

**Akademia Wychowania Fizycznego im. Bronisława Czecha w Krakowie**  
**Wydział Rehabilitacji Ruchowej**

ROZPRAWA DOKTORSKA

mgr Amelia Lizak



**Wpływ niskoenergetycznego promieniowania laserowego oraz wybranych witamin  
na proces gojenia skóry – badania *in vitro* na modelu ludzkich fibroblastów**

Promotor:

dr hab. Anna Ścisłowska-Czarnecka, prof. AWF

Promotor pomocniczy:

dr Katarzyna Chojak-Fijałka

*Pragnę wyrazić moją wdzięczność  
Pani Promotor dr hab. Annie Ścisłowskiej-Czarneckiej, prof. AWF  
za nieocenioną pomoc w trakcie przygotowywania niniejszej pracy doktorskiej.*

*Dziękuję za inspirację do badań, przekazaną mi wiedzę, poświęcony czas.  
Dziękuję za wyrozumiałość, uśmiech, dobre słowo i przyjazną dłoń.*

*Podziękować pragnę również Rodzicom,  
którzy stale mnie wspierali, motywowali, wierzyli we mnie i zawsze mogłam na Was liczyć.*

*Niniejszą pracę dedykuję mojej największej miłości Aurelii, która zaledwie kilka dni temu przyszła  
na świat i w jednej chwili odmieniła moje życie.*

*Córeczko niech każda chwila Twojego życia, będzie tak wspaniała jak Ty. Powodzenia we  
wszystkim, co zaplanujesz. Niech nikt i nic nie zdoła Cię powstrzymać od spełniania marzeń.*

## Wykaz skrótów

AD (ang. *assay diluent*) rozcieńczalnik testowy

ADP (ang. *adenosine diphosphate*) adenzynodwufosforan

AK (ang. *adenylate kinase*) kinaza adenylowa

AMP (ang. *adenosin monophosphate*) adenzynomonofosforan

ATP (ang. *adenosine triphosphate*) adenzynotrójfosforan

BAS (ang. *bicinchoninic acid solution*) roztwór kwasu bicynchoninowego

BCA (ang. *bicinchoninic acid*) kwas bicynchoninowym

CAT (ang. *catalase*) katalaza

CS (II) (ang. *copper sulfate II*) siarczan miedzi II

DSC (ang. *differentia scanning calorimetry*) skaningowa kolorymetria różnicowa

ECM (ang. *extracellular matrix*) macierz zewnątrzkomórkowa

EGF (ang. *epidermal growth factor*) nabłonkowy czynnik wzrostu

FBS (ang. *fetal bovine serum*) surowica płodowa cielęca

FDA (ang. *Food and Drug Administration*) Agencja Żywności i Leków

FGFs (ang. *fibroblast growth factors*) czynniki wzrostu fibroblastów

FITC (ang. *fluorescein isothiocyanate*) izotiocyjanian fluoresceiny

FTIR (ang. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera

GP (ang. *glutathione peroxidase*) peroksydaza glutationowa

GST (ang. *glutathion s-transferase*) transferaza glutationowa

GTR (ang. *guided tissue regeneration*) sterowana regeneracja tkanki

ICAM-1 (ang. *intercellular adhesion molecule*) cząsteczka adhezji międzykomórkowej

IFN (ang. *interferon*) interferon

IL (ang. *interleukin*) interleukina

LLLT (ang. *low-level laser therapy*) laseroterapia niskiego poziomu

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

MMP (ang. *matrix metalloproteinases*) metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej

NBT (ang. *p-nitro blue tetrazolium*) błękit nitrotetrazoliowy

NO (ang. *nitric oxide*) tlenek azotu

PBM (ang. *photobiomodulation*) fotobiomodulacja

PDGF (ang. *platelet-derived growth factor*) płytkopochodny czynnik wzrostu

PE (ang. *phycoerythrin*) fikoerytryna

PerCp (ang. *peridininio-chlorofil*) chlorofil perydynowy

ROS (ang. *reactive oxygen nspecies*) reaktywne formy tlenu

SDS (ang. *sodium dodecyle sulfate*) siarczan dodecyłu sodu

SE (ang. *standard error*) błąd standardowy

SOD (ang. *super oxide dismutase*) dysmutaza ponadtlenkowa

TAS/TAC (ang. *total antioxidative status/total antioxidative capacity*) całkowity status antyoksydacyjny

TG (ang. *thermogravimetric*) termograwimetria

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

TMB (ang. *tetramethylbenzidine*) tetrametylobenzydina

TNF (ang. *tumor necrosis factor*) czynnik martwicy nowotworu

TOS/TOC (ang. *total oxidative status/total oxidative capacity*) całkowity status oksydacyjny

Trx (ang. *thio-redoxin*) tioredoksyna

## Spis treści

|  |    |
|--|----|
| 1. Wstęp .....   | 7  |
| 1.1. Budowa skóry .....  | 7  |
| 1.2. Gojenie ran .....   | 9  |
| 1.3. Wpływ witamin E i K na proces gojenia skóry .....   | 15 |
| 1.4. Lasery .....  | 18 |
| 1.4.1. Wiadomości ogólne .....   | 18 |
| 1.4.2. Niskoenergetyczne promieniowanie laserowe (LLLT) .....  | 19 |
| 1.4.2.1. Niskoenergetyczne promieniowanie laserowe – badania kliniczne .....   | 21 |
| 1.4.2.2. Niskoenergetyczne promieniowanie laserowe – badania komórkowe .....   | 21 |
| 2. Uzasadnienie podjęcia tematu badań .....  | 22 |
| 3. Cel badań .....   | 23 |
| 4. Materiały i metody .....  | 24 |
| 4.1. Hodowla komórkowa .....   | 24 |
| 4.2. Etapy badań .....   | 25 |
| 4.2.1. Etap I – dobór optymalnych parametrów niskoenergetycznego promieniowania laserowego LLLT .....                                    | 25 |
| 4.2.2. Etap II – badanie wpływu witamin i/lub promieniowania laserowego .....  | 26 |
| 4.2.3. Etap III – oznaczenie aktywności wydzielniczej fibroblastów .....   | 27 |
| 4.3. Charakterystyka biomateriałów .....   | 28 |
| 4.4. Sterylizacja biomateriałów .....  | 29 |
| 4.5. Badanie morfologii fibroblastów .....   | 30 |
| 4.6. Badanie przylegania komórek (test CV) .....   | 30 |
| 4.7. Badanie żywotności komórek (test ViaLight) .....  | 30 |
| 4.8. Badanie cytotoksyczności (test ToxiLight) .....   | 31 |
| 4.9. Test „gojenia rany” .....   | 31 |
| 4.10. Oznaczenie poziomu wydzielanego białka – test BCA .....  | 32 |
| 4.11. Oznaczenie poziomu wydzielanego tlenu azotu – test Griessa .....   | 32 |
| 4.12. Oznaczenia poziomu wydzielanych metaloproteinaz .....  | 32 |
| 4.13. Oznaczenie poziomu wydzielanych cytokin .....  | 34 |
| 4.14. Pomiar potencjału oksydacyjnego – test PerOx (TOS/TOC) .....   | 35 |
| 4.15. Pomiar potencjału antyoksydacyjnego – test ImAnOx (TAS/TAC) .....  | 36 |
| 5. Analiza statystyczna .....  | 37 |
| 6. Wyniki .....  | 37 |
| 6.1. Wpływ działania niskoenergetycznego promieniowania laserowego na fibroblasty .....  | 37 |
| 6.1.1. Wpływ działania niskoenergetycznego promieniowania laserowego na przyleganie, proliferację i morfologię fibroblastów .....        | 37 |
| 6.1.2. Wpływ działania niskoenergetycznego promieniowania laserowego na poziom uwalnianej przez fibroblasty kinazy adenylowej (AK) ..... | 43 |
| 6.1.3. Wpływ działania niskoenergetycznego promieniowania laserowego na poziom wydzielanego przez fibroblasty NO .....                   | 45 |
| 6.2. Wpływ działania niskoenergetycznego promieniowania laserowego na „gojenie rany” .....   | 47 |

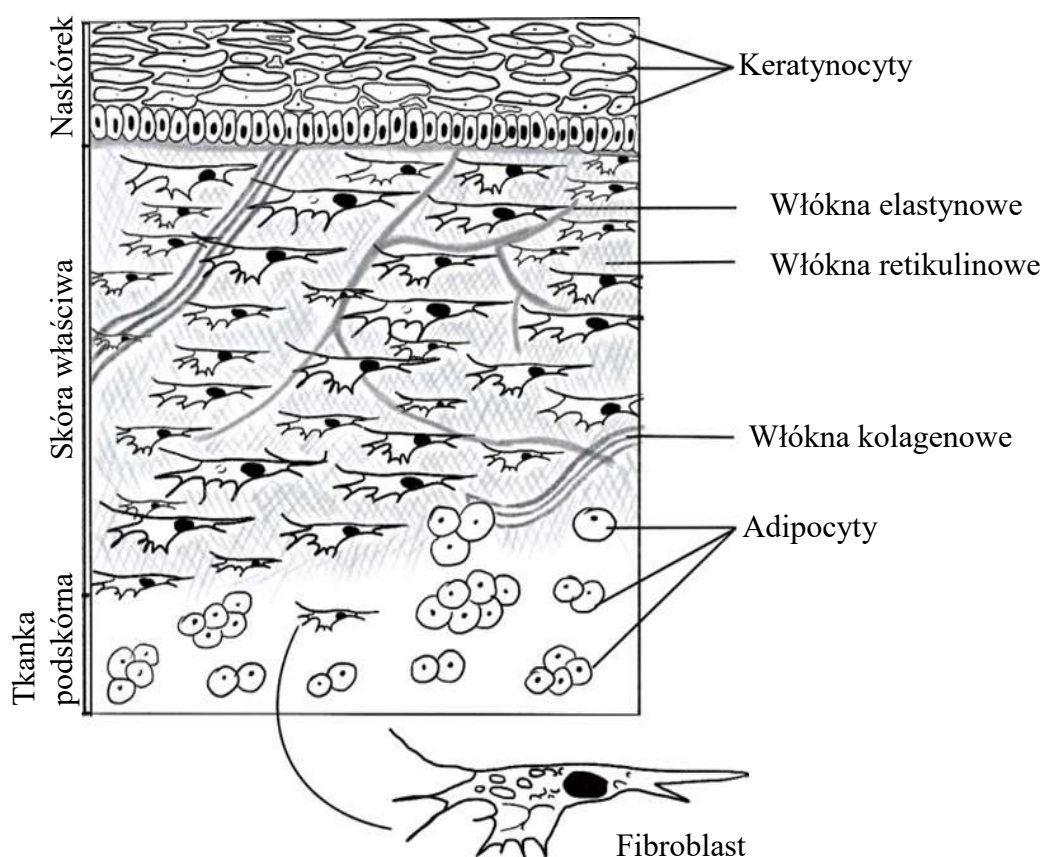
|   |     |
|---|-----|
| 6.3. Wpływ działania niskoenergetycznego promieniowania laserowego na fibroblasty hodowane na membranach pla .....  | 50  |
| 6.3.1. Żywotność oraz aktywność wydzielnicza fibroblastów nienaświetlanych .....  | 50  |
| 6.3.2. Wpływ działania niskoenergetycznego promieniowania laserowego na żywotność fibroblastów .....  | 51  |
| 6.3.3. Wpływ działania niskoenergetycznego promieniowania laserowego na poziom AK .....   | 51  |
| 6.3.4. Wpływ działania niskoenergetycznego promieniowania laserowego na poziom NO .....   | 51  |
| 6.3.5. Wpływ działania niskoenergetycznego promieniowania laserowego na poziom białka .....   | 52  |
| 6.3.6. Wpływ działania niskoenergetycznego promieniowania laserowego na poziom MMP, cytokin oraz potencjał oksydacyjno-antyoksydacyjny .....  | 52  |
| 6.4. Wpływ działania na fibroblasty witamin i/lub niskoenergetycznego promieniowania laserowego .....   | 59  |
| 6.4.1. Żywotność i aktywność wydzielnicza (poziom AK, NO, białka) fibroblastów nienaświetlanych, hodowanych na membranach pla modyfikowanych witaminami E i K .....   | 59  |
| 6.4.2. Wpływ działania niskoenergetycznego promieniowania laserowego na żywotność fibroblastów hodowanych na membranach pla modyfikowanych witaminami E i K .....   | 60  |
| 6.4.3. Wpływ działania niskoenergetycznego promieniowania laserowego na aktywność wydzielniczą (poziom AK, NO, białka) fibroblastów hodowanych na membranach pla modyfikowanych witaminami E i K .....      | 61  |
| 6.4.4. Wpływ działania witaminy K i naświetlania niskoenergetycznym promieniowaniem laserowym na aktywność wydzielniczą (poziom MMP, cytokin oraz potencjał oksydacyjno-antyoksydacyjny) fibroblastów ..... | 62  |
| 7. Dyskusja .....   | 70  |
| 8. Piśmiennictwo .....  | 86  |
| Streszczenie .....  | 103 |
| Abstrakt .....  | 104 |
| Spis rycin .....  | 105 |
| Spis tabel .....  | 107 |

## 1. Wstęp

### 1.1. Budowa skóry

W skórze istnieją mechanizmy odpowiedzialne za gojenie ran, pozwalające na odtworzenie jej prawidłowej, ciągłej struktury. Aby dokładnie zgłębić proces gojenia ran należy dobrze poznać budowę skóry i charakterystykę komórek w niej występujących.

Skóra zbudowana jest z trzech warstw: naskórka, skóry właściwej i tkanki podskórnej (Ryc. 1) (Arda i wsp., 2014).



Ryc. 1. Budowa skóry.

Naskórek jest tkanką ulegającą ciągłej odnowie, która dzięki obecności w warstwie podstawnej komórek macierzystych utrzymuje właściwości regeneracyjne przez całe życie osobnika. Najlicniejszą populację komórek naskórka (90-95 %) stanowią keratynocyty, układające się w warstwy: podstawną, kolczystą, ziarnistą oraz rogową (Solé-Boldo i i wsp., 2020). Komórki warstwy podstawnej naskórka przechodzą szereg przemian morfologicznych i biochemicznych, aby w efekcie końcowym ulec złuszczeniu w procesie keratynizacji naskórka (Murphreya i wsp., 2021). W obrębie naskórka, oprócz

keratynocytów, występują również inne rodzaje komórek jak: melanocyty, komórki Langerhansa czy też komórki Merkla (Yousef i wsp., 2020).

