktywacji płytek zarówno w warunkach wyjściowych, jak i po naświetlaniu. Podobnie nie odnotowano statystycznie znamienych modulujących efektów naświetlania w zakresie wyżej wymienionych parametrów, w każdej z podgrup analizowanej oddzielnie. Analogicznie, jak w przypadku agregacji indukowanej TRAP, gdzie zauważono statystycznie znamienne różnicę w zakresie współczynnika zmiany agregacji  $\beta$  indukowanej ADP, w przypadku analizy agregacji indukowanej ADP, zauważono, że podgrupy różniły się współczynnikiem  $\beta$  dla agregacji indukowanej TRAP.

Tabela 10. Heterogenność względem odpowiedzi agregacyjnej na ADP.

Rodzaj badanego Parametru		Średnie stężenie ± SD w grupie ze wzrostem agregacji	Średnie stężenie ± SD w grupie ze spadkiem agregacji	<i>p</i>
L-Arg po LLLT	[μmol/l]	33,1 ± 7,4	39,5 ± 11,0	Ns
		<i>vs</i>	<i>vs</i>	
L-Arg kontrolna	[μmol/l]	34,0 ± 8,9	39,7 ± 12,2	Ns
		<i>p</i> =Ns	<i>p</i> =Ns	
ADMA po LLLT	[μmol/l]	0,41 ± 0,06	0,43 ± 0,06	Ns
		<i>vs</i>	<i>vs</i>	
ADMA kontrolna	[μmol/l]	0,40 ± 0,06	0,43 ± 0,06	Ns
		<i>p</i> =Ns	<i>p</i> =Ns	
SDMA po LLLT	[μmol/l]	0,23 ± 0,07	0,26 ± 0,06	Ns
		<i>vs</i>	<i>vs</i>	
SDMA kontrolna	[μmol/l]	0,23 ± 0,06	0,26 ± 0,06	Ns
		<i>p</i> =Ns	<i>p</i> =Ns	
sP-selektyna po LLLT	[ng/ml]	27,5 ± 10,8	26,6 ± 9,5	Ns
		<i>vs</i>	<i>vs</i>	
sP-selektyna kontrolna	[ng/ml]	25,4 ± 10,3	25,6 ± 9,7	Ns
		<i>p</i> =Ns	<i>p</i> =Ns	
PF4 po LLLT	[ng/ml]	445 ± 564	553 ± 539	Ns
		<i>vs</i>	<i>vs</i>	
PF4 kontrolna	[ng/ml]	418 ± 564	546 ± 512	Ns
		<i>p</i> =Ns	<i>p</i> =Ns	

Tabela 11. Heterogenność agregacji względem odpowiedzi agregacyjnej na ADP.

Agregacja w odpowiedzi na		Średnie stężenie ± SD w grupie ze wzrostem agregacji	Średnie stężenie ± SD w grupie ze spadkiem agregacji	<i>p</i>
TRAP po LLLT	[AU]	99,7 ± 23,4	88,3 ± 20,6	Ns
		<i>vs</i>	<i>vs</i>	
TRAP kontrola	[AU]	106,6 ± 22,6	104,5 ± 24,6	Ns
		<i>p</i> =Ns	<i>p</i> <0,001	
kolagen po LLLT	[AU]	57,1 ± 22,8	57,9 ± 18,5	Ns
		<i>vs</i>	<i>vs</i>	
kolagen kontrola	[AU]	63,1 ± 25,4	65,3 ± 21,3	Ns
		<i>p</i> =Ns	<i>p</i> =0,009	
ADP po LLLT	[AU]	72,2 ± 25,1	64,5 ± 20,9	Ns
		<i>vs</i>	<i>vs</i>	
ADP kontrola	[AU]	67,4 ± 23,7	75,2 ± 22,3	Ns
		<i>p</i> =0,002	<i>p</i> <0,001	
Wartość β dla TRAP		93,1 ± 7,4	85,2 ± 11,5	0,009
Wartość β dla kolagenu		92,0 ± 13,1	90,3 ± 13,3	Ns
Wartość β dla ADP		93,2 ± 7,4	85,2 ± 11,5	<0,001

#### 4.5. Analiza kontrastywna różnic w podgrupach

Ze względu na rozrzut wartości markerów aktywacji płytek i metabolitów szlaku NO, dla każdego parametru wykazującego ciągłą dystrybucję wartości, dokonano podziału na tertyle. Następnie, dokonano próby znalezienia różnic w zakresie wartości agregacji zarówno wyjściowej, jak i po naświetlaniu laserem pomiędzy ww. tertylami wraz z następczą analizą *post hoc* w przypadku stwierdzenia różnic statystycznie znamienych.

#### *4.5.1. Metabolity szlaku tlenu azotu*

W niniejszym podrozdziale przedstawione zostaną wyniki analiz przeprowadzonych po podzieleniu średnich stężeń w osoczu L-Arg, ADMA i SDMA w warunkach wyjściowych oraz po naświetlaniu.

##### *4.5.1.1. L-Arg*

Nie odnotowano statystycznie znamiennych różnic między markerami aktywacji płytek ani wartościami agregacji, zarówno w warunkach wyjściowych jak i po naświetlaniu, porównując ze sobą tertyle stężeń L-Arg, zarówno w warunkach wyjściowych jak i po naświetlaniu

##### *4.5.1.2. ADMA*

W przypadku ADMA podobnie jak w przypadku L-Arg, nie rejestrowano statystycznie znamiennych różnic pomiędzy: wartościami agregacji, markerami aktywacji płytek; zarówno w warunkach wyjściowych jak i po naświetlaniu, porównując ze sobą tertyle osoczowych poziomów ADMA.

##### *4.5.1.3. SDMA*

Podobnie jak w przypadku pozostałych badanych osoczowych składników osi syntezy NO, nie wykazano znamiennych różnic między markerami aktywacji płytek, ani wartościami agregacji po naświetlaniu jak i w warunkach wyjściowych, porównując ze sobą tertyle stężeń SDMA przed naświetlaniem. Jednakże wykazano statystycznie znamienne różnice w zakresie współczynnika zmiany agregacji ( $\beta$ ), indukowanej kolagenem w zależności od tertyle stężeń SDMA zmierzonego po naświetlaniu ( $p=0,037$ ).

#### *4.5.2. Markery aktywności płytek*

Analogicznie do podziału średnich stężeń L-Arg, ADMA, SDMA, dokonano podziału osoczowych stężeń markerów aktywacji płytek krwi, zarówno w warunkach wyjściowych jak i po podaniu laseroterapii.

#### 4.5.2.1. PF4

Nie odnotowano statystycznie znamiennej różnicy między metabolitami szlaku tlenu azotu, ani wartościami agregacji, zarówno w warunkach wyjściowych jak i po naświetlaniu porównując ze sobą tertyle stężeń PF4.

#### 4.5.2.2. sP-selektyna

W przypadku analiz różnic w zakresie parametrów agregacji w zależności od sP-selektyny oznaczonej wyjściowo stwierdzono statystycznie znamienne różnice w agregacji indukowanej TRAP zarówno w warunkach wyjściowych ( $p=0,004$ ), jak i po naświetlaniu ( $p<0,001$ ). Analizując z kolei obecność różnic, zależnie od poziomu sP-selektyny po naświetlaniu wykazano statystycznie istotne różnice w zakresie agregacji indukowanej kolagenem w warunkach wyjściowych ( $p=0,045$ ) jak i współczynnika  $\beta$  ( $p=0,015$ ), a także wartości agregacji indukowanej TRAP zarówno w warunkach wyjściowych ( $p=0,029$ ), jak i po laseroterapii ( $p=0,007$ ).

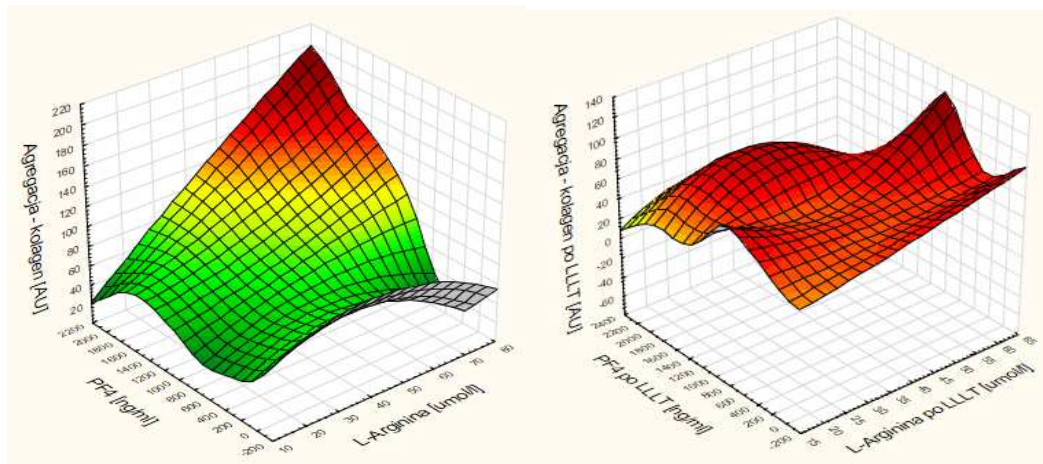
### 4.6. Ocena modulującej roli LLLT na mechanizm agregacji z uwzględnieniem mechanizmów syntezy NO oraz aktywacji płytek krwi

Poddano ocenie efekt modulującej roli LLLT na interakcje pomiędzy metabolitami szlaku biosyntezy tlenu azotu, markerami aktywacji śródbłonna a agregacją indukowaną różnymi agonistami - powierzchniowa analiza regresji.

#### 4.6.1. Agregacja indukowana kolagenem

Odnotowano znamienne spadki agregacji indukowanej kolagenem w analizie regresji ekstrapolując dane dla podgrupy z najwyższymi wartościami markera aktywacji płytek (PF4). Płytki krwi, które wykazywały wyższy stopień aktywacji, określony za pomocą oznaczeń stężeń PF4 wykazywały zatem wyższy stopień supresji agregacji w odpowiedzi na naświetlanie. Wspomniane zależności przedstawiono na wykresie 14.

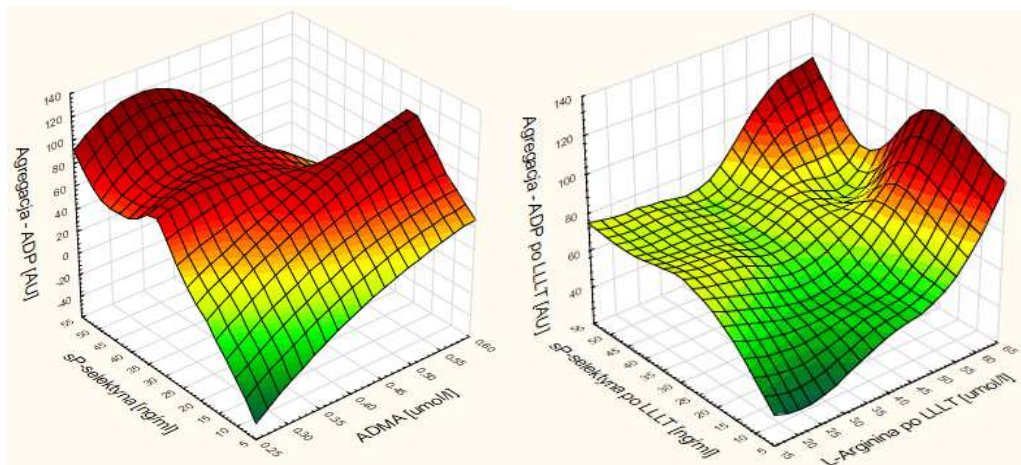




Wykres 14. Agregacja po kolagenie pod wpływem LLLT a potencjalne mechanizmy modulacji.

