

lek. ALICJA SZYMCZYSZYN

**Wpływ stosowanego przezskórnie niskoenergetycznego
promieniowania laserowego na aktywność śródbłonna
naczyniowego oraz funkcję agregacyjną płytek krwi**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Promotor: dr hab. n. med. Arkadiusz Derkacz

Poznań 2014

Wrovasc – Zintegrowane Centrum Medycyny Sercowo – Naczyniowej

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

Dedykuję Rodzicom

Składam serdeczne podziękowania Promotorowi dr hab. n. med. Arkadiuszowi Derkaczowi, dr n. med. Adrianowi Doroszko oraz mgr Ewie Szahidewicz-Krupskiej za życzliwość, poświęcony czas oraz cenne uwagi i wskazówki podczas pisania niniejszej pracy.

SPIS TREŚCI

Wykaz stosowanych skrótów.....	4
1. Wstęp.....	6
1.1. Znaczenie śródbłonna naczyniowego w chorobach układu krążenia	6
1.2. Rola płytek krwi w patogenezie chorób sercowo-naczyniowych	19
1.3. Zastosowanie promieniowania laserowego.....	22
2. Założenia i cel pracy.....	29
3. Materiał i metody.....	30
3.1. Badana grupa.....	30
3.2. Procedura badania.....	31
3.3. Procedura naświetlania.....	31
3.4. Oznaczenia biochemiczne.....	32
3.5. Badanie agregacji płytek krwi	37
3.6. Analiza statystyczna.....	39
4. Wyniki.....	41
4.1. Grupa kontrolna.....	41
4.2. Parametry biochemiczne związane z działaniem antyoksydacyjnym śródbłonna naczyniowego.....	43
4.3. Parametry biochemiczne związane ze szlakiem metabolizmu tlenu azotu...43	
4.4. Parametry biochemiczne związane z potencjałem angiogennym śródbłonna.46	
4.5. Agregacja płytek krwi.....	48
4.6. Zależności pomiędzy badanymi parametrami	51
5. Omówienie i dyskusja.....	56
6. Wnioski.....	66
7. Streszczenie.....	67
8. Summary (streszczenie w języku angielskim).....	69
9. Piśmiennictwo.....	71
10. Załącznik – Zgoda Komisji Bioetycznej.....	89

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ADMA – asymetryczna dimetyloarginina (ang. *asymmetric dimethylarginine*)

ANP – przedsionkowy peptyd natriuretyczny (ang. *atrial natriuretic peptide*)

ASPI – aktywacja płytek krwi zależna od cyklooksygenazy

COL – aktywacja płytek krwi z wykorzystaniem kolagenu

BNP – mózgowy peptyd natriuretyczny (ang. *brain natriuretic peptide*)

ELISA – Immonuenzymatyczne testy fazy stałej (ang. *enzyme linked immunosorbent assai*)

eNOS – śródbłonkowa syntaza tlenku azotu (ang. *endothelial nitro oxide synthase*)

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

FMD – dylatacja zależna od przepływu (ang. *flow mediated dilatation*)

GP – glikoproteina (ang. *glycoprotein*)

GSH – glutation (ang. *glutathione*)

GSSG – utleniony glutation (ang. *oxidized glutathione*)

HPLC – wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa (ang. *high pressure liquid chromatography*)

HUVEC – ludzkie komórki śródbłonka żyły pępowinowej (ang. *human umbilical venous endothelial cells*)

IGF – insulinopodobny czynnik wzrostu (ang. *insulin-like growth factor*)

IL – interleukina (ang. *interleukin*)

IMT – grubość kompleksu intima-media (ang. *intima-media thickness*)

iNOS – indukowalna syntaza tlenku azotu (ang. *inducible nitro oxide synthase*)

LLLT – leczenie niskoenergetycznym promieniowaniem laserowym (ang. *low level laser therapy*)

L-NMMA – N^Gmonometyl-L-arginina (ang. *N^G-Monomethyl-L-arginine*)

LTA – agregometria świetlna transmisyjna (ang. *light transsmision aggregometry*)

NO – tlenek azotu (ang. *nitric oxide*)

nNOS – neuronalna syntaza tlenku azotu (ang. *neuronal nitro oxide synthase*)

NOS – syntaza tlenku azotu (ang. *nitric oxide synthase*)

PDGF – płytko-pochodny czynnik wzrostu (ang. *platelet-derived growth factor*)

PRMT – metylotransferaza argininowa (ang. *protein-arginine methyltransferase*)

ROS – reaktywne formy tlenu (ang. *reactive oxygen species*)

SDMA – symetryczna dimetyloarginina (ang. *symmetric dimethylarginine*)

sGC – rozpuszczalna cyklaza guanylowa (ang. *soluble guanylyl cyclase*)

TGF – transformujący czynnik wzrostu (ang. *transforming growth factor*)

TNF – czynnik martwicy guza (ang. *tumor necrosis factor*)

TRAP – peptyd aktywujący podobny do trombiny (ang. *thrombin-related activation peptide*)

VEGF – czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (ang. *vascular endothelial growth factor*)

vWF – czynnik von Willebranda (ang. *von Willebrand factor*)

1. WSTĘP

1.1 ZNACZENIE ŚRÓDBŁONKA NACZYNIOWEGO W CHOROBAH UKŁADU KRAŻENIA

1.1.1 Choroby sercowo-naczyniowe

Choroby sercowo-naczyniowe stanowią obecnie główną przyczynę zgonów na świecie. Według danych statystycznych Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) w 2008 roku z powodu chorób sercowo-naczyniowych zmarło 21,3 mln osób, co stanowi ok. 30 % wszystkich zgonów. Spośród schorzeń sercowo-naczyniowych największy odsetek śmiertelności dotyczył udarów (kobiety – 37 %, mężczyźni – 34 %) oraz zawałów mięśnia sercowego (odpowiednio 38 % i 46 %) [1]. Biorąc pod uwagę choroby cywilizacyjne, podkreśla się tendencję do zwiększonej zachorowalności na nadciśnienie tętnicze. W chwili obecnej na to schorzenie cierpi ok. 30-40 % populacji ogólnej [2]. Dane statystyczne przedstawione przez American Heart Association (AHA) również potwierdzają, iż w populacji amerykańskiej 33 % osób powyżej 22 roku życia choruje na nadciśnienie tętnicze, co stanowi 78 mln osób [3].

Choroby sercowo-naczyniowe są efektem współistniejących czynników ryzyka, do których zaliczamy głównie: otyłość, palenie tytoniu, nieprawidłową dietę, nadciśnienie tętnicze, cukrzycę, hiperlipidemię oraz brak aktywności fizycznej. Wpływ wymienionych czynników na rozwój chorób sercowo-naczyniowych związany jest między innymi z ich niekorzystnym działaniem na funkcję śródbłonna.

1.1.2 Dysfunkcja śródbłonna naczyniowego w chorobach sercowo-naczyniowych:

Śródbłonek naczyniowy bierze udział w utrzymaniu prawidłowej homeostazy naczyniowej [4, 5]. Obecnie uważa się, iż dysfunkcja śródbłonna prowadzi do powstawania i rozwoju chorób układu krążenia i jest efektem działania czynników ryzyka sercowo-naczyniowego [5]. Zakłada się, że występuje we wczesnym etapie rozwoju miażdżycy [5, 6]. Na podstawie licznych badań klinicznych zaobserwowano występowanie opisywanych zmian w nadciśnieniu tętniczym [5, 7], hipercholesterolemii [5, 8], przewlekłej niewydolności serca, chorobie naczyń obwodowych, przewlekłej chorobie nerek, hiperhomocysteinemii, miażdżycy, chorobie niedokrwiennej serca oraz otyłości [5]. Zaobserwowano, że ryzyko powikłań sercowo-naczyniowych także ma związek z patologią śródbłonna naczyniowego,

a w przypadku ostrych zespołów wieńcowych i udaru mózgu jest wprost proporcjonalne do stopnia jego dysfunkcji [9].

1.1.3 Rola i budowa śródbłonna naczyniowego

Śródbłonek naczyniowy tworzy pojedyncza warstwa komórek, będąca histologicznie nabłonkiem płaskim, która oddziela krew znajdującą się w świetle naczynia od otaczających tkanek. Waży około 1 kg, zawiera około $1,6 \times 10^{23}$ komórek i zajmuje powierzchnię ok. 100m^2 . Pojedyncza komórka śródbłonna (EC) ma około 25-50 μm szerokości, 10-15 μm długości oraz do 5 μm grubości [9, 10].

Śródbłonek naczyniowy nie tylko stanowi funkcję ochronną na zasadzie bariery naczyniowej, ale również pełni aktywną rolę w regulacji homeostazy naczyniowej, jako organ o działaniu endokrynnym [5]. Przy udziale odpowiednich mediatorów, śródbłonek naczyniowy wpływa na procesy zapalne, aktywność płytek, procesy krzepnięcia krwi, adhezję i migrację leukocytów przez ścianę naczyniową. Zapewnia także trombozyzęstencję i chroni przed nadmierną proliferacją i przebudową ściany naczyniowej [9].

Utrzymanie odpowiedniego napięcia naczyń krwionośnych jest możliwe za pośrednictwem wydzielanych przez śródbłonek przekaźników zarówno o działaniu wazodylatacyjnym jak i wazokonstrykcyjnym. Kluczową rolę w tym procesie odgrywa tlenek azotu (NO), który odpowiada za zachowanie odpowiedniego potencjału wazorelaksacyjnego w łożysku naczyniowym. Do czynników naczyniorozszerzających zaliczamy również: prostacyklinę, śródbłonkopochozny czynnik hiperpolaryzujący, bradykininę i adrenomodulinę. Przeciwny mechanizm działania na ścianę naczyniową wykazują między innymi: endotelina-1, angiotensyna II, tromboksan A2, rodniki tlenowe oraz prostaglandyna H2.

Ponadto śródbłonek naczyniowy wydziela:

- czynniki hamujące rozrost komórek – prostacyklina, transformujący czynnik wzrostu β (TGF β), siarczan heparanu oraz wymienione wcześniej tlenek azotu
- czynniki sprzyjające rozrostowi komórkowemu- endotelina-1, angiotensyna II, rodniki tlenowe, płytkopochozny czynnik wzrostu (PDGF), zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (FGF), insulinopodobny czynnik wzrostu (IGF), interleukiny
- czynniki przeciwzakrzepowe – tlenek azotu, prostacyklina, aktywator plazminogenu, białko C, inhibitor czynnika tkankowego, czynnik von Willebranda

- czynniki sprzyjające zakrzepom – endotelina-1, rodniki tlenowe, inhibitor aktywatora plazminogenu 1, tromboksan A2, fibrynogen, czynnik tkankowy
- wskaźniki stanu zapalnego – rozpuszczalne cząsteczki adhezyjne (selektyna-E, selektyna-P, cząsteczka przylegania międzykomórkowego, naczyniowa cząsteczka przylegania komórkowego), chemokiny, czynnik jądrowy NF-kB [11, 12].

1.1.4 Synteza oraz biologiczna funkcja tlenu azotu

Podstawową rolę w procesie regulacji napięcia ścian naczyń odgrywa tlenek azotu, zaliczany do najsilniejszych i najlepiej poznanych wazodilatatorów [4, 12]. Pierwsze badania doświadczalne nad właściwościami wydzielniczymi śródbłonna naczyniowego, w tym kluczowej roli NO w tym procesie przeprowadzili Zawadzki i Furchgott. Zaobserwowali oni, iż działanie wazodylatacyjne acetylocholino na opuszkę aorty królika jest możliwe przy udziale śródbłonna, który wydziela czynnik rozszerzający naczynia, nazwany wówczas śródbłonkowym czynnikiem relaksującym (EDRF) [12, 13]. W późniejszym czasie zidentyfikowano wyżej wymienioną substancję jako tlenek azotu (NO) i stwierdzono, że wpływa ona również na inne procesy biologiczne związane z agregacją płytek krwi, adhezją leukocytów, proliferacją mięśni gładkich naczyń krwionośnych oraz hamowaniem aktywności cytokin i chemokin prozapalnych [12, 14].

Synteza tlenu azotu

Tlenek azotu powstaje w reakcji syntezy z L-argininy, cząsteczkowego tlenu, fosforanu dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (NADPH), przy pomocy enzymu syntazy tlenu azotu (NOS) [4, 12, 14]. W wyniku reakcji chemicznej L-arginina w śródbłonku podlega konwersji do NO i L-cytruliny, natomiast kofaktorami procesu są: tetrahydrobiopteryna, dinukleotyd flawinoadeninowy oraz mononukleotyd flawinowy [14].

Wyróżniamy trzy izoformy syntazy tlenu azotu :

- neuronalną NOS – (NOS I, nNOS), która jest kodowana przez gen NOS1 i ulega aktywacji, gdy zwiększa się stężenie jonów wapnia
- indukowalną NOS – (NOS II, iNOS) kodowaną przez gen NOS2 (17q11.2-12) i aktywowaną przez makrofagi, neutrofile, komórki Browicza–Kupffera, monocyty
- endotelialną (śródbłonkową) NOS – (NOS III, eNOS) kodowaną przez gen NOS3, zależną od stężenie jonów wapnia, zlokalizowaną w śródbłonku, kardiomiocytach, płytkach krwi, neuronach i monocytach

Zarówno neuronalna jak i endotelialna NOS zaliczane są do izoenzymów konstytutywnych, których aktywność zależy głównie od poziomu wapnia (Ca) i kalmoduliny. Należy jednak pamiętać, iż e-NOS może być również syntetyzowana niezależnie od poziomu jonów Ca. Z kolei trzecia izoforma – i-NOS jest aktywowana poprzez cytokiny [14].

Mechanizm działania tlenu azotu

Tlenek azotu posiada pojedynczy niesparowany elektron, co sprawia, że pełni rolę wolnego rodnika i jest silnie reaktywnym związkiem chemicznym. NO reguluje procesy komórkowe w sposób bezpośredni poprzez interakcje z grupami hemowymi białek (np. hemoglobina, cytochromem P450, oksydazą cytochromową C w mitochondriach i katalazą) oraz pośrednio za pośrednictwem reaktywnych form NO (rNOS), które mają właściwości utleniające, nitrujące i prowadzą do nitrozytacji białek [14].

Główny mechanizm działania tlenu azotu polega na aktywacji cyklicznej guanylowej. Tlenek azotu za pośrednictwem cyklicznej guanylowej aktywuje cykliczny guanozyno-4'5'-monofosforan (cGMP). Wzrost aktywności cGMP, pełniącego funkcję przekaźnika II rzędu, prowadzi do zwiększenia aktywności fosfatazy w komórkach mięśni gładkich, która następnie hydrolizuje miozynę. Proces defosforylacji miozyny przyczynia się do inaktywacji łańcuchów regulatorowych oraz zahamowanie ich oddziaływania z aktyną, co w konsekwencji doprowadza do rozkurczu mięśni gładkich naczyń krwionośnych. Tlenek azotu aktywuje również zależne od jonów Ca kanały potasowe, zarówno z udziałem jak i bez cGMP, co prowadzi do ich otwarcia i hiperpolaryzacji błony komórkowej mięśni gładkich. Jednocześnie dochodzi do obniżenia aktywności kanałów wapniowych. Z kolei zmniejszenie dopływu jonów Ca do wnętrza komórki mięśni gładkich manifestują się ich wazorelaksacją [15].

Tlenek azotu wydzielany jest przez komórki EC pod wpływem działania sił ścinających, które powstają w wyniku przepływu krwi w naczyniach krwionośnych. Potwierdzono, że zwiększona w efekcie działania sił ścinających aktywność eNOS stanowi główny mechanizm wazorelaksacyjny w trakcie wysiłku fizycznego [11, 16]. W kilku badaniach doświadczalnych potwierdzono rolę NO w utrzymaniu prawidłowego napięcia ściany naczyniowej przy pomocy N^Gmonometylo-L-argininy (L-NMMA), będącej analogiem L-argininy i wykorzystywanej jako przydatne narzędzie w badaniu funkcji śródbłonna. L-NMMA skutecznie hamuje śródbłonkową syntezę NO i prowadzi do zwiększenia napięcia ścian w łożysku naczyniowym [17]. Taki efekt odnotowano między innymi po podaniu

L-NMMA do tętnicy promieniowej u ludzi, co skutkowało zmniejszonym przepływem krwi w naczyniu świadczącym o zahamowaniu odpowiedzi ze strony tlenu azotu [18].

Mechanizmy dysfunkcji śródbłonna

Dysfunkcja śródbłonna manifestuje się zwężeniem naczyń krwionośnych, wzrostem aktywności prozapalnej oraz proagregacyjnej [6, 9]. W działaniu prozapalnym uczestniczą cytokiny, chemokiny i cząsteczki adhezyjne tj. rozpuszczalne międzykomórkowe cząsteczki adhezyjne (s-ICAM), rozpuszczalne cząsteczki adhezyjne naczyń (s-VCAM), białka C-reaktywnego (CRP), interleukiny-8 (IL-8), które odznaczają się nasiloną ekspresją. Jednocześnie o aktywności prozakrzepowej świadczy zwiększone stężenie czynnika von Willebranda, PA-I, fibrynogenu oraz zmniejszona aktywność t-PA [6]. Szczególnie istotnym zjawiskiem obserwowanym w tym przypadku jest ograniczenie aktywności śródbłonkowego NO, który ze względu na swoje właściwości wazodylatacyjne, odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu prawidłowego napięcia ścian naczyń krwionośnych. Zmniejszona biodostępność NO związana jest z jego ograniczoną syntezą lub przyśpieszoną degradacją [19]. Dysfunkcja śródbłonna wynika także z przewagi czynników naczyniozwężających tj. angiotensyny II i endoteliny-1, których obecność prowadzi do nasilenia wazokonstrykcji w łożysku naczyniowym [9].

Podkreślane jest również znaczenie stresu oksydacyjnego, jako przyczyny dysfunkcji śródbłonna naczyniowego [20, 21]. Zwiększone wytwarzanie O_2^* przez oksydazę NADPH przyczynia się do nasilenia procesu degradacji tlenu azotu i powstania wysoce reaktywnych form tlenu, czyli nadtlenoazotynów, które prowadzą do dalszej oksydacji lipidów oraz białek komórkowych. Mechanizm ten po raz pierwszy zwrócił uwagę podczas badań doświadczalnych nad zwierzęcymi modelami hipercholesterolemii [21]. Inną poznaną przyczyną nasilonej degradacji NO jest utlenianie kofaktora tlenu azotu tetrahydrobiopteryny BH₄ do BH₂ przy udziale $O_2^*/ONOO^-$, w wyniku czego zahamowana zostaje zależna od eNOS synteza tlenu azotu [20].

Obecnie wiadomo, iż upośledzenie mechanizmów związanych z prawidłową regulacją napięcia ścian naczyń krwionośnych w późniejszym etapie prowadzi do rozwoju chorób sercowo-naczyniowych [5, 6, 9]. Udowodniono, iż dysfunkcja śródbłonna związana z zaburzeniem syntezy NO odgrywa istotną rolę w patofizjologii nadciśnienia tętniczego [4, 5, 22].

1.1.5 Rola asymetrycznej dimetyloargininy (ADMA) w patogenezie dysfunkcji śródbłonna naczyniowego

Obecnie podkreśla się znaczenie ADMA jako istotnego czynnika ryzyka rozwoju miażdżycy oraz zgonu z przyczyn sercowo-naczyniowych [23, 24]. Udowodniono, iż podwyższony poziom ADMA w osoczu jest zjawiskiem niekorzystnym z punktu widzenia klinicznego. ADMA działa na zasadzie inhibitora syntazy NO konkurując z L-argininą o miejsce aktywne enzymu [4, 23, 25]. Dostępne w literaturze źródła naukowe podają, że ADMA prowadzi do zmniejszenia biodostępności NO i dysfunkcji śródbłonna naczyniowego [4, 23]. Podwyższony poziom ADMA zaobserwowano między innymi u osób chorujących na miażdżycę [23], nadciśnienie tętnicze [4, 26] i niewydolność nerek [27, 28], hiperglikemię [29], hiperhomocysteinemię, hiperlipidemię i niewydolność serca [30].

Budowa i właściwości chemiczne ADMA

ADMA jest endogennym aminokwasem, który powstaje z argininy w reakcji katalizowanej przez metylotransferazy argininowe (PRMT I, II). Za ich pośrednictwem, po uprzedniej hydrolizie białek, grupa metylowa jest przenoszona z S-adenozylometioniny na argininę, co powoduje powstanie metylowych pochodnych argininy oraz S-adenozylhomocysteiny. Podobnie jak ADMA (Ng, Ng-dimetylo-L-arginia), dwa pozostałe analogi: SDMA (Ng, Ng-dimetylo-L-arginia) oraz L-NMMA (Ng-monometylo-L-arginina) powstają w wyniku przemiany argininy. Metylacja przez PRMT I jest źródłem głównie ADMA i mniejszych ilości LNMMA, zaś w przypadku PRMT II powstaje głównie SDMA, a w mniejszym stopniu L-NMMA [4, 30, 31].

ADMA w porównaniu z pozostałymi metyloargininami jest najbardziej aktywnym biologicznie związkiem chemicznym. Kationowy transporter aminokwasów (CAT), bierze udział w transporcie ADMA oraz pozostałych metyloarginin do wnętrza komórki. Z tego powodu asymetryczna dimetyloarginina występuje w mniejszym stężeniu w osoczu i gromadzi się głównie wewnątrzkomórkowo. ADMA jest inhibitorem wszystkich trzech izoform syntazy tlenu azotu [31].

ADMA rozkładana jest przez dimetyloaminohydrolazę dimetyloargininy (DDAH) [31, 32, 33]. DDAH stanowi istotny mechanizm regulacji w układzie sercowo-naczyniowym i ma miejsce w wątrobie. DDAH wpływa na metabolizm ADMA, zapewniając prawidłowe wydzielanie NO, a w konsekwencji umożliwia zachowanie prawidłowej hemostazy naczyniowej. Biorąc pod uwagę, iż ADMA w nadmiarze stanowi czynnik ryzyka sercowo-

naczyniowego, DDAH wpływając na jej metabolizm, pełni funkcję ochronną związaną z jej niekorzystnym działaniem na śródbłonek naczyniowy [4, 34].

ADMA w chorobach sercowo-naczyniowych

Na podstawie licznych badań doświadczalnych, udowodniono że podniesiony poziom ADMA w osoczu jest istotnym czynnikiem ryzyka rozwoju miażdżycy [23]. ADMA wpływa niekorzystnie na działanie śródbłonka naczyniowego, prowadząc do jego dysfunkcji poprzez zablokowanie syntezy tlenku azotu. Potwierdziły to między innymi przeprowadzone już w 1992 roku badania Vallance'a. Na ich podstawie wysunięto wniosek, że u osób z niewydolnością nerek, z powodu ich upośledzonej funkcji wydalniczej, dochodzi do zwiększonej kumulacji ADMA. Efektem wzrostu stężenia metyloargininy jest wzmożone hamowanie syntezy tlenku azotu [35]. U zdrowej osoby stężenie ADMA wynosi około 0,3-0,5 $\mu\text{mol/l}$. W stanach patologicznych odnotowano wzrost ADMA do wartości 3-10 $\mu\text{mol/l}$, co może skutecznie zablokować syntezę endogennego tlenku azotu. Zaobserwowano również, iż u zdrowej osoby ADMA blokuje enzym eNOS w około 10 %, natomiast w stanach patologicznych eNOS jest inaktywowana przez ten aminokwas nawet w 70 % [31].

Do oceny funkcji śródbłonka naczyniowego służy między innymi wprowadzone przez Celermajera badanie dylatacji zależnej od przepływu (FMD), które określa stopień rozszerzenia tętnicy promieniowej po wcześniejszej okluzji tętnic przedramienia lub proksymalnej części ramienia. Stało się ono podstawowym badaniem w pomiarze funkcji wazodylatacyjnej. Prawidłowy potencjał wazodylatacyjny tętnicy promieniowej świadczy o zdolności śródbłonka do wydzielania czynników rozszerzających naczynia, wśród których podstawową rolę odgrywa NO. Zaburzenie wydzielania NO związane jest z dysfunkcją śródbłonka naczyniowego i w badaniu FMD manifestuje się zmniejszoną wazodylatacją tętnicy promieniowej, po jej wcześniejszym niedokrwieniu [36]. Wykorzystując badanie FMD dowiedziono, iż podniesiony poziom ADMA u dorosłych osób koreluje z osłabioną wazodylatacją ze strony tętnicy promieniowej. Na tej podstawie wysunięto wniosek, że poziom ADMA w zdrowej populacji ma związek z funkcją śródbłonka naczyniowego [37].

Ryzyko rozwoju miażdżycy można także ocenić za pomocą badania grubości kompleksu intima-media (IMT) w tętnicy szyjnej wewnętrznej, przy pomocy ultrasonografii o wysokiej rozdzielczości. U osób zdrowych IMT nie powinna przekraczać 1 mm, wzrost grubości powyżej tej granicy predysponuje do powstania blaszek miażdżycowych [38]. W świetle przedstawionych wcześniej badań wiadomo, iż istnieje wyraźny związek między osoczową ADMA a IMT. Przy czym poziom osoczowej, symetrycznej dimetyloargininy

stanowi ważny czynnik prognostyczny progresji zmian IMT w tętnicy szyjnej [39]. Wydzielanie ADMA przez śródbłonek jest zwiększone w obecności cholesterolu o niskiej gęstości (LDL) oraz jego utlenionej formy. Najprawdopodobniej S-adenozylometionina reguluje wydzielanie ADMA. Jej zwiększona aktywność w obecności utlenionej formy LDL ma związek ze zwiększoną ekspresją genu dla PRMT [40]. W badaniu Kielstein'a i wsp. dowiedziono, że u osób starszych zarówno niechorujących jak i obciążonych pierwotnym nadciśnieniem tętniczym występuje podwyższony poziom ADMA w porównaniu z grupą młodych zdrowych ochotników. Jednocześnie zwrócono uwagę, iż zwiększonemu gromadzeniu ADMA u starszych osób dodatkowo towarzyszy ograniczony przepływ osoczowy przez nerki (ERPF) oraz zwiększony nerkowy opór naczyniowy (RVR). Na podstawie obserwacji wysunięto wniosek, że rozwijająca się wraz z wiekiem upośledzona perfuzji nerek jest efektem zwiększonej kumulacji ADMA, która ogranicza biodostępność tlenu azotu [41]. Ostatnie badania potwierdziły również, iż poziom ADMA jest ważnym czynnikiem zdarzeń sercowo-naczyniowych u pacjentów z chorobą wieńcową [42].