Skórę właściwą stanowi tkanka łączna właściwa, zawierająca komórki, włókna tkanki łącznej, istotę podstawową oraz naczynia krwionośne i zakończenia nerwowe. Wyróżnia się dwie warstwy skóry właściwej: położoną bliżej naskórka warstwę brodawkową oraz położoną głębiej warstwę siateczkowatą. Warstwa brodawkowa zbudowana jest z tkanki łącznej włóknistej luźnej, która zawiera głównie fibroblasty oraz mniej liczne miofibroblasty, fibrocyty, mastocyty, histiocyty, plazmocyty, a także włókna (kolagenowe, elastyczne, retikulinowe) i naczynia krwionośne. Fibroblasty to komórki o wrzecionowatym kształcie z długimi i cienkimi wypustkami cytoplazmatycznymi. Komórki te są odpowiedzialne za produkcję składników istoty międzykomórkowej tkanki łącznej, zarówno włókien (kolagenowych, elastynowych, retikulinowych) jak i składników istoty podstawowej (macierzy) takich jak: glikozaminoglikany (np. kwas hialuronowy, siarczan chondroidyny), proteoglikany (np. beta-glikan, dekoryna) oraz białka niekolagenowe (np. fibronektyna, laminina). Fibroblasty w tkankach dojrzałych skóry przechodzą w formy spoczynkowe zwane fibrocytami. Inną populację komórek skóry właściwej stanowią miofibroblasty (Brown i Krishnamurthy, 2021). Są to komórki łączące w sobie zarówno cechy fibroblastów jak i komórek mięśniowych. Kurczliwość miofibroblastów (dzięki obecności włókien aktynowych) umożliwia obkurczenie gojącej się rany i zbliżanie jej brzegów do siebie, a zatem przejście strukturalne fibroblast - miofibroblast jest punktem kluczowym w procesie zablizniania ran (Alhajj i wsp., 2021). Głębsza warstwa skóry właściwej, tzw. warstwa siateczkowata ma strukturę zbitą, zawiera dużo mniej komórek oraz grubsze włókna sprężyste i kolagenowe w porównaniu z warstwą brodawkową skóry. W obrębie tej warstwy zlokalizowane są również liczne naczynia krwionośne, odcinki wydzielnicze gruczołów potowych i łojowych oraz mieszki włosowe. Jest to także miejsce lokalizacji receptorów czuciowych (Lopez-Ojeda i wsp., 2021).

Najgłębsza warstwa skóry - tkanka podskórna, jest zbudowana z komórek tłuszczowych (adipocytów), które są przedzielone tkanką łączną tworzącą zraziki. Warstwa ta zawiera również części wydzielnicze gruczołów potowych, liczne naczynia krwionośne oraz zakończenia nerwowe (Rehfeld i wsp., 2017).



## 1.2. Gojenie rany

Charakteryzując proces gojenia rany na samym wstępie należy wyjaśnić to pojęcie. Rana jest przerwaniem lub zniszczeniem anatomicznej ciągłości tkanek, które powstały na skutek uszkodzenia. Czynnikiem, który powoduje zniszczenie może być uraz lub choroba. Dodatkowo może dojść do uszkodzenia nerwów, mięśni, ścięgien, stawów, a nawet kości. W niektórych wypadkach zauważa się także przecięcie tkanki podskórnej. Najlepiej goją się rany, które nie przebiegają z infekcją, a sąsiednie tkanki nie zostały naruszone, natomiast najgorzej regenerują się te obrażenia, w których zauważa się zmiążdżenie tkanek znajdujących się w okolicy powstałej rany, co często grozi infekcją. W takim wypadku może dojść do martwicy tkanek i takie martwe fragmenty powinny ulec resorpcji, a następnie dochodzi do wypełnienia ubytków tkanką bliznowatą (Schiavon i wsp., 2016).

Skóra jest pewnego rodzaju łącznikiem człowieka ze środowiskiem zewnętrznym, przez co jest ona nieustannie narażona na uszkodzenia w tym urazy mechaniczne. W związku z tym skóra posiada jeden z największych potencjałów regeneracyjnych w całym organizmie (Borena i wsp., 2015). Podczas gojenia ran dochodzi do złożonych interakcji wielu typów komórek skóry, głównie fibroblastów, keratynocytów, komórek śródbłonna naczyń, rezydentnych i rekrutowanych w to miejsce komórek odpornościowych oraz przebudowy macierzy zewnątrzkomórkowej (Martin i Nunan, 2015, Nilforoushzadeh i wsp., 2017).

Gojenie rany jest procesem dynamicznym, który przebiega w czterech zachodzących na siebie fazach: hemostazy, zapalnej, proliferacyjnej i przebudowy tkankowej (Enoch i Price, 2004, Han i Ceilley, 2017; Leyane i wsp., 2021).

Hemostaza rozpoczyna się bezpośrednio po uszkodzeniu skóry. Uszkodzone naczynia krwionośne aktywują proces krzepnięcia prowadząc do powstania skrzepu (na skutek zlepiania się płytek krwi), który stanowi tymczasową macierz dla migrujących w drugiej fazie gojenia, pod wpływem czynników chemotaktycznych, leukocytów krwi (Gethin, 2012). Płytki krwi są odpowiedzialne nie tylko za powstanie skrzepu, ale są również źródłem wielu czynników regulujących proces gojenia rany. Do najważniejszych z nich zaliczamy płytkopochodny czynnik wzrostu PDGF (ang. *platelet-derived growth factor*) oraz nabłonkowy czynnik wzrostu EGF (ang. *epidermal growth factor*). PDGF jest niezmiernie ważnym czynnikiem, który wpływa na szybkość gojenia się ran skóry.

Faza zapalna jest drugim etapem gojenia rany, podczas której komórki układu odpornościowego leukocyty oraz makrofagi są przyciągane chemotaktycznie do miejsca urazu, głównie poprzez wspomniany już PDGF (Hanafiah i wsp., 2018). Z kolei EGF oprócz

tego, że pobudza migrację komórek to stymuluje także ich proliferację, jak również syntezę i przebudowę macierzy zewnątrzkomórkowej ECM (ang. *extracellular matrix*) (Hu i wsp., 2019). Podczas fazy zapalnej dochodzi do wydzielania szeregu cytokin prozapalnych, takich jak: interleukina 1 (IL-1), czynnik martwicy nowotworu (TNF- $\alpha$  ang. *tumor necrosis factor- $\alpha$* ), interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), chemokiny np. monocytarnego białka chemotaktycznego 1 (MCP-1/CCL2, ang. *monocyte chemoattractant protein 1*), interleukina 8 (IL-8/CXCL8), a także czynników przeciwzapalnych takich jak: interleukina 10 (IL-10) i transformujący czynnik wzrostu (TGF- $\beta$ , ang. *transforming growth factor- $\beta$* ). Najważniejszymi cytokinami zaangażowanymi w proces gojenia są:

- Interleukina 1 (IL-1) – cytokina prozapalna, pobudzająca rozwój reakcji zapalnej, produkowana głównie przez monocyty, makrofagi i neutrofile. Powstaje w formie prekursora pro-IL-1, który następnie jest przekształcany w formę aktywną. Wpływa aktywnie na leukocyty oraz wiele komórek niezwiązanych bezpośrednio z układem odpornościowym. W obrębie naskórka IL-1 stymuluje różnicowanie komórek Langerhansa, indukuje ekspresję cząsteczek adhezji międzykomórkowej ICAM-1 (ang. *intercellular adhesion molecule*) oraz E-selektyny umożliwiając migrację neutrofilów, monocytów i limfocytów. Poprzez indukcję wydzielania przez komórki odpornościowe enzymów proteolitycznych, takich jak: kolagenazy i żelatynazy czy aktywator plazminogenu, uczestniczy w przebudowie macierzy zewnątrzkomórkowej. Zaburzenia produkcji IL-1 w obrębie naskórka i skóry właściwej mają wpływ na procesy gojenia w jej obrębie (Gołąb i wsp., 2016; Pan i wsp., 2020).
- Interleukina 6 (IL-6) – produkowana jest głównie przez makrofagi i monocyty. Charakteryzuje się wielokierunkowością działania. Bardzo silnie pobudza procesy zapalne, stymuluje produkcję białek ostrej fazy, wzmacnia aktywację i proliferację limfocytów B i T a także stymuluje proliferację keratynocytów i fibroblastów. IL-6 działa na wszystkich etapach gojenia rany. Prawdopodobnie bierze ona udział w aktywacji fibroblastów do wydzielania kolagenu, w tworzeniu tkanki ziarninowej. Zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* kontroluje migrację keratynocytów w mechanizmie zależnym od fibronektyny (Li i wsp., 1996; Gołąb i wsp., 2016; Ming-Yuani i wsp., 2018).
- Interleukina 8 (IL-8/CXCL8) – należy do rodziny chemokin CXC, stymuluje migrację leukocytów, a w szczególności neutrofilów, do miejsca uszkodzenia tkanki. IL-8 przyczynia się do neoangiogenezy, fibrynogenezy a także procesu

reepitelializacji podczas procesu naprawy uszkodzonych tkanek (Gołąb i wsp., 2016; Komi i wsp., 2020).

- Interleukina 12 (IL-12) – jest produkowana przede wszystkim przez komórki dendrytyczne i makrofagi, w mniejszych ilościach mogą ją również wydzielać keratynocyty. Jej zadaniem jest aktywacja makrofagów a także blokowanie aktywności przeciwzapalnej interleukiny 10. Cytokinie tej przypisuje się również działanie hamujące angiogenezę w procesie gojenia się ran (Matias i wsp., 2011; Gołąb i wsp., 2016).
- Czynniki martwicy nowotworu (TNF- $\alpha$ ) – produkowany jest głównie przez mastocyty, makrofagi i neutrofile. Cytokina ta działa prozapalnie aktywując monocyty oraz makrofagi. Działa również na fibroblasty, pobudzając je do proliferacji oraz wydzielania kolagenazy i IFN- $\beta$  (Gołąb i wsp., 2016).
- Interleukina 10 (IL-10) – wytwarzana jest przez limfocyty, makrofagi oraz komórki dendrytyczne. IL-10 ułatwia przejście od fazy stanu zapalnego gojenia ran do fazy proliferacyjnej poprzez modulację typu i liczby pierwotnych komórek odpornościowych, które migrują do miejsca urazu oraz przez regulację ekspresji cytokin prozapalnych. IL-10 odgrywa także rolę w przebudowie ECM podczas urazu tkanki i działa ochronnie przeciwdziałając tworzeniu tkanki bliznowatej (Gołąb i wsp., 2016; Singampalli i wsp., 2020).

W tym miejscu należy wspomnieć, że w trakcie toczącego się procesu gojenia ran, zdolność do wydzielania cytokin, posiadają także zaktywowane fibroblasty (Illescas-Montes i wsp., 2019; Tottoli i wsp., 2020, Leyane i wsp., 2021).

W czasie wystąpienia miejscowego stanu zapalnego następuje usuwanie wszystkich uszkodzonych oraz martwych komórek a także ewentualnych patogenów. Ma tu miejsce proces fagocytozy, podczas którego fagocyty (makrofagi i neutrofile) pochłaniają pozostałe fragmenty uszkodzonych tkanek (Velnar i wsp., 2009; Marchewka i wsp., 2018).

Po fazie zapalnej następuje faza trzecia proliferacyjna, która trwa do 14 dni. Faza ta jest związana z migracją fibroblastów do uszkodzonego miejsca i rozpoczęciem przez nie syntezy włókien tkanki łącznej i macierzy zewnątrzkomórkowej, która zastępuje tymczasową macierz utworzoną z fibryny i fibronektyny (Sang Won i wsp., 2018). W pierwszym etapie tej fazy dochodzi do wzmożonej angiogenezy. Zauważa się wówczas, że komórki śródbłonna naczyniowego wytwarzają nowe naczynia krwionośne, czego skutkiem jest fibroplazja, czyli wzmocnienie tkanek w zranionym miejscu. Ponadto, fibroblasty rosną i wytwarzają nową tymczasową macierz zewnątrzkomórkową. Dzieje się to na skutek wydzielania przez nie kolagenu oraz fibronektyny. Warto podkreślić, że

podczas skurczu rany miofibroblasty zmniejszają jej wielkość, dochodzi do zbliżenia brzegów rany i jej kurczenia się, przy jednoczesnym zastosowaniu mechanizmu, który podobny jest do skurczów mięśni gładkich. W momencie osiągnięcia celu dochodzi do apoptozy tych komórek (Tottoli i wsp., 2020). Wydzielane podczas fazy zapalnej cytokiny np. TGF- $\beta$  w trakcie fazy proliferacyjnej działają jako chemoatraktanty. TGF- $\beta$  jest cytokiną, należącą do nadrodziny transformujących czynników wzrostu beta. Jego głównym zadaniem jest kontrola wzrostu, proliferacji, różnicowania, migracji oraz obumierania komórek (Nazimek i Bryniarski, 2012). Ponadto, pełni istotną rolę podczas kontroli przebiegu reakcji odpornościowej. Aktywność TGF- $\beta$  w pełni uzależniona jest od typu komórek, na które oddziałuje (Ramirezi i wsp., 2014; Hinz, 2015). Podczas fazy proliferacyjnej fibroblasty pod wpływem czynnika wzrostu fibroblastów FGF (ang. *fibroblast growth factor*) produkują składniki ECM: kwas hialuronowy, proteoglikany, kolageny.

