

## WPŁYW PROMIENIOWANIA LASEROWEGO NISKIEJ MOCY NA STĘŻENIE ATP W ERYTROCYTACH – BADANIA *IN VITRO*

### THE INFLUENCE OF LOW-POWER LASER ENERGY ON ATP CONCENTRATION IN ERYTHROCYTES - *IN VITRO* STUDY

Edyta Mikołajczyk, Krzysztof Spodaryk

Zakład Kinezyterapii, Katedra Fizjoterapii, AWF Kraków

#### Streszczenie

Lasery tzw. biostymulacyjne wykorzystywane są do zabiegów fizykoterapeutycznych. Celem badań jest analiza wpływu promieniowania laserowego niskiej mocy na stężenie ATP w krwinkach czerwonych.

*Słowa kluczowe: laser niskiej mocy, ATP, erytrocyty, low-power laser energy, ATP, erythrocytes*

#### Abstract

The biostimulation lasers are commonly used in physical therapy practice. The aim of the study was to analyze the influence of low power laser energy on ATP concentration in red blood cells.

*Key words: laser niskiej mocy, ATP, erytrocyty, low-power laser energy, ATP, erythrocytes*

#### Wstęp

W rehabilitacji do zabiegów fizykoterapeutycznych wykorzystuje się promieniowanie laserowe małej mocy (LLLT – low level laser therapy), którego maksymalna moc impulsu promieniowania nie przekracza 500 mW. Lasery małej i średniej mocy zalicza się do grupy tzw. laserówiskoenergetycznych – biostymulacyjnych. Poprzez biostymulację laserową rozumie się pobudzenie różnorodnych struktur, a tym samym i funkcji tkanek, bez wzrostu ich temperatury miejscowej powyżej 1°C. Przyjmuje się, że do procesów biostymulacyjnych najlepsze są lasery, które emitują światło o długości fal od 550 nm do 950 nm, ponieważ takie promieniowanie mieści się w zakresie tzw. „okienka optycznego”, czyli obszaru prawie 100% transmisji światła laserowego przez tkanki (1,2). W fizykoterapii stosowane są lasery, które emitują światło o długości fali od 632,8 do 1500 nm, najczęściej 830 nm i 904 nm. Największą łatwość przenikania ma fala długości 632,8 nm, ale największą penetracją w głąb tkanek charakteryzuje się promieniowanie o długości fali 830 nm (3). Powyższe stwierdzenia mają jedynie podłoże empiryczne, ponieważ w literaturze brak przekonujących, dobrze metodologicznie przeprowadzonych badań w ramach nauk podstawowych, które by w sposób jednoznaczny i jasny opisywały wpływ promieniowania laserowego na poszczególne typy tkanek. Właśnie ze względu na brak modelu

charakteryzującego mechanizmy odpowiedzialne za wywołanie efektu biostymulacyjnego i jednocześnie pozytywne wyniki terapeutyczne, metoda laseroterapii budzi zarówno wiele nadziei jak i kontrowersji.

#### Materiał i metody

Krew do badań otrzymywano od honorowych dawców krwi z Wojewódzkiej Stacji Krwiodawstwa w Krakowie. Do eksperymentu użyta została krew mężczyzn w wieku 20-40 lat. Przed pobraniem materiału zostali poddani badaniom ogólnolekarskim. Nie stwierdzono żadnych chorób przewlekłych, zakaźnych oraz ostrych i przewlekłych stanów zapalnych.

Po 5 minutowym odpoczynku w pozycji siedzącej od ochotnika pobierano krew w ilości 16 ml z żyły w przedniej okolicy stawu łokciowego do heparynowanych probówek typu *vacuum*, z czego 12 ml krwi używano do eksperymentu *in vitro*, a 4 ml do laboratoryjnych badań diagnostycznych, tj. celem oznaczenia podstawowych parametrów hematologicznych (Hb, Ht, MCV, MCHC, WB, PT, RWD) i biochemicznych (stężenie białka całkowitego, fibrynogenu, trójglicerydów, cholesterolu). Krew dawców, których wymienione parametry mieściły się w granicach normy laboratoryjnej, była wykorzystywana do niniejszych badań.