1.1.7 Czynniki wzrostu – VEGF i FGF

Czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF) – jest kluczowym regulatorem angiogenezy. Wydzielany jest przez różne typy komórek między innymi makrofagi, płytki krwi, keratynocyty, komórki mezangialne nerki oraz komórki guzów nowotworowych [43]. VEGF oprócz pobudzania angiogenezy bierze udział w hematopoezie, gojeniu się ran oraz tworzeniu kości. Pobudza proliferację komórek śródbłonna, migrację komórek oraz hamuje apoptozę [43, 44].

W przypadku hipoksji za pośrednictwem czynnika indukowanego hipoksją HIF-1 dochodzi do zwiększonej ekspresji VEGF mRNA, co prowadzi z kolei do pobudzenia angiogenezy [42, 43]. Mechanizm ten związany jest również z patologicznymi procesami związanymi z progresją guzów nowotworowych [44, 45] oraz rozwojem retinopatii [44, 46]. VEGF występuje w postaci kilku izoform: VEGF -A, -B, -C, -D –E i PlGF (ang. *placental growth factor*). Prototypem i dotychczas najlepiej poznanym czynnikiem jest VEGF-A, który głównie odpowiada za angiogenezę i wpływa na przepuszczalność naczyń [45]. VEGF pełni swoją funkcję biologiczną pobudzając receptory o aktywności kinaz tyrozynowych. Receptory: VEGFR-1 (FLT1) oraz VEGFR-2 (KDR) występują w komórkach endotelialnych śródbłonna naczyniowego, przy czym VEGFR-1 uczestniczy w tworzeniu układu kapilarnego, natomiast VEGFR-2 w proliferacji komórek, angiogenezie, transformacji

komórek macierzystych w komórki śródbłonna i krążeniu endotelialnych komórek progenitowych wywodzących się ze szpiku kostnego. Z kolei rozpuszczalne formy receptorów sVEGFR-1 i sVEGFR-2 są inhibitorami VEGF i hamują angiogenezę [44, 45, 47]. VEGF najprawdopodobniej uczestniczy w remodelingu mięśnia serca w miejscu zawału [43]. Z drugiej strony bierze udział w patogenezie miażdżycy, o czym świadczy zwiększona produkcja VEGF pod wpływem utlenionych form cholesterolu (oxLDL) [48].

Liczne prace wykazały zwiększoną ekspresję VEGF w różnych tkankach guzów nowotworowych [49, 50, 51] oraz białaczkach i chłoniakach [43, 52]. Wydzielany przez komórki nowotworowe VEGF pobudza dalszy wzrost guza [43].

Czynnik wzrostu fibroblastów (FGF) reprezentuje zróżnicowaną pod względem budowy i charakterystyki grupę polipeptydów (FGF1-FGF20). FGF należy do najsilniejszych znanych mitogenów komórek pochodzenia ektodermalnego i mezodermalnego. Udowodniono jego wpływ na proces gojenia i angiogenezę. Indukuje on syntezę kolagenu, fibronektyny i proteoglikanu. FGF wiąże się z receptorami FGFRs, które należą do receptorów kinazy tyrozynowej i składają się z trzech domen immunoglobulinopodobnych oraz sekwencji heparynowej. Pobudzenie receptorów prowadzi do uruchomienia różnych szlaków sygnalizacyjnych między innymi prowadzi do aktywacji szlaku kinaz RAS/MAP lub fosfolipazy C. Większość FGF ze względu na powinowactwo do heparyny dodatkowo ma zdolność wiązania się z heparyno-podobnymi glikozoaminoglikanami (HSPAGs) zlokalizowanymi w obrębie macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM). Cząsteczki HSPAGs uczestniczą w dalszym pobudzaniu szlaków sygnalizacyjnych FGF [53, 54].

FGF odgrywa kluczową rolę w migracji komórek i morfogenezie. Odpowiada za powstawanie osi grzbietowo-brzuszej oraz uczestniczy w kształtowaniu kończyn. Udowodniono, iż FGF odpowiada za prawidłowy rozwój śródmózgowia i mózdzku. W badaniu eksperymentalnym na myszach utrata aktywności FGF7 skutkowałą słabszym rozwojem tych struktur [55].

1.1.8 Angiostatyna

Angiostatyna jest silnym inhibitorem angiogenezy. Powstaje w wyniku rozpadu plazminogenu przy udziale metaloproteinaz, do których zaliczamy MMP-2, MMP-3, MMP-7 oraz MMP-9. Działanie proteolityczne potwierdzono również dla urokinazy (uPA) oraz

tkankowego aktywatora plazminogenu (tPa). Angiostatyna składa się z kombinacji domen typu „ciastka duńskiego”, tzw. „kringle” (od 1 do 4), a ich kolejność oraz dobór uzależniony jest od miejsca, w którym zachodzi proteoliza łańcucha plazminogenu. Ze względu na występowanie różnorodnych form angiostatyny posiada ona zróżnicowane miejsca wiązania oraz specyficzne receptory dla syntazy ATP, integryn oraz angiomotyny. Jej obecność stwierdzono w komórkach nowotworowych, płytkach krwi oraz makrofagach. W przypadku płytek krwi proces syntezy zachodzi na powierzchni błony w trakcie agregacji za pośrednictwem tPA oraz metaloproteinaz (MMP-2, MMP-3 MMP-7). Angiostatyna jest także obecna w płytkach nieagregujących. Najprawdopodobniej jest syntetyzowana wówczas w megakariocytach i transportowana do wnętrza płytek krwi [56, 57, 58].

Działanie antyangiogenne angiostatyny zostało niejednokrotnie potwierdzone eksperymentalnie. W badaniu *in vitro* na komórkach HUVEC przez Jurasza i wsp. zablokowanie wydzielania płytkowej angiostatyny, skutkowało wzrostem unaczynienia i połączeń międzykomórkowych w obrębie komórek HUVEC [58]. Dostępne w literaturze źródła podkreślają znaczenie angiostatyny nie tylko ze względu na jej działanie antyangiogenne, ale również na możliwość hamowania wzrostu guzów nowotworowych i tworzenia przerzutów nowotworowych. Po raz pierwszy do takich wniosków doszedł O'Reilly, który odkrył w warunkach *in vivo* obecność angiostatyny w komórkach nowotworowych raka płuca [59]. Obiecujące wyniki doświadczalne O'Reilly'ego zapoczątkowały dalszą serię badań naukowych nad właściwościami angiostatyny i ich ewentualnym zastosowaniem [60]. Badanie doświadczalne Wesphala i wsp. wykazało, iż zdolność do produkcji angiostatyny przez komórki nowotworowe jest zróżnicowana i zależy od charakteru guza. Wszystkie 6 rodzajów linii komórek nowotworowych pochodzących z raka pęcherza, oraz 6 spośród 7 linii komórkowych raka prostaty wykazywały wysoką aktywność związaną z syntezą angiostatyny. Dodatkowo w zakresie wyżej wymienionych linii komórkowych obserwowano zwiększony poziom urokinazy, biorącej udział w proteolizie plazminogenu [61]. Podkreśla się, iż zahamowanie wzrostu guza przez angiostatynę wynika ze zmniejszenia gęstości unaczynienia w jego obrębie oraz wzrostu indeksu apoptozy, natomiast indeks proliferacyjny komórek pozostaje niezmienny [62].

W świetle dostępnych badań rozważano również znaczenie angiostatyny jako czynnika prognostycznego. W grupie pacjentów z rakiem drobnokomórkowym płuca (NSCLCs), u których stwierdzono obecność angiostatyny, mediana przeżycia była dłuższa niż u chorych z guzem, nie wykazującym zdolności do produkcji angiostatyny [57]. Ponadto

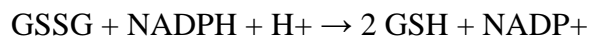
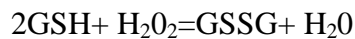
angiostatyna wiąże się z syntezą ATP obecną na powierzchni komórek śródbłonkowych, obniżając jego aktywność. Enzym syntaza ATP zwiększa stężenie ATP, dzięki czemu pozwala przeżyć komórkom śródbłonkowym w warunkach hipoksji, np. wewnątrz guza. Zahamowanie enzymu przez angiostatynę, prowadzi zatem do ograniczenia żywotności komórek, co znalazło zastosowanie w onkologii [63]. Z punktu widzenia klinicznego dostępne są badania eksperymentalne dotyczące wykorzystania angiostatyny do celów terapeutycznych. Już na etapie wczesnych badań O'Reilly doszedł do wniosku, iż egzogenne podawanie angiostatyny do komórek nowotworowych myszy skutecznie zmniejszyło objętość guza [59]. W dostępnej literaturze odnajdujemy również zalety wynikające z terapii złożonej angiostatyną w powiązaniu z innymi czynnikami cytotoksycznymi. Terapia sekwencyjna złożona z radioterapii oraz angiostatyny w leczeniu raka płuca typu Lewisa u myszy okazała się bardziej skuteczna (redukcja guza nowotworowego o 89 %), niż zastosowanie tych metod osobno [64].

Warto zwrócić uwagę, że angiostatyna ma krótki okres półtrwania, co ogranicza jej działanie terapeutyczne. Jedynie nieprzerwane leczenie zachowuje jej skuteczność. Kolejną barierą, która ogranicza jej wykorzystanie są trudności wynikające z jej egzogennej produkcji oraz zachowanie aktywności podczas transportu i przechowywania [65]. W dalszym ciągu podejmuje się jednak próby opracowania skutecznych metod wykorzystania angiostatyny do celów terapeutycznych. W badaniu eksperymentalnym z 2013 r. posłużono się metodami inżynierii genetycznej i za pomocą wektora wirusowego Herpes simplex wprowadzono gen angiostatyny bezpośrednio do komórek nowotworowych glioblastoma multiforme (GSC). W efekcie uzyskano zmniejszenie unaczynienia guza nowotworowego w zakresie komórek nerwowych [66].

1.1.9 Zredukowany glutation (GSH)

Zredukowany glutation GSH - trójpeptydowy tiol zbudowany z glicyny, cysteiny oraz kwasu glutaminowego zaliczany jest do najważniejszych antyoksydantów wewnątrzkomórkowych. GSH występuje w komórkach w postaci wolnej lub związanej z białkami. Powstaje między innymi w wyniku redukcji utlenionego glutationu GSSG przy udziale reduktazy glutationu [67, 68]. W odpowiedzi na stres oksydacyjny w komórkach, GSH za pośrednictwem peroksydazy glutationowej szybko ulega oksydacji do dimerycznej formy

GSSG. Z kolei zredukowany glutation odtwarzany jest przez utlenianie NADPH za pomocą reduktazy glutationowej wg. poniższego wzoru:



[67]

Wskaźnik oksydacji, czyli stosunek zredukowanego glutationu do formy utlenionej jest markerem stresu oksydacyjnego i wskazuje na ogólny stan zdrowia komórek oraz świadczy o ich możliwościach do przeciwdziałania uszkodzeniom związanym ze stresem oksydacyjnym [69]. Stres oksydacyjny związany jest z tworzeniem reaktywnych form tlenu (ROS). Wywołuje niekorzystne zmiany na poziomie struktur komórkowych, które wiążą się z peroksydacją białek i lipidów, uszkodzaniem błony komórkowej oraz wywoływaniem defektów w materiale genetycznym jądra komórkowego. Udowodniono, iż stres oksydacyjny odpowiada za proces starzenia oraz przyczynia się do rozwoju cukrzycy, chorób autoimmunologicznych, choroby Parkinsona oraz Alzheimerera [67, 68]. Podkreśla się również, że stres oksydacyjny prowadzi do uszkodzenia mięśnia sercowego w trakcie jego niedotlenienia i związany jest ze zwiększonym stężeniem reaktywnych form tlenu. W badaniu Iqbal'a i wsp. u pacjentów z zawałem mięśnia sercowego w porównaniu z grupą osób zdrowych odnotowano podwyższony poziom zredukowanego glutationu. Obserwowane różnice wynikały najprawdopodobniej ze wzmożonej aktywacji układów antyoksydacyjnych mających na celu przeciwdziałanie uszkodzeniom wywołanym przez reaktywne formy tlenu. Z kolei w badaniu Shima i wsp. u osób z chorobą niedokrwinną serca, zawałem mięśnia sercowego lub krwawieniem podpajęczynówkowym poziom zredukowanego glutationu był zdecydowanie niższy w stosunku do grupy osób zdrowych. Na tej podstawie autorzy badania wysunęli wniosek, że obniżony poziom zredukowanego glutationu jest czynnikiem ryzyka zmian miażdżycowych zarówno w naczyniach wieńcowych jak i naczyniach mózgowych i świadczy o tendencji do rozwoju chorób sercowo-naczyniowych [70]. Zredukowany glutation pełni kluczową rolę w zapobieganiu powstawania stresu oksydacyjnego. GSH syntetyzowany głównie w wątrobie, chroni komórki wątrobowe przed toksycznym działaniem nadtlenków, toksyn oraz wolnych rodników. Ponadto wykazano, że osoby zakażone wirusem HCV są bardziej podatne na działanie stresu oksydacyjnego, ponieważ obserwuje się u nich zaburzoną syntezę glutationu w komórkach wątroby uszkodzonych przez wirusa zapalenia wątroby typu C [71].

1.1.10 Cykliczny guanozynomonofosforan (cGMP)

cGMP-cykliczny guanozynomonofosforan zaangażowany jest w procesy metaboliczne w różnych komórkach i jest głównym elementem szlaku sygnalizacyjnego dla tlenku azotu oraz peptydu natriuretycznego (NPs). cGMP powstaje z aktywowanej tlenkiem azotu cyklazy guanylowej i jest hydrolizowany przez cykliczną fosfodiesterazę nukleotydową (PDEFs). cGMP uczestniczy w transmisji sygnałów za pośrednictwem szlaku: kinaz białkowych cGMP –PKG, cGMP- PDE oraz cGMP związane z kanałami kationowymi. Tlenek azotu za pośrednictwem cGMP, a następnie w wyniku aktywacji kinaz zależnych od cGMP (kinaz białkowych G) odpowiada za relaksację mięśni gładkich przewodu pokarmowego i naczyń, zahamowanie agregacji płytek, ograniczanie przerostu mięśnia sercowego, ochronę przed niedotlenieniem i reperfuzją serca oraz za polepszenie funkcji poznawczych [72].

Podkreśla się również rolę kardioprotekcyjną przedsionkowego peptydu natriuretycznego (ANP) oraz mózgowego peptydu natriuretycznego, zwanego też peptydem natriuretycznym typu B (BNP) w uszkodzonym mięśniu sercowym. Do ich działania konieczna jest obecność cGMP, która uruchamia szlak odpowiednich kinaz [73, 74]. W badaniach eksperymentalnym zaobserwowano, że myszy pozbawione genu dla ANP lub cyklazy guanylowej chorują na nadciśnienie tętnicze oraz dochodzi u nich do przerostu mięśnia sercowego. Podobnie u myszy pozbawionych możliwości syntezy BNP częściej obserwuje się włóknienie mięśnia sercowego [74]. Zwraca się także uwagę na wpływ cGMP na metabolizm tkanki tłuszczowej i jej udział w powstawaniu otyłości. Literatura podaje, iż cGMP za sprawą NO pobudza adipogenezę. Jednocześnie w badaniu klinicznym Birkenfelda uaktywnienie cGMP przez infuzję ANP u zdrowych ochotników skutkowało wzrostem wolnych kwasów tłuszczowych i obniżeniem ciśnienia tętniczego [73]. Dodatkowo zastosowanie BNP nasiliło lipolizę zarówno u zdrowych jak i chorujących na niewydolność serca [73, 75].

cGMP uczestniczy także w procesach metabolicznych gruczołów wydzielniczych tj. trzustki i wątroby. W trzustce niski poziom NO za pośrednictwem cGMP pobudza sekrecję insuliny z komórek beta trzustki. Odwrotne działanie wywołuje skumulowany NO i nie jest wówczas zależny od mechanizmów cGMP [73]. Jednocześnie za pośrednictwem cGMP przedsionkowy peptyd natriuretyczny pełni swoje funkcje przeciwzapalne hamując TNF-alfa oraz fagocytozę [76]. W chwili obecnej powszechnie wykorzystuje się terapię, której działanie oparte jest na wykorzystaniu transmisji szlaku tlenku azotu NO-cGMP. Podkreśla się skuteczność nitrogliceryny, inhibitorów PDE5 (Sildenafilu, Vardenafilu, Tadalafilu) w leczeniu zaburzeń naczyniowych, takich jak dusznica bolesna, zaburzenia erekcji

i nadciśnienie płucne. Z kolei inhibitory PDE-3 (cilostazol, milrinon) wykorzystywane są w leczeniu chromania przestankowego i ostrej niewydolności serca [72].

1.2. ROLA PŁYTEK KRWI W PATOGENEZIE CHORÓB SERCOWO-NACZYNIOWYCH

Płytki krwi odgrywają kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy naczyniowej. W procesie krzepnięcia uczestniczą w adhezji, aktywacji oraz agregacji [77].

Wieloletnie badania dowiodły, iż płytki krwi oprócz korzystnego wpływu na proces koagulacji, przyczyniają się do powstawania patologicznych zakrzepów w łożysku naczyniowym i w konsekwencji prowadzą do choroby niedokrwiennej serca oraz ostrych incydentów wieńcowych [78]. Istnieje związek między liczbą płytek krwi oraz ich objętością (MPV), a predyspozycją do chorób sercowo-naczyniowych [79, 80]. W prospektywnym badaniu Thaulowa prowadzonym przez około 13 lat na 500 zdrowych mężczyznach w średnim wieku wykazano, iż podwyższona liczba płytek krwi oraz nasilona odpowiedź na ADP zwiększa ryzyko zgonu z powodu choroby wieńcowej [79]. Z kolei metaanaliza obejmująca 6000 pacjentów potwierdziła rolę parametru MPV jako czynnika prognostycznego ryzyka sercowo-naczyniowego związanego z zawałami serca oraz zwiększoną śmiertelnością po ostrych zespołach wieńcowych i nawrocie zwężenia w stencie po interwencji naczyniowej [80].

Potwierdzono również, że płytki krwi biorą udział w patogenezie miażdżycy, głównie przez aktywację procesu zapalnego. Do powstawania zmian zapalnych przyczyniają się przez pobudzanie ekspresji cząsteczek adhezyjnych ze śródbłonka naczyniowego, uwalnianie mediatorów procesu zapalnego i hormonów wzrostu oraz wpływu na adhezję leukocytów. W patogenezie miażdżycy szczególnie podkreśla się znaczenie czynników chemotaktycznych, które naturalnie gromadzone są w ziarnistościach alfa płytek krwi. Uwolnione z płytek chemokiny np. CXCL4, CXCL7 oraz czynniki wzrostu (TGF- β), pełnią głównie funkcję mediatorów procesu zapalnego. Jednocześnie chemokina CXCL4 ma udowodnioną aktywność proaterogenną i pobudza różnicowanie limfocytów T oraz makrofagów kosztem neutrofilów, które ulegają apoptozie oraz zwiększa ilość utlenionego cholesterolu frakcji LDL. Występujące na powierzchni płytek cząsteczki: GPIIb/IIIa, GP1b α , P-selektyny, JAM-A i CD40/CD40L reagując z uszkodzonym śródbłonkiem, leukocytami oraz

cząsteczkami macierzy predysponują do dalszego rozwoju miażdżycy [81, 82]. Udział płytek krwi w manifestacji chorób sercowo-naczyniowych obserwuje się również u pacjentów z cukrzycą. Polega ona na hiperagregacji płytek krwi w odpowiedzi na reakcję różnych agonistów i związana jest z nasileniem wydzielania 11-dehydro tromboksanu B2 [83, 84].

Zjawisko agregacji płytek krwi polega na ich wzajemnym przyleganiu, co prowadzi do powstawania czopu płytkowego. Agregacja płytek została po raz pierwszy zaobserwowana przez Hayema [85], Bizzozero [86], Oslera [87] oraz Schimmelbusha [88] w II poł XIX w. W ciągu ostatnich dziesięciu dekad udowodniono, iż agregacja płytek jest procesem złożonym i wymaga obecności odpowiednich receptorów oraz cząsteczek adhezyjnych, których aktywność uzależniona jest od panujących warunków hemodynamicznych związanych z przepływem krwi.

W agregacji uczestniczą ligandy adhezyjne tj. czynnik von Willebranda (vWF), fibrynogen i fibronektyna. Szczególnie podkreśla się znaczenie vWF, który posiada multimeryczną strukturę oraz odpowiednią powierzchnię dla receptorów płytkowych. Jego zdolność do wychwytywania płytek z krwi oraz zmian konformacji zwiększa powierzchnię wiązania z receptorami oraz możliwość tworzenia kompleksu vWF-GPIb do transmisji sygnału aktywującego. Z kolei fibronektyna wpływa zarówno na proces aktywacji płytek, jak i agregacji przez sieciowanie fibronektyny ze spolimeryzowaną fibryną w połączeniu z fibronektyną obecną w surowicy. Proces agregacji przebiega w 2 fazach: odwracalnej i nieodwracalnej. Pierwsza faza związana jest z odpowiednią aktywacją płytek oraz funkcją adhezyjną receptora GPIb i integryną. Jednoczesne formowanie czopów płytkowych z dyskoidalnych płytek jest zależne od prędkości ścinania krwi. W początkowym etapie kluczową rolę w tym procesie odgrywiają wypustki błonowe, które umożliwiają przyleganie do siebie płytek. Są to odcinki dwuwarstwy lipidowej w kształcie cylindrów, które powstają na powierzchni płytek z powodu działania oporu hemodynamicznego. Z kolei II faza polega na zmianie kształtu i uwolnieniu ziarnistości z płytek krwi przy udziale odpowiednich agonistów tj. ADP, trombiny i TXA2 [89].

W początkowej fazie tworzenia czopu płytkowego istotną rolę odgrywiają zmiany w parametrach związanych z przepływem krwi tj. siły ścinające (*gradient shear*). W zależności od prędkości ścinania wyodrębniono trzy oddzielne mechanizmy agregacji w warunkach *in vivo*. Najpowszechniejszym jest model agregacji, który zachodzi przy udziale fibrynogenu i integryn $\alpha_{IIb}\beta_3$ przy prędkości ścinania poniżej 1000 s^{-1} . W przypadku wyższych prędkości oscylujących w granicach 1000 s^{-1} , w początkowym etapie tworzeniu

czopu płytkowego, konieczny jest udział vWF oraz integryny $\alpha_{IIb}\beta_3$. Przy dużej prędkości ścinania, znacznie powyżej 1000 s^{-1} , w agregacji pośredniczy czynnik vWF, zarówno jego stała jak i rozpuszczalna forma i tworzą się kompleksy vWF-GPIb, przy czym nie dochodzi do aktywacji płytek i nie wymagany jest udział integryny jak w poprzednich procesach [90].

Do oceny agregacji płytek powszechnie wykorzystuje się agregometrię. Agregometria świetlna LTA (ang. *light transmission aggregometry*) stanowi złoty standard w ocenie funkcji płytek krwi i po raz pierwszy została wykorzystana w badaniach w 1962 r. przez Borna i O'Briena. LTA polega na pomiarze światła przechodzącego przez znajdujące się w zawiesinie płytki krwi, przy czym transmisja światła zwiększa się wraz z agregacją płytek. LTA jest metodą pracochłonną i wymaga obecności doświadczonego personelu, w związku z czym może być wykorzystywana tylko w odpowiednio wyspecjalizowanych laboratoriach. Metodą alternatywną jest agregometria impedancyjna, „*single platelet counting*” oraz cytometria przepływowa [91, 92, 93].

Agregometria impedancyjna umożliwia ocenę agregacji płytek krwi na podstawie różnicy w oporności (impedancji) między elektrodami, do których przylegają płytki krwi. Aparat impedancyjny Multiplate Analyzer® umożliwia pomiar agregacji w oparciu o zastosowanie pięciu testów z użyciem odpowiedniego agonisty tj. ADP (ADP test), kolagenu (COL-test), białka TRAP-6 aktywującego receptor trombiny (TRAP-test), kwasu arachidonowego (ASPI test) oraz ristocetyny zależnej od czynnika von Willebranda (RISTO test). Zasada działania aparatu opiera się na wielokrotnej agregacji elektrodowej, podczas której każdemu pomiarowi odpowiadają dwa oznaczenia [94].

Aspiryna ze względu na właściwości antyagregacyjne od lat ma powszechne zastosowanie w profilaktyce chorób sercowo-naczyniowych. Acetylacja enzymu cyklooksygenazy COX-1 w pozycji Ser-529 przy udziale aspiryny skutkuje zablokowaniem syntezy tromboksanu (TXA₂) z kwasu arachidonowego. Mała dawka aspiryny zmniejsza ryzyko zdarzeń sercowo- naczyniowych o 32 % u pacjentów wysokiego ryzyka. Jednakże od 5-45 % pacjentów wykazuje tzw. oporność na aspirynę wynikającą z obniżonej skuteczności jej działania. Obecne badania sugerują, iż obniżona odpowiedź na aspirynę predysponuje do ostrych zespołów wieńcowych. Oporność na aspirynę ma charakter wieloczynnikowy i może wynikać z przyczyn biologicznych, genetycznych, farmakologicznych oraz klinicznych. Podejrzewa się, iż obecność dużej liczby niedojrzałych płytek krwi, powstałych jako efekt zwiększonej przemiany, może predysponować do aspirynooporności [93, 94].

W chwili obecnej do oceny skuteczności działania aspiryny i klopidogrelu oprócz agregometrii fotometrycznej coraz częściej wykorzystuje się agregometrię impedancyjną

(MEA). Metoda ta w porównaniu z agregometrią LTA jest wygodniejszą, ponieważ może być wykorzystana bezpośrednio w testach przyłóżkowych typu „*point of care analysis*” i nie wymaga wyspecjalizowanych warunków laboratoryjnych. Kolejnymi zaletami agregometri impedancyjnej jest możliwość przeprowadzenia badania z krwi pełnej bez konieczności wirowania oraz uzyskanie szybkiego wyniku (badanie trwa ok. 10 minut) [95, 96]. W ocenie aspirynooporności wykorzystuje się również cytometrię przepływową, urządzenie Platalet Funcion Analyzer (PFA-100), metodę *Verify Now Aspirin Assay*, ocenę metabolitu kwasu arachidonowego, oraz 11-dehydrotromboksanu w moczu i krwi. [93]. Agregometria służy jako pomocnicza metoda diagnostyczna przy wykrywaniu trombastenii Glanzmanna [97], choroby von Willebranda [98], choroby Bernarda-Souliera, defektu receptora ADP [99] oraz małopłytkowości poheparynowej [100].