#### 4.6.2. Agregacja indukowana ADP

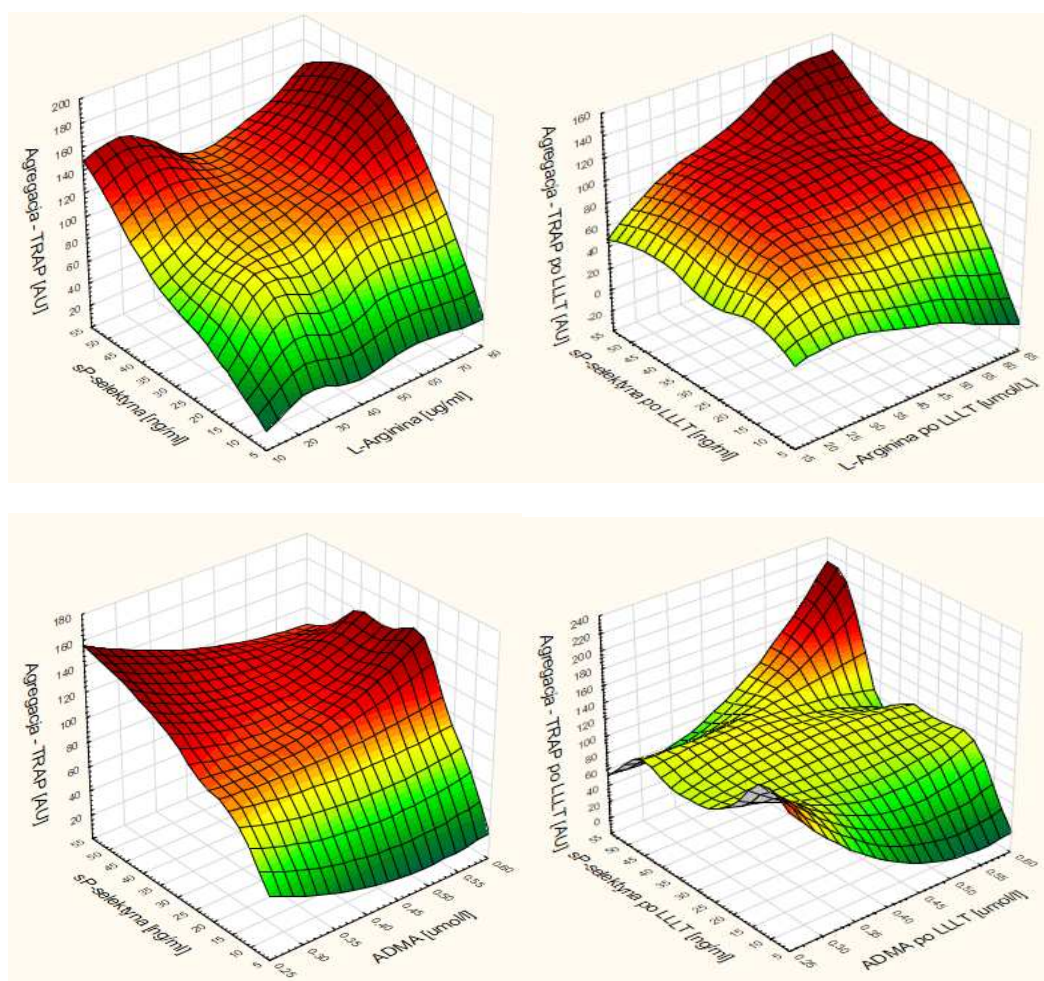
Ocena modulującej roli LLLT na interakcje pomiędzy inhibitorem kompetencyjnym syntazy tlenku azotu (ADMA), markerem aktywacji płytek (sP-selektyną) a agregacją indukowaną ADP wykazała znamienny spadek agregacji w analizie regresji ekstrapolując dane dla podgrupy z najwyższymi wartościami markera aktywacji płytek (wykres 15). Podobnie zatem, jak w przypadku PF4, największa odpowiedź antyagregacyjna dotyczyła próbek krwi o wyjściowo najwyższych stężeniach markera aktywacji płytek.



Wykres 15. Agregacja po ADP pod wpływem LLLT a potencjalne mechanizmy modulacji.

#### 4.6.3. Agregacja indukowana TRAP.

W przypadku agregacji indukowanej TRAP nie odnotowano podobnych do opisanych powyżej zależności w zakresie interakcji z sP-selektyną i L-arg, natomiast zauważalny był, w przeciwieństwie do opisywanych wcześniej zależności, wzrost agregacji w podgrupie z wysokim wyjściowo poziomem ADMA i sP-selektyny (wykres 14).



Wykres 16. Agregacja TRAP zależna pod wpływem LLLT a potencjalne mechanizmy.

## 5. Dyskusja

Niniejsza praca miała na celu optymalizację modelu badawczego, który umożliwi ocenę modyfikacji odpowiedzi agregacyjnej krwi poprzez niskoenergetyczne promieniowanie laserowe w zadanych, ściśle kontrolowanych i powtarzalnych warunkach *in vitro*. Ponadto postanowiono zbadać ewentualne mechanizmy biologiczne, poprzez które LLLT modyfikuje odpowiedź agregacyjną, z jednoczesnym określeniem wpływu niskoenergetycznego promieniowania laserowego na aktywność biologiczną płytek krwi oraz gospodarki NO.

### 5.1. Model badawczy.

Z uwagi na fakt, iż niskoenergetyczne promieniowanie laserowe wykorzystywane jest w codziennej praktyce klinicznej, autor postanowił dobrać model badawczy w taki sposób, by jak najbardziej odpowiadał warunkom naturalnym (między innymi z tego względu zdecydowano o badaniu odpowiedzi agregacyjnej krwi pełnej, a nie jej preparatów np. PRP) i mógł stać się solidną podstawą do prowadzenia dalszych badań, zarówno w modelach *in vitro*, jak i *in vivo*. Biorąc pod uwagę dostępną literaturę z zakresu wpływu niskoenergetycznego promieniowania laserowego na odpowiedź agregacyjną płytek krwi, jest to pierwsza próba usystematyzowania metodologii badań nad tym zjawiskiem. W zamierzeniu autora niniejsza praca ma pozwolić ocenić wpływ LLLT na agregację, jak również przybliżyć potencjalny mechanizm, poprzez który promieniowanie laserowe wywiera wpływ na procesy agregacji. Z uwagi na słabo poznany charakter zjawisk zachodzących w krwi pod wpływem napromieniowania LLLT, najlepszy (między innymi ze względów bioetycznych, bezpieczeństwa osób badanych, jak również konieczności wielokrotnych pomiarów w porównywalnych warunkach) był model badawczy *in vitro*. Pozwoliło to na zminimalizowanie ewentualnych zmiennych, wpływających na otrzymywane wyniki oraz ściśle kontrolowanie warunków, w których badanie było przeprowadzane. Dzięki temu, możliwe było użycie szerokiego spektrum dawek promieniowania bez obaw o ewentualny szkodliwy efekt dla organizmu żywego.

### 5.2 Grupa badana.

Z charakterystyki demograficznej badanej grupy wynika, iż była ona jednorodna. W badaniu udział wzięli młodzi ludzie. Subpopulacje zrekrutowane do obu etapów badania nie różniły się w znaczący sposób i również stanowiły jednorodną grupę. Dzięki selekcji ochotników (młodzi, zdrowi, bez przewlekłych schorzeń, nie poddawani przewlekłej farmakoterapii) wydaje się, iż udało się uzyskać model „fizjologicznej” odpowiedzi krwi na działanie LLLT, oraz ograniczyć liczbę potencjalnych czynników modyfikujących otrzymane wyniki. Tego rodzaju dobór obiektu badań wydaje się konieczny, ze względu na słabo poznane mechanizmy oddziaływania LLLT na płytki krwi.

### 5.3. Parametry promieniowania i układ eksperymentalny.

W prowadzonych w badaniu procedurach naświetlania krwi pełnej, wykorzystano promieniowanie laserowe o długości  $\lambda=662$  nm. Dane dostępne w dotychczas publikowanej literaturze wskazują, iż do tego typu badań wykorzystywano fale z dwóch zakresów  $\lambda=600-700$ nm oraz  $\lambda=800-900$  nm<sup>163-170</sup>. Promieniowanie o tych długościach fal mieści się w tak zwanym „oknie terapeutycznym” dla LLLT. Związane jest to z faktem słabszego pochłaniania tej długości fali przez cząsteczki wody. Dzięki temu, możliwe jest oddziaływanie na morfotyczne składniki krwi. Ponadto wybór takiego zakresu fal powoduje zmniejszenie efektu termicznego LLLT, który nierozdzielnie związany jest z pochłanianiem energii promieniowania przez cząsteczki wody. Zważywszy na fakt, iż promieniowanie z zakresu fal o mniejszej długości ( $\lambda=600-700$  nm), mieści się w zakresie absorpcji dla hemoglobiny, możliwe jest zwiększenie „powinowactwa” wykorzystanego promieniowania do krwi pełnej. Promieniowanie o tak dobranej długości fali (leży w zakresie absorpcji ale nie w maksimum) pozwala na amplifikację potencjalnego efektu terapeutycznego dla pozostałych elementów morfotycznych krwi, w tym badanych w eksperymencie trombocytów, z jednoczesną redukcją nasilenia niepożądanego efektu termicznego. Warto zaznaczyć, że analiza spektrum długości fali, którą dokonano na potrzeby eksperymentu, potwierdziła monochromatyczny charakter promieniowania laserowego, emitowanego poprzez urządzenie wykorzystane do eksperymentu. Wykonane pomiary wykazują wysoką selektywność w zakresie emisji promieniowania o określonej długości fali jak na laser półprzewodnikowy (tego rodzaju źródło użyto w badaniu).

W tego rodzaju urządzeniach zazwyczaj trudno uzyskać wąskie spektrum promieniowania. Możliwe, iż lepszym rozwiązaniem byłoby użycie promieniowania o nie-monochromatycznym charakterze spektrum długości fali (z obu zakresów długości fal). Wiązałoby się to jednak z zwiększoną sumaryczną dawką energii pochłoniętej przez krew, co mogłoby nasilać efekt termiczny i istotnie zakłócać otrzymanywane wyniki.

W dotychczas prowadzonych badaniach z użyciem promieniowania laserowego, trudno w jednoznaczny sposób określić parametry promieniowania, któremu była podana naświetlana krew. Najczęściej autorzy przyjmowali zasadę, iż promieniowanie, które emituje laser jest promieniowaniem docierającym bezpośrednio do krwi, z pominięciem ewentualnych strat. Ten sposób opisu modelu badawczego niesie ze sobą pewne ograniczenia dotyczące precyzji pomiarów oraz utrudnia prawidłową estymację, interpretację i porównywanie wyników poszczególnych eksperymentów. Większość badaczy nie stosowała układów rozpraszających w swoich modelach badawczych<sup>163-169</sup>. W takim przypadku w założeniu teoretycznym emitowana wiązka laserowa dość dokładnie utrzymuje parametry, które ma na wyjściu z urządzenia laserowego (brak dodatkowego układu rozpraszającego/zakłócającego). Powoduje to jednak, iż krew naświetlana jest jedynie punktowo, nie zaś na całej swojej powierzchni i tym samym nie pozwala to we właściwy sposób zdefiniować objętości naświetlanej krwi oraz określić ilości rzeczywistej pochłoniętej dawki. Dodatkowym problemem jest kubatura naczyń, które wykorzystywane są do eksperymentów. Najczęściej mają one kształt prostopadłościanów, co w połączeniu z wąską wiązką promieniowania użytego w eksperymencie nasila jeszcze bardziej zjawisko niepełnego naświetlania krwi. Aby zaradzić tym problemom, użyto układu rozpraszająco-transmisyjnego dobranego w taki sposób, aby promieniowanie obejmowało całość krwi znajdującą się na płytce. Takie rozwiązanie, wprawdzie powodowało zmianę parametrów (polaryzacji oraz gęstości energii) promieniowania laserowego docierającego do badanej krwi, tym niemniej pozwoliło na naświetlanie całej powierzchni badanej próbki krwi i maksymalizację efektu biologicznego.