W eksperymencie użyto 24 próbki od 24 dawców krwi. Każdą próbkę krwi przeznaczoną do badań *in*

*vitro*, tj. 12 ml krwi, dzielono na 6 części po 2 ml. Powstało sześć grup eksperymentalnych, które poddano następującym procedurom:

- krew nie poddana naświetlaniu promieniowaniem laserowym, analizowana zaraz po pobraniu (próbka kontrolna) - **Grupa K0**
- krew naświetlana promieniowaniem laserowym przez 7 minut - **Grupa E7**
- krew naświetlana promieniowaniem laserowym przez 15 minut - **Grupa E15**
- krew naświetlana promieniowaniem laserowym przez 30 minut - **Grupa E30**
- krew naświetlana promieniowaniem laserowym przez 60 minut - **Grupa E60**
- krew nie poddana naświetlaniu promieniowaniem laserowym, analizowana po godzinnej inkubacji w temperaturze 37°C - **Grupa K60**.

Próbki krwi grup E7, E15, E30, E60 były naświetlane promieniowaniem laserowym generowanym przez aparat CTL 1106 M (długość fali 830 nm) odpowiednio przez 7, 15, 30, 60 minut. Próbki krwi K0 oraz K60 nie były napromieniowywane. Próbki z grupy K0 były używane jako kontrola przed eksperymentem, natomiast z grupy K60 jako kontrola po eksperymencie.

Próbki krwi z grupy E7, E15, E30 i E60 były umieszczane w probówkach plastikowych o objętości 5 ml i średnicy 1 cm, które wkładano do łaźni wodnej o temperaturze 37°C w pozycji pionowej. Końcówkę generatora promieniowania laserowego umieszczano nad probówką w odległości 2 cm od poziomu lustra krwi, a średnica wiązki promieniowania laserowego wynosiła 0,8 cm. Przez cały czas prowadzenia eksperymentu próbki krwi były perfundowane mieszaniną gazów (5% CO<sub>2</sub>, powietrze). Celem perfundowania krwi było zapewnienie natlenowania próbki w czasie trwania inkubacji oraz mieszania, aby wszystkie elementy morfotyczne krwi były równomiernie napromieniowywane.

Grupa E7 otrzymywała dawkę promieniowania 6,72 J/cm<sup>2</sup>, grupa E15 14,4 J/cm<sup>2</sup>, grupa E30 28,8 J/cm<sup>2</sup> a grupa E60 57,6 J/cm<sup>2</sup>.

Próbka krwi z grupy K60 nie była napromieniowywana, ale przez okres 60 minut była przechowywana w łaźni wodnej o temperaturze 37°C i perfundowana karbogenem, tak jak pozostałe próbki, w tym próbka z grupy E60.

Stężenie ATP oznaczano w erytrocytach otrzymywanych po trzykrotnym przepłukaniu próbek krwi schłodzoną solą fizjologiczną i usunięciu krwinek białych (aspiracja tzw. buffy coat). Stężenie ATP określano ilościowo spektrofotometrycznie za pomocą zestawu odczynników firmy Sigma.

### Statystyczna analiza danych

Wpływ czasu naświetlania na stężenie ATP był analizowany przy zastosowaniu jednoczynnikowej

analizy wariancji (ANOVA). Dla uzyskania informacji o występujących różnicach pomiędzy poszczególnymi grupami czasowymi zastosowano wieloczynnikową analizę wariancji (MANOVA).

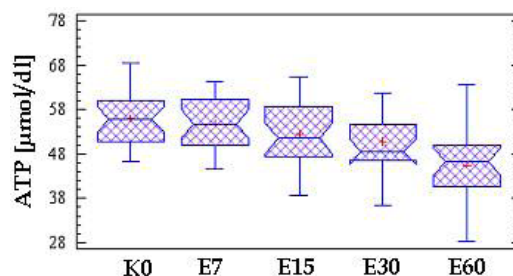
### Wyniki

W niniejszych badaniach stwierdzono statystycznie istotne różnice ATP w zależności od czasu naświetlania (a tym samym dawki promieniowania),  $p < 0.001$  (Tab. 1).

Tabela 1. Wynik analizy wariancji dla ATP

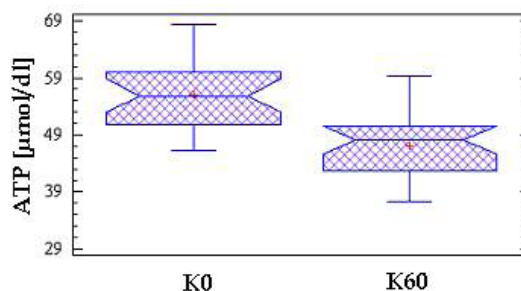
| Zmienność       | Suma kwadratów | Df  | Średnia kwadratów | Czynnik F | Poziom istotności P |
|-----------------|----------------|-----|-------------------|-----------|---------------------|
| Międzygrupowa   | 1600.1         | 4   | 400.024           | 7.88      | <0.001              |
| Wewnątrzgrupowa | 5834.26        | 115 | 50.7327           |           |                     |

Porównanie między sobą wartości uzyskanych w grupach naświetlanych i grupie kontrolnej (grupa K0) wykazało statystycznie istotny spadek wartości stężenia ATP ( $p < 0.05$ ) pomiędzy grupami K0 i E60, E7 i E60 oraz E15 i E60. Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic pomiędzy pozostałymi grupami ( $p > 0.05$ ), Ryc. 1.