1.3 ZASTOSOWANIE PROMIENIOWANIA LASEROWEGO W MEDYCYNIE

1.3.1 Wprowadzenie

Lasery (akronim angielskiego zdania *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* – wzmacnienie światła poprzez wymuszoną emisję promieniowania) jest urządzeniem wytwarzającym promieniowanie elektromagnetyczne (światło z zakresu promieniowania widzialnego, podczerwieni lub ultrafioletu) na zasadzie tak zwanej emisji wymuszonej. Pod wpływem dostarczonej energii wzbudzone atomy emitują fotony, które charakteryzują się dla określonego rodzaju urządzenia laserowego stałą energią. W efekcie tego powstaje promieniowanie monochromatyczne (o ściśle określonej długości fali), spójne (koherentne), najczęściej spolaryzowane (zgodne fazowo) o równoległej (skolimowanej) wiązce, mogące przenosić znaczne energie. Pierwsze urządzenie laserowe skonstruował T. Maiman w 1960 r. [101].

W zależności od ośrodka czynnego, w którym wytwarzane jest promieniowanie, lasery dzielimy na: gazowe, ciała stałego, cieczowe oraz półprzewodnikowe. Uwzględniając długość wytwarzanego promieniowania dzielimy lasery na emitujące promieniowanie podczerwone, widzialne lub nadfioletowe. Ponadto w zależności od charakteru pracy rozróżniamy lasery wytwarzające promieniowanie w sposób ciągły lub impulsowy. Pod względem stosowanej

energii, w zastosowaniach medycznych, promieniowanie laserowe dzieli się na wysokoenergetyczne (o energii od kilkuset do kilku tysięcy J/cm^2) wykorzystywane do destrukcji tkanek, promieniowanie średnioenergetyczne (z energią rzędu kilkudziesięciu J/cm^2) używane w terapii fotodynamicznej (ang. *photodynamic therapy* - PDT) między innymi do leczenia nowotworów, oraz promieniowanie niskoenergetyczne o gęstości energii do kilkudziesięciu J/cm^2 stosowane w biostymulacji [102].

Z przedstawionej powyżej charakterystyki wynika, iż każde urządzenie laserowe charakteryzuje się kilkoma parametrami. Są to: długość emitowanej fali, charakter pracy oraz moc wyjściowa. Parametry te dla danego urządzenia mogą być wartością stałą lub modyfikowalną. Zwłaszcza urządzenia półprzewodnikowe dają dużą możliwość przestrajania parametrów wyjściowych – nie tylko emitowanej mocy, ale i charakteru pracy (działanie impulsowe w szerokim zakresie częstotliwości lub praca ciągła), a nawet niewielka zmiana długości wytwarzanej fali.

Z kolei biorąc pod uwagę promieniowanie oddziałujące na tkanki opisujemy je kilkoma parametrami. Oprócz wymienionych: długości fali (podawanej najczęściej w nm) i mocy (wyrażanej w mW lub W) najczęściej podaje się również zastosowaną energię (jednostką jest J). Aby szczegółowiej opisać te wielkości uwzględniając powierzchnię napromieniowanej tkanki, często uwzględniana jest tak zwana gęstość energii (wyrażana w J/cm^2) lub gęstość mocy (opisywana w mW/cm^2). Całkowita energia pochłonięta przez tkankę jest iloczynem mocy promieniowania emitowanego przez laser i czasu emisji. Dotyczy to oczywiście warunków idealnych, w których całe promieniowanie laserowe dociera do docelowej tkanki.

1.3.2 Efekty biostymulacyjne promieniowania laserowego

Korzystne efekty leczenia światłem znane są od dawna. Już w starożytności stosowano promieniowanie słoneczne (helioterapia) w celu poprawy stanu zdrowia. Za twórcę współczesnej fototerapii uważa się N. Finsena, który za prace [103, 104] nad wykorzystaniem promieniowania widzialnego i nadfioletowego w leczeniu gruźlicy i innych chorób otrzymał w 1903 r. nagrodę Nobla.

Już w kilka lat po uruchomieniu pierwszego urządzenia laserowego E. Mester zaobserwował korzystne efekty promieniowania laserowego o niskiej energii na organizm

ludzki [105]. Od tego czasu datuje się termin leczenia niskoenergetycznym promieniowaniem laserowym (LLLT – *Low Level Laser Therapy*).

Efekty biologiczne promieniowania laserowego wiążą się z absorpcją przez wiązania chemiczne określonej dawki energii. Powoduje to w komórkach powstanie określonych, choć jeszcze nie do końca poznanych, efektów biochemicznych, bioelektrycznych, biomagnetycznych i bioenergetycznych [106]. Efekty biochemiczne wiążą się z modyfikacją (najczęściej przyspieszenie) enzymatycznych procesów biologicznych w organizmie pod wpływem absorpcji energii przez wiązania chemiczne [107, 108, 109]. Efekt bioelektryczny wiąże się ze stabilizacją potencjałów błonowych komórek, co wpływa na procesy transportu przez błonę [107]. Wpływ biomagnetyczny spowodowany jest uporządkowaniem domenowej struktury komórki poprzez oddziaływanie dostarczonej niewielkiej dawki energii na występujące związki chemiczne o charakterze dipolowym [110]. Wreszcie dostarczenie dodatkowej dawki energii stymuluje procesy energetyczne przyspieszając w zakresie komórki procesy wzrostu, podziału czy regeneracji. Stwierdzono, że niskoenergetyczne promieniowanie laserowe, poprzez aktywację łańcucha oddechowego komórki, a zwłaszcza oksydazę cytochromu c, stymuluje syntezę adenozyntroójfosforanu (ATP) [111, 112, 113, 114]. Aktywacja cytoplazmatycznych kinaz, będąca wynikiem wzrostu poziomu energetycznego komórki, pociąga za sobą wzrost syntezy RNA i DNA oraz produkcję białek, zarówno strukturalnych, jak i enzymatycznych [115, 116, 117]. Wszystkie przedstawione procesy aktywowane przez niskoenergetyczne promieniowanie laserowe mają charakter proliferacyjny [118, 119]. Omawiane procesy zwiększające aktywność biologiczną komórki powodują również wymierne efekty w skali tkanki, narządu czy całego organizmu. Najczęściej obserwuje się działanie przeciwzapalne, przeciwbólowe i regeneracyjne. Przeciwzapalne oddziaływanie LLLT spowodowane jest wpływem na aktywność komórek biorących udział w procesach reakcji zapalnej ustroju. Obserwuje się stabilizację limfocytów i makrofagów, co wiąże się ze zmniejszeniem uwalniania cytokin prozapalnych, w tym interleukiny-1 [120, 121, 122], interleukiny-6 [122, 123, 124] czy TNF- α [124, 125, 126]. Jednocześnie obserwowano także wzrost aktywności przeciwzapalnie działającej interleukiny-10 [122, 127]. Ograniczenie nasilenia procesów zapalnych oraz korzystny, bezpośredni wpływ na komórki nerwowe wiąże się ze zmniejszeniem odczuwania bólu. Ponadto hamowanie procesu zapalnego oraz anaboliczne oddziaływanie LLLT związane z dostarczoną bezpośrednio do komórek energią sprzyja regeneracji tkanek. W badaniach

obserwowano wpływ LLLT na intensywniejszy rozrost kolonii śródbłonna jak również hamowanie aktywności fibroblastów.

Efekt biostymulacyjny niskoenergetycznego promieniowania laserowego związany jest z dostarczoną do tkanki energią. Związek pomiędzy efektem biologicznym, a dawką energii opisuje prawo (wykres) Arndta-Schultza. Zwiększanie dostarczanej energii w pewnym zakresie wiąże się ze wzrostem odpowiedzi biologicznej, następnie dochodzi do efektu *plateau*, a przy dalszym wzroście dostarczonej energii efekt biologiczny maleje [106]. W zależności od rodzaju komórek oraz sposobu dostarczania energii do miejsca docelowego (długość fali zastosowanego promieniowania laserowego, liczba cykli naświetlania) zaobserwowano, że efekt *plateau* mieści się w granicach kilku – kilkudziesięciu J/cm^2 . Zaobserwowano także, że korzystniejsze jest wielokrotne dostarczenie mniejszych dawek energii, niż zastosowanie jednorazowej większej dawki. W przypadku stosowania powtarzanych ekspozycji naświetlania sumaryczna dawka, przy nadal korzystnym efekcie, może być mniejsza, niż w przypadku użycia dawki jednorazowej. W przypadku mniejszej mocy promieniowania stosowanego w LLLT unika się przeważnie szkodliwego efektu termicznego, który może wystąpić gdy stosowana gęstość mocy promieniowania przekracza $100-200\text{ mW/cm}^2$. W przypadku gdy efekt termiczny nie ma istotnego znaczenia, korzystne efekty biostymulacji mogą wystąpić aż do zastosowanej gęstości mocy $200-400\text{ mW/cm}^2$, lecz powyżej 500 mW/cm^2 dochodzi przeważnie do uszkodzenia tkanek [106].

Uzyskiwany efekt biologiczny wiąże się także z długością fali zastosowanego promieniowania. Tak zwane okno optyczne dla efektu biostymulacji mieści się w przedziale $550-1000\text{ nm}$ [128]. Promieniowanie o mniejszej oraz większej długości fali jest bardzo silnie pochłaniane przez tkanki i w praktyce nie jest stosowane. Ponadto w przypadku promieniowania o krótszej długości fali, będącego w istocie zakresem ultrafioletowym ($100-400\text{ nm}$) mogłoby dojść do efektów mutagennych i kancerogennych. Przeprowadzone badania porównawcze oceniające wpływ LLLT na metabolizm komórki, wykazały że najlepszy efekt biostymulacji można uzyskać stosując promieniowanie z zakresów $620-680\text{ nm}$ oraz $812-870\text{ nm}$ [111, 129]. Ten ostatni zakres często jest rozszerzany do przedziału około $800-1000\text{ nm}$.

Efekt biostymulacyjny LLLT wykorzystywany jest w rehabilitacji zwłaszcza w zakresie układu kostno-stawowo-mięśniowego i nerwowego, w medycynie regeneracyjnej i estetycznej w zakresie dermatologii i stomatologii [130, 131, 132]. Obecnie rozszerzane są

zastosowania LLLT, podejmuje się próby stosowania tej metody w chorobach układu sercowo-naczyniowego.

1.3.3 Zastosowanie niskoenergetycznego promieniowania laserowego w chorobach układu krążenia

Pierwsze zastosowania promieniowania laserowego w leczeniu chorób układu krążenia wiązały się z użyciem dużych energii. Obecnie laser jest sporadycznie wykorzystywany do udrażniania zamkniętych tętnic zarówno obwodowych, jak i wieńcowych [133, 134]. W roku 1981 Mirhoseini wprowadził technikę wypalania kanałów w uszkodzonym pozawałowo mięśniu sercowym celem poprawy jego ukrwienia [135]. Metoda ta stosowana była zarówno przez kardiochirurgów od strony osierdzia techniką klasyczną lub laparoskopową, jak i od strony wsierdzia za pomocą technik endowaskularnych [136]. Promieniowanie średnioenergetyczne zostało użyte w terapii fotodynamicznej, której celem było zmniejszenie złogów miażdżycowych występujących w tętnicach oraz zapobieganie nawrotowi zwężenia po zabiegu angioplastyki. Przeprowadzone doświadczenia na zwierzętach [137, 138] oraz badania kliniczne [139] przyniosły obiecujące rezultaty.

Promieniowanie laserowe o niskiej energii stosowane było w celu poprawy ukrwienia mięśnia sercowego w stabilnej postaci choroby wieńcowej [140] oraz w ograniczeniu strefy zawału serca, zarówno w badaniach na modelu zwierzęcym [141, 142] jak i pracach klinicznych [143].

Laser emitujący niską energię wykorzystywany był także w zapobieganiu nawrotowi zwężenia po zabiegu angioplastyki wieńcowej [144, 145, 146]. Stwierdzono, że naświetlanie promieniowaniem ogranicza nawrót zwężenia, w wyniku zmniejszenia odczynu zapalnego [147], obniżenia poziomu cytokin oraz wzrostu uwalniania tlenu azotu [148].

1.3.4 Wpływ niskoenergetycznego promieniowania laserowego na śródbłonek naczyniowy

W ostatnim czasie wykorzystanie dla celów terapeutycznych niskoenergetycznego promieniowania laserowego staje się coraz bardziej powszechne. Wzrasta także liczba badań naukowych dotyczących tego zagadnienia. Większość przeprowadzonych badań wykonano metodą *in vitro* na hodowlach komórkowych, oraz na zwierzęcych modelach doświadczalnych. Istnieją tylko pojedyncze doniesienia kliniczne dotyczące bezpośredniego wpływu LLLT na ludzki śródbłonek naczyniowy. Dotychczas udało się udowodnić, iż LLLT ma działanie regeneracyjne i przyspiesza gojenie ran [149, 150, 151]. Wpływ LLLT na proliferację komórek został potwierdzony na różnych hodowlach komórkowych [152, 153, 154]. Podobne działanie wykazano również w badaniu Schindla na referencyjnej linii komórek śródbłonka ludzkiego tzw. komórkach HUVEC. Stwierdzono, iż efekt biostymulacyjny był zależny od zastosowanej dawki. Dla komórek HUVEC znaczący ich wzrost odnotowano dla długości fali 670 nm, przy zastosowaniu dawki LLLT pomiędzy 2-8 J/cm² [155].

Z kolei w badaniu *ex vivo* na ludzkich modelach doświadczalnych udało się potwierdzić korzystnie oddziaływanie LLLT na napięcie naczyniowe. Zastosowanie promieniowania niskoenergetycznego o długości fali 680 nm i gęstości mocy 16 J/cm² wywołało wazodylatację tętnic wieńcowych oraz tętnicy piersiowej wewnętrznej po wcześniejszym zastosowaniu farmakologicznego skurczu [156].

Niskoenergetyczne promieniowanie laserowe wywołuje korzystny efekt na śródbłonek naczyniowy wpływając na metabolizm tlenu azotu [157, 158]. W badaniu na komórkach HUVEC zastosowanie LLLT o długości fali 632 nm oraz gęstości energii 0,26 J/cm² doprowadziło do zwiększonej ekspresji genu dla śródbłonkowej eNOS odpowiedzialnej za syntezę tlenu azotu. Jednocześnie odnotowano, że zwiększona ekspresja genu dla syntazy tlenu związana była z aktywacją szlaku przekąźnikowego PI3K. Na podstawie uzyskanych wyników udało się również potwierdzić, iż naświetlanie komórek śródbłonka zwiększa proliferację oraz migrację komórek [157].

Z kolei w badaniu na szczurach z wywołanym celowo zawałem mięśnia sercowego przez okluzję lewej tętnicy zstępującej zastosowano LLLT o długości fali 804 nm oraz gęstościach mocy 5, 12 i 17 mW/cm². Efektem naświetlania był wzrost iNOS oraz VEGF, które jak się okazało posiadały właściwości kardioprotekcyjne [158]. Innym przykładem potwierdzającym korzystne działanie LLLT na metabolizm tlenu azotu jest badanie, które

przeprowadzono na fibroblastach pochodzących z rany stopy cukrzycowej. Naświetlanie komórek promieniowaniem laserowym o długości fali 830 nm i gęstości mocy 5 J/cm² wywołało działanie przeciwzapalne, znaczący wzrost wydzielania tlenku azotu, ROS oraz pobudziło procesy proliferacji. Wyniki badań sugerują, iż promieniowanie niskoenergetyczne może w przyszłości być wykorzystywane w leczeniu stopy cukrzycowej [159, 160].

Zwiększona produkcja NO może być także efektem zmian w działaniu oksydazy cytochromu c. LLLT najprawdopodobniej zwiększa aktywność oksydazy, przez co dochodzi do uwalniania NO z miejsc aktywnych enzymu [161].

2. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

Choroby sercowo-naczyniowe stanowią jedną z głównych przyczyn zgonów. W chwili obecnej uznaje się, iż dysfunkcja śródbłonna naczyniowego oraz zaburzenia agregacji płytek krwi prowadzą do rozwoju tej grupy schorzeń. Istotne wydaje się opracowanie metod terapeutycznych, których działanie wpływałoby efektywnie na funkcję śródbłonna naczyniowego oraz ograniczało negatywne skutki związane z nadmierną agregacją płytek krwi. Zastanawiające jest, czy stosowane od lat w medycynie niskoenergetyczne promieniowanie laserowe może wywierać korzystny wpływ na agregację płytek oraz aktywność śródbłonna naczyniowego. Przeprowadzone w ostatnim czasie badania eksperymentalne oraz kliniczne potwierdziły korzystne oddziaływanie LLLT w zakresie układu krążenia. Istnieją pojedyncze doniesienia odnośnie działania promieniowania laserowego na ludzki śródbłonek w warunkach *in vivo*, a doniesienia dotyczące oddziaływania na agregację płytek krwi są sprzeczne.

Celem pracy jest

1. Ocena wpływu niskoenergetycznego promieniowania laserowego na potencjał oksydoredukcyjny na podstawie oznaczenia zredukowanego glutationu.
2. Analiza wpływu niskoenergetycznego promieniowania laserowego na śródbłonne czynniki związane ze szlakiem metabolizmu tlenu azotu (L-arginina, ADMA, SDMA, cGMP).
3. Ocena wpływu LLLT na potencjał angiogeny śródbłonna (FGF, VEGF, angiostatyna).
4. Badanie wpływu niskoenergetycznego promieniowania laserowego na agregację płytek krwi w modelu naświetlania *in vivo*.
5. Ocena zależności pomiędzy badanymi parametrami funkcji śródbłonna, a agregacją płytek krwi.

3. MATERIAŁ I METODY

3.1 Badana grupa

W badaniu wzięło udział łącznie 40 osób zdrowych w przedziale wiekowym 20-40 lat. Wśród nich 30 osób (14 kobiet i 16 mężczyzn, śr. wieku $30,03 \pm 5,05$ lat) stanowiło grupę naświetlaną. Pozostałe 10 osób (6 kobiet i 4 mężczyzn, śr. wieku $27,82 \pm 4,65$ lat) zakwalifikowano do grupy kontrolnej. Biorąc pod uwagę różnicę w przenikaniu promieniowaniaiskoenergetycznego do tętnicy promieniowej w zależności od grubości tkanki podskórnej każdemu uczestnikowi badania wyliczono BMI oraz przeprowadzono pomiar ultrasonograficzny głębokości położenia tętnicy promieniowej (odległość od powierzchni skóry do powierzchni ściany tętnicy). Średnia wartość BMI dla grupy naświetlanej wynosiła $22,67 \pm 2,62$, natomiast w grupie kontrolnej $22,44 \pm 2,27$. Wartości głębokości położenia tętnicy promieniowej oscylowały w granicach 5,6 – 8,1 mm i nie różniły się w obu grupach.

Opierając się na wywiadzie lekarskim do grupy naświetlanej rekrutowano młode osoby bez istotnej przeszłości chorobowej. Nie kwalifikowano również ochotników ze schorzeniami ogólnoustrojowymi, które zaburzają funkcję śródbłonna naczyniowego lub wpływają na agregację płytek krwi. Do grupy tych schorzeń zaliczono między innymi choroby sercowo-naczyniowe tj. nadciśnienie tętnicze, cukrzyca, miażdżycowa choroba tętnic obwodowych, niewydolność serca oraz przebyte incydenty sercowo-naczyniowe (udar, przemijający atak niedokrwienny - TIA, zawał mięśnia sercowego). Ponadto do grupy badanej nie mogły przystąpić osoby z aktywnym i przewlekłym procesem zapalnym. Na podstawie wywiadu eliminowano zatem osoby z ostrymi lub przewlekłymi chorobami infekcyjnymi, chorobami o podłożu autoimmunologicznym i endokrynologicznym oraz schorzeniami hematologicznymi i nowotworowymi. Do grupy naświetlanej nie kwalifikowały się również osoby ze schorzeniami ograniczającymi przepływ z zakresie tętnicy promieniowej np. zespołami uciskowymi oraz zakrzepicą czy miażdżycą tętnic obwodowych. W wywiadzie brano również pod uwagę obecność chorób zaburzających prawidłową penetrację promieniowaniaiskoenergetycznego do badanego naczynia tętniczego. W związku z tym eliminowano osoby ze schorzeniami dermatologicznymi, a w szczególności ze zmianami w miejscu naświetlania tętnicy promieniowej takimi jak blizny, znamiona i zmiany rumieniowe. Oprócz wymienionych schorzeń kolejnym kryterium wyłączającym z badania

było przyjmowanie na stałe doustnej antykoncepcji hormonalnej lub innych preparatów farmakologicznych mogących wpływać na agregację płytek krwi lub parametry śródbłonka naczyniowego. W związku z powyższym eliminowano osoby, które w przeciągu ostatnich 7 dni zażywały leki przeciwzapalne (zarówno sterydowe jak i niesterydowe). Podobnie w badaniu nie mogły brać udziału osoby w trakcie terapii hipotensyjnej. Do grupy naświetlanej nie rekrutowano również osób, które w przeciągu miesiąca poddane były zabiegom laseroterapii.

Spośród 40 uczestników 10 osób stanowiło grupę kontrolną, która została utworzona celem oceny prawidłowości zastosowanych metod diagnostycznych. Przy czym kryteria włączenia i wyłączenia z badania były takie same jak dla grupy naświetlanej.

Na przeprowadzenie badania wyraziła zgodę właściwa komisja bioetyczna (załącznik).

3.2 Procedura badania

Przez 3 kolejne dni każdy z 30 uczestników badania miał naświetlaną promieniowaniem laserowym skórę znajdującą się ponad przebiegiem tętnicy promieniowej. Starano się zachować 24 godzinne odstępy pomiędzy zabiegami.

Przed rozpoczęciem procedury naświetlania u wszystkich osób pobrano 40 ml krwi z żyły odłokciowej, celem przeprowadzenia odpowiednich oznaczeń biochemicznych związanych z funkcją śródbłonka naczyniowego oraz agregacji płytek krwi. Analogiczne pobranie krwi przeprowadzano 4 dnia badania, 24 godziny po ostatnim naświetlaniu.

Pozostałe 10 osób miało w tych samych odstępach czasu pobieraną krew celem przeprowadzenia analiz biochemicznych .

3.3 Procedura naświetlania

W badaniu wykorzystano laser półprzewodnikowy LS 808/2000 firmy Laser Secura (Polska, Ryc. 1) emitujący promieniowanie o długości fali 808 nm i maksymalnej mocy 2 W. Półprzewodnikowy element emitujący promieniowanie był na stałe połączony optycznie („spigtailowany”) z układem światłowodowym zakończonym złączką SMA 905 firmy Thorlabs Inc. (USA). Koniec światłowodu został tak zaprojektowany, aby z odległości roboczej pomiędzy złączką SMA, a powierzchnią skóry wynoszącej około 20 cm, obszar naświetlania miał wymiar koła o średnicy około 2 mm. W badaniu stosowano promieniowanie o mocy 50 mW, a sumaryczna dawka energii wynosiła 20 J.

Urządzenie laserowe wyposażone było w rozbudowany układ umożliwiający regulację parametrów pracy, stosowaną moc oraz dawkę promieniowania. Przed rozpoczęciem badań

przeprowadzono kalibrację urządzenia mającą na celu ustalenie rzeczywistej długości emitowanej fali oraz mocy emitowanej na wyjściu złączki SMA. Do pomiaru mocy wykorzystano miernik PMD 100D (Thorlabs, USA), a do kontroli długości fali promieniowania użyto analizatora spektrum promieniowania AQ 6370c (Yokogawa, Japonia). Uzyskane rzeczywiste wartości mocy wykorzystano przy programowaniu parametrów emisji urządzenia laserowego.



Ryc. 1. Urządzenie laserowe LT 808/2000 (Laser Secura, Polska)

Po palpacyjnym wyznaczeniu lokalizacji tętnicy promieniowej od punktu około 2 cm powyżej końca wyrostka rylcowatego, kości promieniowej (czyli 3 cm proksymalnie do linii nadgarstka), na odcinku 4 cm w kierunku bliższym przedramienia i oznaczeniu na skórze markerem, przeprowadzano naświetlanie dostarczając energię metodą wolnego przemieszczania wzdłuż przebiegu tętnicy.

3.4 Oznaczenia biochemiczne

W pracy oznaczano następujące parametry biochemiczne:

- ADMA, SDMA
- L-arginina
- cGMP

- GSH
- VEGF, FGF
- Angiostatyna

Krew do badań pobierano z żyły łokciowej w stanie spoczynku. Do pobierania krwi wykorzystano probówki z zamkniętym systemem aspiracyjno-próżniowym typu S-Monovette® (Sarstedt, Niemcy). W zależności od rodzaju oznaczanego parametru biochemicznego do analizy wykorzystano surowicę, osocze lub krew pełną.

Przygotowanie próbek surowicy do oznaczeń VEGF, FGF oraz angiostatyny:

Krew na surowicę pobierano do probówko-strzykawki z aktywatorem krzepnięcia. Po uzyskaniu skrzepu (ok. 20-30 min.) wirowano przy 1000 x g przez 15 min. W następnej kolejności uzyskaną surowicę rozpipetowano w odpowiednich objętościach do probówek typu eppendorf i przechowywano w temperaturze – 20 °C do czasu wykonania analiz.

Przygotowanie próbek osocza do oznaczeń oraz cGMP:

Krew na osocze pobierano do probówko-strzykawki zawierającej 1,6 mg EDTA/ml krwi. W ciągu 30 min. od pobrania wirowano przy 1000 x g przez 15 min. Uzyskane w ten sposób osocze rozpipetowano w odpowiednich objętościach do probówek typu eppendorf i przechowywano w temperaturze – 20 °C do czasu wykonania analiz.

Przygotowanie próbek krwi pełnej do oznaczenia GSH:

Krew pełną pobierano do probówko-strzykawki zawierającej EDTA jako antykoagulator. Materiał zabezpieczano w probówkach typu eppendorf i przechowywano w zamrażarce, w temp – 80 °C do czasu wykonania analiz.