W końcowej, czwartej fazie gojenia ran (fazie przebudowy/remodelingu), trwającej nawet do 18 miesięcy, ustala się równowaga pomiędzy tworzeniem nowych białek (kolagenu, elastyny) a degradacją ECM oraz naczyń krwionośnych. Procesy przebudowy tkanki przebiegają z udziałem enzymów proteolitycznych, zaangażowanych w degradację składowych macierzy zewnątrzkomórkowej oraz błon podstawnych, wśród których kluczową rolę odgrywają metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP, ang. *matrix metalloproteinases*) (Maquart i Monboisse, 2014). MMP są enzymami biorącymi udział zarówno w procesach fizjologicznych jak i patologicznych jako modulatory procesu zapalnego np. podczas wczesnego etapu gojenia ran (Kopeć-Ślęzak, 2014). Szczególną rolę przypisuje się tutaj żelatynazom: MMP-2 oraz MMP-9, które są głównymi enzymami hydrolizującymi kolagen (Murray i Wynn, 2011). Metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej 2 (MMP-2) jest konstytutywnie produkowana w organizmie, m.in. przez monocyty, limfocyty i aktywowane, migrujące fibroblasty. Jej rola związana jest z procesami fizjologicznymi organizmu, w tym z procesem gojenia ran. MMP-2 oprócz rozkładania kolagenu typu IV, trawi także kolageny typu I, II i III. Ma także znaczenie w angiogenezie a także sprzyja migracji komórek i pobudza ich apoptozę (Caley i wsp., 2015; Antończak i wsp., 2018). Z kolei metaloproteinaza 9 (MMP-9) jest produkowana głównie przez neutrofile, monocyty/makrofagi, ale także przez fibroblasty czy komórki śródbłonna. MMP-9 jest odpowiedzialna za rozkład błony podstawnej naczyń krwionośnych w trakcie procesów związanych z migracją komórek oraz uczestniczy w napływie komórek immunokompetentnych do ogniska zapalnego. Ekspresję tej metaloproteinazy stwierdza się na brzegach zamykającej się rany. Chociaż w fibroblastach

ekspresja MMP-9 jest raczej na niskim poziomie, w procesie gojenia rany enzym ten pełni zasadniczą funkcję w rozkładaniu skrzepu, degradacji i przebudowie składników macierzy zewnątrzkomórkowej, tworzeniu mikronaczyń, w procesie przebudowy i dojrzewania ECM, reepitalizacji oraz ostatecznym formowaniu się blizny. MMP-9 działa nie tylko poprzez rozcinanie komponentów ECM, lecz także poprzez aktywację lub rozkład chemokin i cytokin uczestniczących w procesie gojenia rany (Opdenakker i wsp., 2001; Kołaczowska i wsp., 2006; Malla i wsp., 2008; Caley i wsp., 2015; Antończak i wsp., 2018). Ostatnim etapem czwartej fazy gojenia ran jest obkurczenie blizny (Erickson i Echeverri, 2018). Odpowiedzialne za proces kurczliwości i zamykania rany są wspomniane już miofibroblasty (Hinz i Gabbiani, 2003). Miofibroblasty łączą się ze sobą za pomocą połączeń szczelinowych a skupiając się w obrębie rany wywołują jej obkurczanie. Włókienka kolagenowe są ułożone prostopadle do brzegów rany w celu zwiększenia wytrzymałości mechanicznej tkanki. Podczas tego procesu aktyna wiąże się ze składnikiem zewnątrzkomórkowym - fibronektyną, przyłącza się do włókien kolagenowych, cofa się i dzięki silnej adhezji kolagenu powoduje kurczenie i zamykanie rany. Funkcje skurczu miofibroblastów są modulowane przez prostaglandyny, bradykininy, adrenalinę czy też noradrenalinę. Po przywróceniu integralności tkanki w obrębie rany miofibroblasty ostatecznie są usuwane z miejsca uszkodzenia w procesie apoptozy. Dla fizjologicznej przebudowy tkanki wysoka siła skurczu wytwarzana przez miofibroblasty jest bardzo korzystna, jednakże w momencie, gdy staje się nadmierna powoduje tworzenie blizn przerostowych. Tkanka bliznowata charakteryzuje się zmniejszoną elastycznością i wytrzymałością na rozciąganie w porównaniu ze skórą nieuszkodzoną (Hinz, 2007; Muthusubramaniam i wsp., 2014).

Opisując proces gojenia się rany warto zwrócić uwagę na to, że każde uszkodzenie może wygoić się na dwa różne sposoby. Pierwszym z nich jest regeneracja, która nie niesie za sobą powstawania blizn, drugim zaś – reparacja, która pozostawia po sobie blizny. Dodatkowo można wyróżnić gojenie pierwotne i wtórne. Gojenie pierwotne uważane jest za najkorzystniejszy sposób naprawy powstałych uszkodzeń. W procesie tym dochodzi do odtworzenia ciągłości skóry, co nie pociąga za sobą utraty jakiegokolwiek części tkanki. Podczas tego typu procesu dochodzi do łączenia się brzegów rany, natomiast jej zamknięcie odbywa się przy interwencji osoby do tego przeszkolonej – poprzez użycie zszywek, specjalnej taśmy chirurgicznej lub szwów. Omawiany proces trwa dosyć krótko, a przy okazji jest bardzo mała szansa na powstanie widocznych blizn, ze względu na relatywnie małą ilość strat tkanki (Borena i wsp., 2015).

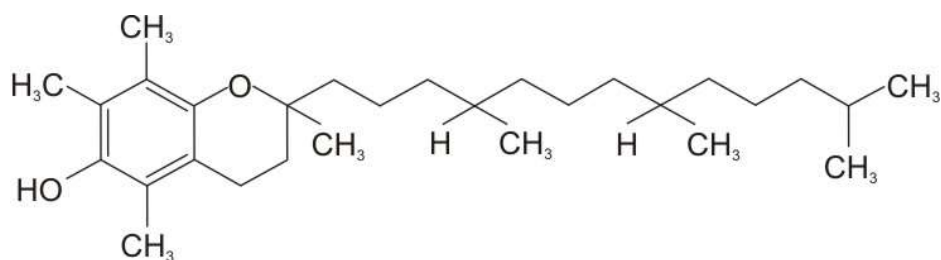
Z kolei drugi rodzaj gojenia, zwany wtórnym, występuje przez ziarninowanie. Jest to znacznie dłuższy proces, który odbywa się tylko w przypadkach, kiedy to poprzedni rodzaj gojenia nie może mieć miejsca, czyli najczęściej podczas znacznego i poważnego urazu, w którym doszło do trwałego uszkodzenia tkanki lub całkowitej jej utraty, w wyniku czego brzegi rany nie przybliżają się do siebie (Sorg i wsp., 2017). Tworzenie się tkanki ziarninowej to ważny i złożony element fazy proliferacji w miejscu gojenia rany. Wymaga interakcji między różnymi typami komórek. Tkanka ziarninowa składa się z macierzy pozakomórkowej: kwasu hialuronowego, proteoglikanów, kolagenu i elastyny, a komórki, które są w niej obecne to fibroblasty, odpowiedzialne za syntezę składnika włóknistego, miofibroblasty oraz komórki śródbłonna odpowiedzialne za proces neoangiogenezy. Trwałe ziarninowanie z nadmiarem makrofagów, fibroblastów i naczyń włosowatych może powodować powolne gojenie się rany lub może świadczyć o infekcji w miejscu rany, powodując nadmierną aktywność komórek zapalnych (Alhajj i wsp., 2021). W tym miejscu warto podkreślić, że ważnym elementem jest tutaj odpowiednia pielęgnacja rany, której brak prowadzi do zakażeń i w konsekwencji do pojawienia się widocznych blizn. Gojenie rany poprzez ziarninowanie zachodzi głównie w przypadku rozległych skaleczeń. Innym rodzajem gojenia się rany jest regeneracja tkanki poprzez rychłozrost. Ten rodzaj gojenia występuje przy niewielkich uszkodzeniach skóry i charakteryzuje się szybką regeneracją tkanki. Kolejnym rodzajem gojenia ran jest regeneracja przebiegająca pod strupem, czyli pod wytworzonym skrzepem krwi, będącym naturalnym opatrunkiem (Rodrigues i wsp., 2019).

Prawidłowość oraz szybkość gojenia się uszkodzonej tkanki zależy od wielu aspektów, do których zalicza się chociażby stan układu odpornościowego, przebyte oraz obecne choroby, stopień uszkodzenia tkanek, temperaturę ciała czy ukrwienie konkretnej części ciała. Proces ten jest także zależny od wielkości rany, rodzaju uszkodzenia, a także od ewentualnego ryzyka wystąpienia zakażenia. Oprócz prawidłowego postępowania podczas pierwszego kontaktu z przerwanym naskórkiem, dotyczącego przemycia go, dezynfekcji czy założenia opatrunku istotną rolę odgrywają także dalsze działania. Należą do nich między innymi częste zmiany opatrunków czy też przyjmowanie leków, w tym antybiotyków. Aby przyspieszyć proces gojenia się uszkodzonej skóry obecnie zaleca się używanie preparatów z zawartością cynku, srebra, wyciągów roślinnych, witamin itp. (Gańczyk i Van Damme-Ostapowicz, 2016).

### 1.3. Wpływ witamin E i K na proces gojenia skóry

Bardzo ważnymi czynnikami mającymi wpływ na prawidłowe funkcjonowanie skóry a także jej gojenie są witaminy a wśród nich witamina E i witamina K (Pop, 2015). Charakteryzując wpływ witaminy E oraz K na proces gojenia się ran należy na samym początku skupić się na krótkim przedstawieniu charakterystyki chemicznej oraz istoty działania obu tych witamin.

Jako witaminy E określa się grupę organicznych związków chemicznych, należąca do tokochromanoli, naturalnie występującą w ośmiu odmianach homologicznych o zbliżonej aktywności fizjologicznej. W jej skład wchodzi cztery tokoferole z nasyconym łańcuchem bocznym ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$ -tokoferole) oraz cztery pokrewne tokotrienole z nienasyconym łańcuchem bocznym ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$ -tokotrienole) pozyskiwane z żywności (Keen i Hassan, 2016). Związki te posiadają tę samą podstawową strukturę chemiczną, która charakteryzuje się powstaniem dwupierscieniowego szkieletu 6-hydroksychromanu oraz łańcucha bocznego, który zbudowany jest z 3 jednostek izoprenowych. Różnią się one liczbą i położeniem grup metylowych w strukturze chromanolu i nie mogą być wspólnie przekształcane (Ryc. 2).



Ryc. 2. Wzór strukturalny witaminy E.

W organizmie człowieka zapotrzebowanie na witaminę E spełnia wyłącznie  $\alpha$ -tokoferol, który wykazuje największą aktywność i występuje w najwyższym stężeniu w surowicy i czerwonych krwinkach. Pozostałe formy tokoferolu są szybciej metabolizowane przez organizm (Lee i Han, 2018). Witamina E nie może być syntetyzowana przez organizm człowieka i zaliczana jest, ze względu na swoje właściwości, do witamin rozpuszczalnych w tłuszczach, dzięki czemu odkłada się głównie w tkance tłuszczowej.  $\alpha$ -tokoferol gromadzi się szczególnie w miejscach, w których wytwarzanie wolnych rodników tlenowych jest największe, takich jak błony mitochondriów i siateczka śródplazmatyczna (Rizvi i wsp., 2014). W kosmetologii witamina E znana jest od lat. Wiadomo, że dobrze wnika w skórę, chroni warstwę tłuszczową naskórka, poprawia ukrwienie skóry, wspomaga leczenie trądziku i łojotokowego zapalenia skóry a także

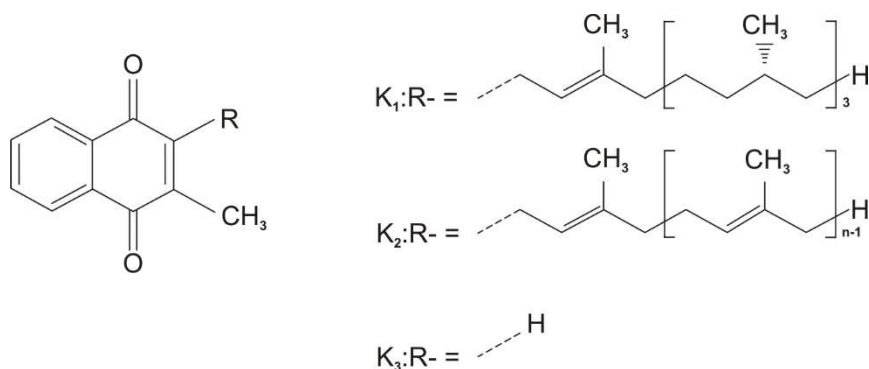
łagodzi podrażnienia i poparzenia skóry, powstałe na skutek działania promieni słonecznych. Dodatkowo działa przeciwzapalnie oraz przeciwobrzękowo (Molski, 2021). Witamina E zapewnia stabilizację i właściwą przepuszczalność błon komórkowych. hamuje proces utleniania białek i lipidów, hamuje rozkład macierzy zewnątrzkomórkowej przez metaloproteiny, uszczelnia i wzmacnia tkanki, dzięki czemu przyspiesza proces gojenia ran (Nizam i wsp., 2014; Park, 2015). Witamina E jest mocnym przeciwutleniaczem, którego jedną z wielu funkcji jest opóźnianie procesu starzenia. Co więcej wykazano, że zwiększa wytwarzanie przeciwciał poprzez wzmacnianie humoralnej odpowiedzi immunologicznej oraz działa jako adiuwant dzięki czemu uczestniczy w regulacji niektórych reakcji immunologicznych (El-Shenawy i wsp., 2015; Dalia i wsp., 2018). Bardzo ważną funkcją witaminy E jest wspomniane już, jej antyoksydacyjne działanie w stosunku do wolnych rodników tlenowych (ROS, ang. *reactive oxygen species*). Przykładami takich rodników są rodniki hydroksylowe, ponadtlenkowe, nadtlenek wodoru czy tlen singletowy (Yang i wsp., 2018). Warto w tym miejscu przypomnieć, że wolne rodniki tlenowe w komórkach są naturalnymi produktami metabolizmu tlenowego. Szczególnie ważne są one w układzie naprawczym gojenia ran. Wpływ ROS na komórki zależy w dużym stopniu od czasu ich działania i stężenia. Umiarkowana ich ilość spełnia ważne funkcje fizjologiczne oraz regulacyjne, m.in. przekazują one sygnały wewnątrzkomórkowe i międzykomórkowe. Anion ponadtlenkowy i nadtlenek wodoru działają jak mitogeny, tym samym zwiększają tempo replikacji DNA i proliferacji komórek (Bhattacharyya i wsp., 2014). ROS są także zaangażowane w wiele procesów takich jak skurcze mięśni, wydzielanie hormonów, regulację napięcia naczyniowego oraz funkcjonowanie układu odpornościowego (Sies i Jones, 2020). W układzie odpornościowym wytwarzane są m.in. podczas aktywacji fagocytozy. Również w stanach zapalnych, które pojawiają się w następstwie uszkodzeń tkanek dochodzi do znacznego wzrostu wytwarzania wolnych rodników tlenowych, zwłaszcza anionorodnika ponadtlenkowego (Skotnicka i wsp., 2017). O bezpośrednim destrukcyjnym działaniu ROS, które wywołuje uszkodzenia komórek możemy mówić wówczas, gdy są one wytworzone w nadmiarze, ich wysoka produkcja może bowiem indukować apoptozę, autofagię bądź też nekrozę komórek (He i wsp., 2017). Najczęściej występującym skutkiem nagromadzenia się wolnych rodników w ustroju jest stres oksydacyjny polegający na zachwianiu równowagi występującej między poziomem czynników utleniających, a poziomem czynników antyoksydacyjnych znajdujących się zarówno w komórkach, jak i tkankach organizmu (Kulbacka i wsp., 2009; Sies, 2020). Utrzymujący się stres oksydacyjny przy braku sprawnie działających mechanizmów naprawczych, prowadzi do utleniania błon



komórkowych, trwałych uszkodzeń - DNA, białek, cukrów, które indukują szereg nieprawidłowości w funkcjonowaniu organizmu. Udowodniono, że stres oksydacyjny jest ważnym czynnikiem sprzyjającym śmierci komórek np. w indukowanej przez TGF- $\beta$  apoptozie. Kolejnym następstwem stresu oksydacyjnego jest zwiększone zużycie adenosynotrójfosforanu (ATP, ang. *adenosine triphosphate*) w komórce poprzez uszkodzenie mitochondriów i hamowanie procesu glikolizy (Höhn i wsp., 2017).