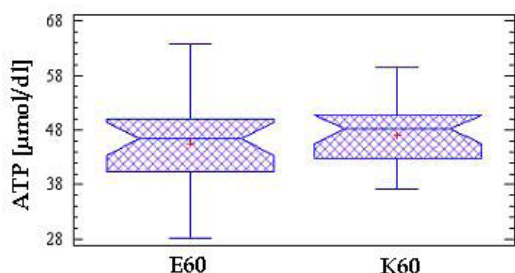
Ryc. 1. Stężenie ATP w erytrocytach poszczególnych grup eksperymentalnych (mediana  $\pm$  SD), \* $p < 0.05$  K0 vs E60, E7 vs E60, E15 vs E60

Dodatkowo obliczono różnice pomiędzy grupą K0 a grupą K60. Analiza wykazała statystycznie znaczący ( $p < 0.001$ ) spadek stężenia ATP w krwinkach czerwonych obserwowany po godzinnej inkubacji tych komórek. (Ryc. 2)



Ryc. 2. Stężenie ATP w erytrocytach grup kontrolnych K0 i K60 (mediana  $\pm$  SD), \* $p < 0.001$

Nie wykazano natomiast statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupami E60 i K60 ( $p > 0.05$ ) (Ryc.3)



Ryc. 3. Stężenie ATP w erytrocytach grupy E60 i K60 (mediana  $\pm$  SD),  $p > 0.05$

## Dyskusja

W badaniach własnych zaobserwowano, że po godzinnej ekspozycji krwi na promieniowanie laserowe o długości fali 830 nm o łącznej dawce 57,6 J/cm<sup>2</sup> nastąpił statystycznie istotny spadek stężenia ATP w krwinkach czerwonych. Podobne obniżenie stężenia ATP obserwowano także w próbce kontrolnej, inkubowanej przez godzinę w identycznych warunkach, jak krew naświetlana promieniowaniem laserowym. Podobne wyniki zmian stężenia ATP w krwinkach czerwonych obserwowali Itoh i wsp. (4) po ekspozycji krwi na działanie promieniowania laserowego o długości fali 632,8 nm i dawkach 4,25 mW, 8,5 i 17,0 mW przez 60, 120 i 240 min, jednakże zmiany te nie były tak nasilone, jak w obecnym eksperymencie. Badacze ci zaobserwowali spowolnienie procesu utraty tego wysokoenergetycznego związku w napromieniowywanych erytrocytach. Niestety Itoh i wsp. nie wytłumaczyli przyczyny obserwowanych zmian. Być może, że ATP jako związek bezpośrednio dostarczający energię w różnych procesach komórkowych, może być oszczędzony przez dostarczanie energii z zewnątrz.

Powyższa różnica w rezultatach własnych z wynikami badań Itoh i wsp. (4) wynikać może ze stosowania innych długości fal promieniowania laserowego. Wiadomo jest bowiem, że istnieje specyficzny zakres długości fal promieniowania laserowego, tj. 550-950 nm, który pokrywa się z widmem absorpcji hemoglobiny (5). Powyższa długość fali monochromatycznej nazywana jest „naświetlaniem okna hemoglobinowego”. Dlatego można wyraźnie podkreślić, że zmiany w metabolizmie krwinek czerwonych zachodzą pod wpływem naświetlania konkretną długością fali lasera.

Wyniki przeprowadzonego w niniejszej pracy eksperymentu są podobne do tych otrzymanych przez Spodaryka (6), który napromieniowywał zawiesinę krwinek czerwonych laserem o długości fali 830 nm i dawką 5, 15 i 30 mW/cm<sup>2</sup> przez 5, 15 i 30 min. Stwierdzono, że stężenie ATP podobnie jak w grupie kontrolnej systematycznie się obniża.