W celu uniknięcia znaczących błędów w opisie modelu badawczego, zastosowanego we własnym układzie eksperymentalnym, dokonano pomiarów charakterystyki promieniowania laserowego, które docierało do badanych próbek. Okazało się, iż wartości promieniowania odbiegają nieco od zakładanych, wyznaczonych na podstawie teoretycznych obliczeń. W toku

wykonywanych pomiarów udało się wyznaczyć dokładne właściwości promieniowania, które docierało do badanych próbek, co zaprezentowano w tabeli 2. Wykazano, iż są one nieznacznie wyższe od wyliczonych na podstawie teoretycznych założeń wartości. Pomimo tych różnic, można przyjąć, iż w pewnych granicach, dawki zastosowane w eksperymencie spełniają założenia modelu badawczego dotyczące geometrycznego wzrostu dawki promieniowania. Należy zaznaczyć, iż laser utrzymywał niemal idealnie pierwotnie ustawione parametry (zostało to potwierdzone pomiarami wykonanymi przy użyciu miernika mocy promieniowania w punkcie wyjścia promieniowania).

Z racji znacznych różnic w zakresie dawek promieniowania, używanych w dotychczas przeprowadzonych badaniach z wykorzystaniem LLLT, autor postanowił zoptymalizować pod tym względem model badawczy. Aby wybrać dawkę promieniowania, która w największym stopniu wpływa na zmianę właściwości zakrzepowych krwi, zdecydowano o użyciu promieniowania z możliwie szerokiego spektrum energii. W tym celu interwałowo dobierano kolejne dawki promieniowania tak, by tworzyły one ciąg geometryczny. Dzięki takiemu sposobowi doboru dawki, w I etapie badania, udało się wyznaczyć parametry promieniowania, dla których efekt biologiczny jest największy ( $19,77 \text{ J/cm}^2$ ) oraz takie, przy których zaczyna zanikać ( $39,54 \text{ J/cm}^2$ ). Ponadto w pracy tej po raz pierwszy, dzięki wykorzystaniu szerokiego spektrum gęstości energii, udało się zobrazować prawo Arndta-Schulza<sup>170</sup> dla zastosowanego w eksperymencie promieniowania laserowego. W przypadku dotychczas przeprowadzonych badań, które potwierdzały zmniejszenie odpowiedzi agregacyjnej płytek krwi, wykazywano jedynie liniową zależność pomiędzy zastosowaną dawką promieniowania, a efektem biologicznym<sup>169, 170</sup>.

#### 5.4. *Efekt termiczny.*

Pomimo, iż w dostępnej literaturze<sup>2</sup> panuje pogląd, że efekt termiczny promieniowania nie pojawia się przy mocach promieniowania poniżej  $100 \text{ mW/cm}^2$  (w badaniu wykorzystano moc o wartości  $53 \text{ mW/cm}^2$ ), zdecydowano o sprawdzeniu efektu termicznego dla wykorzystanego w eksperymencie zakresu promieniowania. Wykazano, iż w przypadku dawki promieniowania wykorzystanej w II etapie eksperymentu, wzrost temperatury naświetlanej krwi wyniósł  $1,6 \text{ }^\circ\text{C}$ . Z przedstawionych danych wynika, iż w przypadku parametrów promieniowania

użytego w badaniu, wbrew opisywanym wcześniej sugestiom, występuje efekt termiczny. Warto jednak podkreślić, iż podczas oceny agregacji w urządzeniach wykorzystywanych w badaniu, wynaczyniona uprzednio krew przez ponad 9 minut inkubowana jest w temperaturze powyżej 37 °C, dlatego wydaje się, iż wzrost temperatury podczas naświetlania ma pomijalny wpływ na otrzymywane wyniki. Należy zaznaczyć, że temperatura krwi wróciła do wartości sprzed procedury naświetlania po 150 sekundach. Z tej właśnie przyczyny autor postanowił wykonywać badania agregacyjne, po upływie 3 minut od zakończenia naświetlania.

#### *5.5. Badania agregacyjne.*

Z otrzymanych w toku badania danych wynika jasno, iż niskoenergetyczne promieniowanie laserowe zmniejsza odpowiedź agregacyjną płytek krwi we wszystkich badanych dawkach oraz w odpowiedzi na trzech badanych agonistach: ADP, TRAP, kolagen. Pomimo stosunkowo małej grupy badanej (9 pacjentów) uzyskane wyniki okazały się istotne statystycznie dla wszystkich wykorzystanych wartościach energii. W drugim etapie badania wyniki potwierdziły się na większej grupie badanych (wyniosła ona 41 osób), do tego etapu użyto jednej wyselekcjonowanej uprzednio dawki promieniowania. Co jest warte podkreślenia, w niniejszym badaniu po raz pierwszy udało się wykazać, iż efekt antyagregacyjny niskoenergetycznego promieniowania laserowego dotyczy również preparatów krwi pełnej.

Dotychczas prowadzone badania, których wyniki były analogiczne do otrzymanych przez autora wykorzystywały krew poddaną wstępnej preparatyce tj. w postaci osocza bogatopłytkowego (PRP). Warty podkreślenia jest fakt, iż otrzymane wyniki trudno w jednoznaczny sposób odnieść do dotychczas przeprowadzonych badań, głównie ze względu na poruszone wcześniej znaczne różnice metodologiczne, w tym różne długości fal emitowane przez laser oraz zakresy energii wykorzystane do badań. Zaprezentowane w niniejszej rozprawie wyniki stanowią jednak rozszerzenie i uzupełnienie badań przeprowadzonych uprzednio przez zespół Brill i wsp.<sup>163</sup>, gdzie wykazano zmniejszoną aktywność agregacyjną płytek krwi po naświetlaniu LLLT (o długości fali równej 632,8 nm, a zatem bardzo zbliżonej do wykorzystanej przez autora), mierzoną w klasycznym agregometrze optycznym, w odpowiedzi na TRAP jako agonistę. Co ciekawe, efekt ten nie był trwały i w zależności od pochłoniętej dawki, zanikał wraz z wydłużaniem czasu, który upłynął od naświetlania. Do podobnych wniosków doszli Ram



Mohan i wsp.<sup>169</sup>, którzy badali agregację płytek zawieszonych w PRP w odpowiedzi na naświetlanie niskoenergetycznym promieniowaniem laserowym. Wykazali oni zmniejszenie odpowiedzi agregacyjnej na kolagen, ADP i ristocetynę. W połączeniu z otrzymanymi w niniejszej pracy wynikami może to sugerować, iż wpływ na modyfikację odpowiedzi agregacyjnej po naświetlaniu niskoenergetycznym promieniowaniem jest najprawdopodobniej konsekwencją zmian zachodzących bezpośrednio w trombocytach lub odbywa się to za pośrednictwem modulacji poza-morfotycznych elementów osocza. Otrzymane przez autora wyniki badań stoją z kolei w opozycji do badań zespołu Hoffmana<sup>167</sup>. Stwierdzili oni bowiem, iż LLLT nie modyfikuje odpowiedzi agregacyjnej płytek na trombinę. Ponadto, ich zdaniem LLLT zwiększa wytrzymałość powstających skrzepów, a także zwiększa zdolność wiązania niektórych czynników krzepnięcia na powierzchni płytek. Należy zaznaczyć, iż autorzy do badań wykorzystywali PRP i izolowane płytki, jak również stosowali wyłącznie pojedynczą dawkę energii (12 J/cm<sup>2</sup>), przenoszoną przez wąską wiązkę promieniowania, która nie obejmowała całej objętości wykorzystywanej w badaniu krwi. Mogło to w znaczący sposób wpływać na otrzymane wyniki. Prawdopodobnym jest, iż w przypadku tego eksperymentu dawka promieniowania użyta do naświetlania, nie mieściła się w tzw. „oknie terapeutycznym”. Świadczyć o tym mogą, chociażby wyniki wspomnianej uprzednio pracy Brill`a i wsp.<sup>163</sup>, gdzie przy wykorzystaniu promieniowania laserowego o innych parametrach, otrzymano wyniki świadczące o zmniejszaniu agregacji aktywowanej trombiną pod wpływem LLLT.

Jak wykazała analiza otrzymanych wyników badań agregometrycznych, odpowiedź na LLLT jest heterogenna. Niektórzy z badanych zareagowali zwiększeniem współczynnika agregacji po zastosowaniu LLLT. Trudno w jednoznaczny sposób określić przyczyny tego zjawiska. Żaden z przebadanych potencjalnych mechanizmów modyfikujących odpowiedź agregacyjną nie wykazał istotnych statystycznie różnic pomiędzy poszczególnymi grupami. Ciekawą obserwacją jest natomiast fakt, iż modulacja odpowiedzi agregacyjnej przez LLLT jest powiązana pomiędzy poszczególnymi agonistami. Tego rodzaju związek wykazano pomiędzy TRAP i ADP. Z wykonanych analiz wynika, iż modyfikacja odpowiedzi agregacyjnej krwi pełnej na LLLT w przypadku TRAP, była zarazem predykatorem zmian w zakresie agregacji, jako konsekwencji naświetlania LLLT dla ADP. Ponadto, wykazano analogiczny związek dla odpowiedzi na ADP co potwierdziło występowanie zależności pomiędzy odpowiedziami na tych



dwóch agonistów. Istnienie powiązania obu tych mechanizmów agregacyjnych, należy łączyć z powiązaniem szlaków transdukcji sygnałów wewnątrzkomórkowych, w odpowiedzi na obu agonistów i wzajemnym sprzężeniem przekaźników odpowiedzi komórkowej, które warunkują efektywną odpowiedź agregacyjną trombocytów <sup>171</sup>.

#### 5.6. *Potencjalne mechanizmy oddziaływania LLLT.*

Poza oceną odpowiedzi agregacyjnej, w niniejszej rozprawie porównano stopień aktywacji naświetlanych płytek krwi, w odniesieniu do kontrolnych (nienaświetlanych). W tym celu oznaczono poziom osoczowych markerów aktywacji płytek tj. PF4 i sP-selektyny w obu badanych grupach. Wykonane pomiary nie wykazały istotnych różnic pomiędzy naświetlaną i kontrolną grupą. Wydaje się, iż otrzymane wyniki stoją w tym zakresie w opozycji do rezultatów prac zespołu Brilla <sup>163</sup>, który w swojej pracy postuluje, iż pod wpływem LLLT następuje zmniejszenie poziomu P-selektyny. Biorąc jednak pod uwagę szczegóły metodologiczne zastosowane przez autorów, uznać należy, iż są one uzupełnieniem tych prac. Autor niniejszej rozprawy badał bowiem poziom rozpuszczalnej w osoczu frakcji P-selektyny, natomiast poprzednicy badali frakcję znajdującą się bezpośrednio na powierzchni trombocytów. Biorąc pod uwagę, iż autorzy obu prac wykorzystywali niskoenergetyczne promieniowanie laserowe o podobnej długości fal, można dojść do wniosku, iż LLLT modyfikuje raczej skład błon fosfolipidowych trombocytów, aniżeli substancji uwalnianych przez nie do osocza. Możliwe także, że ze względu na relacje objętościowe płytek do osocza (Pct), ilość uwalnianych przez płytki mediatorów do osocza powoduje stosunkowo niewielką ilościowo zmianę ich stężenia, co w połączeniu ze stosunkowo niedużą grupą badaną (41 osób) uniemożliwiło zobrazowanie zmian na poziomie statystycznej istotności.