Komórki chroniąc się przed nadmiarem wolnych rodników wykształciły zrównoważony system antyoksydacyjny, który zabezpiecza przed toksycznym działaniem ROS. Mechanizmy te obejmują związki, pochodzenia zarówno egzo- jak i endogennego, które tworzą złożony system o właściwościach enzymatycznych i nieenzymatycznych. W skład systemu enzymatycznego wchodzi m.in. wewnątrzkomórkowa i mitochondrialna dysmutaza ponadtlenkowa (SOD, ang. *superoxide dismutase*), peroksydaza glutationowa (GP, ang. *glutathione peroxidase*), katalaza (CAT, ang. *catalase*), transferaza glutationowa (GST, ang. *glutathione transferase*), tioredoksyna (Trx, ang. *thio-redoxin*), oraz przeciwutleniacze enzymatyczne, które spowalniają i blokują tworzenie ROS, redukują stres oksydacyjny odbudowując struktury uszkodzonych cząsteczek. Z kolei w skład systemu nieenzymatycznego wchodzi m.in.  $\beta$ -karoten,  $\alpha$ -tokoferol, witamina C czy też koenzym Q10 (Ighodaro i Akinloye, 2018).

Witaminy K to rozpuszczalne w tłuszczach, grupy związków chemicznych naturalnie występujące w organizmie człowieka. Posiadają one wspólną strukturę pierścienia naftochinonu, ale różnią się długością i nasyceniem dołączonego lipofilowego łańcucha bocznego. Wyróżnia się trzy formy witaminy K: K1 (filochinon), syntetyzowany przez organizmy roślinne, słabo przyswajany przez organizm ludzki, K2 (menachinon), który wchłania się całkowicie, syntetyzowany przez organizmy zwierzęce i bakterie fermentujące oraz K3 (menadion), otrzymywany syntetycznie, który odznacza się wysoką aktywnością biologiczną (Ryc. 3) (Karu i wsp., 2005; Karl i wsp., 2017; Turck i wsp., 2017).



Ryc. 3. Wzór strukturalny witamin: K1, K2, K3.

Witaminy K przez wiele lat przypisywano wyłącznie rolę w procesie krzepnięcia krwi, co było związane z faktem, że katalizuje ona w wątrobie między innymi syntezę protrombiny, nieaktywnego prekursora trombiny, enzymu przekształcającego fibrynogen w fibrynę (Palta i wsp., 2014). Ostatnie doniesienia naukowe opisują jednak szerokie spektrum jej działania również w tkankach pozawątrobowych. Potwierdzono przykładowo jej osłonowe i lecznicze działanie w osteoporozie, miażdżycy, chorobach nowotworowych i chorobach sercowo-naczyniowych, czy też chorobach centralnego układu nerwowego (Kosińska i wsp., 2008; Bieniek i wsp., 2015; Jinghe i wsp., 2015). Witamina ta pośredniczy w kluczowych procesach biochemicznych takich jak wzrost i apoptoza komórek. Ponadto, wykazuje działanie przeciwbólowe, przeciwgrzybiczne, przeciwbakteryjne i przeciwzapalne (Hodges i wsp., 2017), co wydaje się być istotne w procesie gojenia się ran. Witamina K jest także zaangażowana w zwiększenie szczelności ścian naczyń krwionośnych, ograniczanie mikrokrwawienia. Witamina ta łagodzi zaczerwienienia, wybroczyny oraz siniaki. Kosmetyki z witaminą K przeznaczone są do cery naczyniowej oraz z trądzikiem różowatym (Wawrzyniak i wsp., 2015). Widocznymi objawami, które wskazują na niedobór witaminy K są m.in. hamowanie procesu tworzenia skrzepu, problemy z gojeniem się uszkodzenia skóry, łatwość powstawania krwotoków wewnętrznych i zewnętrznych, które są często przyczyną tworzenia siniaków (Kosińska i wsp., 2008; Kucharz i wsp., 2018).

## **1.4. Lasery**

### **1.4.1. Wiadomości ogólne**

Słowo „laser” jest angielskim skrótem wyrażenia *light amplification by stimulated emission of radiation*, które określa wzmocnienie światła przez wymuszoną emisję promieniowania. Światło laserowe obejmuje tylko jedną wartość częstotliwości (długości fali) i natężenia, jest zatem spójne, monochromatyczne i zogniskowane (Tunner i wsp., 2002). Historia leczenia światłem sięga dawnych czasów, ale dopiero w XX wieku zaczęto naukowo wykorzystywać niektóre rodzaje fal świetlnych w leczeniu schorzeń somatycznych. Natomiast w 1960 roku fizyk Theodore Maiman opublikował pierwszą pracę na temat promieniowania laserowego i jego skutkach zdrowotnych.

Wyróżnia się kilka sposobów klasyfikacji laserów, między innymi ze względu na widmo emitowanego promieniowania, ośrodek czynny (np. lasery: półprzewodnikowe, gazowe, na cieczy i na ciele stałym), charakter pracy (impulsowy bądź ciągły), czy zakres mocy emitowanych przez urządzenie. W codziennej praktyce klinicznej stosuje się lasery,

które emitują promieniowanie z zakresu długości fal charakterystycznych dla światła widzialnego. Promieniowanie laserowe w kontakcie z materią podlega zjawiskom: odbicia, załamania i absorpcji. W momencie kontaktu promieniowania ze skórą jest ono rozpraszane i pochłaniane, wskutek czego wiązka traci swoją kolimację i koherencję, ale nadal posiada jedną częstotliwość fali. Wszystkie te czynniki decydują o tym na jaką głębokość wnika światło laserowe, a tym samym jakie zmiany wywoła w tkankach, do których dotrze (Draelos i Pugliese, 2014; Mosca i wsp., 2019). Wpływ światła laserowego na tkankę zależy więc od wielu czynników: rodzaju lasera, gęstości mocy emitowanej wiązki, absorpcji tkanek przy różnych długościach fali, czasu trwania ekspozycji oraz rodzaju tkanki poddanej temu działaniu. W praktyce klinicznej, jak i biomedycznych badaniach dawki: energii i mocy najczęściej podawane są zindeksowane na jednostkę powierzchni. I tak najczęściej wykorzystywaną w przypadku energii jednostką jest  $J/cm^2$ , która jest miarą ekspozycji promieniowania zwanej też fluencją (ang. *radiant exposure lub fluence*). W przypadku mocy najczęściej stosowaną jednostką jest  $mW/cm^2$ , którą określa się jako irradiancję (Mosca i wsp., 2019).

Ze względu na wartości wypromieniowanej energii promieniowanie laserowe dzielimy na: niskoenergetyczne (małej mocy), średnioenergetyczne (średniej mocy) oraz wysokoenergetyczne (dużej mocy), (Pyszora i Adamczyk 2005).

#### **1.4.2. Niskoenergetyczne promieniowanie laserowe (LLLT)**

Terapię wykorzystującą niskoenergetyczne promieniowanie laserowe (LLLT, ang. *low-level laser therapy*) wprowadził w 1967 roku węgierski chirurg, profesor medycyny Endre Mester. LLLT wykorzystuje światło w zakresie od 600 nm do 1100 nm oraz energii od 1 do 500 mW (Hashmi i wsp., 2010). Niskoenergetyczne promieniowanie laserowe ma za zadanie wywołać w komórce efekt fotochemiczny i procesy biostymulacji czy też fotobiomodulacji (Santos i wsp., 2018; Musstaf i wsp., 2019; Leyane i wsp., 2021, He i wsp., 2021; Tripodi i wsp., 2021). Dlatego też, coraz częściej w publikacjach naukowych, z zakresu badań wpływu niskoenergetycznego promieniowania laserowego zamiennie do LLLT stosuje się określenie fotobiomodulacja (PBM, ang. *photobiomodulation*). Szczególnie ma to znaczenie w badaniach *in vitro*, czyli w przypadku działania niskoenergetycznym promieniowaniem laserowym na komórki, trudno bowiem w tym przypadku mówić o stosowaniu wobec nich terapii.

Wykorzystywanie LLLT niesie za sobą właściwe użytkowanie i zapewnienie odpowiedniego bezpieczeństwa. Urządzenia te, zaliczane są do 3 klasy bezpieczeństwa.

Lasery te nie powodują wzrostu temperatury naświetlanej tkanki powyżej 1°C (Kozyra, 2015). W Polsce aktualnie obowiązuje norma PN-EN 60825-1:2005 (PN-EN 60825-1:2005 Bezpieczeństwo urządzeń laserowych, Część 1: Klasyfikacja sprzętu i wymagania. Ze względu na szkodliwość działania urządzenia laserowe są sklasyfikowane na podstawie parametru GED (Granica Emisji Dostępnej, z ang. AEL: *Accessible Emission Limit*), który jest maksymalnym poziomem promieniowania lasera lub urządzenia laserowego i którego wartości są wyspecyfikowane w zależności od energii, pasma widmowego i czasu ekspozycji (Kozyra, 2015) (Łukasik i in., 2016). Klasa lasera informuje o skali zagrożeń związanych z użytkowaniem. Aktualnie obowiązuje nowy podział na siedem klas (1, 1M, 2, 2M, 3R, 3B, 4). Im wyższy jest numer klasyfikacyjny, tym laser bądź urządzenie laserowe stwarza większe potencjalne zagrożenie. Zgodnie z ww. normą wyróżniamy następujące klasy laserów, które zostały przedstawione w tabeli 1.

Tabela 1. Klasy bezpieczeństwa laserów.

| Klasa | Opis  |
|-------|---|
| 1     | lasery całkowicie bezpieczne  |
| 1M    | lasery klasy 1 emitujące promieniowanie w zakresie 302,5–4000 nm, które mogą być niebezpieczne w przypadku wprowadzenia elementów optycznych w tor wiązki laserowej   |
| 2     | lasery niecałkowicie bezpieczne, emitujące promieniowanie widzialne w zakresie 400–700 nm; ochrona oczu jest zapewniona przez zamknięcie oka na skutek odruchu zamknięcia powiek w przypadku silnego oświetlenia oczu |
| 2M    | lasery klasy 2, które mogą być niebezpieczne w przypadku wprowadzenia elementów optycznych w tor wiązki laserowej   |
| 3R    | lasery małego ryzyka  |
| 3B    | lasery niebezpieczne w każdym przypadku patrzenia w wiązkę laserową bezpośrednio padającą lub po odbiciu zwierciadlanym   |
| 4     | lasery bardzo niebezpieczne; należy chronić oczy i skórę zarówno przed promieniowaniem bezpośrednim, jak i rozproszonym   |

#### **1.4.2.1. Niskoenergetyczne promieniowanie laserowe – badania kliniczne**

LLLT jest formą wspomagającą, stosowaną w różnych dziedzinach medycyny min. w fizykoterapii, chirurgii, stomatologii, dermatologii, neurologii, ortopedii, okulistyce, kardiologii, otolaryngologii czy też kosmetologii (Avci i wsp., 2013, Jenkins i Carroll, 2011). Dzięki badaniom klinicznym udało się określić tzw. „okno optyczne”, w którym przez naskórek i skórę na głębokość kilku milimetrów przechodzi światło, w przedziale od czerwieni do bliskiej podczerwieni (Chaves i wsp., 2014). Stosowaniu LLLT przypisuje się wiele korzystnych aspektów. Metoda ta jest: bezbolesna, prosta, posiadającą niewiele przeciwwskazań, atermiczna i aseptyczna a przy właściwym użytkowaniu całkowicie bezpieczna (Rai i wsp., 2018). Wielu autorów na podstawie przeprowadzonych badań klinicznych opisuje pozytywne efekty stosowania LLLT jako skuteczne narzędzie w działaniu przeciwbólowym, przeciwzapalnym, w zmniejszeniu obrzęków limfatycznych, w niwelowaniu trądziku, trudno gojących się ran i blizn (Kajagar i wsp., 2012; Belli i wsp., 2015; Jácomo i wsp., 2015; Chiarotto i wsp., 2014; Núñez i wsp., 2013; Assis i wsp., 2013; Jang i wsp., 2016; Yousef i wsp., 2017; Mathur i wsp., 2017; Tantawy i wsp., 2018; Taradaj 2018; Vaghardoost i wsp., 2018; Tantawy i wsp., 2019; Rubira i wsp., 2019; Santos i wsp., 2020; Kholoosy i wsp., 2020; Kilmartin i wsp., 2020). Obiecujące efekty kliniczne zauważono także u pacjentów z przewlekłym, zaawansowanym zapaleniem, po wszczepieniu implantów zębowych i kostnych innych okolic ciała (Omasa i wsp., 2012, de Vasconcellos i wsp., 2013). Jednakże, pomimo tak wielu prac potwierdzających skuteczność działania LLLT w różnych jednostkach chorobowych, istnieją także doniesienia, które tego pozytywnego efektu nie dowodzą. Brak skuteczności LLLT stwierdzono min. w przypadku leczenia obrzęku limfatycznego (Klimartin i wsp., Akgul i wsp., 2020), stanu zapalnego w chorobach stawów skroniowo-żuchwowych (Jurkowski i wsp., 2011) czy też bólu (Jeffrey i wsp., 2000). Z kolei Sadick i wsp. (2018) opisali różną skuteczność działania LLLT w przypadku leczenia zanikowych blizn potrądzikowych (Sadick i wsp., 2018). Autorzy tej pracy wykazali, że skuteczność działania niskoenergetycznego promieniowania zależy od rodzaju skóry i blizny potrądzikowej pacjenta, a także od zastosowanych parametrów naświetlania laserem (Sadick i wsp., 2018).