Powyżej wymienione dwie publikacje są jedynymi, w których omawiane są wyniki badań wpływu napromieniowywania erytrocytów światłem laserowym. W tym miejscu należy wspomnieć o pracach opisujących zmiany w aktywności enzymów funkcjonujących w błonie erytrocyta i wpływających na działanie pompy sodowo-potasowej. Kilańczyk i wsp. (7) badali wpływ promieniowania laserowego o długości fali 670 nm na aktywność Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPazy błony erytrocytarnej. Stwierdzono, że dawki 19,1, 38,2, 57,3, 76,4 i 95,5 J/cm<sup>2</sup> powodują wzrost aktywności pompy sodowo-potasowej, który może wynikać ze zwiększenia stężenia wewnątrzkomórkowego Na<sup>+</sup> na skutek wzrostu napływu Na<sup>+</sup>, wzrostu powinowactwa Na<sup>+</sup> lub przemieszczania podjednostek enzymu w błonie komórkowej. Podobne badania, ale z zastosowaniem promieniowania laserowego o długości fali 810 nm przeprowadziła Kujawa i wsp. (8), stwierdzając, że taka ekspozycja krwinek czerwonych doprowadza do wzrostu aktywności Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPazy i Mg<sup>2+</sup>-ATPazy, oraz że dochodzi do zmian aktywności pompy sodowo-potasowej. Powyżej cytowane prace dotyczą więc oddziaływania promieniowania laserowego na niektóre zjawiska cytofizjologiczne.

Również uboga jest literatura dotycząca badań nad wpływem promieniowania laserowego na krwinki jądrzaste i generujące ATP w szlaku pentozowym. Karu i wsp. (9) napromieniowywali *in vitro* linie komórek HeLa światłem lasera o długości fali 632,8 nm, Kato i wsp. (10) promieniowaniem o długości fali 415 nm, Vekshin i wsp. o długości 602 nm (11), Passarella i wsp. (12) o długości fali 633 nm, Gordon i Surrey (13) o długości fali 650 nm i 725 nm, a więc w zakresie światła widzialnego. Badania wyżej wymienionych autorów wykazały, że mitochondria są „wrażliwe” na działanie monochromatycznego promieniowania laserowego o powyższych długościach fal. Wykazano, że w wyizolowanych mitochondriach wątroby szczura wzrasta synteza ATP i zużycie tlenu. Stwierdzono, że promieniowanie o długości fal wcześniej wymienionych wzmacnia syntezę ATP. Z drugiej strony Kato i wsp. (10) wykazali, że światło laserowe o długości fali 477, 511 i 554 nm nie wpływa na szybkość procesów zachodzących w mitochondriach. Vekshin i wsp. (11) rok później potwierdzili obserwacje Kato i wsp. (10) stwierdzając, że zużycie tlenu jest przyspieszone przez napromieniowywanie komórek światłem monochromatycznym o długości fali 365 i 436 nm, ale nie obserwuje się tego samego procesu podczas stosowania długości fal 313, 546 i 577 nm. Passarella i wsp. (14, 15) wykazali, że promieniowanie o długości fali 633 nm powoduje wzrost potencjału błony mitochondrialnej i gradientu protonów i wzrost szybkości zamiany ADP w ATP. Natomiast Bortoletto i wsp. (17) stwierdzili zmiany w błonach mitochondrialnych po napromieniowywaniu komórek laserem o długości

fali 635 nm. Zmiany te wyrażały się tym, iż w naświetlanych komórkach zaobserwowano mitochondria o niskim potencjale błony, a także zmieniony kształt mitochondriów, które przybierały kształt ziarnisty. Tak więc we wszystkich wyżej cytowanych eksperymentach mniej uwagi poświęcono zużyciu tlenu i stężenia ATP w cytozolu, a przede wszystkim skupiano się na strukturze wyizolowanych mitochondriów.

Herbert i wsp. (18) poddali działaniu promieniowania laserowego o długości fali 820 nm ludzkie limfocyty krwi obwodowej i stwierdzili wzrost stężenia ATP w tych komórkach. Inne wyniki otrzymał Bolognani i wsp. (19) po napromieniowywaniu embrionalnych komórek ludzkich laserem o długości fali 632 nm, przez 5, 15 i 30 min przy gęstości energii 0,64 mW/cm<sup>2</sup>. Stwierdzono, że poziom ATP nie zmienia się po naświetlaniu laserem nawet przez 30 min.

Pomimo niepełnej wiedzy dotyczącej biofizycznych i biochemicznych zjawisk zachodzących w komórkach i tkankach pod wpływem promieniowania laserowego o różnej długości fali i energii, ten bodziec fizyczny jest bardzo często wykorzystywany do leczenia ran, zwalczania bólu czy zmniejszania objawów stanu zapalnego. Wydaje się więc ze wszechmiar konieczne zintensyfikowanie badań w obszarze cytobiochemii i cytofizjologii w odniesieniu do zjawisk adaptacyjnych w odpowiedzi na promieniowanie laserowe stosowane w rehabilitacji medycznej.