W toku dalszych analiz okazało się, iż stężenie sP-selektyny zarówno przed, jak i po naświetlaniu w sposób ujemny koreluje ze współczynnikiem zmiany agregacji  $\beta$  dla kolagenu jako agonisty. Świadczy to pośrednio o zaangażowaniu tego markera aktywacji płytek krwi w proces odpowiedzi biologicznej trombocytów na LLLT. Wykazanie tego rodzaju związku jedynie dla odpowiedzi agregacyjnej na kolagen, przy braku takiej zależności dla pozostałych agonistów sugerować może, iż za modulację odpowiedzi agregacyjnej wskutek naświetlania laserem, odpowiedzialne są co najmniej dwa niezależne mechanizmy. Analizując zależność

agregacji od poszczególnych tertyli stężeń sP-selektyny zarówno przed, jak i po naświetlaniu wykazano związek z nasileniem agregacji indukowanej peptydem aktywującym receptor trombiny (TRAP).

Tlenek azotu jest czynnikiem rozszerzającym naczynia, ma także właściwości antyagregacyjne<sup>143, 144, 145</sup>. Uważa się, iż niskoenergetyczne promieniowanie laserowe modyfikuje funkcję cytochromów, czego efektem jest między innymi zwiększone wytwarzanie NO<sup>172</sup>. Jedną z hipotez badawczych stawianych przez autora zakładała, iż LLLT - poprzez wzrost aktywności osoczowych lub/i płytkowych frakcji NO - powoduje wzrost poziomu NO, a co za tym idzie, może modyfikować odpowiedź agregacyjną płytek krwi. Otrzymane wyniki nie potwierdziły jednak tego przypuszczenia. W materiale własnym nie obserwowano istotnych różnic w poziomach L-arg, ADMA, SDMA pomiędzy obiema badanymi grupami, z czego można wnioskować, iż LLLT nie nasilało zatem w istotny sposób syntezy tlenku azotu. Należy jednak zaznaczyć, iż grupa ze spadkiem agregacji w odpowiedzi na kolagen po poddaniu krwi na działanie LLLT wykazała się statystycznie wyższym stężeniem SDMA, względem kontrolnej nienaświetlanej grupy. Świadczyć to może o modulacji poprzez laser aktywności PRMT1 i PRMT2 powodując zachwianie proporcji ich aktywności i zmianę syntezy, tylko SDMA bez zmian syntezy ADMA. Możliwa byłaby także modulacja aktywności DDAH, jakkolwiek brak zmian stężenia ADMA, które jest degradowane przez ten enzym, przeczy tej tezie. Nie można wykluczyć, iż pomimo otrzymanych wyników to NO jest odpowiedzialny za spadek agregacji. Możliwe jest chociażby zwiększone jego uwalnianie z nitrozo-hemoglobiny (NO-Hb)<sup>58</sup>. Niestety w wykonanych badaniach nie ma możliwości określenia tej frakcji NO. W tym celu konieczne byłoby jednak oznaczenie azotanów jako metabolitów tlenku azotu, bądź też prześledzenie zmian ilościowych w zakresie cGMP jako wtórnego przekaźnika NO.

W niniejszej rozprawie przy użyciu powierzchniowej analizy regresji podano analizie modulującą rolę LLLT na interakcje pomiędzy metabolitami szlaku biosyntezy tlenku azotu, markerami aktywacji śródbłonna a agregacją indukowaną różnymi agonistami. Obserwowany modulujący wpływ LLLT na agregację indukowaną kolagenem w podgrupie z najwyższymi wyjściowymi wartościami PF4 może wskazywać na efekt osłabienia pro-agregacyjnej funkcji głównie w przypadku pre-aktywowanych płytek, co w spojrzeniu klinicznym może być szczególnie korzystnym zjawiskiem w populacji ze zwiększonym / wysokim ryzykiem sercowo -

naczyniowym i/lub z towarzyszącą opornością na leki przeciwplatekcyjne. Potencjalnie korzystnym zjawiskiem jest również modulujący wpływ LLLT na agregację indukowaną ADP w podgrupie z najwyższymi wyjściowymi wartościami sP-selektyny. Podobnie jak w przypadku analizowanej wcześniej interakcji pomiędzy agregacją indukowaną kolagenem, PF4 i L-Arg, może wskazywać na hamowanie preaktywacji płytek przez LLLT. Należy jednak wspomnieć, iż odnotowany wzrost agregacji indukowanej TRAP w podgrupie z wysokim wyjściowo poziomem ADMA i sP-selektyny, jako izolowany w odniesieniu do pozostałych agonistów wskazuje na rozłączność szlaków sygnałowych indukujących agregację w odpowiedzi na trombinę oraz ADP i kolagen<sup>171</sup>. Jest to efekt odmienny od oczekiwanego i w związku z tym wymagane są dalsze badania w tym zakresie, by móc w sposób bardziej jednoznaczny i precyzyjny określić modulującą rolę LLLT w subpopulacji z preaktywowanymi płytkami (tj. wyższymi wartościami stężeń markerów ich aktywacji i jednocześnie nieoptymalnej biodostępności tlenu azotu).

#### 5.7. Ograniczenia pracy.

Ograniczeniem pracy jest niewielka liczebność grupy badanej, jakkolwiek uzyskane dane pozwalają wykazać, iż niskoenergetyczne promieniowanie laserowe zmniejsza odpowiedź agregacyjną krwi pełnej w warunkach *in vitro*.

W projekcie nie badano pełnego profilu gospodarki tlenkiem azotu, a jedynie jej wybrany fragment (oś PRMT->L-Arg/ADMA->DDAH). Bardziej kompleksowe zbadanie szlaku biotransformacji tlenu azotu pozwoliłoby na definitywne określenie interakcji pomiędzy LLLT-NO, a agregacją płytek w krwi pełnej.

Opisane w pracy parametry, służące ocenie aktywacji i czynność płytek krwi (sP-selektyna, PF4), stanowią jedynie część możliwych do oceny, zważywszy jednak na stosunkowo skąpe dane literaturowe dotyczące wpływu LLLT na aktywację płytek krwi, stanowią one podstawę do dalszych badań.

Ponadto, pełna analiza wpływu niskoenergetycznego promieniowania laserowego na funkcje płytek krwi wymaga dalszych badań w modelu *in vivo*.

## 6. Wnioski.

1. Udało się zoptymalizować model badawczy pozwalający na naświetlanie próbek krwi w ściśle kontrolowanych i powtarzalnych warunkach.
2. Naświetlanie niskoenergetycznym promieniowaniem laserowym zmniejsza odpowiedź agregacyjną krwi pełnej na wybranych agonistów w warunkach *in vitro*.
3. Wszystkie zastosowane w eksperymencie dawki promieniowania wykazywały antyagregacyjny efekt, jakkolwiek najskuteczniejszą w tym aspekcie okazała się dawka o energii  $19,77 \text{ J/cm}^2$ .
4. Nie potwierdzono modulującego wpływu niskoenergetycznego promieniowania na poziom osoczowych markerów aktywności płytek.
5. Nie wykazano wpływu niskoenergetycznego promieniowania laserowego na wybrane markery szlaku biotransformacji tlenu azotu.

## **7. Streszczenie:**

### *7.1. Wstęp*

Słowo laser jest akronimem angielskich wyrazów: wzmocnienie światła poprzez wymuszoną emisję promieniowania (z ang. Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation). Od momentu skonstruowania pierwszego urządzenia laserowego ten rodzaj promieniowania jest obiektem badań i zainteresowań naukowców. Wpływ tego rodzaju promieniowania laserowego na funkcje komórki jest wielokierunkowy i nie w pełni poznany. Do najważniejszych modyfikacji jej aktywności należy: nasilanie procesów oddychania wewnątrzkomórkowego głównie poprzez aktywację enzymów łańcucha oddechowego, wzmaganie syntezy DNA i RNA, modyfikację procesów apoptozy. Naturalną konsekwencją tych zjawisk jest fakt, iż niskoenergetyczne promieniowanie laserowe znajduje zastosowanie w codziennej praktyce klinicznej w: chirurgii, ortopedii, onkologii, dermatologii, stomatologii czy kardiologii. Co ważne jednak, dokładny mechanizm terapeutycznego oddziaływania niskoenergetycznego promieniowania laserowego nie został w pełni poznany.

Trombocyty są morfotycznymi składnikami krwi pozbawionymi jądra komórkowego. Ich podstawowym zadaniem w organizmie ludzkim jest zapewnienie właściwej hemostazy. Biorą one również czynny udział w procesie odpowiedzi immunologicznej, onkogenezy czy modulacji reakcji zapalnej. Należy zaznaczyć, iż nadmierna aktywacja płytek krwi bierze czynny udział w etiopatogenezie licznych chorób, w szczególności schorzeń układu sercowo-naczyniowego, które są główną przyczyną zgonów w krajach wysokorozwiniętych. Istnieje wiele metod pomiaru aktywności płytek krwi. Do najważniejszych i najczęściej stosowanych należy: ocena ich funkcji agregacyjnej w różnego rodzaju agregometrach oraz ilościowa i jakościowa ocena substancji uwalnianych do osocza tzw. markerów aktywacji płytek. Wiele czynników ma wpływ na aktywność płytek krwi. Jednym z najlepiej poznanych, naturalnie występujących w organizmie ludzkim modulatorów aktywności płytek jest tlenek azotu, którego, jak sugerują liczne doniesienia, gospodarka w ludzkim organizmie może być modulowana przez LLLT.

W związku z coraz częstszym zastosowaniem niskoenergetycznego promieniowania laserowego w leczeniu tego rodzaju schorzeń istotnym zagadnieniem jest wpływ tego rodzaju oddziaływania na aktywność agregacyjną trombocytów. Niestety nieliczne dotychczas

prorowadzone badania nie dają jednoznacznej odpowiedzi na temat skuteczności i bezpieczeństwa tego rodzaju terapii.

### 7.2. Cel pracy

Celem pracy jest optymalizacja modelu badawczego, tak aby umożliwić jak najdokładniejsze zbadanie wpływu niskoenergetycznego promieniowania laserowego na odpowiedź agregacyjną krwi. Kolejnym z celów badania jest próba określenia potencjalnych mechanizmów mogących modulować odpowiedź agregacyjną krwi pod wpływem LLLT.