#### **1.4.2.2. Niskoenergetyczne promieniowanie laserowe – badania komórkowe**

Niskoenergetyczne promieniowanie laserowe działa na podstawowe molekularne funkcje komórki żywego organizmu. Wpływ ten jest wielokierunkowy i nie w pełni poznany. Jednym z głównych, efektów tego oddziaływania jest wspomniana wcześniej

fotobiostymulacja objawiająca się między innymi zwiększoną proliferacją komórek (AlGhamdi i wsp., 2012; Etemadi i wsp., 2021). Dokładny mechanizm tego zjawiska nie został do końca poznany, przypuszcza się jednak, że u jego podstaw leży aktywacja łańcucha oddechowego a w szczególności udział oksydazy cytochromu c (AlGhandi i wsp., 2012). Wykazano również, że naświetlanie laserem niskiej mocy ma wpływ na migrację i różnicowanie komórek, produkcję ATP, syntezą DNA i RNA (Szymanska i wsp., 2013; Naderi i wsp., 2017; Chaves, 2014; Freitas i Hamblin, 2016; Chaudary, 2020; Nilforoushzadeh i wsp., 2019). Niskoenergetyczne promieniowanie laserowe ma także wpływ na zmiany w aktywności pompy sodowo-potasowej oraz wymianę elektrolitową między komórką a jej otoczeniem (Santos i wsp., 2007; Kassak i wsp., 2006). Przypuszcza się, iż zjawisko to może mieć związek z działaniem przeciwbólowym LLLT (Lopatina i wsp., 2012). Wykazane zostało również, iż naświetlanie laserem niskiej mocy ma wpływ na produkcję reaktywnych form tlenu a efekt ten jest zależny od dawki promieniowania lasera (Zhang i wsp., 2008). W wyższych dawkach niskoenergetyczne promieniowanie laserowe może także indukować apoptozę. Dokładny mechanizm, tego zjawiska również nie został do końca poznany, ale wydaje się, że może on być silnie powiązany z produkcją reaktywnych ROS (Huang i wsp., 2011; Gao i wsp., 2006; Sun i wsp., 2010). Zastosowanie niskoenergetycznego promieniowania laserowego wpływa także na proces angiogenezy, syntezy kolagenu, proces obkurczania się rany i ponownej epitelizacji skóry (Crisan i wsp., 2013; Frozanfar i wsp., 2013; Cunha i wsp., 2019). Wykazano również, że oczekiwany efekt fotobiostymulacji komórek zależy od zastosowanych w badaniach parametrów naświetlania laserem (Huang i wsp., 2011a; Núñez i wsp., 2013; Loreti i wsp., 2015; de Vasconcelos i wsp., 2015; Catarino i wsp., 2015; Gupta i wsp., 2015; Ranjbar i Ashrafzadeh-Takhtfooladi, 2016; Nadhreen i wsp., 2019).

## **2. Uzasadnienie podjęcia tematu badań**

W świetle wyników badań naukowych wiadomo, że zastosowanie monoterapii, takiej jak np. miejscowe podanie np. kwasu hialuronowego, kolagenu czy też czynników wzrostu komórek, ma w ocenie klinicznej jedynie nieznaczny wpływ na poprawę procesu gojenia (Pikuła i wsp., 2015). Optymalnym rozwiązaniem terapeutycznym poprawiającym proces gojenia ran, zwłaszcza tych trudno się gojących np. trądzikowych, oparzeniowych, czy owrzodzeniowych wydaje się być zastosowanie kilku metod równocześnie, czyli zastosowanie tzw. terapii skojarzonej. Proces gojenia ran może być modyfikowany/wspomagany nie tylko przez substancje aktywne, ale również przez

wybrane czynniki fizykalne np. magnetostymulację, ultradźwięki, ciepło i zimno, a także niskoenergetyczne promieniowanie laserowe.

Również pomimo wielu przeprowadzonych eksperymentów dotyczących wpływu laseroterapii na organizm ludzki, uzyskane wyniki jak dotąd nie dały jednoznacznej odpowiedzi dotyczącej doboru właściwych parametrów stosowanych zabiegów. Opisywane rezultaty badań klinicznych wprawdzie zdają się potwierdzać pozytywny wpływ niskoenergetycznego promieniowania laserowego na układy biologiczne, w szczególności na organizm człowieka, jednakże zakres parametrów stosowanych w badaniach chociażby w regeneracji tkanek skóry jest bardzo rozległy. Autorzy prac naukowych podkreślają niezgodność wyników podobnych badań z zakresu laseroterapii, co może być spowodowane zróżnicowaną i często niedokładnie opisaną w pracy metodyką zabiegów. Autorzy mało precyzyjnie przytaczają dane dotyczące zastosowanej aparatury, dobranych parametrów naświetlania oraz sposobu aplikacji wiązki lasera, co nie pozwala na jednoznaczną ocenę wyników przeprowadzonych badań. To z kolei utrudnia powtórzenie badań przez innych, a także powoduje problemy z porównywaniem uzyskanych wyników własnych z rezultatami otrzymanymi i opisanymi w piśmiennictwie przez innych naukowców.

W piśmiennictwie brak jest również badań, które opisywałyby wpływ terapii skojarzonych na proces gojenia ran skóry. Bardzo istotnym wydaje się więc, określenie w warunkach hodowli *in vitro* optymalnych dla komórek skóry parametrów naświetlań laserem a także ustalenie czy istnieją wzajemne interakcje pomiędzy działaniem na komórki wybranych czynników aktywnych i niskoenergetycznego promieniowania laserowego a odpowiedzią komórkową mierzoną poziomem produkcji czynników odgrywających istotną rolę w procesie gojenia ran.

### **3. Cel badań**

Celem niniejszych badań była ocena wpływu niskoenergetycznego promieniowania laserowego oraz witamin E i K na odpowiedź komórkową ludzkich fibroblastów w warunkach hodowli *in vitro*.

#### **Cel realizowano poprzez zbadanie:**

1. Które z zastosowanych parametrów naświetlania niskoenergetycznym promieniowaniem laserowym mają najkorzystniejszy wpływ na: morfologię, przyleganie, proces „gojenia rany” oraz aktywność wydzielniczą fibroblastów?

2. Czy witaminy E i K mają wpływ na żywotność i aktywność wydzielniczą fibroblastów?
3. Czy równoczesne działanie witaminy E lub K i naświetlania niskoenergetycznym promieniowaniem laserowym wpływa na żywotność i aktywność wydzielniczą fibroblastów oraz potencjał oksydacyjno-antyoksydacyjny tych komórek?

#### **Postawiono hipotezę badawczą**

Założono, że niektóre spośród 12 badanych parametrów naświetlania niskoenergetycznym promieniowaniem laserowym oraz witaminy będą stymulowały fibroblasty, do wydzielania czynników sprzyjających procesowi gojenia ran.

### **4. Materiały i metody**

#### **4.1. Hodowla komórkowa**

Standardowo fibroblasty Hs680 hodowane były w plastikowych butelkach (Nest SB, USA) o pojemności 75 ml w pożywce hodowlanej DMEM (Lonza, USA) z dodatkiem 10 % surowicy cielęcej FBS (ang. *fetal bovine serum*), (Gibco, USA) oraz 5 % roztworu antybiotyków: penicyliny i streptomycyny (Sigma - Aldrich, Niemcy), w atmosferze 5 % CO<sub>2</sub> i temperaturze 37°C. Do eksperymentów zostały użyte komórki z pasaży od 5-6. Zawiesina komórek była uzyskiwana poprzez dodanie do hodowli w butelce tryple (Lonza, USA). Po odwirowaniu komórki były doprowadzone do stężenia 0,01 mln komórek/ml, po czym 1 ml zawiesiny komórek był umieszczany: podczas I etapu badań (zob. podrozdział 4.2.1) na okrągłych szkiełkach hodowlanych (Menzel Glaser, Germany) w studzienkach 24-dołkowej płytki hodowlanej (Nest SB, USA), natomiast w II etapie badań (zob. podrozdział 4.2.2) w dołkach 24-dołkowej płytki (Nest SB, USA) zawierających sterylne krążki membran i szkiełka hodowlane (Menzel Glaser, Germany). Hodowla fibroblastów prowadzona była odpowiednio przez 3, 5, 7, 9 lub 11 dni w inkubatorze (MCO-18AC PhCbi, UK), w atmosferze 5 % CO<sub>2</sub> i temperaturze 37°C. W celu oznaczenia aktywności wydzielniczej fibroblastów, po upływie określonego czasu hodowli odpowiednio od 3 do 11 dni, zbierano i zamrożono (w -20°) nadsącz z nad hodowli komórek, w celu późniejszego dokonania oznaczeń.



## 4.2. Etapy badań

### 4.2.1. Etap I – dobór optymalnych parametrów naświetlania niskoenergetycznym promieniowaniem laserowym

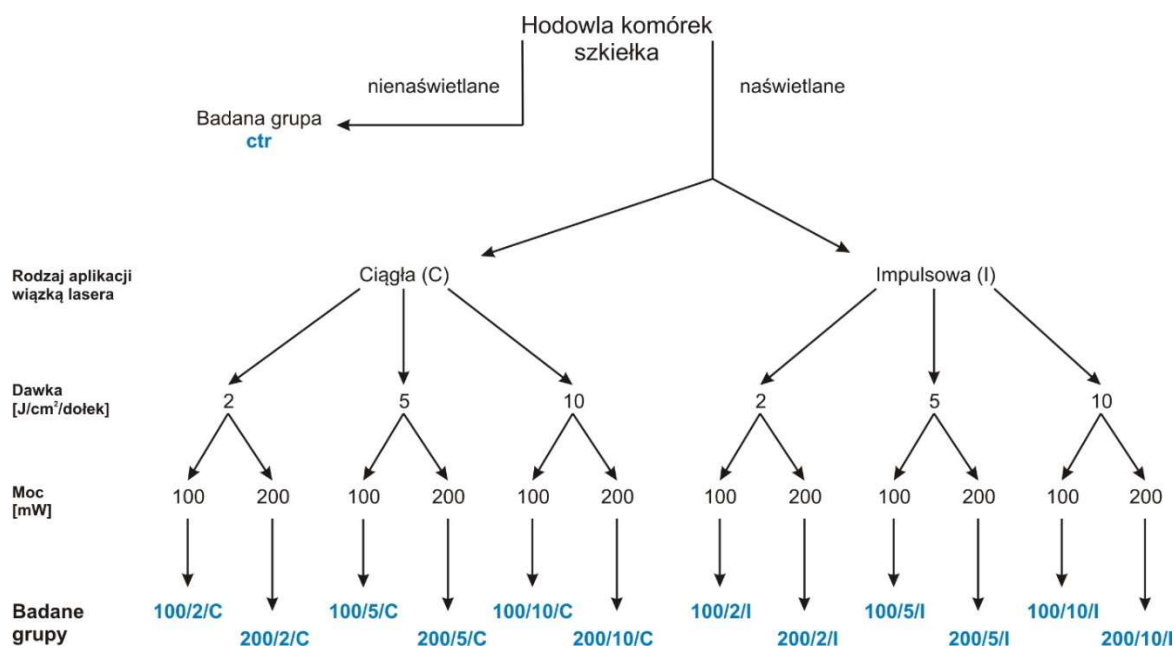
Do naświetlania laserem fibroblastów Hs680 rosnących na okrągłych szkiełkach hodowlanych (Menzel Glaser, Germany) (kontrola) w dołkach 24-dołkowej płytki (Nest SB, USA), został użyty aparat PhysioGo 400C firmy ASTAR z aplikatorem punktowym generującym promieniowanie elektromagnetyczne w zakresie światła podczerwonego o długości fali 808 nm oraz mocy 100 lub 200 mW. Zastosowano następujące dawki promieniowania:

- i) 2 J/cm<sup>2</sup>/dołek z komórkami
- ii) 5 J/cm<sup>2</sup>/dołek z komórkami
- iii) 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek z komórkami

Wiązka promieniowania laserowego była aplikowana w sposób ciągły (C) lub impulsowy (I) - częstotliwość 100 Hz z 50 % współczynnikiem wypełnienia. Promieniowanie laserowe było aplikowane z odległości 1 cm, 1 raz na dobę (co 24 h) - 2, 4, 6, 8 i 10 razy. Eksperyment kończono w 3 (2 aplikacje lasera), 5 (4 aplikacje lasera), 7 (6 aplikacje lasera), 9 (8 aplikacje lasera) lub 11 dniu hodowli (10 aplikacje lasera).

Celem tego etapu badań był dobór najbardziej odpowiednich parametrów działania niskoenergetycznego promieniowania laserowego na: morfologię i przyleganie komórek, „gojenie rany”, cytotoksyczność oraz aktywność wydzielniczą fibroblastów mierzona poziomem tlenku azotu (NO) i białka w nadsączach znad hodowli komórek.

I etap eksperymentu został przeprowadzony według schematu opisanego poniżej (Ryc. 4).



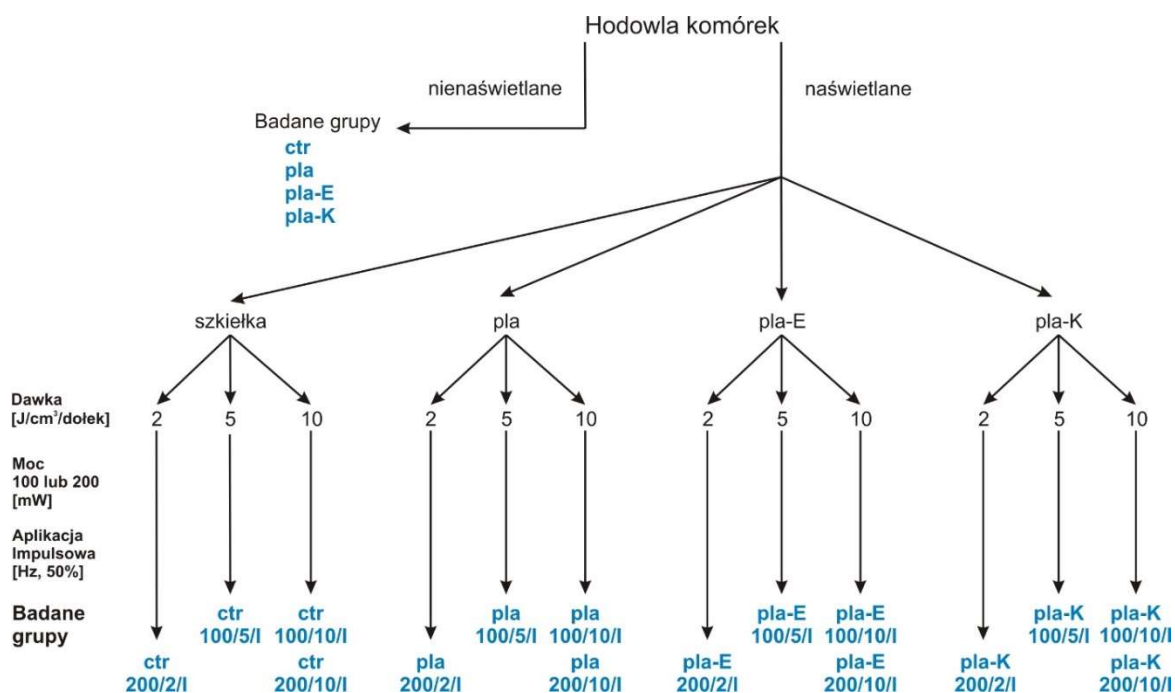
Ryc. 4. Schemat I etapu badań dotyczącego wpływu na hodowane na szkiełkach fibroblasty Hs680 naświetlania ciągłą (C) lub impulsową (I) wiązką promieniowania laserowego o mocy 100 lub 200 mW oraz dawkach 2, 5 lub 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek.