## Wniosek

Godzinne napromieniowywanie krwinek czerwonych promieniowaniem laserowym o łącznej dawce 57,6 J/cm<sup>2</sup> powoduje podobne pod względem wartości obniżenie ATP w erytrocytach jak ich jednogodzinna inkubacja.

## Piśmiennictwo

1. Mika T. Kilka uwag na temat niskoenergetycznej terapii laserowej. *Balneol Pol* 1995; 37(3): 59-62.
2. Talar J, Radziszewski K, Bryndza E. Biostymulacja laserowa. *Wiad Lek* 1993; 46(17/18): 683-6.
3. Taradaj J. Elektroterapia XXI wieku. Katowice: OPM, 2000: 58-9.
4. Itoh T, Murakami H, Orihashi K. i wsp. The protective effect of low power He-Ne laser against erythrocytic damage caused by artificial heart-lung machines. *Hiroshima J Med Sci* 1996; 45: 15-22.
5. Galletti G, Bolognani I, Ussia G. Laser applications in Medicine. W: Proceedings of the 3<sup>rd</sup> World Congress-International Society for Laser Applications in Medicine. Bologna: Monduzzi Editore, 1992; s. 25-32, 161-6, 283-8.

6. Spodaryk K. The influence of low-power laser energy on red blood cell metabolism and deformability. *Clin Hemorheol Microcirc* 2001; 25: 145-51.
7. Kilańczyk E, Palecz D, Bryszewska M. Effect of red laser light on Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in human erythrocyte membranes sensitized with Zn-phthalocyanine. *J Clin Laser Med Surg* 2002; 20(2): 71-5.
8. Kujawa J, Zawodnik L, Zawodnik I. i wsp. Effect of low-intensity (3.75-25 J/cm<sup>2</sup>) near-infrared (810 nm) laser radiation on red blood cell ATPase activities and membrane structure. *J Clin Laser Med Surg* 2004; 22(2): 111-7.
9. 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: 219-23.
10. Kato M, Shinzawa K, Yoshikawa S. Cytochrome oxidase is a possible photoreceptor in mitochondria. *Photochem Photobiophys* 1981; 2: 263-9.
11. Vekshin NL, Mironov GP. Flavin-dependent oxygen uptake in mitochondria under illumination. *Biofizika* 1982; 27: 537-9.
12. Passarella S, Casamassima E, Molinari S. i wsp. Increase of proton electrochemical potential and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated in vitro by helium-neon laser. *Fed Eur Biochem Soc* 1984; 175: 95-9.
13. Gordon SA, Surrey K. Red and far-red light action on oxidative phosphorylation. *Radiat Res* 1960; 12: 325-39.
14. Passarella S, Perlino E, Quagliarriello E. i wsp. Evidence of changes induced by He-Ne laser irradiation in the biochemical properties of rat liver mitochondria. *Bioelectrochem Bioenerg* 1983; 10: 185-98.
15. Passarella S, Ostuni A, Atlante A. Increase in the ADP/ATP Exchange in rate liver mitochondria irradiated in vitro by He-Ne laser. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 156: 978-86.
16. Karu T, Andreichuk T, Ryabykh T. Suppression of human blood chemiluminescence by diode laser radiation at wavelength 660, 820, 880, and 950 nm. *Laser Therapy* 1993; 5: 103-9.
17. Bortoletto R, Silva NS, Zangaro RA. i wsp. Mitochondrial membrane potential after low-power laser irradiation. *Lasers in Medical Science* 2004; 18: 204-6.
18. Herbert KE, Bhusate LL, Scott DL i wsp. Effect of laser light at 820 nm on adenosine nucleotide levels in human lymphocytes. *Lasers Life Sci* 1989; 3: 37-46.
19. Bolognani L, Bolognani Fantin AM. i wsp. Effects of low-power 632 nm radiation (HeNe laser) on human cell line: influence on adenyl nucleotides and cytoskeletal structures. *J Photochem Photobiol B* 1994; 26: 257-64.

Otrzymano: 27 listopad 2006

Zaakceptowano: 21 grudzień 2006

Adres do korespondencji:

Edyta Mikołajczyk

Zakład Kinezyterapii, Katedra Fizjoterapii

AWF Kraków,

31-571 Kraków

al. Jana Pawła II 78

tel. 683-11-67

ejmikolajczyk@poczta.onet.pl