### 7.3. Materiał i metody

Do badania rekrutowano zdrowe osoby w wieku od 21 do 45 lat. Wykluczano ochotników z ostrymi i przewlekłymi schorzeniami a także przyjmujących leki i substancje wpływające na funkcję płytek krwi i gospodarkę tlenkiem azotu. Badanie podzielono na dwa etapy do pierwszego włączono 9 osób a do drugiego 41. W pierwszym etapie badania oceniano modyfikację odpowiedzi agregacyjnej krwi pełnej na trzech wybranych agonistów (TRAP, ADP, kolagen) w zależności od różnych dawek promieniowania laserowego ( $\lambda=662$  nm). Celem tego etapu badania było wytypowanie dawki promieniowania wykazującej największy efekt biologiczny. W drugiej części badania zbadano poziom wybranych markerów aktywacji płytek (PF4 i sP-selektyny) oraz aktywność procesów metabolizmu NO (poprzez ocenę osi PRMT-L-Arg/ADMA-DDAH). Uzyskane wyniki poddano opracowaniu statystycznemu. Do obliczeń wykorzystano program Statistica 10.0 StatSoft®.

### 7.4 Wyniki

Wszystkie wykorzystane w pierwszym etapie badania dawki promieniowania w sposób istotny statystycznie obniżały aktywność agregacyjną krwi pełnej w odpowiedzi na wszystkich trzech zadanych agonistów. Największy efekt biologiczny wykazano dla dawki promieniowania o energii równej  $19,77 \text{ J/cm}^2$ . W drugim etapie badania potwierdzono istotny statystycznie spadek agregacji pod wpływem ADP, TRAP i kolagenu po naświetlaniu niskoenergetycznym promieniowaniem laserowym ( $19,77 \text{ J/cm}^2$ ). Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w poziomach markerów aktywacji płytek (PF4, sP-selektyny) w grupie kontrolnej i naświetlanej.

Nie zaobserwowano istotnych różnic w stężeniach badanych metabolitów syntezy tlenku azotu (L-Arg, ADMA i SDMA) w grupie kontrolnej i naświetlanej.

#### 7.5. Wnioski

Udało się zoptymalizować model badawczy pozwalający na naświetlanie próbek krwi w ściśle kontrolowanych i powtarzalnych warunkach. Udowodniono, iż niskoenergetyczne promieniowanie laserowe obniża aktywność agregacyjną krwi *in vitro*. Nie potwierdzono jednak wpływu niskoenergetycznego promieniowania laserowego na proces biotransformacji tlenku azotu ani na poziom uwalniania markerów aktywacji płytek krwi.

## **8. Summary**

### *8.1. Introduction*

The term laser is an acronym for *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*. Since the laser device was constructed, such light sources are being a subject of numerous studies. The effect of laser radiation on cell function is multidirectional and not fully understood. The most important changes in cellular metabolism include: increase in activation of intracellular enzymes involved in the respiratory chain, increased synthesis of DNA and RNA, modification of apoptosis. The natural consequence of these phenomena is a fact that the low-energy laser radiation has found an application in routine clinical practice, such as: surgery, orthopedics, oncology, dermatology, dentistry or cardiology, however the exact mechanisms by which LLLT exerts therapeutic effect remain still not fully understood.

Thrombocytes are enucleated blood cells playing a pivotal role in the maintenance of hemostasis. They also participate in the process of immune response, oncogenesis or modulation of the inflammatory response. It should be noted that the excessive activation of platelets participates in the etiopathogenesis of many diseases, particularly cardiovascular disease, which is the main cause of death in well developed countries.

There are many methods for measuring platelet activity, and the most important and commonly used are: evaluation of aggregatory function or assessment of the substances released into the plasma known as "markers of platelet activation". Many factors are postulated to change platelet activity, among which one of the best known is nitric oxide. Low level laser therapy (LLLT) is postulated as one of the modulator of nitro oxide biotransformation in humans. Growing body of attention within the last few years is being paid to LLLT as a part of cardiovascular therapy. Hence, its effect on platelet function is an important issue. Unfortunately, so far only a few studies have been conducted and do not address properly this issue in terms of efficacy and safety of such therapeutic strategy.

### *8.2. Aim*

The aim of the study is to develop a research model which will allow to investigate the effect of low energy laser radiation on platelet aggregation. The identification of potential mechanisms that modulate platelet aggregation due to LLLT is the second goal of the study.



### 8.3. Material and methods

Only healthy volunteers, aged from 21 to 45 years were included to the study. The exclusion criteria were: acute or chronic diseases, chronic pharmacotherapy which could potentially affect platelet function or nitric oxide synthesis.

The study was divided into two phases: the first one included 9 subjects and the second 41. At the first stage of the study, platelet aggregation in response to three agonists (TRAP, ADP, collagen) was evaluated following previous platelet exposure to the different doses of laser radiation ( $\lambda=662$  nm). This was intended in order to establish the dose laser radiation which has demonstrated to exert the greatest biological effect. In the second part the experiment, the levels of platelet activation markers (PF4 and sP-selectin) and metabolites of the NO biosynthesis pathway were measured (both, before and after laser radiation). The statistical analysis was performed using Statistica 10.0 StatSoft®.

### 8.3 Results

All laser doses used in the first stage of study significantly reduced the platelet aggregation in response to all three agonists. The largest decrease in aggregation was observed in response to the radiation with an energy of  $19,77 \text{ J/cm}^2$ . Even though the second stage of study confirmed a statistically significant decrease of aggregation (ADP, collagen, TRAP used as agonist) after irradiation of low-energy laser radiation, no statistically significant differences in the levels of platelet activation markers (PF4, sP-selectin) between the control and irradiated group were noted. There were no significant differences in the amount of substrates for nitric oxide synthase (L-Arg, ADMA and SDMA) between the two analyzed groups.

### 8.4 Conclusions

Author managed to construct a research model which allows to irradiate the blood samples under strictly controlled and repeatable conditions. It has been proved that the low-energy laser radiation decreases platelet aggregation in *in vitro* models. However, no effect of low-energy laser radiation on the synthesis of nitric oxide nor on the level of platelet activation markers was observed.

Piśmiennictwo:

---

- <sup>1</sup> Maiman T, Stimulated optical radiation in ruby, *Nature*, 1960, 187, 493–494
- <sup>2</sup> Derkacz A, Śródnaczyniowe naświetlanie tętnic niskoenerygetycznym promieniowaniem laserowym jako nowa metoda prewencji nawrotu zwężenia po zabiegu angioplastyki wieńcowej, Wydawnictwo AM Wrocław, 2007
- <sup>3</sup> Mester E, Szende, B, Gartner P, The effect of laser beams on the growth of hair in mice, *Radiobiol Radiother*, 1968, 9, 621–626
- <sup>4</sup> Karu T, Molecular Mechanism of the therapeutic effect of Low-Intensity Laser Radiation, *Laser in life sciences*, 1988, 2(1), 53-74
- <sup>5</sup> Karu T, Photobiology of Low-Power Laser Effects, *Health Physics*, 1989, 56(5), 691-704
- <sup>6</sup> AlGhamdi K, Kumar A, Moussa N, Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells, *Lasers Med Sci*, 2012, 27(1), 237-249
- <sup>7</sup> Zhang J, Xing D, Gao X, Low-power laser irradiation activates Src tyrosine kinase through reactive oxygen species-mediated signaling pathway, *J Cell Physiol*, 2008, 217(2), 518-528
- <sup>8</sup> Karu T, Pyatibrat L, Kolyakov S, Afanasyeva N, Absorption measurements of a cell monolayer relevant to phototherapy: reduction of cytochrome c oxidase under near IR radiation, *J Photochem Photobiol B*, 2005, 81(2), 98-106
- <sup>9</sup> Pastore D, Greco M, Passarella S, The specific Helium-Neon laser sensitivity of the purified cytochrome c oxidase, *Int J Rad Biol*, 2000, 76, 863-870
- <sup>10</sup> Karu T, Pyatibrat L, Kalendo G, Photobiological modulation of cell attachment via cytochrome c oxidase, *Photochem Photobiol Sci*, 2004, 211-216

- 
- <sup>11</sup> Karu T, Low power laser therapy, In *Biomedical Photonics Handbook* Ed:Tuan Vo-Dinh. Boca Raton, CRC Press, 2003, 48(1), 48-25
- <sup>12</sup> Karu T, Pyatibrat, L, Kalendo, G, Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro, *J Photochem Photobiol B.*, 1995, 27, 219–223
- <sup>13</sup> Pastore D, Di Martino C, Bosco G, Passarella S, Stimulation of ATP synthesis via oxidative phos-phorylation in wheat mitochondria irradiated with helium-neon laser, *Biochem Molec Biol Int*, 1996, 39, 149–157
- <sup>14</sup> Tafur J, Mills P, *Low-Intensity Light Therapy:Exploring the Role of Redox Mechanisms*, *Photomed Laser Surg*, 2008, 26, 321-326
- <sup>15</sup> Xuejuan G, Xing D, Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low power laser irradiation, *Journal of Biomedical Science*, 2009, 16, 4
- <sup>16</sup> Shefer G, Oron U, Irintchev A, Wernig A i wsp., Skeletal muscle cell activation by low-energy laser irradiation: a role for the MAPK/ERK pathway, 2001, 187(1), 73-80
- <sup>17</sup> Karu T, *Low Power Laser Therapy*, In *Biomedical Photonics Handbook*, 2003, 48, 1-25
- <sup>18</sup> Kwolek A, Zwolińska J, Weres A, Wpływ dawki terapeutycznej na skuteczność laseroterapii nisko- i wysokoenergetycznej, *Acta Bio-Optica et Informatica Medica Inżynieria Biomedyczna*, 2011, 17(3), 171-178
- <sup>19</sup> AlGhamdi K, Kumar A, Moussa A, Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells, *Lasers Med Sci*, 2012, 27(1), 237-249
- <sup>20</sup> Huang L, Wu S, Xing D, High fluence low-power laser irradiation induces apoptosis via inactivation of Akt/GSK3 $\beta$  signaling pathway, *J Cell Physiol*, 2011, 226(3), 588-601

- 
- <sup>21</sup> Gao X, Chen T, Xing D, Wang F i wsp., Single cell analysis of PKC activation during proliferation and apoptosis induced by laser irradiation, *J Cell Physiol*, 2006 , 206(2), 441-448
- <sup>22</sup> Sun X, Wu S, Xing D, The reactive oxygen species-Src-Stat3 pathway provokes negative feedback inhibition of apoptosis induced by high-fluence low-power laser irradiation, *FEBS J* , 2010, 277(22), 4789-4802
- <sup>23</sup> Luo J, Glycogen synthase kinase 3beta (GSK3beta) in tumorigenesis and cancer chemotherapy, *Cancer Lett*, 2009, 273(2), 194-200
- <sup>24</sup> Yu-Shengyou, Li Y, Dexamethasone inhibits podocyte apoptosis by stabilizing the PI3K/Akt signal pathway, *Biomed Res Int*, 2013, doi: 10.1155/2013/326986
- <sup>25</sup> Gao X, Chen T, Xing D, Wang F i wsp., Single cell analysis of PKC activation during proliferation and apoptosis induced by laser irradiation, *J Cell Physiol*, 2006, 206(2), 441-448
- <sup>26</sup> Wang F, Chen T, Xing D, Wang J i wsp., Measuring dynamics of caspase-3 activity in living cells using FRET technique during apoptosis induced by high fluence low-power laser irradiation, *Lasers Surg Med*, 2005, 36(1), 2-7
- <sup>27</sup> Porter A, Jänicke R, Emerging roles of caspase-3 in apoptosis, *Cell Death Differ*, 1999, 6(2), 99-104
- <sup>28</sup> Houeild N, Abrahamse H, In vitro exposure of wounded diabetic fibroblast cells to a helium-neon laser at 5 and 16 J/cm<sup>2</sup>, *Photomed Laser Surg*, 2007, 25(2), 78-84
- <sup>29</sup> Ocaña-Quero J, Perez de la Lastra J, Gomez-Villamandos R, Moreno-Millán M, Biological Effect of Helium-Neon (He-Ne) Laser Irradiation on Mouse Myeloma (Sp2-Ag14) Cell Line In Vitro, *Lasers in Medical Science*, 1998, 13(3), 214-218
- <sup>30</sup> Santos Hde L, Rigos C, Tedesco A, Ciancaglini P, Biostimulation of Na, K-ATPase by low-energy laser irradiation (685 nm, 35 mW): comparative effects in membrane, solubilized and DPPC:DPPE-liposome reconstituted enzyme, *J Photochem Photobiol B*, 2007, 89(1) , 22-28