#### 4.2.2. Etap II – badanie wpływu witamin i/lub niskoenergetycznego promieniowania laserowego

Hodowlę fibroblastów prowadzono na okrągłych szkiełkach hodowlanych (Menzel Glaser, Germany), membranach pla (polilaktydu) lub na membranach pla wzbogaconych witaminami: witaminą E (pla-E) lub witaminą K (pla-K) i dodatkowo naświetlano optymalnie dobranymi na podstawie wyników z I etapu badań parametrami światła lasera (Ryc. 4).

Na tym etapie badań w pierwszej kolejności sprawdzano żywotność komórek, cytotoksyczność oraz aktywność wydzielniczą fibroblastów mierzoną poziomem NO i białka w nadsączach znad hodowli komórek.

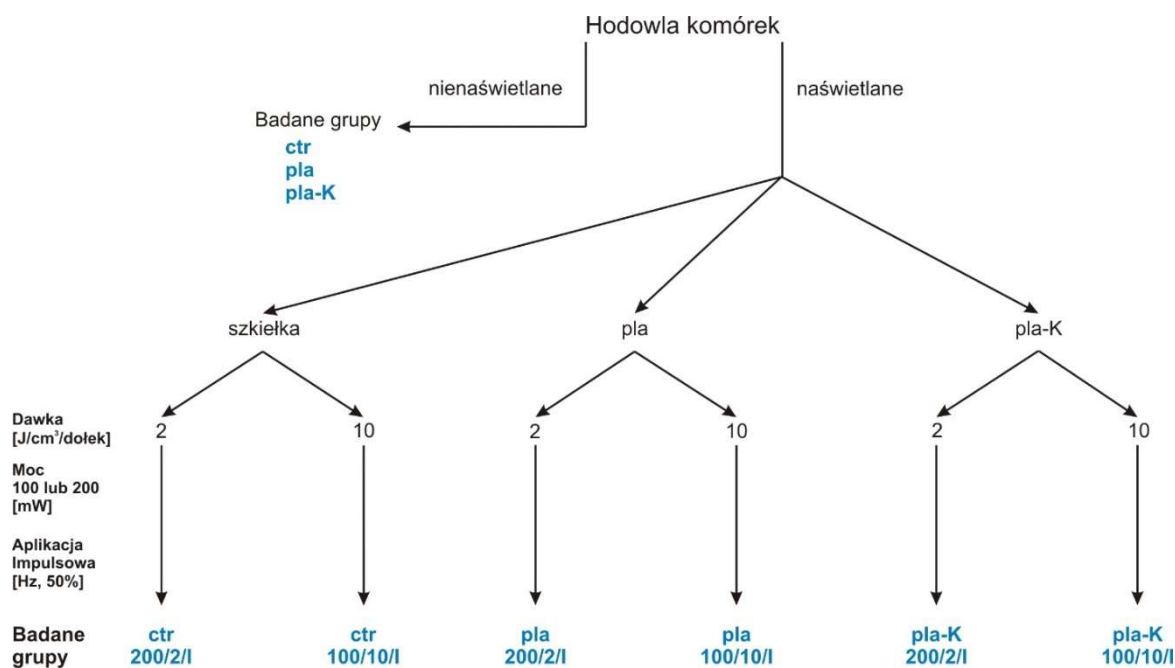
Do naświetlania komórek zastosowano wiązkę promieniowania laserowego o mocy 100 lub 200 mW i dawki promieniowania: 2, 5 lub 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek z komórkami (Ryc. 5). Wiązkę lasera we wszystkich badanych grupach aplikowano w sposób impulsowy (I) - częstotliwość 100 Hz z 50 % współczynnikiem wypełnienia. Naświetlanie laserem było aplikowane z odległości 1cm, 1 raz na dobę (co 24 h) 2, 4, 6 razy w trakcie hodowli komórek. Eksperyment był kończony w 3 (2 aplikacje lasera), 5 (4 aplikacje lasera) lub 7 (6 aplikacje lasera) dniu hodowli fibroblastów.



Ryc. 5. Schemat II etapu badań dotyczącego wpływu na fibroblasty Hs680 różnych podłoży hodowlanych: szkiełka hodowlanego (ctr), membran polilaktydu (pla), membran polilaktydu modyfikowanych witaminą E (pla-E), membran polilaktydu modyfikowanych witaminą K (pla-K) oraz naświetlania impulsową (I) wiązką promieniowania laserowego o mocy 100 mW i dawkach 5 lub 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek oraz o mocy 200 mW i dawkach 2 lub 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek.

#### 4.2.3. Etap III - oznaczenie aktywności wydzielniczej fibroblastów

Celem tego etapu badań było w wybranych grupach eksperymentalnych (w których stwierdzono najkorzystniejszy wpływ jednoczesnego naświetlania laserem i witamin na komórki) oznaczenie poziomu: cytokin, metaloproteinaz oraz potencjału oksydacyjnego i antyoksydacyjnego. Do tego etapu badań wykorzystano zebrane w trakcie II etapu eksperymentu nadsącze znad hodowli komórek, które zostały poddane jednoczesnemu działaniu witaminy K i naświetlaniu laserem o wybranych parametrach. Oznaczeń dokonano w nadsączach badanych grup w II etapie eksperymentu zebranych w 3 (2 aplikacje lasera) i 5 (4 aplikacje lasera) dniu hodowli fibroblastów.



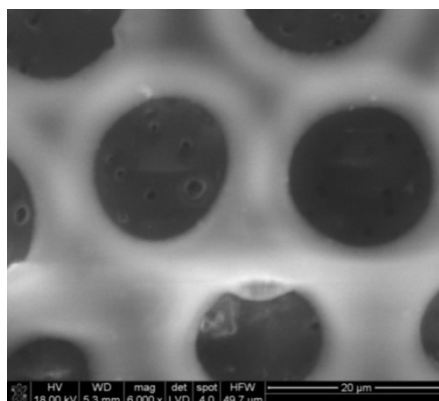
Ryc. 6. Schemat III etapu badań dotyczącego wpływu na fibroblasty Hs680 różnych podłoży hodowlanych: szkiełka hodowlanego (ctr), membran polilaktydu (pla), membran polilaktydu modyfikowanych witaminą K (pla-K) oraz naświetlania impulsową (I) wiązką promieniowania laserowego o mocy 100 mW i dawce 10 J/cm<sup>2</sup>/dolek oraz o mocy 200 mW i dawce 2 J/cm<sup>2</sup>/dolek.

#### 4.3. Charakterystyka biomateriałów

Do badań nad wpływem światła laserowego na fibroblasty i ich aktywność pobudzaną laserem biostymulującym użyte zostały polimery w postaci membrany z kopolimeru L/DL (20:80, L: DL), (kopolimer l-laktydu z poli-DL-laktydem) zwanego dalej pla (polilaktydem) oraz polimerowe membrany z pla, do których wprowadzono modyfikatory w postaci: witaminy E (1 % wagowy) i witaminy K (1 % wagowy). Kopolimer pla w postaci membrany został wprowadzony jako materiał/podłoże pozwalające na powolne/stopniowe uwalnianie witamin z membrany w trakcie hodowli komórek podczas trwania eksperymentu.

Materiał na bazie medycznego kopolimeru L/DL-laktydu (atest Food and Drug Administration - FDA) otrzymano metodą inwersji fazowej. Wybrany do badań materiał został przebadany pod kątem bezpieczeństwa we wcześniejszych badaniach jako potencjalny opatrunek, implant w sterowanej regeneracji tkanek GTR (ang. *guided tissue regeneration*) (Mas i wsp., 2016). W badaniach wykorzystano kopolimer pla o masie cząsteczkowej 200 kDa. Zastosowano metodę formowania, która pozwoliła na uzyskanie membran o porowatości na poziomie 45-50 % i średnim rozmiarze porów 5-25 μm (Ryc. 7). Taka mikrostruktura membrany wpływa korzystnie na komórki tkanki łącznej

skóry (min. fibroblasty, makrofagi). Zakłada się, że opisana porowatość powinna wspomagać procesy związane z uwalnianiem czynników aktywujących procesy regeneracyjne skóry. Dodatkowo materiał membranowy PLA charakteryzuje się grubością 180-260  $\mu\text{m}$ , zwilżalnością na poziomie 65° (materiał średnio hydrofilny) oraz relatywnie wysoką jak na materiały porowate wytrzymałością (12,5 MPa), co znacząco ułatwiło manipulowanie materiałem podczas eksperymentu.



Ryc. 7. Membrana polimerowa z polilaktonu (PLA). Obraz ze skaningowego mikroskopu elektronowego.

Jako materiał referencyjny (kontrolny) była wykorzystana membrana polimerowa PLA pozbawiona funkcji nośnika (porowata, niemodyfikowana żadną z witamin). Wstępne badania nad wpływem lasera biostymulującego na porowatą membranę z PLA potwierdziły, że tak przygotowane membrany nie ulegają degradacji pod wpływem działania lasera w zakresie światła czerwonego i podczerwonego, nie odnotowano żadnych zmian zarówno w zakresie fizykochemii materiału (zwilżalność, mikrostruktura, energia powierzchniowa) jak i w zakresie struktury: badania spektroskopowe FTIR (ang. *Fourier transform infrared spectroscopy*), badania termiczne TG/DSC (ang. *thermogravimetric/differential scanning calorimetry*). Biomateriały wykorzystane w eksperymentach uzyskiwane były w ramach współpracy naukowej z laboratorium Katedry Biomateriałów i Kompozytów Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki, Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie.

#### 4.4. Sterylizacja biomateriałów

Membrany PLA użyte do badań były sterylizowane poprzez naświetlanie promieniowaniem UV przez 20 minut z każdej strony materiału. Następnie krążki były umieszczane w 24 dołkowej płytce hodowlanej (Nest SB, USA).

#### **4.5. Badanie morfologii fibroblastów**

Część badanych próbek (po dwie z każdej serii) przeznaczono do obserwacji morfologii hodowanych na nich fibroblastów. Przylegające do podłoża komórki były barwione przez pół minuty 0.5 % fioletem krystalicznym (Sigma, USA), a następnie przepłukiwane wodą. Obserwacje morfologii komórek (kształt komórek, liczba i długość wypustek oraz sposób ich wzrostu) zostały przeprowadzone za pomocą mikroskopu (Motic AE-2000T, Niemcy) przy powiększeniu 40x. Zdjęcia komórek zostały wykonane kamerą mikroskopową Moticom-BTU8 (Motic Europe, Spain).

#### **4.6. Badanie przylegania komórek (test CV)**

Ponieważ fibroblasty są komórkami przylegającymi do podłoża (jest to warunek ich wzrostu i proliferacji) ich przyleganie do badanych materiałów zostało zbadane za pomocą testu wchłaniania fioletu krystalicznego (CV). Komórki przylegające do podłoża zostały utrwalone w 2 % paraformaldehydzie (PF) przez 5 minut (Sigma - Aldrich, Niemcy), wybarwione 0.5 % fioletem krystalicznym rozpuszczonym w H<sub>2</sub>O przez 5 minut (Sigma - Aldrich, Niemcy) a następnie przepłukane 3 x 1 minutę wodą. Barwnik pochłonięty przez komórki został wyekstrahowany przez dodanie do każdego dołka hodowlanego 0,5 ml 100 % metanolu (Linegal Chemicals, Polska). Gęstość optyczną (O.D.) płynu zmierzono przy długości fali 570 nm za pomocą czytnika FLUOstar Omega (BMG Labtech, Niemcy).

#### **4.7. Badanie żywotności komórek (test ViaLight)**

Żywotność fibroblastów Hs680 została zbadana przy użyciu testu luminescencyjnego z wykorzystaniem gotowego zestawu odczynników Vialight (Lonza, Szwajcaria). Działanie testu Vialight opiera się na luminescencyjnej detekcji ATP, które jest obecne we wszystkich metabolicznie aktywnych komórkach. Metoda bioluminescencyjna wykorzystuje aktywność enzymu lucyferazy katalizującej reakcję rozkładu ATP do AMP przy obecności lucyferyny. W reakcji tej energia rozkładu jest emitowana w postaci światła, którego ilość jest proporcjonalna do ilości ATP i jednocześnie proporcjonalna do liczby żywych komórek. Zanim wykonano test, wszystkie odczynniki doprowadzono do temperatury pokojowej. Z dołków z komórkami odebrano nasącz z nad hodowli pozostawiając w dołkach po 400 µl pożywki hodowlanej. Następnie do każdego dołka dodano po 200 µl lizera Cell Lysis Reagent, po czym po 10 minutach inkubacji przełożono 200 µl mieszaniny nasączu z lizerem do białej 96-dołkowej płytki (Nest SB, USA) dodając następnie 200 µl odczynnika AMR PLUS. Po upływie 2 minut oznaczono

ilość wyemitowanego promieniowania przy pomocy czytnika FLUOstar Omega (BMG Labtech, Niemcy).