- Oznaczenia czynnika wzrostu śródbłonkowego (VEGF):

VEGF oznaczono z surowicy krwi za pomocą zestawu ELISA (R&D Systems Europe Ltd, Wielka Brytania) zgodnie z dostępną instrukcją producenta. Czułość metody wynosiła 9 pg/ml.

Do analizy wykorzystano polistyrenową mikropłytkę zawierającą dołki opłaszczone monoklonalnym przeciwciałem przeciwko VEGF. W analizie wykorzystano test kanapkowy

tzw „*sandwich test*” z przeciwciałem wychwytyjącym (I-rzędowe przeciwciało) i detekcyjnym (II-rzędowe przeciwciało).

W początkowym etapie, na dołki mikropłytki rozpipetowano 100 µl badanej próbki surowicy oraz odpowiednio rozcieńczonego roztworu wzorcowego. Następnie mikropłytkę inkubowano przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. W następnej kolejności 3- krotnie przepłukiwano wszystkie dołki buforowym roztworem wodnym (400 µl).

Na odpowiednio osuszoną płytkę naniesiono 200 µl koniugatu VEGF (II-rzędowe przeciwciało) znakowanego peroksydazą chrzanową.

W przeprowadzonym teście ELISA antygen VEGF w pierwszej kolejności uległ związaniu z nieznakowanym przeciwciałem detekcyjnym znajdującym się na płytce. Następnie przeciwciało znakowane peroksydazą chrzanową przyłączając się do przeciwciała detekcyjnego umożliwiło identyfikację szukanego antygenu wywołując barwną reakcję po dodaniu odpowiedniego substratu.

Pomiar VEGF wykonano za pomocą spektrofotometru mikropłytkowego Epoch™ (BioTek Instruments Inc, USA) z oprogramowaniem Gen5, przy długości fali 450 nm, stosując jako referencyjną falę o długości 570 nm. Stężenie VEGF w badanych próbkach określano na podstawie krzywej wzorcowej [162].

- Oznaczenia czynnika wzrostu fibroblastów (FGF):

FGF oznaczono z surowicy krwi, wykorzystując metodę immunoenzymatyczną przy użyciu wysokoczułego zestawu ELISA (R&D Systems Europe Ltd., Wielka Brytania). Zastosowany test immunoenzymatyczny typu podwójnego wiązania, inaczej „*sandwich test*” umożliwił detekcje antygenu przy udziale przeciwciała wychwytyjącego i detekcyjnego. Czułość metody wynosiła 0,07pg/ml.

Do każdego dołka mikropłytki rozpipetowano 100 µl próbki badanej i standardu. Następnie mikropłytkę z opłaszczonymi przeciwciałami monoklonalnymi inkubowano przez 2 godziny w temperaturze pokojowej na orbitalnej wytrząsarce płytkowej (prędkość obrotowa mieściła się w zakresie: 50-500 obrotów). Po inkubacji mikropłytkę 6-krotnie przemywano buforem wodnym i odpowiednio osuszano. W następnej kolejności dodano 200 µl koniugatu FGF (przeciwciało detekcyjne) do każdego dołka mikropłytki i ponownie inkubowano płytkę oraz 6-krotnie przemywano buforem wodnym. Po dodaniu do każdego dołka 50 µl roztworu substratu (liofilizowany NADPH), a następnie 50 µl wzmacniacza, zaobserwowano zmianę barwy roztworu.

W trakcie testu poszukiwany antygen FGF w pierwszej kolejności uległ związaniu z przeciwciałami znajdującymi się na mikroplacie. W następnym etapie przeciwciało znakowane enzymem uległo związaniu z przeciwciałem monoklonalnym, co umożliwiło dektekcję antygeny po dodaniu substratu.

Absorbancję próbek mierzono przy długości fali 490 nm, stosując jako referencyjną falę o długości 650 nm, na spektrofotometrze mikroplacowym Epoch™ (BioTek Instruments Inc, USA) z oprogramowaniem Gen5. Stężenie FGF w badanych próbkach określano na podstawie krzywej wzorcowej [163].

- Metoda oznaczenia angiostatyny:

Angiostatynę oznaczono z surowicy krwi metodą immunoenzymatyczną ELISA za pomocą zestawu ELH-Angiostatin (RayBio Inc., USA).

Do analizy parametru wykorzystano test typu podwójnego wiązania. Czułość metody wynosiła 20 ng/ml. W teście zastosowano 96-dołkową mikroplaczkę polistyrenową opłaszczoną przeciwciałami wychwytyjącymi.

Po dodaniu 100 µl próbki surowicy i roztworu wzorcowego do każdego dołka mikroplaczkę inkubowano przez 2,5 godziny w temperaturze pokojowej.

Zgodnie z zasadą działania testu „*sandwich test*”, w pierwszej kolejności badany antygen uległ związaniu z nieznakowanym przeciwciałem na mikroplacie. W kolejnym etapie przeciwciało znakowane enzymem połączyło się z przeciwciałami monoklonalnym tworząc tzw strukturę kanapki, czyli antygeny zawieszony pomiędzy dwoma warstwami przeciwciał.

Wartości absorbancji przeprowadzono dla długości fali 450 nm. Stężenie angiostatyny w badanej próbce odczytano z krzywej wzorcowej [164].

- Metoda oznaczania zredukowanego glutationu (GSH):

- 1) Przygotowanie próbek do oznaczania GSH:

Po rozmrożeniu i wymieszaniu próbki dodano 350 µl 5 % kwasu meta fosforowego (MPA). Następnie materiał wirowano z prędkością 1000 obr. w wirówce przez 10 min. Dodano 50 µl ekstraktu MPA do 3 ml buforu analitycznego (*assay bufor*). Do momentu użycia rozcieńczony roztwór przechowywano na lodzie.

Oznaczenia zredukowanego (GSH) opierało się na metodzie kolometrycznej przy zastosowaniu zestawu BIOXYTECH GSH/GSSSG-412.

Ilościowa ocena całkowitego glutationu (utlenionego i zredukowanego) polegała na zastosowaniu odczynnika Ellmana, czyli 5,5' kwasu 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzenowego (DTNB), który w wyniku reakcji z GSH tworzy związek wykrywalny za pomocą spektrofotometrii przy długości fali 412 nm [165].

Oznaczenie stężenia cGMP:

Stężenia cGMP oznaczono w osoczu EDTA metodą ELISA z zastosowaniem konkurencyjnego testu (R&D Systems Europe Ltd., Wielka Brytania) o czułości zestawu równym 3,06 pmol/ml. Do analizy biochemicznej wykorzystano 96-dołkową mikropłytkę opłaszczoną przeciwciałami monoklonalnymi.

Na dołki mikropłytki rozpipetowano 100 µl badanej próbki i roztworu wzorcowego, 50 µl cGMP związanego z peroksydazą chrzanową oraz 50 µl koniugatu przeciwciał anti-cGMP. Przez 3 godziny mikropłytkę inkubowano na wytrząsarce, a następnie 4-krotnie przemywano. Dodany w końcowym etapie substrat wywołał barwną reakcję.

Metoda, którą zastosowano do oznaczenia antygeny opierała się na tzw. teście konkurencyjnym. W trakcie analizy cGMP z badanej próbki osocza, konkurowało z cGMP związanym z peroksydazą chrzanową o miejsce wiązania z przeciwciałem anti-cGMP. Jednocześnie za pomocą przeciwciał umieszczonych na płytce możliwa była detekcja przeciwciał związanych z cGMP znakowanych peroksydazą. Pomiar wykonywano za pomocą czytnika mikropłytek Elx800™ (BioTek Instruments Inc, USA) z oprogramowaniem KC4, przy długości fali 450 nm. Jako referencyjną zastosowano falę o długości 570 nm. Natężenie barwy było wprost proporcjonalne do ilości związanego z peroksydazą cGMP i odwrotnie proporcjonalne do ilości badanego antygeny cGMP. Stężenie cGMP w badanych próbkach określano na podstawie krzywej wzorcowej [166].

- Oznaczenie stężenia L-argininy i jej metylowych pochodnych: ADMA i SDMA:

Oznaczenia stężenia L-argininy oraz ADMA i SDMA przeprowadzono metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej-HPLC z spektrofluoresceinowym pomiarem detekcji za pomocą chromatografu firmy Varian. Całość analizy chromatograficznej odbywała się pod kontrolą oprogramowania komputerowego Star Chromatography Workstation ver. 6.3.

Do próbek badanych i wzorcowych dodano 10 $\mu\text{mol/l}$ L-homoargininy. Dalsza analiza osocza odbywała się techniką ekstrakcji SPE (*Solid Phase Extraction*) na kolumnkach SCX-50 (Varian Inc., Palo Alto, USA).

W kolejnym etapie zastosowano derywatyzację z odczynnikiem OPA (o-ftaldialdehyd-5,4 mg/ml w buforze boranowym o pH 8,4 i 0,4 % v/v 2-merkaptioetanol), a następnie otrzymane anality poddano rozdzielaniu chromatograficznemu.

Chromatografię przeprowadzono w systemie izokratycznym na kolumnie Symmetry C-18, 150 x 4,6 mm, 5 μ (Waters Co., Milford USA) w temperaturze 35 °C, przy użyciu 50 mM buforu fosforanowego z 12 % acetonitrylem i przepływem 1,1ml/min.

Detekcja fluoresceinowa odbywała się przy długości fali wzbudzenia 340nm i emisji 450 nm. Porównanie odpowiednich współczynników (L-argininy/L-homoargininy, ADMA/L-homoargininy i SDMA/L-homoargininy) ze standardami o znanych stężeniach umożliwiło wyliczenie stężeń szukanych parametrów [167, 168, 169].

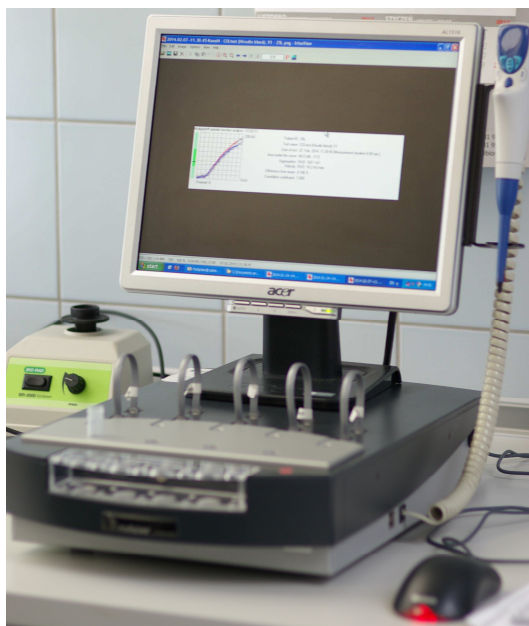
3.5 Badanie agregacji płytek krwi

Oznaczenia agregometryczne wykonywano z krwi pełnej, którą pobierano do probówki-strzykawki zawierającej hirudynę jako antykoagulator.

Agregację płytek krwi przeprowadzono wykorzystując aparat Multiplate® Platelet Function Analyzer (Dynabyte GmbH, Niemcy, Ryc. 2) [170].

Zgodnie ze specyfikacją agregometru do analizy statystycznej wykorzystywano 3 rodzaje uzyskanych wyników:

- Agregację
- Prędkość agregacji
- Pole powierzchni pod krzywą



Ryc. 2. Agregometr Multiplate® Platelet Function Analyzer

W trakcie analizy zastosowano jednocześnie testy ADP (aktywacja płytek krwi przez ADP), COL (aktywacja płytek krwi z wykorzystaniem kolagenu) i TRAP (aktywacja płytek krwi poprzez receptor trombiny). Wszystkie oznaczenia przeprowadzono w ciągu godziny od pobrania krwi.

a) Test ADP:

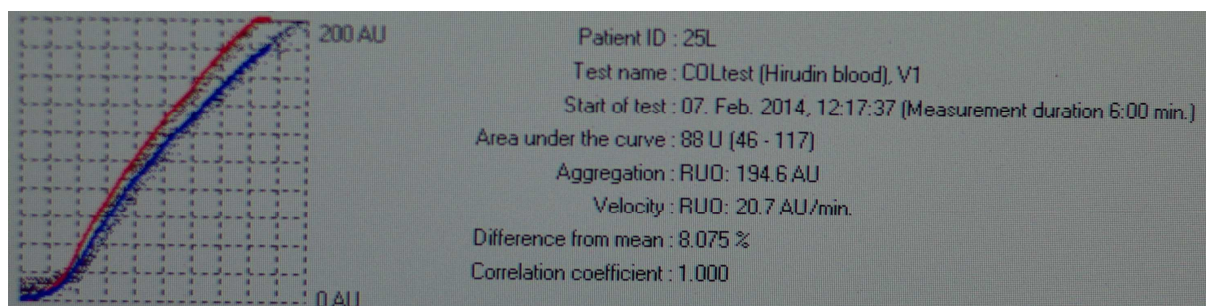
Do kuwety dodano 300 μ l 0,9 % soli fizjologicznej (temp. 37°C) i 300 μ l badanej próbki krwi, a następnie całość inkubowano przez 2 min. W kolejnym etapie dodano 20 μ l agonisty ADP (Roche Diagnostics, Szwajcaria). Stężenie końcowe odczynnika wynosiło 3,2 μ g/ml. Pomiar wykonano po 6 minutach. Zmiana impedancji wywołana agregacją została przedstawiona graficznie i odpowiadała wyznaczonemu przez aparat Multiplate polu powierzchni pod krzywą.

b) Test COL:

Po dodaniu do kuwety 300 μ l 0,9 % soli fizjologicznej (temp. 37°C) i 300 μ l krwi pełnej, całość inkubowano przez 2 min. W kolejnym etapie dodano 20 μ l odczynnika „COL” (Roche Diagnostics, Szwajcaria). Końcowe stężenie agonisty wynosiło 3,2 μ g/ml. Po 6 min agregację oznaczono graficznie w formie pola powierzchni pod wyznaczoną krzywą.

c) Test TRAP:

Do kuwety dodano 300 μ l 0,9 % soli fizjologicznej (temp. 37°C) i 300 μ l badanej próbki krwi, a następnie inkubowano przez 2 min. W drugiej kolejności dodano 20 μ l agonisty TRAP (Roche Diagnostics, Szwajcaria) o końcowym stężeniu równym 32 μ mol. Następnie całość inkubowano przez 6 min. Agregację płytek oznaczono na podstawie zmian impedancji, które odpowiadało graficznie przedstawionemu polu powierzchni pod wyznaczoną za pomocą aparatu krzywą.



Ryc. 3. Przykładowy wynik testu agregacji z urządzenia Multiplate® Platelet Function Analyzer

3.6. Analiza statystyczna

Analiza statystyczna przeprowadzona została przy użyciu programu Statistica 10.0 Stat Soft® (Polska).

W przypadku analiz dla zmiennych niezwiązanych, po wstępnej analizie normalności rozkładu, jednorodności wariancji dla zmiennych testem Shapiro Wilka i testem Leven'a, dokonywano analizy istotności różnic testem U-Manna-Whitneya dla zmiennych nieparametrycznych, natomiast dla zmiennych parametrycznych posługiwano się testem t-Studenta. W zależności od charakteru zmiennych wykazujących ciągłą dystrybucję stosowano analizę korelacji Spearmana dla zmiennych nieparametrycznych i Pearsona dla zmiennych parametrycznych. Analogicznie dla zmiennych powiązanych, zależnie od ich charakteru stosowano test t-Studenta.

W przypadku analizy dla dwóch par zmiennych powiązanych wykorzystano test znaków lub test Wilcoxon. Jednocześnie dla większej ilości uszeregowanych czasowo zmiennych nieparametrycznych posłużono się testem Friedmana z następczą analizą *post-hoc*.

Dla zmiennych parametrycznych stosowano jednoczynnikową analizę wariancji. W przypadku wizualizacji analizy regresji za pomocą wykresów trójwymiarowych dla zmiennej wyjaśnianej stosowano metodę wygładzenia najmniejszych kwadratów ważonych odległościami. Za istotną statystycznie przyjęto wartość $p < 0,05$.

4. WYNIKI

4.1 Grupa kontrolna

Nie występowały różnice istotnie statystyczne pomiędzy grupą naświetlaną a grupą kontrolną, zarówno uwzględniając płeć (stosunek kobiet do mężczyzn w obu grupach $p=0,72$), jak i wiek badanych ($30,03 \pm 5,05$ vs $27,82 \pm 4,65$ lat; $p=0,40$). Nie stwierdzono także znamienych różnic pomiędzy grupą naświetlaną, a grupą kontrolną w średnich wartościach badań biochemicznych oraz BMI (odpowiednio $22,67 \pm 2,62$ vs. $22,44 \pm 2,27$; $p=0,67$) wykonanych przed naświetlaniem. Wyniki przedstawia Tabela 1.

Tabela 1. Porównanie grupy badanej z grupą kontrolną. Wyniki obu grup we wstępnym badaniu (przed naświetlaniem grupy badanej)

Rodzaj badania	Grupa badana (średnia \pm SD) N=30	Grupa kontrolna (średnia \pm SD) N=10	<i>p</i>
VEGF [pg/ml]	307,34 \pm 227,90	285,41 \pm 172,38	0,85
FGF [pg/ml]	2,97 \pm 2,39	2,12 \pm 0,95	0,34
Angiostatyna [pg/ml]	265,22 \pm 151,43	209,52 \pm 37,03	0,20
GSH [μ mol/l]	769,41 \pm 145,37	845,85 \pm 173,42	0,18
cGMP [pg/ml]	79,79 \pm 28,18	80,04 \pm 27,10	0,98
SDMA [μ mol/l]	0,24 \pm 0,05	0,23 \pm 0,04	0,43
ADMA [μ mol/l]	0,38 \pm 0,05	0,35 \pm 0,05	0,12
L-arginina [μ mol/l]	35,42 \pm 9,36	31,17 \pm 8,37	0,34
Arg/ADMA	94,93 \pm 24,70	102,19 \pm 26,11	0,50

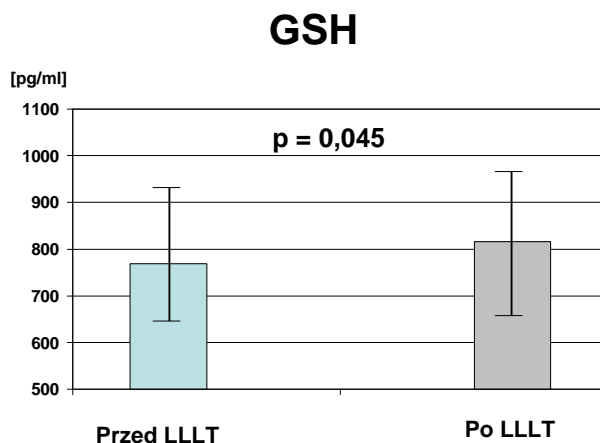
W grupie kontrolnej (która nie była poddana LLLT) nie występowały istotne statystycznie różnice pomiędzy pierwszym a drugim badaniem, w średnich wartościach badań biochemicznych. Wyniki przedstawia Tabela 2.

Tabela 2. Porównanie wyników w grupie kontrolnej pomiędzy badaniem wyjściowym, a drugim badaniem wykonanym po 4 dniach.

Rodzaj badania	Badanie wyjściowe (średnia ± SD) N=10	Badanie po 4 dniach (średnia ± SD) N=10	<i>p</i>
VEGF [pg/ml]	285,41 ± 172,38	285,61 ± 150,20	1,00
FGF [pg/ml]	2,12 ± 0,95	2,77 ± 2,21	0,55
Angiostatyna [pg/ml]	209,52 ± 37,03	321,31 ± 331,42	0,27
GSH [μmol/l]	845,85 ± 173,42	708,13 ± 176,82	0,13
cGMP [pg/ml]	80,04 ± 27,10	73,46 ± 30,33	0,11
SDMA [μmol/l]	0,23 ± 0,04	0,24 ± 0,06	0,75
ADMA [μmol/l]	0,35 ± 0,05	0,35 ± 0,04	0,75
L-arginina [μmol/l]	31,17 ± 8,37	36,01 ± 11,04	0,75
Arg/ADMA	102,19 ± 26,11	102,19 ± 30,40	0,34

4.2 Parametry biochemiczne związane z działaniem antyoksydacyjnym śródbłonna naczyniowego.

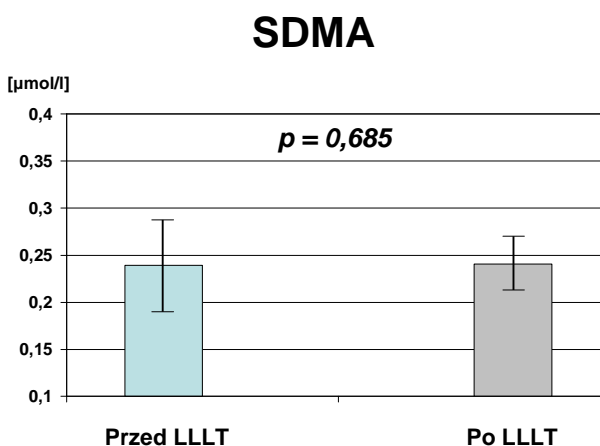
Oceniając stężenia glutationu stwierdzono istotny statystycznie ich wzrost ($p=0,045$) w wyniku zastosowania LLLT. Wartość średniego stężenia przed naświetlaniem wynosiła $769,41 \pm 145,37 \mu\text{mol/l}$, natomiast po zabiegach $815,15 \pm 151,69 \mu\text{mol/l}$. (Ryc. 4).



Ryc. 4. Średnie stężenia wraz z odchyleniem standardowym glutationu w grupie naświetlanej przed oraz po LLLT.

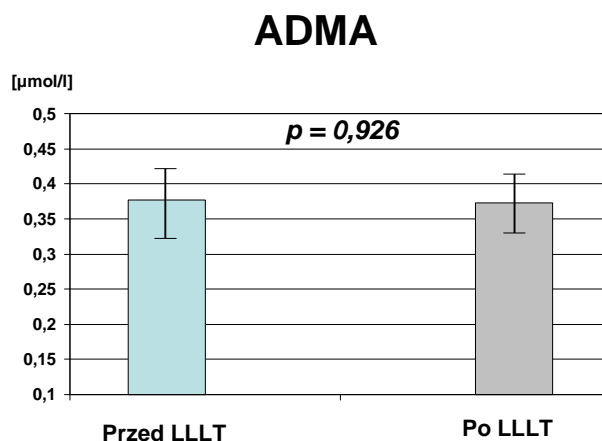
4.3 Parametry biochemiczne związane ze szlakiem metabolizmu tlenu azotu

Niskoenergetyczne promieniowanie laserowe nie wpływało na zmianę stężeń SDMA. Przed naświetlaniem ich średnia wartość wynosiła $0,239 \pm 0,048 \mu\text{mol/l}$, natomiast po $0,240 \pm 0,030 \mu\text{mol/l}$ ($p=0,658$). (Ryc. 5).



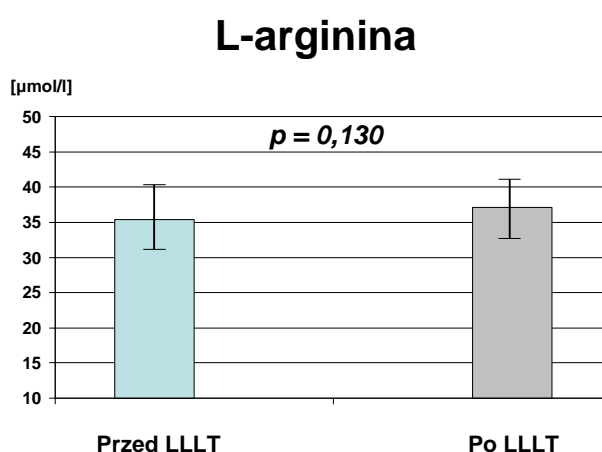
Ryc. 5. Porównanie średnich stężeń (wraz z odchyleniami standardowymi) SDMA w grupie naświetlanej przed oraz po LLLT.

Nie zaobserwowano również wpływu LLLT na stężenia ADMA. Wartości przed i po naświetlaniu nie różniły się statystycznie ($p=0,926$) i wynosiły odpowiednio $0,377 \pm 0,051$ vs $0,373 \pm 0,044$ $\mu\text{mol/l}$. (Ryc. 6).



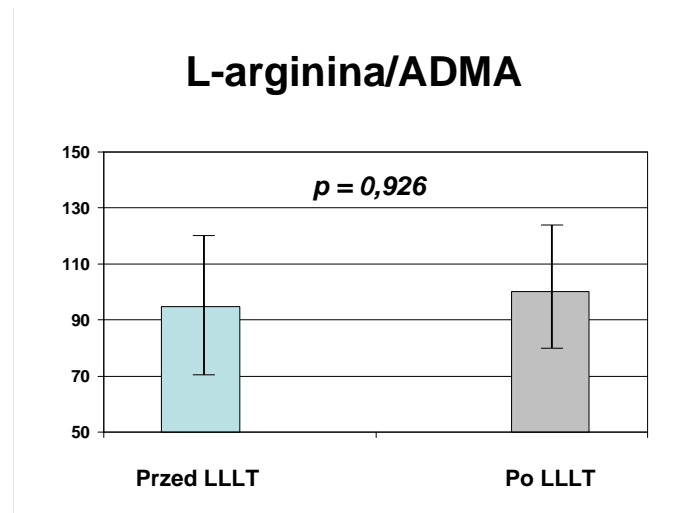
Ryc. 6. Porównanie średnich stężeń ADMA (wraz z odchyleniami standardowymi) w grupie naświetlanej przed oraz po LLLT.

Nie odnotowano istotnych statystycznie różnic ($p=0,130$) w średnich stężeniach L-argininy przed oraz po naświetlaniu niskoenergetycznym promieniowaniem laserowym. Średnie stężenie przed LLLT wynosiło $35,42 \pm 9,36$ $\mu\text{mol/l}$, natomiast po zabiegach naświetlania $37,13 \pm 8,60$ $\mu\text{mol/l}$. (Ryc. 7).