- 
- <sup>31</sup> Kassák P, Sikurová L, Kvasnicka P, Bryszewska M, The response of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> -ATPase of human erythrocytes to green laser light treatment, *Physiol Res*, 2006, 55(2), 189-194
- <sup>32</sup> Lopatina E, Yachnev I, Penniyaynen V, Plakhova V i wsp., Modulation of signal-transducing function of neuronal membrane Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase by endogenous ouabain and low-power infrared radiation leads to pain relief, *Med Chem*, 2012, 8(1), 33-39
- <sup>33</sup> Breitbart H, Levinshal T, Cohen N, Friedmann H i wsp., Changes in calcium transport in mammalian sperm mitochondria and plasma membrane irradiated at 633 nm (HeNe laser), *J Photochem Photobiol B*, 1996, 34(2-3), 117-121
- <sup>34</sup> Lubart R, Friedmann H, Sinykov M, Cohen N i wsp., Changes in calcium transport in mammalian sperm mitochondria and plasma membranes caused by 780 nm irradiation, *Lasers Surg Med*, 1997, 21, 493-499
- <sup>35</sup> Kokoska E, Wolff A, Smith G, Miller T, Epidermal growth factor-induced cytoprotection in human intestinal cells involves intracellular calcium signaling, *J Surg Res*, 2000, 88, 97-103
- <sup>36</sup> Lavi R, Shainberg A, Friedmann H, Shneyvays V i wsp., Low Energy Visible Light Induces Reactive Oxygen Species Generation and Stimulates an Increase of Intracellular Calcium Concentration in Cardiac Cells, *J Biol Chem*, 2003, 278, 40917-40922
- <sup>37</sup> Yang W, Chen J, Yu J, Zhou L, Effects of low power laser irradiation on intracellular calcium and histamine release in RBL-2H3 mast cells, *Photochem Photobiol*, 2007, 83(4), 979-984
- <sup>38</sup> Alexandratou E, Yova D, Handris P, Kletsas D i wsp., Human fibroblast alterations induced by low power laser irradiation at the single cell level using confocal microscopy, *Photochem Photobiol Sci*, 2002, 1(8), 547-552

- 
- <sup>39</sup> Kalthof B, Bechem M, Flocke K, Pott L i wsp., Kinetics of ATP-induced Ca<sup>2+</sup> transients in cultured pig aortic smooth muscle cells depend on ATP concentration and stored Ca<sup>2+</sup>, *J Physiol (Lond)*, 1996, 466, 245–262
- <sup>40</sup> Kitajima S, Ozaki H, Karaki H, Role of different subtypes of P<sub>2</sub> purinoceptor on cytosolic Ca<sup>2+</sup> levels in rat aortic smooth muscle., *Eur J Pharmacol*, 1994, 266, 263–226
- <sup>41</sup> Houreld N, Sekhejane P, Abrahamse H, Irradiation at 830 nm stimulates nitric oxide production and inhibits pro-inflammatory cytokines in diabetic wounded fibroblast cells, *Lasers Surg Med*, 2010, 42(6), 494-502
- <sup>42</sup> Karu T, Pyatibrat L, Afanasyeva N, Cellular effects of low power laser therapy can be mediated by nitric oxide., *Lasers Surg Med*, 2005, 36(4), 307-314
- <sup>43</sup> Chen C, Hung H, Hsu S, Low-energy laser irradiation increases endothelial cell proliferation, migration, and eNOS gene expression possibly via PI3K signal pathway, *Lasers Surg Med*, 2008, 40(1), 46-54
- <sup>44</sup> Mitchell U, Mack G, Low-level laser treatment with near-infrared light increases venous nitric oxide levels acutely: a single-blind, randomized clinical trial of efficacy, *Am J Phys Med Rehabil*, 2013, 92(2), 151-156
- <sup>45</sup> Tuby H, Maltz L, Oron U, Modulations of VEGF and iNOS in the rat heart by low level laser therapy are associated with cardioprotection and enhanced angiogenesis, *Lasers Surg Med*, 2006, 38(7), 682-688
- <sup>46</sup> Samoilova K, Zhevago N, Petrishchev N, Zimin A, Role of nitric oxide in the visible light-induced rapid increase of human skin microcirculation at the local and systemic levels: II. healthy volunteers, *Photomed Laser Surg*, 2008, 26(5), 443-449
- <sup>47</sup> Antunes F, Boveris A, Cadenas E, On the mechanism and biology of cytochrome oxidase inhibition by nitric oxide, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(48), 16774-16779

- 
- <sup>48</sup> Lindgård A, Hultén L, Svensson L, Soussi B, Irradiation at 634 nm releases nitric oxide from human monocytes, *Lasers Med Sci.*, 2007, 22(1), 30-36
- <sup>49</sup> Gomes L, Dalmarco E, André E, The brain-derived neurotrophic factor, nerve growth factor, neurotrophin-3, and induced nitric oxide synthase expressions after low-level laser therapy in an axonotmesis experimental model, *Photomed Laser Surg*, 2012, 30(11), 642-647
- <sup>50</sup> Mittermayr R, Osipov A, Piskernik C, Haindl S i wsp., Blue laser light increases perfusion of a skin flap via release of nitric oxide from hemoglobin, *Mol Med*, 2007, 13(1-2), 22-29
- <sup>51</sup> Pinto K, Tim C, Crovace M, Matsumoto M i wsp., Effects of biosilicate scaffolds and low-level laser therapy on the process of bone healing, *Photomed Laser Surg*, 2013, 31(6), 252-260
- <sup>52</sup> Trelles M, Mayayo E, Bone fracture consolidates faster with low-power laser; *Lasers in Surgery and Medicine*, 1987, 7(1), 36-45
- <sup>53</sup> Liu X, Lyon R, Meier H, Thometz J i wsp., Effect of lower level laser therapy on rabbit tibial fracture, *Photomed Laser Surg*, 25(6), 2007, 487-494
- <sup>54</sup> Huertas R, Luna-Bertos E, Ramos-Torrecillas J, Leyva F i wsp., Effect and Clinical Implications of the Low-Energy Diode Laser on Bone Cell Proliferation, *Biol Res Nurs*, 2013, doi: 10.1177/1099800413482695
- <sup>55</sup> Saygun I, Nizam N, Ural A, Serdar M, Avcu F i wsp., Low-level laser irradiation affects the release of basic fibroblast growth factor (bFGF), insulin-like growth factor-I (IGF-I), and receptor of IGF-I (IGFBP3) from osteoblasts, *Photomed Laser Surg*, 2012, 30(3), 149-154
- <sup>56</sup> Ribeiro D, Matsumoto M, Low-level laser therapy improves bone repair in rats treated with anti-inflammatory drugs, *J Oral Rehabil*, 2008, 35(12), 925–933

- 
- <sup>57</sup> Nissan J, Assif D, Gross M, Yaffe A i wsp., Effect of low intensity laser irradiation on surgically created bony defects in rats, *J Oral Rehabil*, 2006, 33(8), 619-924
- <sup>58</sup> Hoffman M, Monroe D, Low Intensity Laser Therapy speeds wound healing in hemophilia by enhancing platelet procoagulant activity, *Wound Repair Regen*, 2012, 20(5), 770-777
- <sup>59</sup> Woodruff L, Bounkeo J, Brannon W, Dawes K i wsp., The efficacy of laser therapy inwound repair: a meta-analysis of the literature, *Photomed Laser Surg* 2004, 22, 241–247
- <sup>60</sup> Firat E, Dağ A, Günay A, Kaya B i wsp., The effects of low-level laser therapy on palatal mucoperiosteal wound healing and oxidative stress status in experimental diabetic rats, *Photomed Laser Surg*, 2013, 31(7), 315-321
- <sup>61</sup> Dawood M, Salman S, Low level diode laser accelerates wound healing, *Lasers Med Sci*, 2013, 28(3), 941-945
- <sup>62</sup> Silveira P, Silva L, Freitas T, Latini A i wsp., Effects of low-power laser irradiation (LPLI) at different wavelengths and doses on oxidative stress and fibrogenesis parameters in an animal model of wound healing, *Lasers Med Sci*, 2011, 26(1), 125-131
- <sup>63</sup> Usumez A, Cengiz B, Oztuzcu S, Demir T i wsp., Effects of laser irradiation at different wavelengths (660, 810, 980, and 1,064 nm) on mucositis in an animal model of wound healing, *Lasers Med Sci*, 2013, DOI: 10.1007/s10103-013-1336-z
- <sup>64</sup> Lacjaková K, Bobrov N, Poláková M, Slezák M i wsp., Effects of equal daily doses delivered by different power densities of low-level laser therapy at 670 nm on open skin wound healing in normal and corticosteroid-treated rats: a brief report, *Lasers Med Sci*, 2010, 25(5), 761-766
- <sup>65</sup> Chow R, Heller G, Barnsley L, The effect of 300Mw 830 nm laser on chronic neck pain, A double-blind randomized placebo controlled study, *Clin J Pain*, 2006, 124(1-2), 201-210



- 
- <sup>66</sup> Enwemeka C, Parker J, Dowdy D, Harkness E i wsp., The efficacy of low-power lasers in tissue repair and pain control: a meta-analysis study, *Photomed Laser Surg*, 2004, 22, 323-329
- <sup>67</sup> Maia M, Bonjardim L, Quintans Jde S, Ribeiro M i wsp., Effect of low-level laser therapy on pain levels in patients with temporomandibular disorders: a systematic review, *J Appl Oral Sci*, 2012, 20, 594-602
- <sup>68</sup> Bjordal J, Johnson M, Iversen V, Aimbire F i wsp., Low-level laser therapy in acute pain: a systematic review of possible mechanisms of action and clinical effects in randomized placebo-controlled trials, *Photomed Laser Surg*, 2006, 24, 158-168
- <sup>69</sup> Ribeiro D, Matsumoto M, Low-level laser therapy improves bone repair in rats treated with anti-inflammatory drugs, *J Oral Rehabil*, 2008, 35(12), 925–933
- <sup>70</sup> Jang H, Lee H, Meta-analysis of pain relief effects by laser irradiation on joint areas, *Photomed Laser Surg*, 2012, 30(8), 405-417
- <sup>71</sup> Derkacz A, Protasiewicz M, Poręba R, Szuba A i wsp., Usefulness of intravascular low-power laser illumination in preventing restenosis after percutaneous coronary intervention, *Am J Cardiol*, 2010, 106(8), 1113-1117
- <sup>72</sup> Derkacz A, Protasiewicz M, Poręba R, Doroszko A i wsp., 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), 763-768
- <sup>73</sup> Oron U, Yaakobi T, Oron A, Mordechovitz D i wsp., Low-Energy Laser Irradiation Reduces Formation of Scar Tissue After Myocardial Infarction in Rats and Dogs, *Circulation*, 2001, 296-301