#### **4.8. Badanie cytotoksyczności (test ToxiLight)**

Przy użyciu zestawu odczynników Toxilight (Lonza, Szwajcaria), wykrywającego aktywność kinazy adenylowej AK w nadsączu zebranym z hodowli komórkowych oznaczono ewentualny cytotoksyczny wpływ naświetlania laserem i witamin względem fibroblastów. Kinaza adenylowa jest enzymem, który jest obecny w żywych komórkach i który jest uwalniany przez ginące komórki do pożywki hodowlanej. Aktywność uwolnionej AK jest proporcjonalna do ilości uszkodzonych/martwych w hodowli komórek. Reakcja ta przebiega dwuetapowo: w pierwszej kolejności dodanie ADP do pożywki zawierającej enzym AK powoduje powstanie ATP a następnie w drugim etapie enzym lucyferaza rozkłada ATP w obecności lucyferyny do AMP. Energia powstała w wyniku rozkładu ATP emitowana jest w postaci światła a jego ilość jest proporcjonalna do ilości ATP, a w konsekwencji do ilości uwolnionej z komórek AK. Przed wykonaniem testu wszystkie odczynniki doprowadzono do temperatury pokojowej. Z dołków z komórkami pobrano po 20  $\mu$ l nadsączu z hodowli komórek a następnie przełożono go do białej 96-dołkowej płytki (Nest SB, USA). Następnie do każdego dołka dodano po 100  $\mu$ l roztworu AK Detection Reagent po czym po 5 minutach inkubacji przy pomocy czytnika FLUOstar Omega (BMG Labtech, Niemcy) przeprowadzono odczyt luminescencji.

#### **4.9. Test „gojenia rany”**

Aby wykonać test „gojenia rany” fibroblasty były hodowane w 24 dołkowych płytkach hodowlanych, w których zostały umieszczone inserty (IBIDI<sup>®</sup>, Martinsried, Niemcy) z określoną (500  $\mu$ m) przerwą bezkomórkową. Inserty te są wykonane z biokompatybilnego silikonu, który umożliwia idealne przyleganie do podłoża płytki (bez użycia kleju) (Pitzurra i wsp., 2020). W dołkach płytki z insertami umieszczono komórki w liczbie 0,01 mln komórek/ml. Komórki inkubowano z insertami przez noc. Następnie usuwano inserty a komórki przepłukiwano pożywką hodowlaną w celu usunięcia komórek, które nie przylgnęły do podłoża. Następnie do komórek dodawano 1 ml świeżej pożywki hodowlanej. Komórki naświetlano wiązką promieniowania laserowego aplikowaną w sposób impulsowy (I) o częstotliwości 100 Hz z 50 % współczynnikiem wypełnienia. Promieniowanie laserowe było aplikowane 1 raz na dobę (co 24 h) - 2, 4, 6 razy. Eksperyment był kończony odpowiednio w 3 (2 aplikacje lasera), 5 (4 aplikacje lasera),

7 (6 aplikacji lasera) dniu hodowli. Zarastanie wolnej przestrzeni przez komórki zostało ocenione za pomocą mikroskopu odwróconego (Motic AE-2000T, Niemcy) i sfotografowane przy powiększeniu 40x, za pomocą kamery mikroskopowej Moticam-BTU8 (MoticEurope, Spain).

#### **4.10. Oznaczenie poziomu wydzielanego białka - test BCA**

Test BCA służy do oznaczania ilości białka znajdującego się w nadsączach zebranych znad hodowli komórkowej. Do dołków płytki 96-studzienkowej (Nest SB, USA) przeniesiono po 10  $\mu$ l badanych próbek i dodano 200  $\mu$ l mieszaniny (w stosunku 1:50) siarczanu miedzi II (CS II) (Sigma - Aldrich, Niemcy) oraz kwasu bicynchoninowego (BCA) (Sigma-Aldrich, Niemcy). W następnym kroku płytki inkubowano przez 30 min w (ciemności) po czym zmierzono absorbancję wykorzystując czytnik FLUOstar Omega (BMG Labtech, Niemcy). Pomiaru O.D. (ang. *optical density*) dokonano przy długości fali 570 nm.

#### **4.11. Oznaczenie poziomu wydzielanego tlenu azotu - test Griessa**

Test Griessa służy do pomiaru ilości NO znajdującego się w nadsączach zebranych znad hodowli komórek. Do dołków 96-studzienkowej płytki (Nest SB, USA) przeniesiono 100  $\mu$ l nadsącza znad komórek, po czym dodano 100  $\mu$ l mieszaniny (odczynniki zmieszane w stosunku 1:1) odczynników Griessa A (1 % sulfamid w 5 % kwasie fosforanowym) (Sigma - Aldrich, Niemcy) i B (0,1 % naftylenediamina w H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Sigma - Aldrich, Niemcy) Po upływie 5 minut przy użyciu czytnika FLUOstar Omega (BMG Labtech, Niemcy) zmierzono absorbancję O.D. przy długości fali 540 nm.

#### **4.12. Oznaczenie poziomu wydzielanych metaloproteinaz**

Pomiar poziomu wydzielanych przez komórki metaloproteinaz (w formie nieaktywnego prekursora enzymu i formie aktywnej) dokonano metodą zymografii żelatynowej, która jest zmodyfikowaną metodą elektroforetyczną pozwalającą na pomiar aktywności proteolitycznej enzymów, których substrat można inkorporować w żelu poliakrylamidowym z dodatkiem SDS (siarczanu dodecyłu sodu). Metoda ta pozwala na wykrycie poziomu prometaloproteinaz 9 (pro-MMP-9) i 2 (pro-MMP-2), oraz metaloproteinaz 9 (MMP-9) oraz 2 (MMP-2) (Kończowska i wsp., 2006).

W pierwszej kolejności przygotowano roztwory żelu rozdzielającego (10 %) i żelu zagęszczającego (4 %) o następujących składach. Żelu rozdzielający: akrylamid 30 %



- bisakrtylamid 0.8 % (Bio - Rad, USA) - 3495  $\mu$ l; Tris-HCl 1.5M, pH=8.8 (Bio - Rad, USA) - 2625  $\mu$ l; SDS 20 % (Sigma - Aldrich, Niemcy) - 52.5  $\mu$ l; glicerol 66 % (Sigma - Aldrich, Niemcy) - 1200  $\mu$ l; Żelatyna 1 % (Sigma - Aldrich, Niemcy) - 3105  $\mu$ l; TEMED (Bio - Rad, USA) - 7.05  $\mu$ l; APS (nadsiarcezan amonu) 20 % (Sigma - Aldrich, Niemcy) - 17.4  $\mu$ l. Żel zagęszczający: akrylamid 30 % - bisakrtylamid 0.8 % (Bio - Rad, USA) - 845  $\mu$ l; Tris - HCl 1.5M, pH=8.8 (Bio - Rad, USA) - 1275  $\mu$ l; SDS 20 % (Sigma - Aldrich, Niemcy) - 25.5  $\mu$ l; glicerol 66 % (Sigma - Aldrich, Niemcy) - 1145  $\mu$ l; dH<sub>2</sub>O - 1700  $\mu$ l; TEMED (Bio - Rad, USA) - 5.1  $\mu$ l; APS (nadsiarcezan amonu) 20 % (Sigma - Aldrich, Niemcy) - 7  $\mu$ l.

Katalizatory polimeryzacji (TEMED, APS) były dodane bezpośrednio przed wylaniem żeli pomiędzy szyby ze szlifem. Jako pierwszy wylano żel rozdzielający z pozostawieniem wolnej przestrzeni na żel zagęszczający, w którym po wylaniu umieszczone zostały grzebienie na studzienki. Po zastygnięciu (około 1 h) żele zostały umieszczone na 12 h w temperaturze 4°C. W celu przeprowadzenia ilościowej analizy poziomu białka w próbkach został przeprowadzony test BCA (zob. rozdział 4.10). Na podstawie otrzymanych wyników w badanych próbkach dokonana została normalizacja poziomu białka według wzoru:

$$[\text{O.D. próbki o najmniejszej wartości/O.D. danej próbki}] * 30 = x \text{ ml próbki}$$

gdzie: x oznacza objętość badanej próbki, która została dopełniana roztworem soli fizjologicznej do objętości 30  $\mu$ l.

Do dalszych analiz używane były próbki o jednakowej zawartości białka. Następnie do 30  $\mu$ l każdej próbki dodano 15  $\mu$ l buforu (ang. *loading buffer*) o składzie: 500  $\mu$ l roztworu Tris - HCl 0.5 M, pH = 6.8; 250  $\mu$ l SDS 40 %; 312  $\mu$ l glicerolu 66 %; 60  $\mu$ l bromofenolu (Bio - Rad, USA) oraz kroplę glicerolu w celu obciążenia próbki a następnie tak przygotowane próbki mieszano przy pomocy Vortexu (BioSan, Łotwa) i inkubowano w temperaturze 37°C przez 15 minut. Tuż przed rozpoczęciem elektroforezy wyciągnięto grzebienie z żelu zagęszczającego, natomiast szyby z żelami zostały umieszczone w aparacie do elektroforezy (Bio - Rad, USA). W kolejnym kroku do aparatu został wlany schłodzony bufor rozdzielający o składzie: 3 g Tris, 14.36 g glicyny, 5 ml SDS 20 % oraz 1000 ml wody destylowanej. Do pierwszej studzienki nałożono 10  $\mu$ l standardu białkowego o szerokim zakresie białek (podbarwionego SDS - PAGE; Bio - Rad, USA), a do pozostałych po 15  $\mu$ l badanych próbek. Pierwsze 10 minut prowadzono elektroforezę przy napięciu 120 V (pozwoliło to na ustawienie się próbek w linii na granicy żelu zagęszczającego i rozdzielającego) po czym podwyższono napięcie do 200 V. Elektroforezę

proszono przez 45 minut. Po zakończeniu elektroforezy, zostały ściągnięte żele, które następnie płukano (na wytrząsarce Elpan, Polska) dwukrotnie po 15 minut w 2.5 % roztworze Triton X - 100 (Bio - Rad, USA) w celu odpłukania SDS. Po tym czasie żele umieszczono w buforze inkubacyjnym o składzie: 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris - HCl o pH=8; 0.02 % NaN<sub>3</sub> 1 μM ZnSO<sub>4</sub> (wszystkie z Sigma - Aldrich, Niemcy) i inkubowane przez dobę na łaźni wodnej w temperaturze 37°C. Po tym czasie żele barwiono w 0.5 % roztworze błękitu kumazyny (ang. *brillant blue*) (Sigma - Aldrich, Niemcy), a następnie odbarwiano w roztworze odbarwiającym (ang. *equili bratang buffer*) do momentu uwidocznienia się jasnych prążków. Ostatnim etapem było wykonanie zdjęć żeli dzięki systemowi do dokumentacji Syngene Ingenius Bio Imaging. Do analizy otrzymanych skanów wykorzystano programy GeneSnapSynGene i GeneToolsSynGene. Obecność żelatynaz została stwierdzona na podstawie mas molekularnych odbarwionych prążków, odczytanych ze standardu białkowego.

#### **4.13. Oznaczenie poziomu wydzielanych cytokin**

Poziomy cytokin w nadsączach z nad hodowli oznaczano metodą cytometrii przepływowej oraz zestawów Flex Set (CBA) zgodnie z instrukcją producenta (Cytometric Bead Array, BD Biosciences, USA). W skrócie, 50 μl każdej próbki badanej i próbek pochodzących z seryjnych rozcieńczeń standardów było inkubowane przez godzinę z mikrokulkami sprzężonymi z multipleksowanymi przeciwciałami. Zastosowany został *Humane Inflammation Kit* (BD Biosciences, USA), który pozwala na równoczesne oznaczenie poziomu 6 cytokin: interleukiny (IL-1β), interleukiny 6 (IL-6), interleukiny 8 (IL-8), interleukiny 10 (IL-10), interleukiny 12p70 (IL-12p70) oraz czynnika martwicy nowotworu (TNF-α), istotnych dla przebiegu procesu gojenia ran. Technika CBA polega na pomiarze średniej wartości fluorescencji znacznika sprzężonego z daną grupą mikrokulek oraz różnicy intensywności fluorescencji po inkubacji materiału z przeciwcytokinowymi swoistymi przeciwciałami monoklonalnymi, sprzężonymi z fikoerytryną (PE, ang. *phycoerythrin*). Aby jednocześnie wykryć w badanej próbce obecność 6 cytokin stosuje się mieszaninę 6 typów mikrokulek, a różnice w intensywności fluorescencji każdego typu mikrokulek pozwalają na zidentyfikowanie danej cytokiny. Obecność danej cytokiny w próbce zostaje stwierdzona na podstawie podwójnego sygnału dla FL-3 i FL-2.

W pierwszej kolejności do każdej ependorfy (Nest SB, USA) zawierającej standard, próbkę lub kontrolę dodano po 50 μl roztworu zawierającego mieszaninę kuleczek pokrytych przeciwciałami skierowanymi przeciwko każdej z 6 analizowanych cytokin,

w następnym kroku procedury do ependorf dodano standardy lub próbki, a do kontroli negatywnej dodano rozcieńczalnik (ang. *assay diluent*). Następnie do wszystkich ependorf dodano po 50 µl sprzężonych z PE przeciwciał skierowanych przeciwko każdej z 6 cytokin, następnie próbki inkubowano w ciemności przez 2 godziny, w temperaturze pokojowej (RT). Po tym czasie do każdej próbki dodano po 1 ml buforu płuczącego i próbki zwirowano (200 g, 5 min, RT). Za pomocą pipety zebrano nadsącz z nad peletów i do każdej próbki dodano po 300 µl buforu płuczącego po czym próbki przeniesiono do nowych ependorf (Nest SB, USA), w których wykonano pomiary na cytometrze. Kalibracji cytometru przepływowego dokonano używając BD CaliBRITE™Beads, tj. mikrokulek opłaszczonych FITC - izotiocyjanian fluoresceiny (FL-1), PE (FL-2) i PerCp - peridinin - chlorofil (FL-3). W następnej kolejności dokonano kalibracji urządzenia przy pomocy programu CytExpert Software dla platformy CytoFLEX z *Humane Inflammation Kit* z użyciem pozytywnych kontroli dla detektorów FITC i PE. Analizy danych i określenie stężeń cytokin przeprowadzono w programie Microsoft Excel przy wykorzystaniu krzywych standardowych, którą wykonano na podstawie kolejnych rozcieńczeń standardu. Maksymalne stężenie standardu cytokin wynosiło 5000 pg/ml, kolejne seryjne rozcieńczenia wykonano w rozcieńczalniku (ang. *assay diluent*) odpowiednio 1:2, 1:4, 1:8, skończywszy na rozcieńczeniu 1:256 co odpowiada stężeniu cytokin 20 pg/ml.