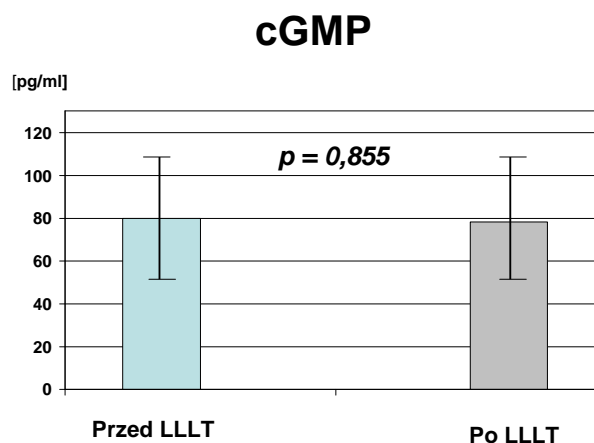
Ryc. 7. Porównanie średnich stężeń wraz z odchyleniami standardowymi L-argininy w grupie naświetlanej przed oraz po LLLT.

Ponadto wyliczono proporcję stężeń L-argininy/ADMA zarówno przed jak i po zabiegach naświetlania. Nie uzyskano różnic znamiennej statystycznie ($p=0,943$). Średnia wartość przed LLLT wynosiła $94,9 \pm 24,7$, natomiast po zabiegach $100,3 \pm 21,8$. (Ryc. 8).



Ryc. 8. Porównanie wyliczonych proporcji L-argininy do ADMA w grupie naświetlanej przed oraz po LLLT.

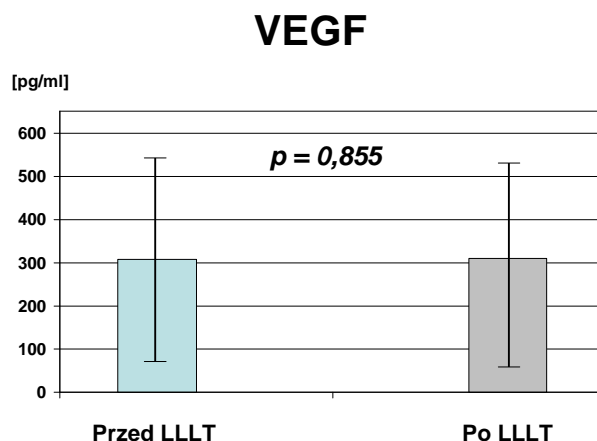
Nie zaobserwowano znamiennej różnic ($p=0,855$) w stężeniach cGMP przed i po naświetlaniu. Średnie wartości wraz z odchyleniem standardowym wynosiły odpowiednio $79,79 \pm 28,18$ vs $78,40 \pm 28,13$ pg/ml. (Ryc. 9).



Ryc. 9. Porównanie średnich stężeń wraz z odchyleniami standardowymi cGMP w grupie naświetlanej przed oraz po LLLT.

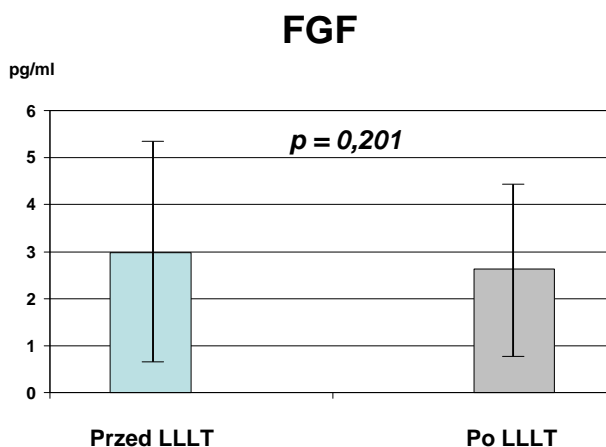
4.4 Parametry biochemiczne związane z potencjałem angiogennym śródbłónka

Nie odnotowano istotnych statystycznie różnic ($p=0,855$) w stężeniach VEGF przed oraz po naświetlaniu niskoenergetycznym promieniowaniem laserowym. Średnie stężenie przed LLLT wynosiło $307,34 \pm 227,90$ pg/ml, natomiast po zabiegach naświetlania $309,74 \pm 241,89$ pg/ml (Ryc. 10).



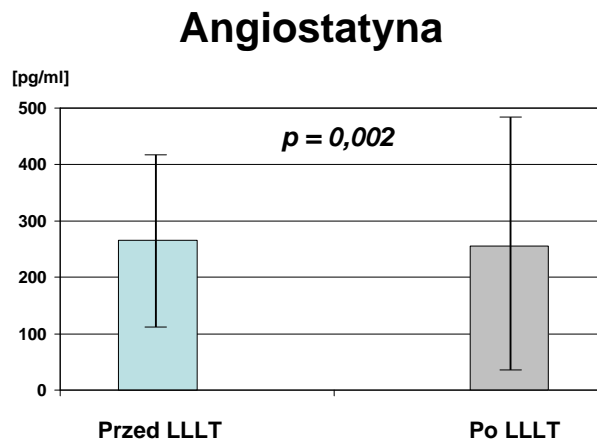
Ryc. 10. Porównanie stężeń VEGF w grupie naświetlanej przed oraz po naświetlaniu (przedstawiono wartości średnie oraz SD).

Podobnie nie stwierdzono znamienych statystycznie różnic ($p=0,201$) w stężeniach FGF mierzonych przed oraz po zabiegach LLLT. Średnie stężenie przed naświetlaniem wynosiło $2,97 \pm 2,39$ pg/ml, natomiast po $2,63 \pm 1,87$ pg/ml (Ryc. 11).



Ryc. 11. Porównanie średnich stężeń oraz odchyłeń standardowych FGF w grupie naświetlanej przed oraz po LLLT.

Analizując stężenia angiotatyny zaobserwowano istotny statystycznie ($p=0,002$) spadek w wyniku stosowania niskoenergetycznego promieniowania laserowego. Średnie stężenie przed LLLT wynosiło $265,22 \pm 151,43$ pg/ml, natomiast po naświetlaniu $255,16 \pm 228,68$ pg/ml (Ryc. 12).



Ryc. 12. Porównanie średnich stężeń wraz z odchyleniami standardowymi angiotatyny w grupie naświetlanej przed oraz po LLLT.

4.5 Agregacja płytek krwi.

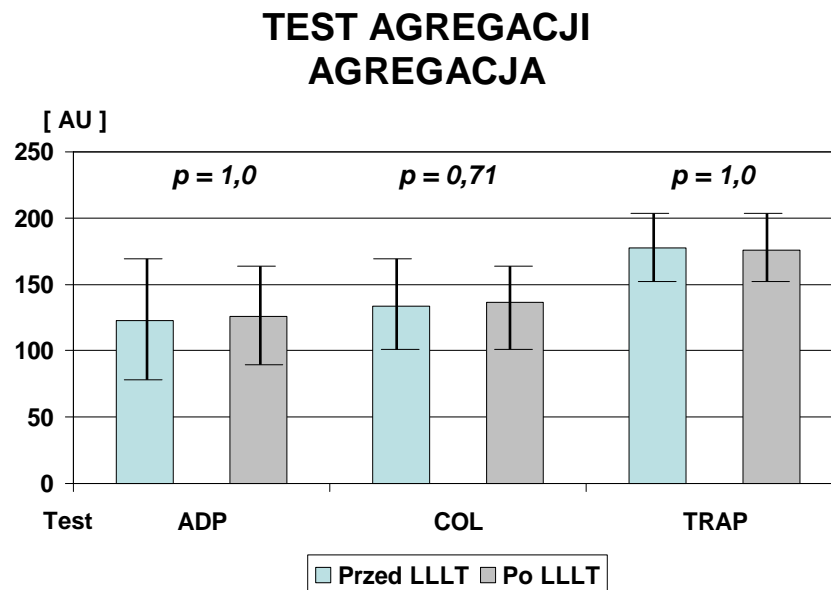
Oceniając agregację przeprowadzoną za pomocą testów ADP, COL i TRAP nie uzyskano różnic znamiennej statystycznie pomiędzy badaniami przed LLLT, a wykonanymi po naświetlaniu.

W przypadku testu ADP agregacja wynosiła przed naświetlaniem $122,60 \pm 44,20$ AU, natomiast po procedurze naświetlania miała wartość $125,63 \pm 35,25$ AU ($p=1,00$).

Dla testu COL agregacja przed LLLT wynosiła $133,62 \pm 37,12$ AU, a po procedurze $136,60 \pm 33,78$ AU ($p=0,71$).

Wartości agregacji uzyskane za pomocą testu TRAP wynoszą przed i po LLLT odpowiednio $177,54 \pm 47,33$ vs $175,75 \pm 52,53$ ($p=1,00$).

Wyniki agregacji przedstawia Ryc. 13.



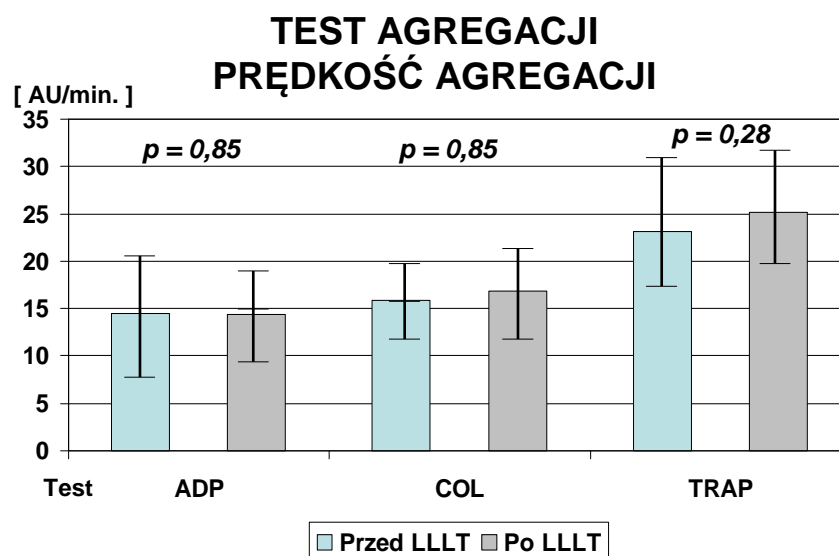
Ryc. 13. Wyniki testu agregacji płytek krwi mierzonego w testach ADP, COL i TRAP w grupie naświetlanej przed oraz po LLLT.

W przeprowadzonym pomiarze prędkości agregacji dla testu ADP wartości przed naświetlaniem wynosiły $14,48 \pm 5,99$ AU/min, natomiast po naświetlaniu miały wartość $14,33 \pm 4,60$ AU/min ($p=0,85$).

Prędkość agregacji zbadana w teście COL wynosiła przed LLLT $15,87 \pm 4,24$ AU/min, podczas gdy po naświetlaniu miała wartość $16,81 \pm 4,71$ AU/min, ($p=0,85$).

Wyniki prędkości agregacji badane w teście TRAP, przed i po zastosowaniu promieniowania laserowego wynosiły odpowiednio $23,12 \pm 6,55$ vs $25,20 \pm 5,96$ AU/min, ($p=0,282$).

Wyniki prędkości agregacji przedstawia Ryc. 14.



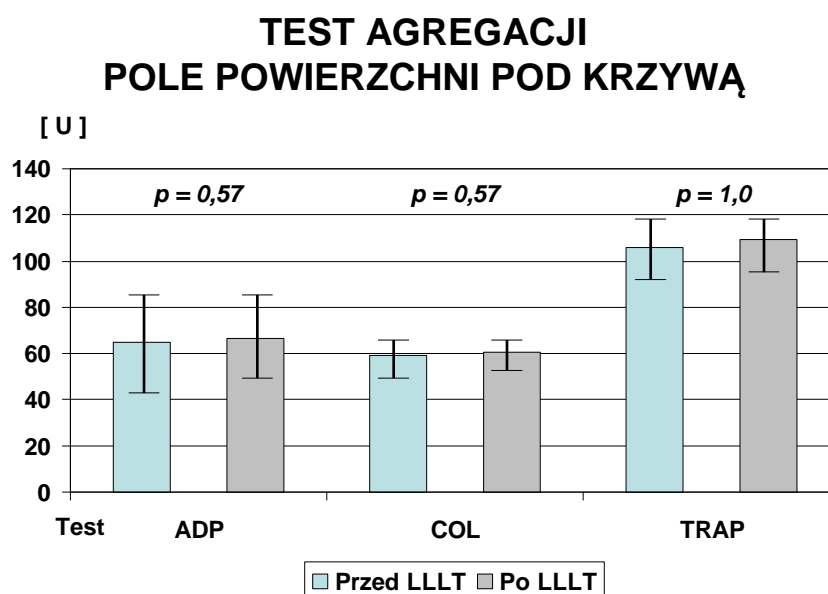
Ryc. 14. Wyniki testu agregacji dla parametru prędkość agregacji mierzonego w testach ADP, COL i TRAP w grupie naświetlanej przed oraz po LLLT.

Średnie pole powierzchni pod krzywą agregacji, dla testu ADP, wynosiło przed naświetlaniem $64,968 \pm 25,193$ U, natomiast po procedurze $66,387 \pm 20,904$ U, ($p=0,57$).

Pole powierzchni pod krzywą agregacji dla przeprowadzonego testu COL wynosiło przed i po LLLT odpowiednio $59,39 \pm 18,81$ vs $60,61 \pm 17,03$ U, ($p=0,57$).

Dla testu TRAP wyliczone pole powierzchni pod krzywą agregacji przed naświetlaniem miało wartość $105,68 \pm 29,10$ U, podczas gdy po LLLT wynosiło $109,45 \pm 25,84$ U, ($p=1,00$).

Wyliczone wartości pola powierzchni pod krzywą agregacji przedstawia Ryc. 15.



Ryc. 15. Wyliczone wartości dla parametru pole powierzchni pod krzywą agregacji mierzonego w testach ADP, COL i TRAP w grupie naświetlanej przed oraz po LLLT.

4.6 Zależności pomiędzy badanymi parametrami

Biorąc pod uwagę możliwość występowania powiązań patogenetycznych związanych ze zmianami potencjału oksydacyjno-redukcyjnego oraz aktywnością antyangiogenną płytek krwi, przy jednoczesnym wykazaniu braku wpływu LLLT na agregację, przeprowadzono analizę korelacji pomiędzy parametrami charakteryzującymi te procesy. Dodatkowo poddano ocenie występowanie zależności pomiędzy parametrami charakteryzującymi biodostępność tlenku azotu (ADMA, L-arg, L-arg/ADMA), a agregacją płytek krwi.

Z uzyskanych wyników korelacji przedstawiono jedynie te, które miały związek z zastosowaniem niskoenergetycznego promieniowania laserowego.

W grupie kontrolnej wykazano obecność dodatniej korelacji pomiędzy stężeniem zredukowanego glutationu mierzonym w warunkach wyjściowych, a stężeniem angiostatyny ($r=0,49$; $p<0,05$). Po zastosowaniu niskoenergetycznego promieniowania laserowego w grupie badanej nie wykazano występowania wyżej opisywanego związku.

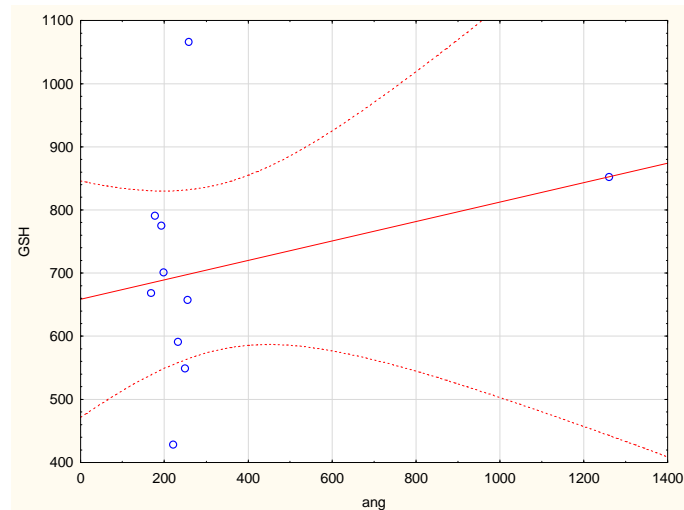
W zakresie parametrów charakteryzujących biodostępność tlenku azotu na uwagę zasługuje występowanie dodatniej korelacji pomiędzy stężeniem ADMA, a wartością prędkości agregacji indukowanej kolagenem ($r=0,4$; $p<0,05$). Po przeprowadzeniu przezskórnego naświetlania zależność przestała mieć znaczenie statystyczne.

Ponadto, po zastosowaniu niskoenergetycznego promieniowania laserowego stwierdzono obecność ujemnej korelacji pomiędzy stężeniem L-argininy i wartościami agregacji indukowanej ADP mierzonej jako pole powierzchni pod krzywą ($r=-0,43$; $p<0,05$), które nie występowały przed naświetlaniem.

Istotną statystycznie ujemną korelację obserwowano również przed naświetlaniem pomiędzy wartością współczynnika L-arg/ADMA, a aktywacją płytek krwi poprzez receptor trombiny zmierzoną agregometrycznie po naświetlaniu i wyrażoną jako prędkość agregacji ($r=-0,37$; $p<0,05$).

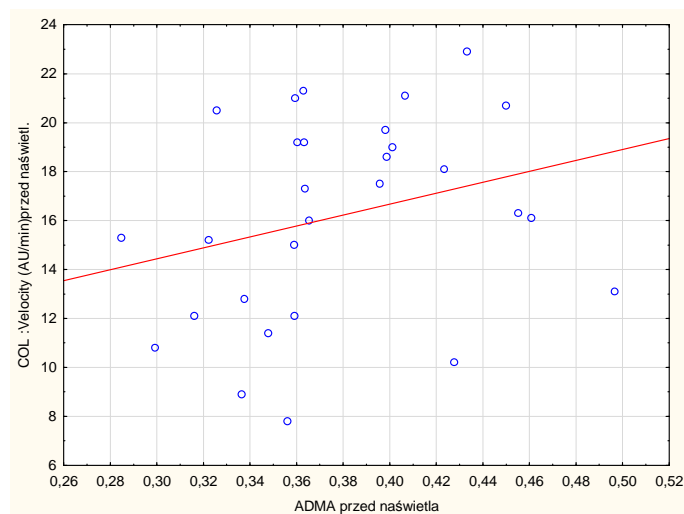
W niniejszej pracy celem oceny modulującego wpływu LLLT przeprowadzono również analizę regresji mierzonej metodą najmniejszych kwadratów ważonych odległościami. Wykazano między innymi interakcje pomiędzy stężeniami GSH, angiostatyny i agregacją indukowaną zarówno ADP, jak i poprzez receptor trombiny.

Wykazano dodatnią korelację pomiędzy cytozolowym potencjałem oksydacyjno-redukcyjnym mierzonym za pomocą stężenia GSH, a poziomem angiostatyny w grupie kontrolnej. ($r=0,49$; $p<0,05$). (Ryc. 16).



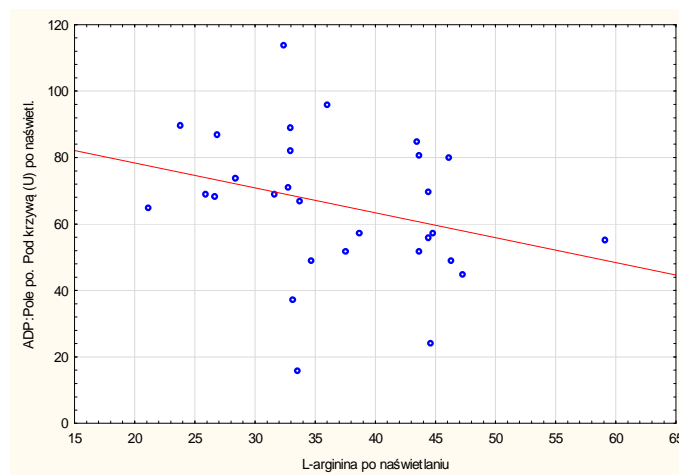
Ryc. 16. Wykres rozrzutu pomiędzy stężeniem zredukowanego glutationu, a angiostatyny w grupie kontrolnej.

Zaobserwowano dodatni związek pomiędzy stężeniem ADMA i wartościami prędkości agregacji indukowanej kolagenem przed zastosowaniem niskoenergetycznego promieniowania laserowego ($r=0,40$, $p<0,05$). (Ryc. 17).



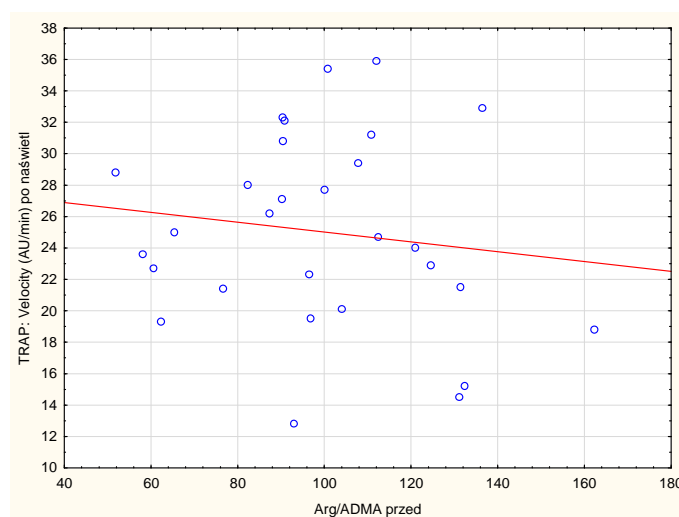
Ryc. 17. Zależność pomiędzy stężeniem ADMA i wartościami prędkości agregacji indukowanej kolagenem (COL) przed zastosowaniem LLLT.

Obserwowano ujemną zależność pomiędzy stężeniem L-argininy, a wartościami agregacji indukowanej ADP mierzonej jako pole powierzchni pod krzywą po naświetlaniu ($r=-0,43$; $p<0,05$) (Ryc. 18).

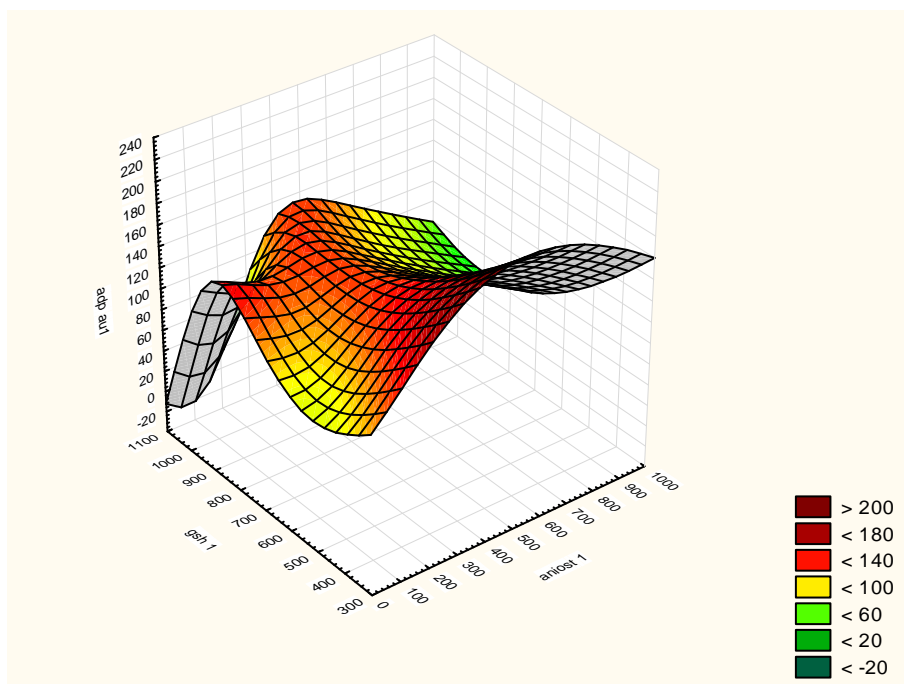


Ryc. 18. Wykres rozrzutu pomiędzy stężeniem L-argininy, a wartościami agregacji indukowanej ADP po zastosowaniu LLLT.

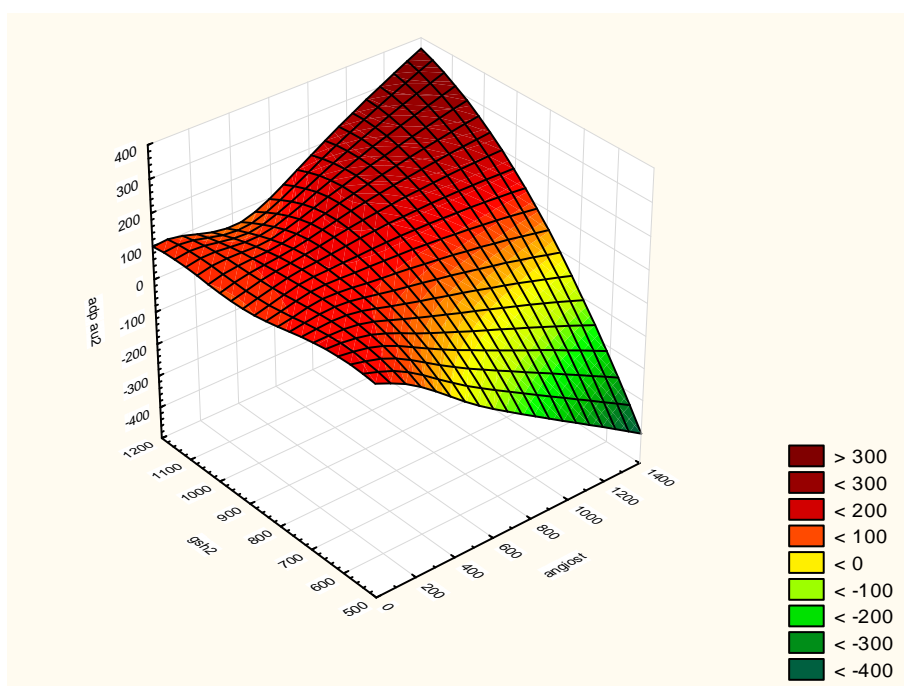
Stwierdzono ujemną korelację w zakresie stosunku L-arg/ADMA przed zastosowaniem LLLT, a wartościami agregacji indukowanej TRAP mierzonej jako prędkość agregacji ($r=-0,37$; $p<0,05$) (Ryc. 19).



Ryc. 19. Wykres rozrzutu odpowiadający zależności pomiędzy stosunkiem L-arg/ADMA przed naświetlaniem, a wartościami agregacji indukowanej TRAP mierzonej jako prędkość agregacji po zastosowaniu LLLT.