- 
- <sup>74</sup> Tuby H, Maltz L, Oron U, Induction of autologous mesenchymal stem cells in the bone marrow by low-level laser therapy has profound beneficial effects on the infarcted rat heart, *Lasers Surg Med*, 2011, 43(5), 401-409
- <sup>75</sup> Yaakobi T, Shoshany Y, Levkovitz S, Rubin O i wsp., Long-term effect of low energy laser irradiation on infarction and reperfusion injury in the rat heart, *J Appl Physiol*, 2001, 90(6), 2411-2419
- <sup>76</sup> Marcu L, Jo J, Fang Q, Papaioannou T i wsp., Detection of rupture-prone atherosclerotic plaques by time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy, *Atherosclerosis*, 2009, 204(1), 156-164
- <sup>77</sup> Marcu L, Fluorescence lifetime in cardiovascular diagnostics, *J Biomed Opt*, 2010, 15(1), DOI: 011106-1-011106-10
- <sup>78</sup> Carvalho R, Alcântara P, Kamamoto F, Cressoni M i wsp., Effects of low-level laser therapy on pain and scar formation after inguinal herniation surgery: a randomized controlled single-blind study, *Photomed Laser Surg*, 2010, 28(3), 417-422
- <sup>79</sup> Freitas C, Melo C, Alexandrino A, Noites A, Efficacy of low-level laser therapy on scar tissue, *J Cosmet Laser Ther*, 2013, 15(3), 171-176
- <sup>80</sup> Cury V, Moretti A, Assis L, Bossini P i wsp., Low level laser therapy increases angiogenesis in a model of ischemic skin flap in rats mediated by VEGF, HIF-1 $\alpha$  and MMP-2, *J Photochem Photobiol B*, 2013, 125, 164-170
- <sup>81</sup> Carati C, Anderson S, Gannon B, Piller N, Treatment of postmastectomy lymphedema with low-level laser therapy: a double blind, placebo-controlled trial, *Cancer*, 2003, 98(12), 2742
- <sup>82</sup> Hirschl M, Katzenschlager R, Francesconi C, Kundi M, Low level laser therapy in primary Raynaud's phenomenon-results of a placebo controlled, double blind intervention stud, *J Rheumatol*, 2003, 31(12), 2408-2412

- 
- <sup>83</sup> Bjordal J, Bensadoun R, Tuner J, Frigo L i wsp., A systematic review with meta-analysis of the effect of low-level laser therapy (LLLT) in cancer therapy-induced oral mucositis, *Support Care Cancer*, 2011, 19(8),1069-1077
- <sup>84</sup> Bensadoun R, Nair R, Low-level laser therapy in the prevention and treatment of cancer therapy-induced mucositis: 2012 state of the art based on literature review and meta-analysis, *Curr Opin Oncol*, 2012, 24(4), 363-370
- <sup>85</sup> Gautam A, Fernandes D, Vidyasagar M, Maiya A i wsp., Effect of low-level laser therapy on patient reported measures of oral mucositis and quality of life in head and neck cancer patients receiving chemoradiotherapy--a randomized controlled trial, *Support Care Cancer*, 2013, 21(5), 1421-1428
- <sup>86</sup> Angelov N, Pesevska S, Nakova M, Gjorgoski I i wsp., Periodontal treatment with a low-level diode laser: clinical findings, *Gen Dent*, 2009, 57(5), 510-513
- <sup>87</sup> Yang H, Huang Y, Treatment of burning mouth syndrome with a low-level energy diode laser, *Photomed Laser Surg*, 2011, 29(2), 123-125
- <sup>88</sup> Khadra M, The effect of low level laser irradiation on implant-tissue interaction. In vivo and in vitro studies, *Swed Dent J Suppl*, 2005, 172, 1-63
- <sup>89</sup> Omasa S, Motoyoshi M, Arai Y, Ejima K i wsp., Low-level laser therapy enhances the stability of orthodontic mini-implants via bone formation related to BMP-2 expression in a rat model, *Photomed Laser Surg*, 2012, 30(5), 255-261
- <sup>90</sup> Deppe H, Horch H, Laser applications in oral surgery and implant dentistry, *Lasers Med Sci*, 2007, 22(4), 217-221

- 
- <sup>91</sup> de Vasconcellos L, Barbara M, Deco C, Junqueira J i wsp., Healing of normal and osteopenic bone with titanium implant and low-level laser therapy (GaAlAs): a histomorphometric study in rats, *Lasers Med Sci*, 2013, DOI: 10.1007/s10103-013-1326-1
- <sup>92</sup> Khadra M, Rønold H, Lyngstadaas S, Ellingsen J i wsp., Low-level laser therapy stimulates bone-implant interaction: an experimental study in rabbits, *Clin Oral Implants Res*, 2004, 15(3), 325-332
- <sup>93</sup> Thon J, Italiano J, Platelets: production, morphology and ultrastructure, *Handb Exp Pharmacol*, 2012, 210, 3-22
- <sup>94</sup> Ware J, Corken A, Khetpal R, Platelet function beyond hemostasis and thrombosis, *Curr Opin Hematol*, 2013, 20(5), 451-456
- <sup>95</sup> Oron U, Yaakobi T, Oron A, Mordehovitz D i wsp., Low-Energy Laser Irradiation Reduces Formation of Scar Tissue After Myocardial Infarction in Rats and Dogs, *Circulation*, 2001, 296-301
- <sup>96</sup> Tuby H, Maltz L, Oron U, Induction of autologous mesenchymal stem cells in the bone marrow by low-level laser therapy has profound beneficial effects on the infarcted rat heart, *Lasers Surg Med*, 2011, 43(5), 401-409
- <sup>97</sup> Jennings I, Woods T, Kitchen S, Walker I, Platelet function testing: practice among UK National External Quality Assessment Scheme for Blood Coagulation participants, 2006, *Journal of Clinical Pathology*, 2008, 61(8), 950-954
- <sup>98</sup> Italiano J, Mairuhu A, Flaumenhaft R, Clinical relevance of microparticles from platelets and megakaryocytes, 2010, *Curr Opin Hematol*, 2010, 17(6), 578-584
- <sup>99</sup> Zimmerman G, Two by two: The pairings of P-selectin and P-selectin glycoprotein ligand 1, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(18), 10023–10024

---

<sup>100</sup> Mutlu A, Gyulkhandanyan A, Freedman J, Leytin V, Concurrent and separate inside-out transition of platelet apoptosis and activation markers to the platelet surface, *Br J Haematol*, 2013, 163(3), 377-384

<sup>101</sup> McEver R, Beckstead J, Moore K i wsp., GMP-140, a platelet-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies, *J Clin Invest*, 1989, 84, 92

<sup>102</sup> Woltmann G, McNulty C, Dewson G, Symon F i wsp., 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), 3146-3152

<sup>103</sup> Ishiwata N, Takio K, Katayama M i wsp., Alternatively spliced isoform of P-selectin is present in vivo as a soluble molecule, *J Biol Chem*, 1994, 269, 23708

<sup>104</sup> Li L, Qian K, Geng J, A 28-kDa glycoprotein functions as a platelet ligand for P-selectin (CD62P), *Thromb Haemost*, 2002, 87, 706–711

<sup>105</sup> Fijnheer R, Frijns C, Korteweg J, Rommes H i wsp., The origin of P-selectin as a circulating plasma protein, *Thromb Haemost*, 1997, 77, 1081–1085

<sup>106</sup> Järemo P, Milovanovic M, Richter A, Gender and stable angina pectoris: women have greater thrombin-evoked platelet activity but similar adenosine diphosphate-induced platelet responses, *Thromb Haemost*, 2005, 94(1), 227-228

<sup>107</sup> Antonopoulos C, Sfyroeras G, Kakisis J, Moulakakis K i wsp., The role of soluble P selectin in the diagnosis of venous thromboembolism, *Thromb Res*, 2013, DOI: 10.1016/j.thromres.2013.08.014

- 
- <sup>108</sup> Hrachovinova I, Cambien B, Hafezi-Moghadam A, Kappelmayer J i wsp., Interaction of P-selectin and PSGL-1 generates microparticles that correct hemostasis in a mouse model of hemophilia A, *Nat Med*, 2003, 9, 1020–1025
- <sup>109</sup> Kaufmann J, Wellnhofer E, Kappert K, Urban D i wsp., Soluble P-selectin level correlates with acetylsalicylic acid but not with clopidogrel response in patients with stable coronary artery disease after a percutaneous coronary intervention, *Coron Artery Dis*, 2013, 24(4), 312-320
- <sup>110</sup> Ferroni P i wsp., Soluble P-selectin as a marker of in vivo platelet activation, *Clin Chim Acta*, 2009; 399, 88–91
- <sup>111</sup> Shimomura H i wsp., Serial changes in plasma levels of soluble P-selectin in patients with acute myocardial infarction, *Am J Cardiol*, 1998, 81, 397–400
- <sup>112</sup> Mashru M, Shah V, Soneji S, Loya Y i wsp., Soluble levels of cell adhesion molecules (CAMs) in coronary artery disease, *Indian Heart J*, 2010, 62(1), 57-63
- <sup>113</sup> Chen W, Chen S, Lee C, Cherng W i wsp., Plasma P-selectin predicts long-term cardiovascular events in hospitalized patients with suspected coronary artery disease and preserved left ventricular function: a 10-year follow-up study, *Biomed J*, 2013, 36(3), 137-143
- <sup>114</sup> Ishiwata S i wsp., Postangioplasty restenosis: platelet activation and the coagulation-fibrinolysis system as possible factors in the pathogenesis of restenosis, *AmHeart J*, 1997, 133, 387–392
- <sup>115</sup> Wang Q, Zhao W, Bai S i wsp., Association between plasma soluble P-selectin elements and progressive ischemic stroke, *Exp Ther Med*, 2013, 5(5), 1427–1433
- <sup>116</sup> Marquardt L, Ruf A, Mansmann U, Winter R i wsp., Course of platelet activation markers after ischemic stroke, *Stroke*, 2002, 33, 2570–2574

- 
- <sup>117</sup> Wang C, Song C, Zheng Q, Significance of soluble P-selectin in diagnosis of pre-disseminated intravascular coagulation state in children with severe pneumonia, *Zhonghua Er Ke Za Zhi*, 2012, 50(12), 948-952
- <sup>118</sup> Monte S, Biochemical markers for prediction of preclampsia: review of the literature, *J Prenat Med*, 2011, 5(3), 69-77
- <sup>119</sup> Kazmi R, Cooper A, Lwaleed B, Platelet function in pre-eclampsia, *Semin Thromb Hemost*, 2011, 37(2), 131-136
- <sup>120</sup> Rucinski B, Stewart G, De Feo P, Boden G i wsp., Uptake and processing of human platelet factor 4 by hepatocytes, *Proc Soc Exp Biol Med*, 1987, 186(3), 361-367
- <sup>121</sup> Mosnier L, Platelet factor 4 inhibits thrombomodulin-dependent activation of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) by thrombin, *J Biol Chem*, 2011, 286(1), 502-510
- <sup>122</sup> Bouwens E, Stavenuiter F, Mosnier L, Mechanisms of anticoagulant and cytoprotective actions of the protein C pathway, *J Thromb Haemost*, 2013, 11(1), 242-253
- <sup>123</sup> Prechel M, Walenga J, Emphasis on the Role of PF4 in the Incidence, Pathophysiology and Treatment of Heparin Induced Thrombocytopenia, *Thromb J*, 2013, 11(1), DOI: 10.1186/1477-9560-11-7
- <sup>124</sup> Stringer S, Gallagher J, Specific binding of the chemokine platelet Factor 4 to heparan sulfate, *J Biol Chem*, 1997, 272, 20508–20514
- <sup>125</sup> Demma L, Levy J, A case series of recombinant platelet factor 4 for heparin reversal after cardiopulmonary bypass, *Anesth Analg*, 2012, 115(6), 1273-1278
- <sup>126</sup> Busch C, Dawes J, Pepper D i wsp., Binding of platelet factor 4 to cultured human umbilical vein endothelial cells, *Thromb Res*, 1980, 19, 129