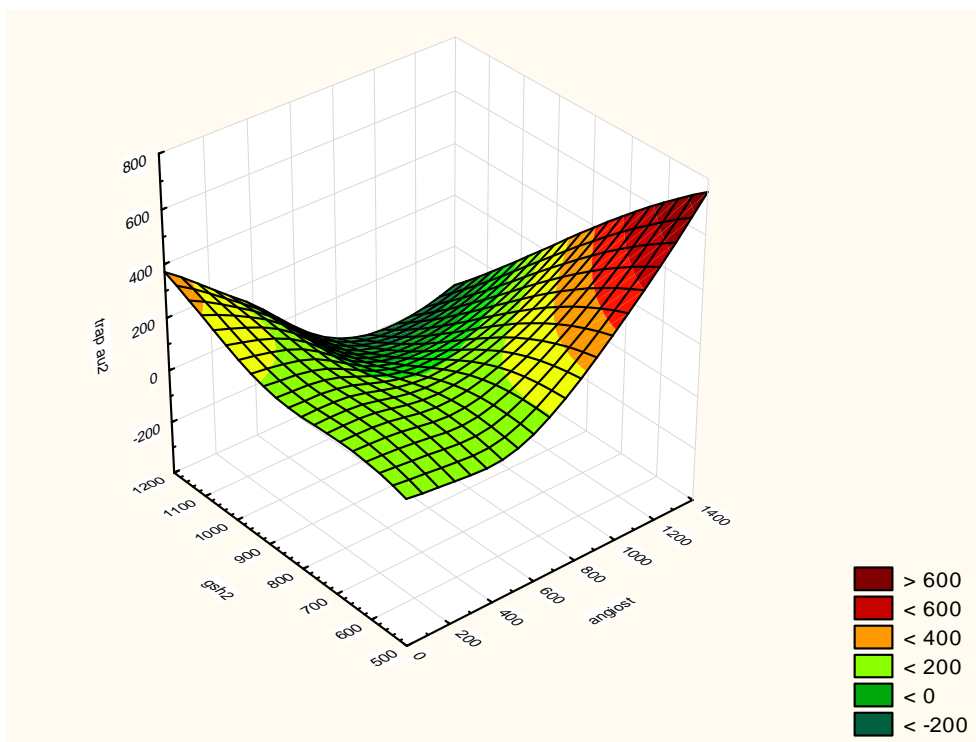


Przed LLLT

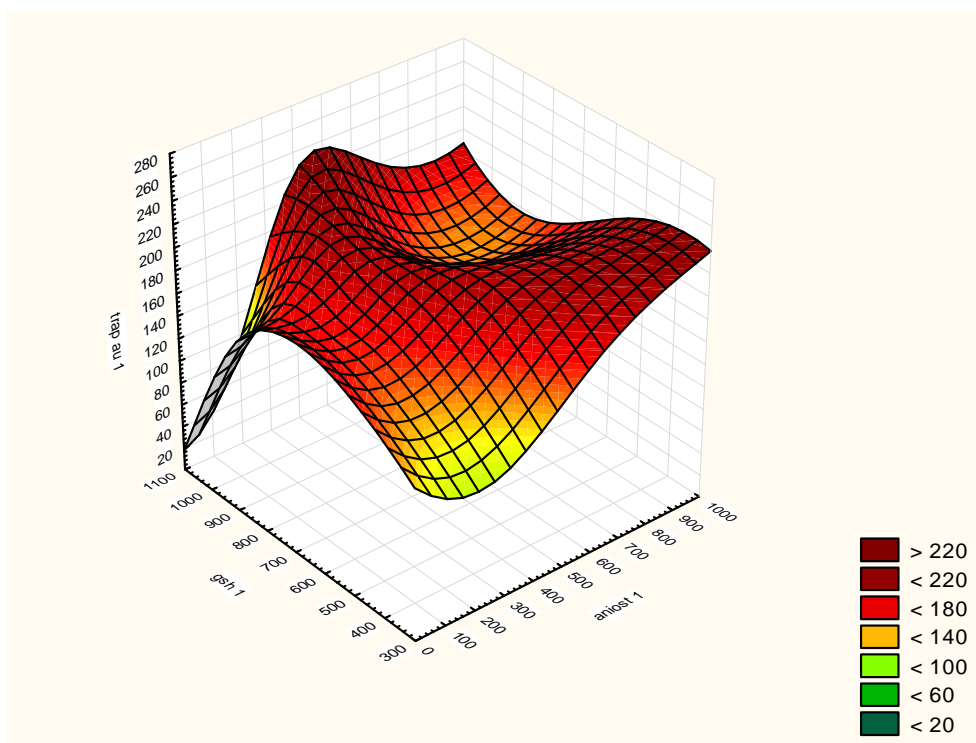


Po LLLT

Ryc. 20. Trójwymiarowy wykres zależności wartości agregacji indukowanej ADP (pole powierzchni pod krzywą), a stężeniami angiostatyny oraz GSH.



Przed LLLT



Po LLLT

Ryc. 21. Trójwymiarowy wykres zależności wartości agregacji indukowanej TRAP (pole powierzchni pod krzywą) względem stężeń angiotatyny i GSH.

5. OMÓWIENIE I DYSKUSJA

Grupa badana

W niniejszym badaniu oceniono wpływ LLLT na śródbłonek naczyniowy oraz funkcję agregacyjną płytek krwi, wykorzystując oznaczenia parametrów biochemicznych oraz agregację płytek. Biorąc pod uwagę, że dotychczas prowadzone badania na ten temat miały charakter eksperymentalny i dotyczyły w większości przypadków hodowli komórkowych lub zwierzęcych modeli doświadczalnych, w niniejszej pracy podjęto próbę weryfikacji działania promieniowania, w warunkach klinicznych, bezpośrednio na ludzki śródbłonek.

Grupa badana składała się z 30 osób poddanych naświetlaniu oraz 10 będących grupą kontrolną. Istotną trudność stanowiło zebranie odpowiedniej liczby osób nie stosujących w ostatnim okresie czasu leczenia farmakologicznego. Większość potencjalnych uczestników badania eliminowana była z powodu zażycia w dniach poprzedzających rekrutację niesterydowych leków przeciwzapalnych. U kobiet ponadto bardzo częste było stosowanie farmakologicznej antykoncepcji, u mężczyzn zdarzały się osoby stosujące suplementy diety, w których istniało prawdopodobieństwo występowania L-argininy czy sterydów anabolicznych.

Zastosowanie grupy kontrolnej nie miało na celu porównywanie uzyskanych przy jej badaniu wyników z grupą badaną. Zasadniczym celem pracy było porównanie wyników w zakresie grupy badanej przed oraz po jej naświetlaniu. Grupa kontrolna służyła do wykazania słuszności zastosowanej metody badawczej. Miała na celu ocenę wpływu preparatyki materiału biologicznego i stosowanych metod badanych, jako czynników mogących zakłócać interpretację uzyskanych wyników. W przypadku stwierdzenia zmian pod wpływem naświetlania, brak takich różnic w grupie kontrolnej wskazywał jednoznacznie na wpływ promieniowania, a nie innych elementów stosowanych w procedurze (na przykład nakłuciu tętnicy celem pobrania krwi). W związku z powyższym, przy braku znamienych różnic w grupie badanej w wynikach agregacji płytek, nie przeprowadzono analogicznych badań dla grupy kontrolnej. Analiza statystyczna w zakresie grupy kontrolnej nie wykazała jednak znamienego wpływu stosowanych metod badawczych na uzyskiwane wyniki.

Promieniowanie laserowe

Jak wspomniano we wstępie, najkorzystniejszy efekt biologiczny w przypadku LLLT uzyskuje się stosując promieniowanie z zakresu około 660 nm lub 800-1000 nm. W niniejszym badaniu zastosowano promieniowanie 808 nm. W porównaniu z promieniowaniem z zakresu około 660 nm użyta długość fali ma znacznie większą penetrację wgłąb tkanek. Dlatego w wypadku naświetlania tętnicy promieniowej laserem emitującym światło z zakresu bliskiej podczerwieni wydaje się być korzystniejsze. W badaniach klinicznych, w których konieczna jest głęboka penetracja tkanek, najczęściej stosuje się „dłuższy” zakres promieniowania. Ponadto długości fali promieniowania około 800 nm mieszczą się w najkorzystniejszym obszarze „okna optycznego” odpowiadającego niskiemu pochłanianiu promieniowania przez wodę znajdującą się w tkankach. Większe długości fali promieniowania (około 1000 nm) leżące na granicy okna optycznego mają gorsze właściwości penetracji tkanek.

Wiadomym jest, że korzystny efekt LLLT wzrasta wraz z liczbą przeprowadzonych ekspozycji. Optymalnie prawdopodobnie powinno być ich znacznie więcej. Jednakże grupa badana składała się z młodych, zdrowych, czynnych zawodowo osób. Po przeprowadzonej przed rozpoczęciem badania wnikliwej analizie stwierdzono, że większa liczba niż trzy codzienne ekspozycje (co wraz z pobraniem krwi po badaniu wiązało się z czterokrotnym codziennym przyjściem osób badanych do Kliniki) nie będzie możliwa.

Z liczbą ekspozycji wiąże się bezpośrednio sumaryczna dawka promieniowania zastosowana w eksperymencie. Przyjęto, że podczas pojedynczej ekspozycji pochłonięta dawka (po korekcji parametrów emisji urządzenia laserowego) będzie wynosić 20 J. Wydaje się, że większe dawki, stosowane na relatywnie małej powierzchni, mogłyby spowodować miejscowe efekty uboczne, które miałyby wpływ na końcowe wyniki. W efekcie sumaryczna dawka wynosiła 60 J. Nie można wykluczyć, że przedłużenie eksperymentu polegające na wielokrotnej ekspozycji (nawet przy mniejszej dawce jednostkowej, ale większej sumarycznej) spowodowałoby mocniej wyrażoną odpowiedź biologiczną.

Brak jest możliwości oceny rzeczywistej dawki LLLT oddziałującej na śródbłonek tętnicy promieniowej oraz krew przepływającą przez naczynie. Nieznana jest wielkość promieniowania pochłonięta przez tkanki znajdujące się pomiędzy naskórkiem, a tętnicą.

Biorąc jednak pod uwagę cechy anatomiczne, wybrano tętnicę najbardziej dostępną promieniowaniu, a zastosowana długość fali promieniowania najgłębiej penetrowała tkanki. W dostępnej literaturze brak jest opracowań, na podstawie których można byłoby oszacować skuteczną dawkę działającą miejscowo na śródbłonek oraz przepływającą krew. Ze względu na pochłoniętą przez tkanki dawkę w niniejszym badaniu, zastosowane wielkości energii są znacznie większe niż używane w badaniach eksperymentalnych na hodowlach komórkowych czy małych zwierzętach laboratoryjnych.

Wpływ LLLT na parametry biochemiczne

Zredukowany glutation GSH

Z uzyskanych wyników parametrów biochemicznych wykazano, iż naświetlanie niskoenergetycznym promieniowaniem laserowym prowadzi do wzrostu zredukowanego glutationu, pełniącego funkcję buforu sulfidowego. Można wnioskować, że laser o niskiej energii wpływając na zredukowany glutation, przeciwdziała powstawaniu stresu oksydacyjnego. Liczne doniesienia potwierdzają działanie antyoksydacyjne LLLT na podstawie zmian w parametrach określających potencjał oksydacyjno-redukcyjny [171, 172]. Wydaje się, że efekt zależny jest od zastosowania odpowiedniej dawki promieniowania oraz długość fali. Takie wnioski płyną z pracy Silveira i wsp., która przeprowadzona została na zwierzęcych modelach doświadczalnych. Laser HeNe (długość fali 632 nm) zarówno przy gęstości energii 1 J/cm², jak i 3 J/cm² powodował zmniejszenie stresu oksydacyjnego. Z kolei laser GaAs (arsenek galu – emitujący promieniowanie o znacznie większej długości) tylko przy zastosowaniu dawki 3 J/cm² wywoływał oczekiwany efekt [173]. Wykorzystane w niniejszej pracy parametry lasera (długość fali 808 nm, gęstość energii 20 J/cm²) również okazały się skuteczne w osiągnięciu działania antyoksydacyjnego. W tym wypadku LLLT przyczyniło się do zmian w poziomie zredukowanego glutationu.

Mechanizm tych zmian nie jest jednak znany. Być może związany jest z redukcją utlenionej formy glutationu do formy zredukowanej pod wpływem reduktazy glutationowej. Przesunięcie równowagi w kierunku zredukowanego glutationu po zastosowaniu LLLT świadczy o jego pozytywnym oddziaływaniu na organizm. GSH chroni komórki przed szkodliwym działaniem stresu oksydacyjnego i w przypadku takiego narażenia może ulec przemianie do formy utlenionej (GSSG).

Dotychczas nieliczne doniesienia zajmowały się badaniem zależności między LLLT, a GSH w kontekście działania antyoksydacyjnego. Przykładem jest praca de Lima oraz wsp. przeprowadzona na szczurach z ostrym uszkodzeniem płuc. Pod wpływem naświetlania niskoenergetycznym promieniowaniem laserowym (długość fali 660 nm, moc 30 mW, energia 5,4 J) zaobserwowano wzrost zredukowanego glutationu, co świadczyło o właściwościach antyoksydacyjnych promieniowania [174]. Wyniki niniejszej pracy potwierdzają wpływ LLLT na GSH także u ludzi, uprzednio obserwowany tylko na modelu zwierzęcym.

W literaturze występują pojedyncze doniesienia, o korzystnym efekcie działania LLLT na potencjał redox u ludzi, w których nie oceniano jednak zmian w zakresie GSH. W badaniu de Marchi i wsp., po zastosowaniu naświetlania (długość fali 810 nm, energia 30 J) na 5 min przed wysiłkiem fizycznym, wykazano obniżenie parametrów stresu oksydacyjnego związanych z aktywnością dysmutazy ponadtlenkowej oraz uszkodzeniem lipidów i protein [175]. Istnieje również doniesienie sugerujące niekorzystny wpływ LLLT na potencjał oksydacyjno-redukcyjny. W badaniu *in vitro* Huanga i wsp. przeprowadzonym na neuronach, efekt antyoksydacyjny obserwowano jedynie w komórkach uprzednio narażonych na stres oksydacyjny. W przypadku zdrowych neuronów, ekspozycja na niskoenergetyczne promieniowanie laserowe o długości 808 nm i gęstości energii 3 J/cm² skutkowało wzrostem reaktywnych form tlenu (ROS) [176]. Inne prace również dowiodły, że LLLT może zwiększać wydzielanie reaktywnych form tlenu, prowadzić do wzrostu aktywności metaloproteinaz lub nasilonej peroksydacji lipidów [177, 178].

Czynniki wzrostu

Obecnie istnieje pogląd, że promieniowanie laserowe o niskiej energii pobudza proliferację komórek. Potwierdzeniem tego są liczne badania *in vitro* prowadzone na różnych typach hodowli komórkowych np. fibroblastach, komórkach śródbłonna, keratynocytach, mioblastach i osteoblastach [154, 179, 180]. Istnieją doniesienia wykazujące, że LLLT pobudza proliferację komórek śródbłonna za pośrednictwem czynników wzrostu tj. VEGF [47, 181], lub FGF [182, 183]. W badaniu Góralczyka i wsp. naświetlanie komórek HUVEC promieniowaniem niskoenergetycznym o długości fali 635 nm oraz gęstości energii 2 i 4 J/cm² wywoływało najlepszy efekt proliferacyjny. Obserwowano wówczas najmniejszą ilość wolnego czynnika VEGF-A. Wynikało to z faktu, że naświetlanie pobudzało cząsteczki

VEGF do ich wiązania z receptorami, co w efekcie zwiększało proliferację komórek EC. Jednocześnie LLLT przyczyniało się do zmniejszenia poziomu inhibitorów proliferacji tj. wolnych receptorów dla VEGF – sVEGFR-1 oraz sVEGFR-2 [47]. Z kolei w badaniu Martignango i wsp. wykazano, iż promieniowanie o długości fali 904 nm i gęstości energii 2 i 3 J/cm² stosowane do naświetlania hodowli komórkowych mysich fibroblastów, na poziomie molekularnym zwiększa ekspresję genu dla VEGF, co w efekcie skutkuje pobudzeniem komórek do proliferacji [187]. Podobny efekt obserwowano przy naświetlaniu ludzkich keratynocytów laserem o dł. fali 780 nm i był on najbardziej zauważalny przy zastosowaniu energii promieniowania równej 1,5 J/cm² [152].

W niniejszej pracy badano wpływ LLLT na zmiany w zakresie czynników wzrostu VEGF oraz FGF. Nie udało się jednak stwierdzić istotnych statystycznie różnic w zakresie ich stężeń po zastosowaniu biostymulacji. Odnotowano jedynie nieznaczny wzrost wartości średnich VEGF po zastosowaniu LLLT. Warto zwrócić uwagę, że w badaniu Derkacza i wsp., które zostało przeprowadzone także na materiale klinicznym, również nie obserwowano wzrostu VEGF po zastosowaniu angioplastyki wieńcowej wewnątrznaczyniowego naświetlania tętnic. Podobne obserwacje dotyczące braku zmian w zakresie czynnika wzrostu VEGF wynikać mogą z faktu, że oba badania przeprowadzone zostały u ludzi i zastosowano tę samą długość fali (808 nm). Z drugiej jednak strony wewnątrznaczyniowe naświetlanie spowodowało istotne statystycznie zmniejszenie FGF, nie obserwowane w niniejszym badaniu [181]. Różnice w odpowiedzi FGF na LLLT mogą wynikać z ograniczonej biodostępności naświetlania metodą przezskórną w porównaniu z zastosowaniem metody wewnątrznaczyniowej.

Angiostatyna

W zakresie oznaczeń biochemicznych istotną obserwacją jest znamienne obniżenie poziomu angiostatyny w grupie badanej, w odpowiedzi na LLLT. Angiostatyna jest powszechnie znanym inhibitorem angiogenezy. Biorąc pod uwagę wyniki badań możemy założyć, że LLLT obniżając poziom angiostatyny, powoduje równocześnie przesunięcie równowagi w kierunku czynników o działaniu pro-angiogennym. W związku z tym LLLT pośrednio predysponować może do procesów angiogenezy, pomimo tego, że nie udało się potwierdzić bezpośredniego działania promieniowania na VEGF. Pojedyncze doniesienia potwierdzają ten pogląd, choć pobudzenie procesów angiogenezy wiązano raczej ze wzrostem iNOS oraz VEGF. Nie badano natomiast wpływu LLLT na stężenie angiostatyny [185, 186].

Z kolei w badaniu Zaidi oraz wsp. wysunięto wniosek, że LLLT pobudza angiogenezę przez wzrost angiomiotyny oraz spadek angiostatyny u myszy ze sklerodermią. Naświetlanie ich przez 14 dni promieniowaniem laserowym (o parametrach 670 nm, 50 mW/cm², 2,3 J/cm²) przyczyniło się do tworzenia krążenia obocznego w niedotlenionych wcześniej kończynach [187]. W dostępnej literaturze nie odnaleziono więcej źródeł, które potwierdzałyby istnienie zależności między LLLT, a poziomem angiostatyny.

Należy zwrócić uwagę, iż wysunięty w niniejszym badaniu wniosek związany z pobudzeniem angiogenezы przez obniżenie angiostatyny pod wpływem LLLT, nie został w pełni potwierdzony doświadczalnie i wymaga opracowania bardziej zaawansowanych metod badawczych. Jednocześnie zwrócono uwagę na możliwe korzyści i działania niepożądane wynikające z poczynionej obserwacji. Wydaje się prawdopodobne, że LLLT ograniczając działanie angiostatyny, może zostać wykorzystane do poprawy perfuzji w niedotlenionych tkankach. Szczególnie miałyby to znaczenie w niedotlenionym mięśniu sercowym lub uszkodzonych tkankach, gdzie fizjologicznie hipoksja prowadzi do pobudzenia procesów angiogenezы i tworzenia krążenia obocznego. Z drugiej strony w przypadku guzów nowotworowych angiostatyna ogranicza ich dalszy wzrost przez hamowanie neowaskularyzacji. Z tego wynika, iż LLLT nie powinno być stosowane u osób z chorobą nowotworową, ponieważ brak hamującego działania angiostatyny na proliferację komórek mogłoby pobudzać w sposób niekontrolowany angiogenezę naczyniową [188].

Wpływ LLLT na metabolizm tlenu azotu

W przedstawionej pracy próbowano ocenić wpływ LLLT na metabolizm tlenu azotu. W tym celu posłużono się analizą parametrów związanych ze szlakiem metabolizmu NO tj. ADMA, SDMA, L-argininą. Wydawało się to istotne ze względu na udowodnione korzystne oddziaływanie tlenu azotu na śródbłonek naczyniowy. W zakresie tych związków nie stwierdzono jednak znamiennych różnic przed i po procedurze naświetlania. W literaturze liczne doniesienia podają jednak korzystne oddziaływanie niskoenergetycznego promieniowania laserowego na biodostępność NO. Autorzy tych prac analizują jednak odmienne niż w niniejszej pracy parametry związane z metabolizmem tlenu azotu. Podkreśla się między innymi, iż LLLT powoduje zwiększenie ekspresji genu dla syntazy tlenu azotu, która bierze udział w przemianie L-arg w NO. Lohr i wsp. w swoim badaniu wykazują, że w przypadku hipoksji LLLT o długości fali 670 nm pobudza wydzielanie NO

z nitrozylowanej hemoglobiny oraz mioglobiny i związane to jest między innymi z konwersją HbNO do metHb [161]. Podobnie Osipov i wsp. wykazali, że fotoliza nitrozylowych kompleksów hemoglobiny stanowi źródło NO [189]. W niniejszej pracy badano wpływ LLLT na stężenie ADMA, ze względu na obecność licznych publikacji podkreślających znaczenie ADMA w powstawaniu chorób sercowo-naczyniowych, w odniesieniu do dysfunkcji śródbłonna. Brak danych literaturowych odnośnie wpływu LLLT bezpośrednio na poziom ADMA tym bardziej skłonił do tych obserwacji. Wydaje się jednak, że potwierdzone w licznych pracach korzystne oddziaływanie LLLT na metabolizm NO przebiega w innych mechanizmach niż badane w niniejszej pracy. Możliwy jest wpływ promieniowania na modyfikację stresu oksydacyjnego, jakkolwiek brak znamiennej poprawy wazodylatacyjnej funkcji śródbłonna ocenianej w części eksperymentalnej niniejszej pracy zdaje się przeczyć tej tezie.

Źródła podają, że tlenek azotu pełni funkcję antyagregacyjną przez pobudzenie syntezy cGMP. W odniesieniu do cGMP pełniącego rolę przekaźnika wtórnego w szlaku sygnalizacyjnym NO, również nie stwierdzono znamiennych różnic w jego poziomie po zastosowaniu LLLT. W literaturze nieliczne doniesienia wykazują jednak związek między LLLT, a podwyższonym poziomem cGMP czego efektem jest zmniejszona agregacja płytek krwi [190, 191, 192]. Nie zaobserwowano jednak takich efektów w niniejszym badaniu.

Wpływ LLLT na agregację płytek krwi

W niniejszym badaniu nie wykazano wpływu niskoenergetycznego promieniowania laserowego na agregację płytek krwi. LLLT nie wywołało znamiennych różnic w agregacji w odpowiedzi na trzech agonistów: ADP, COL i TRAP. W literaturze niektóre doniesienia wskazują, że LLLT może zmniejszać agregację płytek. Przykładem tego jest badanie Brila, które przeprowadzone zostało w warunkach *in vitro*. Na podstawie analizy parametrów agregacji w zależności od długości fali promieniowania obserwowano różne zachowanie się płytek. Między innymi wykazano, że LLLT o długościach fali odpowiadającej czerwieni słabiej agregują i ulegają adhezji [193]. W przypadku promieniowania w zakresie podczerwieni, LLLT zmniejsza agregację i nasila adhezję płytek krwi, ale efekt obserwowany był tylko w przypadku szybkiej zmiany faz promieniowania. W innym badaniu tego samego autora potwierdzono, że laser He-Ne (helowo neonowy) o długości fali 632 nm i mocy 7 mW powoduje zmniejszoną odpowiedź płytek krwi na agonistę aktywującego trombinę (TRAP).

Jednocześnie wykazano, że w procesie tym uczestniczy cGMP, którego poziom po naświetlaniu niskoenergetycznym promieniowaniem laserowym ulega zwiększeniu o 50 % [192]. Z kolei w badaniu Burduli i wsp. autorzy analizowali zmiany w zakresie agregacji płytek krwi pod wpływem LLLT u pacjentów z chorobą wrzodową w fazie zaostrzenia [194]. W trakcie badania pacjentów naświetlano metodą wewnątrznacyniową, przezskórnie lub obiema metodami. Wyniki sugerowały, iż LLLT wpływa korzystnie na właściwości płytek krwi i hamuje agregację [195]. Nie odnaleziono opracowań, które jednoznacznie wykazywałyby, iż LLLT z zakresu czerwieni i podczerwieni nasila agregację.

Zależności pomiędzy badanymi czynnikami

W zaprezentowanej pracy wykazano obecność istotnych statystycznie korelacji w odniesieniu do modulującej roli niskoenergetycznego promieniowania laserowego. Istotną, dodatnią korelację stwierdzono pomiędzy zredukowanym glutationem, a poziomem angiostatyny. Można przypuszczać, że przy wzroście zredukowanego glutationu hamowane są procesy neowaskularyzacji. Odmienny efekt obserwowany jest w przypadku hipoksji tkankowej, której towarzyszy najczęściej stres oksydacyjny. W takiej sytuacji pobudzana jest angiogeneza, która przeciwdziałać ma dalszemu niedotlenieniu tkanek. W niniejszym badaniu po zastosowaniu LLLT stwierdzono zniesienie zależności pomiędzy angiostatyną i GSH. Wydaje się to być korzystne z punktu widzenia braku hamowania angiogenezy i uzależnienia tego procesu od cytozolowego potencjału oksydacyjno-redukcyjnego. Z drugiej strony w przypadku zmian o charakterze nowotworowym wiąże się to z ryzykiem progresji procesu rozrostowego. Potwierdza to empirycznie postawioną tezę, że biostymulacja laserowa jest przeciwwskazana w przypadku potwierdzenia, czy nawet podejrzenia procesu rozrostowego.

W zakresie parametrów związanych z biodostępnością tlenu azotu uwagę zwracała dodatnia zależność pomiędzy L-argininą, a agregacją indukowaną ADP, po zastosowaniu niskoenergetycznego promieniowania laserowego. Z tego wynika, iż zwiększona biodostępność tlenu azotu wiąże się z działaniem antyagregacyjnym. O modulującej roli LLLT świadczy zaobserwowanie tego efektu dopiero po zastosowaniu naświetlania.

Wykazano również dodatnią korelację pomiędzy ADMA, a agregacją indukowaną kolagenem. Liczne prace podają, że ADMA jest predyktorem chorób sercowo naczyniowych.

Obserwowane działanie proagregacyjne ADMA potwierdza zatem jej negatywny wpływ na układ krążenia. Po zastosowaniu LLLT nie obserwuje się jednak zależności pomiędzy ADMA, a agregacją, co potwierdza terapeutyczne działanie niskoenergetycznego promieniowania laserowego.

Kolejną zależnością, istotną z punktu widzenia modulującego wpływu LLLT, jest ujemna korelacja pomiędzy stosunkiem L-arg/ADMA, a agregacją indukowaną trombiną. W tym wypadku wyjściowa biodostępność tlenu azotu jest predyktorem działania antyagregacyjnego, które ujawnia się dopiero po zastosowaniu niskoenergetycznego promieniowania laserowego.

W niniejszym badaniu dokonano również oceny modulującej roli LLLT w analizie regresji. Wykazano między innymi modulację pod wpływem LLLT agregacji indukowanej przez ADP w kontekście cytozolowego potencjału oksydacyjnego mierzonego za pomocą GSH oraz angiostatyny. Wskazywać to może na istotną rolę modulującego LLLT, w nawiązaniu do interakcji pomiędzy tkankowym potencjałem redox (stopień niedotlenienia tkanki i reperfuzji), angiogenezą i agregacją. Podobną modulującą rolę dwóch parametrów (angiostatyna, GSH) obserwowano również z agregacją indukowaną trombiną. Sugerując się tymi obserwacjami, można wysunąć wniosek, że LLLT moduluje antyangiogenne działanie płytek w sytuacji zmian potencjału redox.

Ograniczenia pracy

Istotnym ograniczeniem pracy była mała grupa badana. Problemem, jak wspomniano wyżej, była rekrutacja osób spełniających kryteria włączenia do grupy badanej. Duża liczba młodych osób przyjmowała środki farmakologiczne wpływające bezpośrednio na aktywność śródbłonna naczyniowego lub agregację płytek krwi. Dotyczyło to w szczególności leków z grupy NLPZ. Duża część kobiet przyjmowała na stałe doustne leki antykoncepcyjne, co również dyskwalifikowało je z uczestnictwa w badaniu.

Inne ograniczenia wynikały z samej procedury badania. W badaniu wykorzystano tylko jedną długość promieniowania laserowego. Inne długości promieniowania mogą potencjalnie charakteryzować się odmiennym działaniem na organizm, w tym na funkcję śródbłonna czy agregację płytek krwi. Przy użyciu, zastosowanej w badaniu metody naświetlania śródbłonna naczyniowego, nie można oszacować rzeczywistej dawki

promieniowania docierającej do śródbłonka naczyniowego. Biorąc jednak od uwagę, że inne metody naświetlania wiązałyby się z postępowaniem inwazyjnym, byłyby trudne do uzasadnienia na gruncie etycznym.

Ze względu na problemy organizacyjne związane z procedurą badania wymagającą czterokrotnego zgłoszenia się do Kliniki, zwiększenie liczby naświetlań nie było możliwe. Takie rozwiązanie byłoby z pewnością korzystniejsze biorąc pod uwagę, iż efekt biostymulacyjny jest silniejszy w przypadku sumowania się mniejszych dawek.

Pewnym ograniczeniem była niewielka powierzchnia poddana naświetlaniu promieniowaniem laserowym. Uzyskany efekt oddziaływania na śródbłonek miał raczej miejscowy charakter parakryny niż wpływ na całość tego narządu.

6. WNIOSKI

1. Niskoenergetyczne promieniowanie laserowe modyfikuje funkcję śródbłonka naczyniowego zwiększając jego potencjał antyoksydacyjny.
2. Zastosowane LLLT (808 nm, sumaryczna dawka 60 J) nie wywołało istotnych zmian w parametrach szlaku metabolizmu tlenu azotu.
3. Niskoenergetyczne promieniowanie laserowe zwiększa potencjał angiogeny śródbłonka naczyniowego.
4. Zastosowane przezskórnio niskoenergetyczne promieniowanie laserowe (808 nm, sumaryczna dawka 60 J) nie wpływa na agregację płytek krwi w agregometrycznych pomiarach krwi pełnej, w odpowiedzi na aktywację ADP, kolagenem i poprzez receptor trombiny.
5. Wykazane w niniejszym badaniu zależności pomiędzy parametrami śródbłonkowymi oraz agregacyjnymi świadczą o modulującym wpływie LLLT na śródbłonek naczyniowy oraz agregację płytek krwi.

7. STRESZCZENIE

Wstęp. Choroby sercowo-naczyniowe stanowią jedną z głównych przyczyn zgonów. W chwili obecnej uznaje się, iż dysfunkcja śródbłonna naczyniowego oraz zaburzenia agregacji płytek krwi prowadzą do rozwoju tej grupy schorzeń. Istotne wydaje się opracowanie metod terapeutycznych, których działanie wpływałoby efektywnie na funkcję śródbłonna naczyniowego oraz ograniczało negatywne skutki związane z nadmierną agregacją płytek krwi. Przeprowadzone w ostatnim czasie badania eksperymentalne oraz kliniczne potwierdziły korzystne oddziaływanie niskoenergetycznego promieniowania laserowego (LLLT) w zakresie układu krążenia. Istnieją pojedyncze doniesienia odnośnie działania promieniowania laserowego na ludzki śródbłonek w warunkach *in vivo*, a doniesienia dotyczące oddziaływania na agregację płytek krwi są sprzeczne.

Cel pracy. Celem badania była ocena wpływu niskoenergetycznego promieniowania laserowego na aktywność śródbłonna na podstawie oznaczeń wybranych parametrów biochemicznych. Ponadto oceniano wpływ niskoenergetycznego promieniowania laserowego na agregację płytek krwi w modelu *in vivo*. Podjęto też próbę ustalenia zależności pomiędzy badanymi parametrami w zależności od zastosowanego LLLT.

Materiał i metoda. Do badania włączono 40 zdrowych osób, nie stosujących leków mogących wpłynąć na wyniki biochemiczne. Spośród nich 30 stanowiło właściwą grupę badaną, a 10 kontrolną. Po pobraniu krwi, grupa badana (30 osób) trzykrotnie (raz dziennie przez trzy doby) miała naświetlaną tętnicę promieniową za pomocą lasera półprzewodnikowego 808 nm – dawką promieniowania 20 J z mocą 50 mW. Czwartego dnia uczestnikom badania, ponownie pobrano krew. Przeprowadzono ocenę biochemiczną (czynniki wzrostu śródbłonna naczyniowego – VEGF, czynniki wzrostu fibroblastów – FGF, angiostatyna, glutation, symetryczna i asymetryczna dimetyloarginina – SDMA, ADMA, L-arginina) oraz agregację płytek za pomocą agregometru Multiplate z wykorzystaniem aktywacji płytek za pomocą ADP, kolagenu i poprzez receptor trombiny (testy ADP, COL i TRAP). Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej wykorzystując program Statistica StatSoft.

Wyniki. Stwierdzono istotny statystycznie wzrost stężenia zredukowanego glutationu ($769,41 \pm 145,37$ vs $815,15 \pm 151,69$ $\mu\text{mol/l}$, $p=0,045$) oraz spadek stężenia angiostatyny ($265,22 \pm 151,43$ vs $255,16 \pm 228,68$ pg/ml , $p=0,002$) w wyniku naświetlania niskoenergetycznym promieniowaniem laserowym. Nie obserwowano istotnych zmian w zakresie VEGF, FGF,

SDMA, ADMA. Nie zaobserwowano także różnic w agregacji krwi (w żadnym z trzech stosowanych testów).

Stwierdzono także istotne statystycznie korelacje pomiędzy stężeniami badanych czynników pod wpływem naświetlania promieniowaniem laserowym. Wykazano między innymi korelacje pomiędzy zredukowanym glutationem, a poziomem angiotatyny ($r = 0,49$; $p < 0,05$); L-argininą, a agregacją indukowanej ADP ($r = -0,43$; $p < 0,05$); ADMA a agregacją indukowaną kolagenem ($r = 0,40$; $p < 0,05$); L-arg/ADMA oraz agregacją indukowaną trombiną ($r = 0,37$; $p < 0,05$). Ponadto stwierdzono występowanie zależności pomiędzy parametrami agregacyjnymi, GSH i angiotatyną w analizie regresji. W grupie kontrolnej nie obserwowano zmian stwierdzanych w grupie badanej, spowodowanych naświetlaniem.

Wnioski. Przeskórne naświetlanie tętnicy promieniowej niskoenergetycznym promieniowaniem laserowym o długości fali 808 nm, wywołuje korzystny efekt biologiczny na śródbłonek naczyniowy, zwiększając jego potencjał angiogeny oraz antyoksydacyjny. Jednocześnie nie stwierdzono wpływu LLLT na agregację płytek krwi oraz parametry szlaku metabolizmu tlenu azotu. Wykazano obecność dodatnich korelacji świadczących o modulującym wpływie LLLT na aktywność śródbłonka naczyniowego oraz agregację płytek krwi.

8. SUMMARY

Introduction. Cardiovascular diseases are among the main causes of death. At present it has been established that endothelial dysfunction and platelet aggregation lead to that group of conditions. It seems relevant to draw up therapeutic methods which could effectively affect the vascular endothelium's function and limit the negative effects associated with the excessive platelet aggregation. Recently conducted experimental and clinical studies confirmed the beneficial effects of low-level laser therapy (LLLT) on the cardiovascular system, there are however only single reports of laser radiation on human endothelium *in vivo* and reports regarding effects on the platelet aggregation are contradictory.

The aim of the thesis. The aim of the study was to evaluate the effect of the low-level laser radiation on endothelial function, based on assessment of selected biochemical parameters. In addition, the effect of the low-level laser radiation on platelet aggregation in the *in vivo* model was evaluated. An attempt has also been taken to establish the correlation between the studied parameters depending on the applied LLLT.

Material and methods. The study included a group of 40 healthy people who did not use any medication that could affect the biochemical results. 30 of them were the appropriate test group and 10 were the control one. After taking blood samples the test group (30 people) underwent three cycles (once a day for three days) of having their radial artery irradiated with a semiconductor laser at a wavelength of 808 nm – a radiation dose of 20 J (summary 60 J) with the power of 50 mW. On the fourth day, all subjects had blood samples taken again.

A biochemical assessment was conducted taking into account vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblast growth factor (FGF), angiostatin, glutathione (GSH), symmetric dimethylarginine (SDMA), asymmetric dimethylarginine (ADMA), L-arginine and the aggregation of whole blood using an aggregometer Multiplate by means of platelet activation ADP, collagen and thrombin-related activation peptide (ADP, COL and TRAP tests).

The results were statistically analyzed using Statistica StatSoft program.

Results. A statistically significant increase in the concentration of glutathione (GSH) was stated ($769,41 \pm 145,37$ vs $815,15 \pm 151,69$ $\mu\text{mol/l}$, $p=0,045$) and a decrease in concentration of angiostatin ($265,22 \pm 151,43$ vs $255,16 \pm 228,68$ pg/ml , $p<0,002$) as a result of laser irradiation. No important changes in the field of VEGF, FGF, SDMA, ADMA and L-arginine

were observed. No difference in the blood aggregation (in any of the used three tests) was observed.

Furthermore a statistically significant correlation between the concentration of the researched parameters under the effect of low-energy laser irradiation. Among others a correlation between glutathione and angiostatin levels ($r = 0,49$; $p < 0,05$); L-arginin, and ADP induced aggregation ($r = -0,43$; $p < 0,05$); ADMA and collagen induced aggregation ($r = 0,40$; $p < 0,05$); L-arg/ADMA as well as thrombin induced aggregation ($r = 0,37$; $p < 0,05$). On top of this a dependency has been found between aggregation parameters, GSH and angiostatin using a regression analysis. The control group did not produce before mentioned results relating to the irradiation.

Conclusions

Transdermal irradiation of the radial artery using a low level laser therapy at 808 nm wavelength produces a beneficial biological effect on the epithelium, increasing its angiogenic and antioxidative potential. At the same time no influence has been found of LLLT on the aggregation of platelets nor on the parameters of NO metabolic pathway. A positive correlation providing modulating effect of LLLT on the activity of epithelium and on the aggregation of platelets has been demonstrated.

9. PIŚMIENNICTWO

1. Mendis S, Puska P, Norrving B i wsp.: Global atlas on cardiovascular disease prevention and control. World Health Organization, Geneva 2011.
2. Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redon J i wsp.: Wytyczne ESH/ESC dotyczące postępowania w nadciśnieniu tętniczym w 2013 roku. Grupa Robocza Europejskiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego (ESH) i Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego (ESC) do spraw postępowania w nadciśnieniu tętniczym. *Kardiologia Pol* 2013; 7(supl. III): 27-118.
3. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ i wsp.: Heart disease and stroke statistics –update 2013. Report from American Heart Association. *Circulation*. 2013; 127: 6-245.
4. Doroszko A, Andrzejak R, Szuba A: Dysfunkcja śródbłonna i ADMA w patogenezie nadciśnienia tętniczego. *Nadciśnienie Tętnicze*. 2008; 12(3): 224-237.
5. Hadi H, Carr CS, Suwaidi J: Endothelial dysfunction: Cardiovascular risk factors therapy and outcome. *Vasc Health Risk Manag*. 2005; 1(3): 183-198.
6. Kłosińska M: Kliniczna ocena funkcji śródbłonna. *Kardiologia po Dyplomie*. 2005; 4(7): 67-68.
7. Bragulat E, de la Sierra A, Antonio MT i wsp.: Endothelial dysfunction in salt-sensitive essential hypertension. *Hypertension*. 2001; 37: 444-448.
8. Sorensen KE, Celermajer DS, Georgakopoulos D i wsp.: Impairment of endothelium-dependent dilation is an early event in children with familial hypercholesterolemia and is related to the lipoprotein (a) level. *J Clin Invest*. 1994; 93: 50-55.
9. Chłopicki S, Gryglewski RP: Farmakologia śródbłonna. *Kardiologia Pol* 2002; 57(supl.IV): 5-15.
10. Félétou M: The Endothelium: Multiple Functions of the Endothelial Cells—Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators. Morgan & Claypool Life Sciences Publishers, San Rafael 2011.

11. Baszczuk A, Kopczyński K, Thielemann A: Dysfunkcja śródbłonna naczyniowego u chorych na pierwotne nadciśnienie tętnicze z hiperhomocysteinemią. *Postepy Hig Med Dosw.* 2014; 68: 91-100.
12. Obońska K, Grąbczewska Z, Fisz J: Ocena czynności śródbłonna naczyniowego-gdzie jesteśmy, dokąd zmierzamy? *Folia Cardiol Excerpta.* 2010; 5(5): 292-297.
13. Furchgott RF, Zawadzki JV: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980; 288(5789): 373-376.
14. Mackiewicz U, Mączewski M, Beręśiewicz A: Różne twarze tlenu azotu. *Kardiologia Pol.* 2002; 57(supl IV): 17-21.
15. Sokołowska M, Włodek L: Dobrze i źle strony tlenu azotu. *Folia Cardiol.* 2001; 8(5): 467-477.
16. Cines DB, Pollak ES, Buck CA i wsp.: Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood.* 1998; 91: 3527-3561.
17. Moncada S, Higgs EA: The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med.* 1993; 329: 2002-2012.
18. Vallance P, Collier J, Moncada S: Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet.* 1989; 2(8670): 997-1000.
19. Hinderliter AL, Caughey M: Ocena funkcji śródbłonna jako czynnika ryzyka choroby sercowo-naczyniowej. *Kardiologia po Dyplomie.* 2004; 3(6): 19-28.
20. Guzik TJ: Wolne rodniki tlenowe w mechanizmie dysfunkcji śródbłonna. *Kardiologia Pol.* 2002; 57(supl. IV): 36-45.
21. Cai H, Harrison DG: Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: The role of oxidant stress. *Circulation Res.* 2000; 87: 840-844.
22. Taddei S, Virdis A, Mattei P, i wsp.: Vasodilation to acetylcholine in primary and secondary forms of human hypertension. *Hypertension.* 1993; 21: 929-933.
23. Riccioni G, Scotti L, D'Orazio N, Gallina S i wsp.: ADMA/SDMA in elderly subjects with asymptomatic carotid atherosclerosis: values and site-specific association. *Int J Mol Sci.* 2014; 15(4): 6391-6398.

24. Lu TM, Ding YA, Lin SJ, Lee WS, Tai HC: Plasma levels of asymmetrical dimethylarginine and adverse cardiovascular events after percutaneous coronary intervention. *Eur Heart J.* 2003; 24:1912-1919.
25. Leiper J, Nandi M, Torondel B, Murray-Rust J i wsp: Disruption of methylarginine metabolism impairs vascular homeostasis. *Nat Med.* 2007; 13(2): 198-203.
26. Tain YL, Huang LT: Restoration of asymmetric dimethylarginine-nitric oxide balance to prevent the development of hypertension. *Int J Mol Sci.* 2014; 15(7): 11773-11782.
27. Hammes MS, Watson S, Coe FL, Ahmed F i wsp.: Asymmetric dimethylarginine and whole blood viscosity in renal failure. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2014. doi:10.3233/CH-141843.
28. Boger RH, Zoccali C: ADMA: A novel risk factor that explains excess cardiovascular event rate in patients with end-stage renal disease. *Atheroscler Suppl.* 2003; 4: 23-28.
29. Xia W, Shao Y, Wang Y, Wang X, Chi Y: Asymmetric dimethylarginine and carotid atherosclerosis in Type 2 diabetes mellitus. *J Endocrinol Invest.* 2012; 35(9): 824-827.
30. Sibal L, Agarwal SC, Home PD, Boger RH: The role of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in endothelial dysfunction and cardiovascular disease. *Curr Cardiol Rev.* 2010; 6(2): 82-90.
31. Trocha M, Merwid-Ląd A, Szuba A i wsp.: Asymmetric dimethylarginine synthesis and degradation under physiological and pathological conditions. *Adv Clin Exp Med.* 2010; 19(2): 233-243.
32. Achan V, Broadhead M, Malaki M i wsp.: Asymmetric dimethylarginine causes hypertension and cardiac dysfunction in humans is actively metabolized by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23: 1455-1459.
33. Ito A, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto L i wsp.: Novel mechanism for endothelial dysfunction dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation.* 1999; 99: 3092-3095.
34. Dayoub H, Achan V, Adimoolam S, Jacobi J i wsp.: Dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates nitric oxide synthesis: Genetic and physiological evidence. *Circulation.* 2003; 108(24): 3042-3047

35. Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S: Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet*. 1992; 339(8793): 572-575.
36. Neubauer-Geryk J, Bieniaszewski L: Metody oceny funkcji śródbłonna. Wazodylatacja tętnicy ramiennej po niedokrwieniu. *Choroby Serca i Naczyń*. 2007; 4(4): 190–196.
37. Juonala M, Viikari JS, Alfthan G i wsp.: Brachial artery flow-mediated dilation and asymmetrical dimethylarginine in the cardiovascular risk in young fins. *Circulation*. 2007; 116: 1367-137.
38. Adamczak-Ratajczak A, Mądry E, Krawczyk M, Zywert M: Kompleks intima-media-znaczenie diagnostyczne. *Care Review*. 2010; 12(3): 877-878.
39. Furuki K, Adachi H, Enomoto M, Otsuka M: Plasma level of asymmetric dimethylarginine (ADMA) as a predictor of carotid intima-media thickness progression: Six-year prospective study using carotid ultrasonography. *Hypertension Res*. 2008; 31: 1185-1189.
40. Böger RH, Sydow K, Borlak J, Thum T i wsp.: LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetrical dimethylarginine in human endothelial cells: involvement of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. *Circulation Res*. 2000; 87(2): 99-105.
41. Kielstein JT, Bode-Böger SM, Frölich JC, Ritz E, Haller H, Fliser D: Asymmetric dimethylarginine, blood pressure, and renal perfusion in elderly subjects. *Circulation*. 2003; 107: 1891-1895.
42. Schnabel R, Blankenberg S, Lubos E, Lackner KJ: Asymmetric dimethylarginine and the risk of cardiovascular events and death in patients with coronary artery disease. Results from the athero gene study. *Circulation Res*. 2005; 9: 53-59.
43. Duffy AM, Bouchier-Hayes DJ, Judith Harmey JH: Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its role in non-endothelial cells: Autocrine signalling by VEGF. *Madame Curie Bioscience Database*. Landes Bioscience Austin, 2000.
44. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z: Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *The FASEB Journal*. 1999; 13: 19-22.

45. Grochulik A, Chodurek E, Domal-Kwiatkowska D, Dzierewicz Z: VEGF-A celem antyangiogennej terapii przeciwnowotworowej. *Pos Biol Komórki*. 2007; 34(3): 557-580.
46. Luty GA, McLeod DS, Bhutto I, Wiegand SJ: Effect of VEGF trap on normal retinal vascular development and oxygen-induced retinopathy in the dog. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011; 52(7): 4039-4047.
47. Góralczyk K, Szymańska J, Łukowicz M, Drela E, i wsp.: Effect of LLLT on endothelial cells culture. *Lasers Med Sci* 2015; 30: 273-278.
48. Ramos MA, Kuzuya M, Esaki T i wsp.: Induction of macrophage VEGF in response to oxidized LDL and VEGF accumulation in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998; 18: 1188-1196.
49. Larcher F, Robles AI, Duran H Murillas R i wsp: Up-regulation of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in mouse skin carcinogenesis correlates with malignant progression state and activated H-ras expression levels. *Cancer Res*. 1996; 56: 5391-536.
50. Soker S, Kaefer M, Johnson M, Klagsbrun M i wsp.: Vascular endothelial growth factor-mediated autocrine stimulation of prostate tumor cells coincides with progression to a malignant phenotype. *Am J Pathol*. 2001; 159: 651-659.
51. Plate KH, Breier G, Weich HA, Risau W: Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature*. 1992; 359(6398): 845-848.
52. Caamano JH, Rizzo CA, Durham SK i wsp.: Nuclear factor (NF)-kappa B2 (p100/p52) is required for normal splenic microarchitecture and B cell-mediated immune responses. *J Exp Med*. 1998; 187: 185-196.
53. Thisse B, Thisse C: Functions and regulations of fibroblast growth factor signaling during embryonic development. *Dev Biol*. 2005; 287(2): 390-402.
54. Lo Vasco VR, Leopizzi M, Puggioni C, Della Rocca C, Businaro R: Fibroblast growth factor acts upon the transcription of phospholipase C genes in human umbilical vein endothelial cells. *Mol Cell Biochem*. 2014; 388(1-2): 51-59.

55. Xu J, Liu Z, Ornitz DM: Temporal and spatial gradients of Fgf8 and Fgf17 regulate proliferation and differentiation of midline cerebellar structures. *Development*. 2000; 127(9): 1833-1843.
56. Wahl ML, Kenan DJ, Gonzalez-Gronow M, Pizzo SV: Angiostatin's molecular mechanism: aspects of specificity and regulation elucidated. *J Cell Biochem*. 2005; 96(2): 242-261.
57. Volm M, Mattern J, Koomägi R: Angiostatin expression in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2000; 6(8): 3236-3240.
58. Jurasz P, Alonso D, Castro-Blanco S, Murad F, Radomski MW: Generation and role of angiostatin in human platelets. *Blood*. 2003; 102(9): 3217-3223.
59. O'Reilly MS, Holmgren L, Chen C, Folkman J: Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. *Nat Med*. 1996; 2(6): 689-692.
60. Lannutti BJ, Gately ST, Quevedo ME, Soff GA, Paller AS: Human angiostatin inhibits murine hemangioendothelioma tumor growth in vivo. *Cancer Res*. 1997; 57(23): 5277-5280.
61. Westphal JR, Van't Hullenaar R, Geurts-Moespot A, Sweep FC, Verheijen JH: Angiostatin generation by human tumor cell lines: involvement of plasminogen activators. *Int J Cancer*. 2000; 86(6): 760-767.
62. Sierko E, Sierko PP, Wojtukiewicz MZ: Angiostatyna – ukryty w układzie hemostazy naturalny inhibitor angiogenezy: perspektywy zastosowania w terapii przeciwnowotworowej. *J Oncol*. 2002; 52(2): 144-149.
63. Moser TL, Stack SM, Asplin I, Enghild JJ i wsp.: Angiostatin binds ATP synthase on the surface of human endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*. 1999; 96(6): 2811-2816.
64. Mauceri HJ, Hanna NN, Beckett MA, Gorski DH i wsp.: Combined effects of angiostatin and ionizing radiation in antitumour therapy. *Nature*. 1998; 394(6690): 287-291.
65. Dell'Eva R, Pfeffer U, Indraccolo S, Albini A, Noonan D: Inhibition of tumor angiogenesis by angiostatin: from recombinant protein to gene therapy. *Endothelium*. 2002; 9(1): 3-10.