- 
- <sup>127</sup> Fabris F, Luzzatto G, Stefani P, Girolami B i wsp., Heparin-induced thrombocytopenia, *Haematologica*, 2000, 85(1), 72-81
- <sup>128</sup> Buyukasýk N, Ileri M, Alper A, Senen K i wsp., Increased blood coagulation and platelet activation in patients with infective endocarditis and embolic events, *Clin Cardiol*, 2004, 27(3), 154-115
- <sup>129</sup> Tarhan G, Gümüřlü F, Yilmaz N, Saka D i wsp., Serum adenosine deaminase enzyme and plasma platelet factor 4 activities in active pulmonary tuberculosis, HIV-seropositive subjects and cancer patients, *J Infect*, 2006, 52(4), 264-268
- <sup>130</sup> Kasperska-Zajęc A, Recovery of platelet factor 4 (PF-4) and beta-thromboglobulin (beta-TG) plasma concentrations during remission in patients suffering from atopic dermatitis, *Platelets*, 2010, 21(7), 522-524
- <sup>131</sup> Cenni E, Fotia C, Rustemi E, Yuasa K i wsp., Idiopathic and secondary osteonecrosis of the femoral head show different thrombophilic changes and normal or higher levels of platelet growth factors, *Acta Orthop*, 2011, 82(1), 42-49
- <sup>132</sup> Yamamoto T, Chikugo T, Tanaka Y, Elevated plasma levels of beta-thromboglobulin and platelet factor 4 in patients with rheumatic disorders and cutaneous vasculitis, *Clin Rheumatol*, 2002, 21(6), 501-504
- <sup>133</sup> Peterson J, Zurakowski D, Italiano J, Michel L i wsp., VEGF, PF4 and PDGF are elevated in platelets of colorectal cancer patients, *Angiogenesis*, 2012, 15(2), 265-273
- <sup>134</sup> Lambert M, Xiao L, Nguyen Y, Kowalska M i wsp., The role of platelet factor 4 in radiation-induced thrombocytopenia, *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2011, 80(5), 1533-1540
- <sup>135</sup> Sachais B, Turrentine T, Dawicki McKenna J i wsp., Elimination of platelet factor 4 (PF4) from platelets reduces atherosclerosis in C57Bl/6 and apoE<sup>-/-</sup> mice, *Thromb Haemost*, 2007, 98, 1108-1113



- 
- <sup>136</sup> Aidoudi S, Bikfalvi A, Interaction of PF4 (CXCL4) with the vasculature: a role in atherosclerosis and angiogenesis, *Thromb Haemost*, 2010, 104(5), 941-948
- <sup>137</sup> Kasper B, Brandt E, Ernst M, Petersen F, Neutrophil adhesion to endothelial cells induced by platelet factor 4 requires sequential activation of Ras, Syk, and JNK MAP kinases, *Blood*, 2006, 107(5), 1768-1775
- <sup>138</sup> McMorran B, Burgio G, Foote S, New insights into the protective power of platelets in malaria infection, *Commun Integr Biol*, 2013, 6(3), DOI: 10.4161/cib.23653
- <sup>139</sup> Yang L, Du J, Hou J, Jiang H i wsp., Platelet factor-4 and its p17-70 peptide inhibit myeloma proliferation and angiogenesis in vivo, *BMC Cancer*, 2011, 11(261), DOI: 10.1186/1471-2407-11-261
- <sup>140</sup> Wood K, Cortese-Krott M, Kovacic J, Noguchi A i wsp., Circulating blood endothelial nitric oxide synthase contributes to the regulation of systemic blood pressure and nitrite homeostasis, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33(8), 1861-1871
- <sup>141</sup> Cortese-Krott M, Rodriguez-Mateos A, Sansone R i wsp., Human red blood cells at work: identification and visualization of erythrocytic eNOS activity in health and disease, *Blood*, 2012, 120(20), 4229-4237
- <sup>142</sup> Knowles R, Moncada S, Nitric oxide synthases in mammals, *Biochem J*, 1994, 298, 249–258
- <sup>143</sup> Radomski M, Palmer R, Moncada S, Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium, *Lancet*, 1987, 2, 1057–1058
- <sup>144</sup> Emerson M, Momi S, Paul W, Alberti P i wsp., Endogenous nitric oxide acts as a natural antithrombotic agent in vivo by inhibiting platelet aggregation in the pulmonary vasculature, *Thromb Haemost*, 1999, 81, 961–966

---

<sup>145</sup> Barrett M, Willis A, Vane J, Inhibition of platelet-derived mitogen release by nitric oxide (EDRF), *Agents Actions*, 1989, 27, 488-491

<sup>146</sup> Naseem K, Riba R, Unresolved roles of platelet nitric oxide synthase, *J Thromb Haemost*, 2008, 6(1), 10-19

<sup>147</sup> Moore C, Sanz-Rosa D, Emerson M, Distinct role and location of the endothelial isoform of nitric oxide synthase in regulating platelet aggregation in males and females in vivo, *Eur J Pharmacol*, 2011, 651, 152-158

<sup>148</sup> Tymvios C, Moore C, Jones S, Solomon A i wsp., Platelet aggregation responses are critically regulated in vivo by endogenous nitric oxide but not by endothelial nitric oxide synthase, *Br J Pharmacol*, 2009, 158(7), 1735-1742

<sup>149</sup> Ozüyaman B, Gödecke A, Küsters S, Kirchhoff E i wsp., Endothelial nitric oxide synthase plays a minor role in inhibition of arterial thrombus formation, *Thromb Haemost*, 2005, 93(6), 1161-1167

<sup>150</sup> Mehta J, Chen L, Kone B, Mehta P i wsp., Identification of constitutive and inducible forms of nitric oxide synthase in human platelets, *J Lab Clin Med*, 1995, 125(3), 370-377

<sup>151</sup> Freedman J, Loscalzo J, Barnard M, Alpert C, Nitric oxide released from activated platelets inhibits platelet recruitment, *J Clin Invest*, 1997, 100, 350–356

<sup>152</sup> Pinto V, de Souza P, Brunini T, Oliveira M i wsp., Low plasma levels of L-arginine, impaired intraplatelet nitric oxide and platelet hyperaggregability: implications for cardiovascular disease in depressive patients, *J Affect Disord*, 2012, 140(2), 187-192

<sup>153</sup> Freedman J, Sauter R, Battinelli E, Ault K i wsp., Deficient platelet-derived nitric oxide and enhanced hemostasis in mice lacking the NOSIII gene, *Circ Res*, 1999, 84, 1416–1422

- 
- <sup>154</sup> Crane M, Rossi A, Megson I, A potential role for extracellular nitric oxide generation in cGMP-independent inhibition of human platelet aggregation: biochemical and pharmacological considerations, *Br J Pharmacol*, 2005, 144, 849–859
- <sup>155</sup> Iafrafi M, Vitseva O, Tanriverdi K, Blair P i wsp., Compensatory mechanisms influence hemostasis in setting of eNOS deficiency, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 288, 1627–1632
- <sup>156</sup> Modrego J, Azcona L, Martín-Palacios N, Zamorano-León J i wsp., Platelet content of nitric oxide synthase 3 phosphorylated at serine(1177) is associated with the functional response of platelets to aspirin, *PLoS One*, 2013, 8(12), e82574
- <sup>157</sup> Yokoyama S, Ikeda H, Haramaki N, Yasukawa H i wsp., HMG-CoA reductase inhibitor protects against in vivo arterial thrombosis by augmenting platelet-derived nitric oxide release in rats, *J Cardiovasc Pharmacol*, 2005, 45(4), 375-381
- <sup>158</sup> Hecker M, Nematollahi H, Hey C, Busse R i wsp., Inhibition of arginase by NG-hydroxy-L-arginine in alveolar macrophages: implications for the utilization of L-arginine for nitric oxide synthesis, *FEBS Lett*, 1995, 359, 251–254
- <sup>159</sup> Mizayaki H, Matsuoka H, Cooke J i wsp., Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a novel marker of atherosclerosis, *Circulation*, 1999, 99, 1141–1146
- <sup>160</sup> Wojciak-Stothard B, Torondel B, Tsang L, Fleming I i wsp., ADMA/DDAH pathway is a critical regulator of endothelial cell motility, *J Cell Sci*, 2007, 120(Pt 6), 929-942
- <sup>161</sup> Auclair Y, Richard S, The role of arginine methylation in the DNA damage response, *DNA Repair*, 2013, 12(7), 459-465
- <sup>162</sup> Doroszko A, Andrzejak R, Szuba A, Endothelial dysfunction and ADMA in pathogenesis of arterial hypertension, *Hypertension*, 2008, 12(3), 224–237

---

<sup>163</sup> Brill A, Shenkman B, Brill G, Tamarin I i wsp., 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, 87–93

<sup>164</sup> Ram Mohan S, Thomas G, Shafique T, Grimley R, Effects of Nd-YAG laser on platelet function in vitro: A comparative study using the spectraprobe, ‘hot tip’ and bare fibres, *Lasers Med Sci*, 1991, 6(1), 1-6

<sup>165</sup> Eldar M, Marom R, Scheinowitz M, Djaldetti M i wsp., In vitro effects of CO<sub>2</sub> laser irradiation on platelets: Influence of aspirin, *Lasers Med Sci*, 1991, 6(1), 15-21

<sup>166</sup> Gresner P, Watała C, Sikurova L, The effect of green laser light irradiation on whole blood platelets, *J Photochem and Photobiol*, 2005, 79, 43–50

<sup>167</sup> Olban M, Wachowicz B, Koter M, Bryszewska M, The biostimulatory effect of red laser irradiation on pig blood platelet function, *Cell Biol Int*, 1998, 22, 245–248

<sup>168</sup> Utz I, Utz S, Tuchin V, Effects of low-energy laser biostimulation on rheological properties of blood, *Soc Photo-Opt Instrum. Eng*, 1993, 1883, 83–90

<sup>169</sup> Hoffman M, Monroe D, Low intensity laser therapy speeds wound healing in hemophilia by enhancing platelet procoagulant activit, *Wound Repair and Regeneration*, 2012, 20(5), 770–777

<sup>170</sup> Kochel B, Łukowiak E, Biostymulacyjna terapia laserowa, RES Inco-Laser, Wrocław, 1994

<sup>171</sup> Kaushansky K, Lichtman M, Beutler E, Kipps T i wsp., *Williams Hematology*, 2010, 114, 1735-1814

<sup>172</sup> Chaudhry H, Lynch M, Schomacker K, Bringruber R i wsp., Relaxation of vascular smooth muscle induce by low-power laser radiation, *Photochem Photobiol*, 1993, 58, 661-669

---

## Załącznik 1 - Zgoda Komisji Bioetycznej

### 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 17/2014

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 **Piotr Rola** w sprawie badania: **Wpływ niskoenergetycznego promieniowania laserowego na funkcje agregacyjną płytek krwi w warunkach in vitro.**

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