66. Zhang G, Jin G, Nie X, Mi R i wsp.: Enhanced antitumor efficacy of an oncolytic herpes simplex virus expressing an endostatin-angiostatin fusion gene in human glioblastoma stem cell xenografts. *PLoS One*. 2014; 9: e95872.
67. Czajka A: Wolne rodniki tlenowe a mechanizmy obronne organizmu. *Nowiny Lekarskie*. 2006; 7(6): 582-586.
68. Karpińska A, Gromadzka G: Stres oksydacyjny i naturalne mechanizmy antyoksydacyjne-znaczenie w procesie neurodegeneracji. Od mechanizmów molekularnych do strategii terapeutycznych. *Postępy Hig Med Dośw*. 2013; 67: 43-53.
69. McMahon BK, Gunnlaugsson T: Selective detection of the reduced form of glutathione (GSH) over the oxidized (GSSG) form using a combination of glutathione reductase and a Tb(III)-cyclen maleimide based lanthanide luminescent 'switch on' assay. *J Am Chem Soc*. 2012; 134(26): 10725-10728.
70. Markuszewski L, Okoński P, Banach M, Wierzbński P, Pietruszyński R: Rola stresu oksydacyjnego i reaktywnych postaci tlenu w patogenezie uszkodzenia mięśnia sercowego po reperfuzji. Glutation jako związek zapobiegający uszkodzeniom poreperfuzyjnym. *Folia Cardiol*. 2006; 13(1): 9-18.
71. Juszczak J: Hepatitis C. Patogeneza i terapia. Termedia, Poznań 2009.
72. Francis SH, Busch JL, Corbin JD, Sibley D: cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. *Pharmacol Rev*. 2010; 62(3): 525-563.
73. Pfeifer A, Kilić A, Hoffmann LS: Regulation of metabolism by cGMP. *Pharmacol Ther*. 2013; 140(1): 81-91.
74. Potter LR, Abbey-Hosch S, Dickey DM: Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocr Rev*. 2006; 27(1): 47-72.
75. Birkenfeld AL, Budziarek P, Boschmann M, Moro C: Atrial Natriuretic Peptide Induces Postprandial Lipid Oxidation in Humans. *Diabetes*. 2008; 57(12): 3199–3204.
76. Kiemer AK, Gerwig T, Gerbes AL, Meissner i wsp.: Kupffer-cell specific induction of heme oxygenase 1 (hsp32) by the atrial natriuretic peptide-role of cGMP. *J Hepatol*. 2003; 38(4): 490-498.

77. Rodvien R, Mielke CH Jr: Role of platelets in hemostasis and thrombosis. *West J Med.* 1976; 125: 181-186.
78. Palomo I, Fuentes E, Padró T, Badimon L: Platelets and atherogenesis: Platelet anti-aggregation activity and endothelial protection from tomatoes (*Solanum lipopersicum* L.). *Exp Ther Med.* 2012; 3(4): 577–584.
79. Thaulow E, Erikssen J, Sandvik L, Stormorken H, Cohn PF: Blood platelet count and function are related to total and cardiovascular death in apparently healthy men. *Circulation.* 1991; 84: 613-617.
80. Chu SG, Becker RC, Berger PB, Bhatt DL i wsp.: Mean platelet volume as a predictor of cardiovascular risk: a systematic review and meta-analysis. *J. Thromb. Haemost.* 2010; 8:148-156.
81. Karshovska E, Zagorac D, Zernecke A, Weber C, Schober A: A small molecule CXCR4 antagonist inhibits neointima formation and smooth muscle progenitor cell mobilization after arterial injury. *J. Thromb. Haemost.* 2008; 6: 1812-1815.
82. Hundelshausen P, Schmitt MNM: Platelets and their chemokines in atherosclerosis—clinical applications. *Front Physiol.* 2014; 5: 294.
83. Ghoshal K, Bhattacharyya M: Overview of Platelet Physiology: Its Hemostatic and Nonhemostatic Role in Disease Pathogenesis. *The Scientific World Journal.* 2014; doi.org/10.1155/2014/781857.
84. Hughes A, McVerry BA, Wilkinson L, Goldstone AH i wsp.: Diabetes, a hypercoagulable state? Haemostatic variables in newly diagnosed type 2 diabetic patients. *Acta Haematol.* 1983; 69(4): 254-259.
85. Hayem G: Recherches sur l'evolution des hematies dans le sang de l'homme et des vertebres. *Arch Physiol Norm Pathol II.* 1878; 5: 692-734.
86. Bizzozero J: On a new blood particle and its role in thrombosis and blood coagulation. *Virchows Arch Pathol Anat Physiol Klin Med* 1882; 90: 261-332.
87. Osler W: On certain problems in the physiology of the blood corpuscles. *The Medical News* 1886; 48: 421-425.
88. Eberth J, Schimmelbusch C: Experimentelle Untersuchungen uber Thrombose Die Anfange der Thrombenbildung. *Fortschr Med.* 1885; 3: 379-389.

89. Shaun PJ: The growing complexity of platelet aggregation. *Blood*. 2007; 109(12): 5087-5095.
90. Nesbitt WS, Westein E, Tovar-Lopez FJ: A shear gradient-dependent platelet aggregation mechanism drives thrombus formation. *Nat Med*. 2009; 15: 665-673.
91. Nielsen HL, Kristensen SD, Thygesen SS, Mortensen J i wsp.: Aspirin response evaluated by the Verify Now Aspirin System and light transmission aggregometry. *Thromb Res*. 2008; 123(2): 267-273.
92. Cattaneo M, Cerletti C, Harrison P, Hayward CP i wsp.: Recommendations for the standardization of light transmission aggregometry: a consensus of the working party from the platelet physiology subcommittee of SSC/ISTH. *J Thromb Haemost*. 2013; 11: 1183-1189.
93. Floyd CN, Goodman T, Becker S, Chen N: Increased platelet expression of glycoprotein IIIa following aspirin treatment in aspirin-resistant but not aspirin-sensitive subjects. *Br J Clin Pharmacol*. 2014; 78(2): 320-328.
94. Łabuz-Roszak B, Pierzchała K, Machowska-Majchrzak K, Porosińska A, Wawrzyńczyk M: Evaluation of platelet functions in patients taking acetylsalicylic acid as a secondary stroke prevention. *Ann Acad Siles*. 2010; 64: 54-63.
95. Sibbing D, Braun S, Jawansky S, Vogt W i wsp.: Assessment of ADP-induced platelet aggregation with light transmission aggregometry and multiple electrode platelet aggregometry before and after clopidogrel treatment. *Thromb Haemost*. 2008; 99(1): 121-126.
96. Lee J, Kim JK, Kim JH, Dunuu T i wsp.: Recovery time of platelet function after aspirin withdrawal. *Curr Ther Res Clin Exp*. 2014; 76: 26-31.
97. Awidi A, Maqablah A, Dweik M, Bsoul N, Abu-Khader A: Comparison of platelet aggregation using light transmission and multiple electrode aggregometry in Glanzmann thrombasthenia. *Platelets*. 2009; 20(5), 297-301.
98. Valarche V, Desconclois C, Boutekedjiret T, Dreyfus M, Proulle V: Multiplate whole blood impedance aggregometry: a new tool for von Willebrand disease. *J Thromb Haemost*. 2011; 9(8): 1645-1647.

99. Stemberger M, Al Khatib A, Spannagl M, Calatzis A, Lison S: Usefulness of Multiple Electrode Aggregometry (MEA) for the detection of inherited platelet disorders. *Schattauer Hämostaseologie* 2012; 1: ED12-ED17 (www.haemostaseologie-online.com).
100. Galea V, Khaterchi A, Francoise R, Gerotziafas i wsp.: Heparin-induced multiple lectrode aggregometry is a promising and useful functional tool for heparin-induced thrombocytopenia diagnosis: Confirmation in a prospective study. *Platelets*. 2013; 24(6): 441-447.
101. Maiman, T: Stimulated optical radiation in ruby. *Nature*. 1960; 187: 493–494.
102. Derkacz A. Przegląd zastosowania promieniowania laserowego w kardiologii inwazyjnej. Stan obecny i kierunki rozwoju. *Przegląd Lekarski*. 2004; 61: 35-38.
103. Finsen N: Om Lysets Indvirkninger paa Huden. *Hospitalstidende*. 1893; Nr. 27.
104. Finsen N: Om Anvendelse i Medicinen af koncentrerede kemiske Lysstraaler. Kjobenhavn, Gyldendale 1896
105. Mester E, Szende, B, Gartner P: The effect of laser beams on the growth of hair in mice. *Radiobiol Radiother*. 1968; 9: 621–626.
106. Kochel B, Łukowiak E: Biostymulacyjna terapia laserowa. RES Inco-Laser. Wrocław, 1994.
107. Cieślak G, Adamek M, Sieroń A, Kamiński M: Wpływ niskoenergetycznego promieniowania laserowego na aktywność wybranych enzymów mitochondrialnych. *Acta Bio-Opt Inf Med*. 1995; 1: 131-135.
108. Kruk A, Mostovnikov W, Chochłov I, Serduczenko N: Efektywność terapeutyczna promieniowania laserowego o małym natężeniu. Część III: Zmiany biochemiczne w tkankach. *Acta Bio-Opt Inf Med*. 1997; 3: 59-83.
109. Mostovnikov W, Mostovnikowa G, Pławski W, Tretiakow S: Molekularne mechanizmy terapeutycznego promieniowania laserowego. RES Inco-Laser; Wrocław 1994.
110. Mostovnikov V, Mostovnikova G, Pławskij V, Pławskaja L, Morozova R: Procesy fotofizyczne określające działanie biologiczne i terapeutyczne promieniowania laserowego o małym natężeniu. *Acta Bio-Opt Inf Med*. 1995; 1: 55-62.

111. Karu T: Low power laser therapy. In: Biomedical Photonics Handbook. Ed: Tuan Vo-Dinh. Boca Raton, CRC Press. 2003; 48-1 – 48-25.
112. Pastore D, Di Martino C, Bosco G, Passarella S: Stimulation of ATP synthesis via oxidative phosphorylation in wheat mitochondria irradiated with helium-neon laser. *Biochem Molec Biol Int.* 1996; 39: 149-157.
113. 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.
114. 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.
115. Xuejuan G, Xing D: Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low power laser irradiation. *J Biomed Sci.* 2009; 16: 4.
116. Tafur J, Mills P: Low-Intensity Light Therapy: Exploring the Role of Redox Mechanisms. *Photomed Laser Surg.* 2008; 26: 321-326.
117. Huang L, Wu S, Xing D: High fluence low-power laser irradiation induces apoptosis via inactivation of Akt/GSK3 β signaling pathway. *J Cell Physiol.* 2011; 226(3): 588-601.
118. Zhang L, Xing D, Gao X, Wu S: Low-power laser irradiation promotes cell proliferation by activating PI3K/Akt pathway. *J Cell Physiol.* 2009; 219, 553-562.
119. 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: 518-528.
120. Aimbire F, Ligeiro de Oliveira AP, Albertini R, Corrêa JC i wsp.: Low level laser therapy (LLLT) decreases pulmonary microvascular leakage, neutrophil influx and IL-1beta levels in airway and lung from rat subjected to LPS-induced inflammation. *Inflammation.* 2008; 31(3), 189-197.
121. Mafra de Lima F, Villaverde AB, Salgado MA, Castro-Faria-Neto HC i wsp.: Low intensity laser therapy (LILT) in vivo acts on the neutrophils recruitment and chemokines/cytokines levels in a model of acute pulmonary inflammation induced by aerosol of lipopolysaccharide from Escherichia coli in rat. *J Photochem Photobiol B.* 2010;101: 271-278.

122. Derkacz A, Protasiewicz M, Poręba R, Doroszko A, Andrzejak R: Effect of the intravascular low energy laser illumination during percutaneous coronary intervention on the inflammatory process in vascular wall. *Lasers Med Sci.* 2013; 28: 763-768.
123. Shiba H, Tsuda H, Kajiya M, Fujita T i wsp.: Neodymium-doped yttrium-aluminium-garnet laser irradiation abolishes the increase in interleukin-6 levels caused by peptidoglycan through the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in human pulp cells. *J Endod.* 2009; 35: 373-376.
124. Pezelj-Ribarić S, Kqiku L, Brumini G, Urek MM: Proinflammatory cytokine levels in saliva in patients with burning mouth syndrome before and after treatment with low-level laser therapy. *Lasers Med Sci.* 2013; 28: 297-301.
125. Oliveira RG, Ferreira AP, Côrtes AJ, Aarestrup BJ i wsp.: Low-level laser reduces the production of TNF- α , IFN- γ , and IL-10 induced by OVA. *Lasers Med Sci.* 2013; 28(6): 1519-1525.
126. Mesquita-Ferrari RA, Martins MD, Silva JA Jr, da Silva TD: Effects of low-level laser therapy on expression of TNF- α and TGF- β in skeletal muscle during the repair process *Lasers Med Sci.* 2011; 26: 335-340.
127. de Lima FM, Villaverde AB, Albertini R, Corrêa JC i wsp.: Dual Effect of low-level laser therapy (LLLT) on the acute lung inflammation induced by intestinal ischemia and reperfusion: Action on anti- and pro-inflammatory cytokines. *Lasers Surg Med.* 2011; 43: 410-420.
128. Talar J, Radziszewski K, Bryndza E: Biostymulacja laserowa. *Wiad Lek.* 1993; 46: 683-686.
129. Karu T, Afanasyeva N, Kolyakov S, Patibrat L, Welser L: Changes in absorbance of monolayer of living cells induced dye laser radiation at 633, 670, and 820 nm. *IEEE J Sel Top Quantum Electron* 2001; 7: 982-988.
130. Fiedor P, Kęcik T, Niechoda Z, Nowakowski W i wsp.: Zarys klinicznych zastosowań laserów. Dom Wydawniczy Ankar, Warszawa 1995.
131. Kujawa J: Zastosowanie biostymulacji laserowej w rehabilitacji. Część II: Laseroterapia niskoenergetyczna u chorych po urazach tkanek miękkich narządu ruchu. *Med Sport.* 1999; 3: 201-213.

132. Sieroń A, Adamek M, Cieślak G: Podstawowe zasady postępowania w biostymulacji laserowej. *Acta Bio-Opt Inf Med.* 1995; 1: 63-66.
133. Dahm J: Excimer laser coronary angioplasty (ELCA) for diffuse in-stent restenosis: Beneficial long-term results after sufficient debulking with a lesion-specific approach using various laser catheters. *Lasers Surg Med.* 2001; 16: 84-89.
134. Topaz O, Das T, Dahm J, Madyhoon H i wsp.: Excimer laser revascularisation: Current indications, applications and techniques. *Lasers Med Sci.* 2001; 16: 72-77.
135. Mirhoseini M, Cayton M: Revascularisation of the heart by laser. *J Microsc Surg.* 1983; 3: 253-260.
136. Gepstein L, Hayam G, Shpun S, Ben-Haim S: Hemodynamic evaluation of the heart with a nonfluoroscopic electromechanical mapping technique. *Circulation.* 1997; 96: 3672-3680.
137. Katoh T, Asahara T, Naitoh Y, Nakajima H: In vivo intravascular laser photodynamic therapy in rabbit atherosclerotic lesions using a lateral direction fiber. *Lasers Surg Med.* 1997; 20: 373-381.
138. Nyamekye I, Anglin S, McEwan J, MacRobert i wsp.: Photodynamic therapy of normal and balloon-injured rat carotid arteries using 5-amino-levulinic acid. *Circulation.* 1995; 91: 417-425.
139. Rockson S, Kramer P, Razavi M, Szuba A: Photoangioplasty for human peripheral atherosclerosis: Results of a phase I trial of photodynamic therapy with motexafin lutetium (Antrin). *Circulation.* 2000; 102: 2322-2324.
140. Życiński P, Krzemińska-Pakuła M, Peszyński-Drews C, Kierus A i wsp.: Laser biostimulation in end-stage multivessel coronary artery disease-a preliminary observational study. *Kardiol Pol.* 2007; 65: 13-21.
141. Oron U, Yaakobi T, Oron A, Hayam G i wsp.: Attenuation of infarct size in rats and dogs after myocardial infarction by low-energy irradiation. *Lasers Surg Med.* 2001; 28: 204-211.
142. Whittaken P, Rakusan K, Kloner R: Transmural channels can protect ischaemic tissue. Assessment of long-term myocardial response to laser- and needle-made channels. *Circulation.* 1996; 93, 143-152.

143. Ilich-Stoianovich O, Nasonov E, Balabanova R: Effects of low-intensity infrared impulse laser therapy on inflammation activity markers in patients with rheumatoid arthritis. *Ter Arkh.* 2000; 72: 32-34.
144. De Scheerder I, Wang K, Nikolaychik V, Kaul i wsp.: Long-term follow-up after coronary stenting and intravascular red laser therapy. *Am J Cardiol.* 2000; 86: 927-930.
145. Kaul U, Singh B, Sudan D, Ghose T, Kipshidze N: Intravascular red light therapy after coronary stenting – angiographic and clinical follow-up study in humans. *J Invas Cardiol.* 1998; 10: 534-538.
146. Derkacz A, Protasiewicz M, Poręba R, Szuba A, Andrzejak R: Usefulness of intravascular low-power laser illumination in preventing restenosis after percutaneous coronary intervention. *Am J Cardiol.* 2010; 106: 1113-1117.
147. Derkacz A, Protasiewicz M, Poręba R, Doroszko A, Andrzejak R: Effect of the intravascular low energy laser illumination during percutaneous coronary intervention on the inflammatory process in vascular wall. *Lasers Med Sci.* 2013; 28: 763-768.
148. Derkacz A: Śródnaczyniowe naświetlanie tętnic niskoenergetycznym promieniowaniem laserowym jako nowa metoda prewencji nawrotu zwężenia po zabiegu angioplastyki wieńcowej. *Akademia Medyczna we Wrocławiu 2007; [Rozprawa Habilitacyjna].*
149. Mester E, Mester AF, Mester A: The biomedical effects of laser application. *Lasers Surg Med.* 1985; 5: 31-39.
150. Conlan MJ, Rapley JW, Cobb CM: Biostimulation of wound healing by low-energy laser irradiation. *J Clin Periodontol.* 1996; 23(5): 492-496.
151. Gonçalves RV, Novaes RD, Matta SL, Benevides GP i wsp.: Comparative study of the effects of gallium-aluminum-arsenide laser photobiomodulation and healing oil on skin wounds in wistar rats: a histomorphometric study. *Photomed Laser Surg.* 2010; 28(5): 597-602.
152. Basso FG, Oliveira CF, Kurachi C, Hebling J, Costa CA: Biostimulatory effect of low-level laser therapy on keratinocytes in vitro. *Lasers Med Sci.* 2013; 28(2): 367-74.
153. Damante CA, De Micheli G, Miyagi SP, Feist IS, Marques MM: Effect of laser phototherapy on the release of fibroblast growth factors by human gingival fibroblasts. *Lasers Med Sci.* 2009; 24(6): 885-891.

154. Moore P, Ridgway TD, Higbee RG, Howard EW, Lucroy MD: Effect of wavelength on low-intensity laser irradiation-stimulated cell proliferation in vitro. *Lasers Surg Med.* 2005; 36(1): 8-12.
155. Schindl A, Merwald H, Schindl L, Kaun C, Wojta J: Direct stimulatory effect of low-intensity 670 nm laser irradiation on human endothelial cell proliferation. *Br J Dermatol.* 2003; 148(2): 334-336.
156. Plass CA, Wieselthaler GM, Podesser BK, Prusa AM: Low-level-laser irradiation induces photorelaxation in coronary arteries and overcomes vasospasm of internal thoracic arteries. *Lasers Surg Med.* 2012; 44(9): 705-711.
157. Chen CH, Hung HS, Hsu SH: Low-Energy Laser irradiation increases endothelial cell proliferation, migration, and eNOS gene expression possibly via PI3K signal pathway. *Lasers Surg Med.* 2008; 40: 46-54.
158. 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.
159. Houreld NN, Sekhejane PR, 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.
160. Beckmann KH, Meyer-Hamme G, Schröder S: Low level laser therapy for the treatment of diabetic foot ulcers: a critical survey. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2014: doi:10.1155/2014/626127.
161. Lohr NL , Keszler A , Pratt P, Bienengraber M i wsp.: Enhancement of nitric oxide release from nitrosyl hemoglobin and nitrosyl myoglobin by red/near infrared radiation: Potential role in cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol.* 2009; 47: 256-263.
162. <http://www.rndsystems.com/Products/DVE00>
163. <http://www.rndsystems.com/Products/HSFB00D>
164. <http://www.raybiotech.com/human-angiostatin-elisa-kit-serum-plasma-cell-culture-supernatant-and-urine.html>
165. http://www.oxisresearch.com/product_details_new.html?ProductSelector=21040
166. <http://www.rndsystems.com/Products/KGE003>

167. Teerlink T, Nijvelt J, Jong S, Leeuwen PA: Determination of arginine, asymmetric dimethylarginine and symmetric dimethylarginine in human plasma and other biological samples by high – performance liquid chromatography. *Annal Biochem.* 2002; 303: 131-137.
168. Valtonen P, Karppi J, Nyyssönen K, Valkonen VP: Comparison of HPLC method and commercial ELISA assay for asymmetric dimethylarginine (ADMA) determination in human serum. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2005; 828: 97-102.
169. Teerling T: HPLC analysis of ADMA and other methylated L-arginine analogs in biological fluids; *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007; 851: 21-29.
170. http://www.rochemultiplate.com/content/dam/internet/corporate/diagnostics/multiplate/en_GB/documents/Product%20brochure%20-%20Multiplate%20analyzer%20-%20Powerful%20analysis%20of%20platelet%20function.pdf.
171. Fillipin LI, Mauriz JL, Vedovelli K, Moreira AJ i wsp.: Low-level laser therapy (LLLT) prevents oxidative stress and reduces fibrosis in rat traumatized Achilles tendon. *Lasers Surg Med.* 2005; 37(4): 293-300.
172. Firat ET, 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.
173. Silveira PC, da Silva LA, Pinho CA, De Souza PS i wsp.: Effects of low-level laser therapy (GaAs) in an animal model of muscular damage induced by trauma. *Lasers Med Sci* 2013; 28(2): 431-426.
174. de Lima FM, Albertini R, Dantas Y, Maia-Filho AL i wsp.: Low-level laser therapy restores the oxidative stress balance in acute lung injury induced by gut ischemia and reperfusion. *Photochem Photobiol.* 2013; 89(1): 179-188.
175. De Marchi T, Leal JE, Bortoli C, Tomazoni SS i wsp.: Low-level laser therapy (LLLT) in human progressive-intensity running: effects on exercise performance, skeletal muscle status, and oxidative stress. *Lasers Med Sci.* 2012; 27(1): 231-236.
176. Huang YY, Nagata K, Tedford CE, McCarthy T, Hamblin MR: Low-level laser therapy (LLLT) reduces oxidative stress in primary cortical neurons in vitro. *J Biophotonics.* 2013; 6(10): 829–838.

177. Da Fonseca AS, Presta GA, Gelle M, de Paoli F, Valenca SS: Low-intensity infrared laser increases plasma proteins and induces oxidative stress in vitro. *Laser Med. Sci.* 2012; 27: 211-217.
178. Mohanty SK, Sharma M, Gupta PK: Generation of ROS in cells on exposure to CW and pulsed near-infrared laser tweezers. *Photochem Photobiol Sci.* 2006; 5(1): 134-139.
179. Stein A, Benayahu D, Maltz L, Oron U: Low level level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. *Photomed Laser Surg.* 2005; 23(2): 161-166.
180. Ben-Dov N, Shefer G, Irintchev A, Wernig A i wsp.: Low-energy laser irradiation affects satellite cell proliferation and differentiation in vitro. *Biochim Biophys Acta.* 1999; 1448(3): 372-380.
181. Derkacz A, Protasiewicz M, Rola P, Podgorska K i wsp.: Effects of intravascular low-level laser therapy during coronary intervention on selected growth factors levels. *Photomed Laser Surg.* 2014; 32(10): 582-587.
182. Saygun I, Nizam N, Ural AU, Serdar MA, 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.
183. Yu W, Naim JO, Lanzafame RJ: The effect of laser irradiation on the release of bFGF from 3T3 fibroblasts. *Photochem Photobiol.* 1994; 59(2): 167-170.
184. Martignago CC, Oliveira RF, Pires-Oliveira DA, Oliveira PD i wsp.: Effect of low-level laser therapy on the gene expression of collagen and vascular endothelial growth factor in a culture of fibroblast cells in mice. *Lasers Med Sci.* 2014. doi:10.1007/s10103-014-1644-y.
185. Bibikova A, Belkin V, Oron U: Enhancement of angiogenesis in regenerating gastrocnemius muscle of the toad (*Bufo viridis*) by low-energy laser irradiation. *Anat Embryol (Berl).* 1994; 190(6): 597-602.
186. Mirsky N, Krispel Y, Shoshany Y, Maltz L, Oron U: Promotion of angiogenesis by low energy laser irradiation. *Antioxid Redox Signal.* 2002; 4(5): 785-790.

187. Zaidi M, Krolikowki JG, Jones DW, Pritchard KA Jr i wsp.: Transient repetitive exposure to low level light therapy enhances collateral blood vessel growth in the ischemic hindlimb of the tight skin mouse. *Photochem Photobiol* 2013; 89(3): 709-713.
188. Li TS, Kaneda Y, Ueda K, Hamano K i wsp.: The influence of tumour resection on angiostatin levels and tumour growth-an experimental study in tumour-bearing mice. *Europ J Cancer*. 2001; 37: 2283–2288.
189. Osipov AN, Borisenko GG, Vladimirov YA: Biological activity of hemoprotein nitrosyl complexes. *Biochemistry (Mosc)*. 2007; 72(13): 1491-1504.
190. Mellion BT, Ignarro LJ, Ohlstein EH, Pontecorvo EG: Evidence for the inhibitory role of guanosine 3', 5'-monophosphate in ADP-induced human platelet aggregation in the presence of nitric oxide and related vasodilators. *Blood*. 1981; 57(5), 946-955.
191. Park JW, Pikhova B, Nghiem K, Lozier JN, Schechter AN: Inhibitory effect of nitrite on coagulation processes demonstrated by thrombelastography. *Nitric Oxide*. 2014; 40: 45-51.
192. Brill AG, Shenkman B, Brill GE, 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(2): 87-93.
193. Brill GE, Budnik IA, Gasparian LV, Shenkman B i wsp.: Influence of laser irradiation of the whole blood in vitro on adhesion and aggregation of blood platelets. *Vopr Kurortol Fizioter Lech Fiz Kult*. 2008; (1): 15-18..
194. Burduli NM, Gutnova SK: The influence of low-intensive laser therapy on the aggregation properties of thrombocytes in patients with peptic ulcer. *Klin Med (Mosk)*. 2006; 84(2): 61-64.
195. Gresner P, Watała C, Sikurová L: The effect of green laser light irradiation on whole blood platelets. *J Photochem Photobiol B*. 2005; 79(1): 43-50.

10. ZAŁĄCZNIK

OPINIA KOMISJI BIOETYCZNEJ

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

KB/nr 8/2014

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 złożyła **Alicja Szymczyszyn** w sprawie badania: **Wpływ stosowanego przezskórnie niskoenergetycznego promieniowania laserowego na funkcje śródbłonna naczyniowego oraz agregację płytek krwi.**

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