#### **4.14. Pomiar potencjału oksydacyjnego – test PerOx (TOS/TOC)**

Całkowity stan oksydacyjny TOS (ang. *total oxidative status*) komórek określono poprzez pomiar całkowity poziomów nadtlenków lipidów zgodnie z protokołem zestawu PerOx (TOS/TOC) (Immunodiagnostik AG, Bensheim, Niemcy). Poziomy nadtlenków w badanych próbkach nadsączu z nad hodowli komórek określono na podstawie reakcji peroksydazy chrzanowej z dwuchlorkiem tetrametylobenzydyny (TMB) w obecności nadtlenku wodoru. Reakcja z enzymem daje rozpuszczalny produkt o niebieskim zabarwieniu. Reakcję enzymatyczną przerywa się dodając 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, co prowadzi do zmiany koloru roztworu na żółty. Do studzienek 96-dołkowej płytki zamieszczonej w zestawie ImAnOx dodano po 10 µl kalibratora (CAL), kontroli CTRL1, CTRL2 (odczynniki obecne w zestawie) lub badanej próbki. Jako blank posłużył odczynnik RECSOL w objętości 10 µl (odczynnik obecny w zestawie). Następnie do wszystkich dołków płytek dodano po 100 µl gotowego buforu (Reabuf A), po czym dokonano pierwszego odczytu płytki przy długości fali 450 nm przy użyciu czytnika FLUOstar Omega (BMG Labtech, Niemcy). Następnie do wszystkich dołków dodano po

100 µl mieszaniny buforów (RBF) a następnie inkubowano płytkę przez 15 min, w 37 °C. Po tym czasie do każdego dołka dodano po 50 µl odczynnika stop solution (STOP) i dokonano II odczytu płytki przy długości fali 450 nm przy użyciu czytnika FLUOstar Omega (BMG Labtech, Niemcy). Na podstawie zmierzonych wartości absorbancji z I i II odczytu przy długości fali 450 nm (czytnik FLUOstar Omega (BMG Labtech, Niemcy) określono całkowity poziom nadtlenków [µmol/l] w badanych próbkach nadsącza znad hodowli komórek zgodnie ze wzorem podanym przez producenta (Immunodiagnostik AG, Bensheim, Niemcy).

Wzór:

Stężenie próbki [µmol/l] = O.D. próbki – OD blanku / O.D. kalibratora – O.D. blanku x stężenie kalibratora [µmol/l]

#### **4.15. Pomiar potencjału antyoksydacyjnego – test ImAnOx (TAS/TAC)**

Całkowity stan antyoksydacyjny TAS (ang. *total antioxidative status*) komórek określono w reakcji przeciwutleniaczy z wcześniej określoną (znaną) ilością egzogenego nadtlenku wodoru (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) zgodnie z protokołem gotowego zestawu ImAnOx (TAS/TAC) (Immunodiagnostik AG, Bensheim, Niemcy). W teście tym przeciwutleniacze reagują z nadtlenkiem, a ilość nieprzereagowanego H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> jest mierzona spektrofotometrycznie. Różnica między dodaną a zmierzoną ilością H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (w stosunku do kalibratora zamieszczonego w zestawie) jest proporcjonalna do aktywności przeciwutleniającej. Do studzienek 96-dołkowych płytek zamieszczonych w zestawie ImAnOx dodano po 10 µl kalibratora, kontroli CTRL1, CTRL2 (odczynniki obecne w zestawie) lub badanej próbki. Następnie do wszystkich dołków płytek dodano po 100 µl Reagenta 1, po czym płytki inkubowano przez 10 min w temperaturze 37°C. Po inkubacji do wszystkich dołków jednej płytki dodano 100 µl Reagenta 2a (z enzymem) natomiast do drugiej płytki Reagenta 2b (bez enzymu). Następnie obie płytki inkubowano przez 5 min w temperaturze pokojowej. Po tym czasie do wszystkich dołków obu płytek dodano po 50 µl odczynnika stop solution. Na podstawie zmierzonych wartości przy długości fali 450 nm absorbancji w dołkach obu płytek (czytnik FLUOstar Omega (BMG Labtech, Niemcy) określono całkowity stan antyoksydacyjny w nadsączach znad hodowli komórek wyrażony w [µmol/l] zgodnie ze wzorem dostarczonym przez producenta zestawu (Immunodiagnostik AG, Bensheim, Niemcy).

Wzór:

Zdolność antyoksydacyjna próbki [ $\mu\text{mol/l}$ ] =  $392 - (392 - \text{stężenie kalibratora}) \times \text{OD próbki} / \text{O.D. kalibratora}$

## 5. Analiza statystyczna

Dane przedstawiono w postaci wartości średnich i błędów standardowych. Normalność rozkładów zweryfikowano na podstawie testu Shapiro-Wilka. Oceny jednorodności wariancji dokonano przy użyciu testu F. W przypadku spełnienia założeń testów parametrycznych różnice pomiędzy grupą kontrolną, a grupa badaną sprawdzono przy użyciu testu T-studenta natomiast w momencie niespełnienia założeń, przy wykorzystaniu nieparametrycznego testu U Manna-Whitneya. Różnice pomiędzy grupą kontrolną, a grupami badanymi porównano przy wykorzystaniu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA), a następnie do oceny *post-hoc* wykorzystano test Tukeya, w przypadku danych o rozkładzie normalnym (test Barletta) oraz o jednorodnej wariancji (test Brown-Forsyth). Przy braku założeń testu parametrycznego wykorzystano test Kruskalla-Wallis z oceną *post-hoc* testem Dunna. W analizach wyników przyjęto poziom istotności  $p \leq 0.05$ .

Do analizy statystycznej i graficznej wyników zastosowany został program Microsoft Excel 2007 i GraphPad 7 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## 6. Wyniki

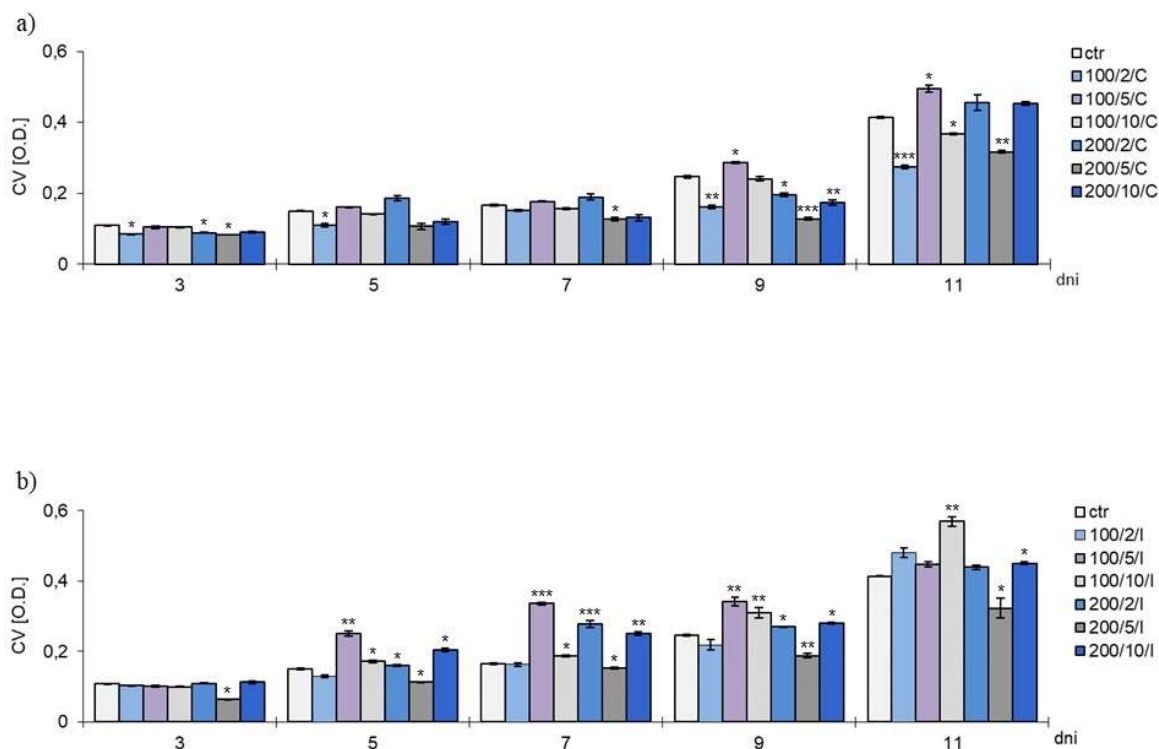
### 6.1. Wpływ działania niskoenergetycznego promieniowania laserowego na fibroblasty

#### 6.1.1. Wpływ działania niskoenergetycznego promieniowania laserowego na przyleganie, proliferację i morfologię fibroblastów

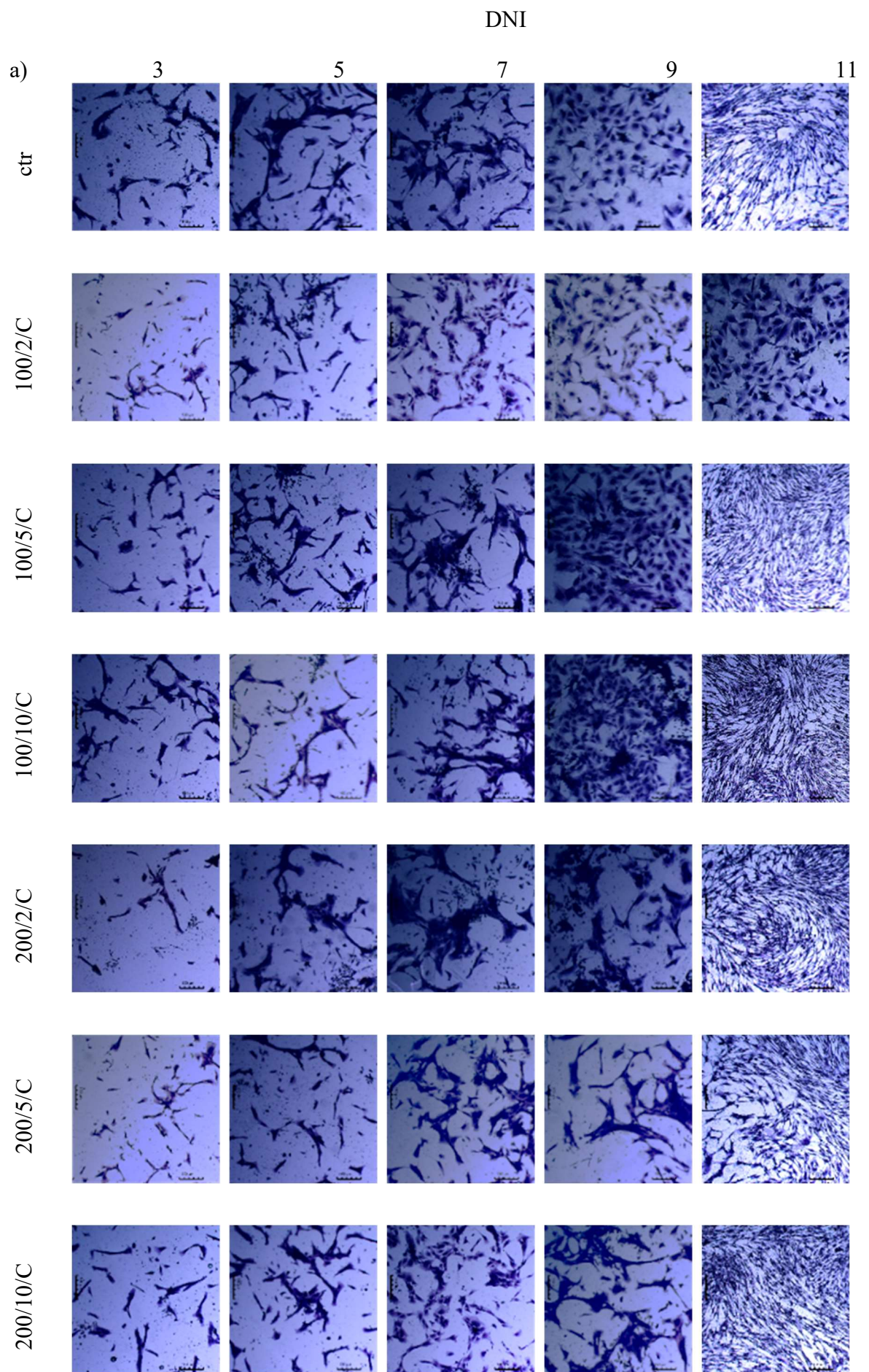
W kolejnych dniach eksperymentu fibroblasty w grupie kontrolnej, nienaświetlane (grupa ctr) dzieliły się, co skutkowało wzrostem liczby przylegających komórek w porównaniu do 3 dnia ich hodowli (Ryc. 8a, b). Działanie wiązką ciągłą lasera na morfologię i przyleganie fibroblastów wykazało, że jedynie w przypadku 8- i 10-krotnego naświetlania fibroblastów laserem, o mocy 100 mW i dawce 5 J/cm<sup>2</sup>/dołek (grupa 100/5/C) nastąpił wzrost przylegania komórek w porównaniu do komórek nienaświetlanych (grupa ctr) (Ryc. 8a). Z kolei 2-krotne naświetlanie wiązką ciągłą lasera o mocy 100 mW i dawce 2 J/cm<sup>2</sup>/dołek (grupa 100/2/C) oraz o mocy 200 mW i dawkach 2 i 5 J/cm<sup>2</sup>/dołek (grupy 200/2/C oraz 200/5/C) zmniejszyło liczbę komórek przylegających do podłoża (Ryc. 8a). Dalsze naświetlanie fibroblastów laserem o tych samych parametrach, spowodowało spadek przylegania komórek po 4-krotnej (grupa 100/2/C), 6-krotnej (grupa 200/5/C), 8-krotnej

(grupy 100/2/C, 200/2/C, 200/5/C) oraz 10-krotnej (grupy 100/2/C i 200/5/C) aplikacji wiązką promieniowania laserowego. Również w przypadku naświetlania fibroblastów laserem o mocy 100 i 200 mW oraz dawce 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek, 8-krotna (grupa 200/10/C) oraz 10-krotna (grupa 100/10/C) aplikacja wiązką promieniowania laserowego skutkowała spadkiem przylegania komórek (Ryc. 8a). Potwierdzeniem uzyskanych wyników jest obserwacja morfologii komórek, przedstawiająca spadek lub wzrost zagęszczenia komórek naświetlanych w odpowiednich dołkach hodowlanych w stosunku do komórek kontrolnych, nienaświetlanych (grupa ctr) (Ryc. 9a).

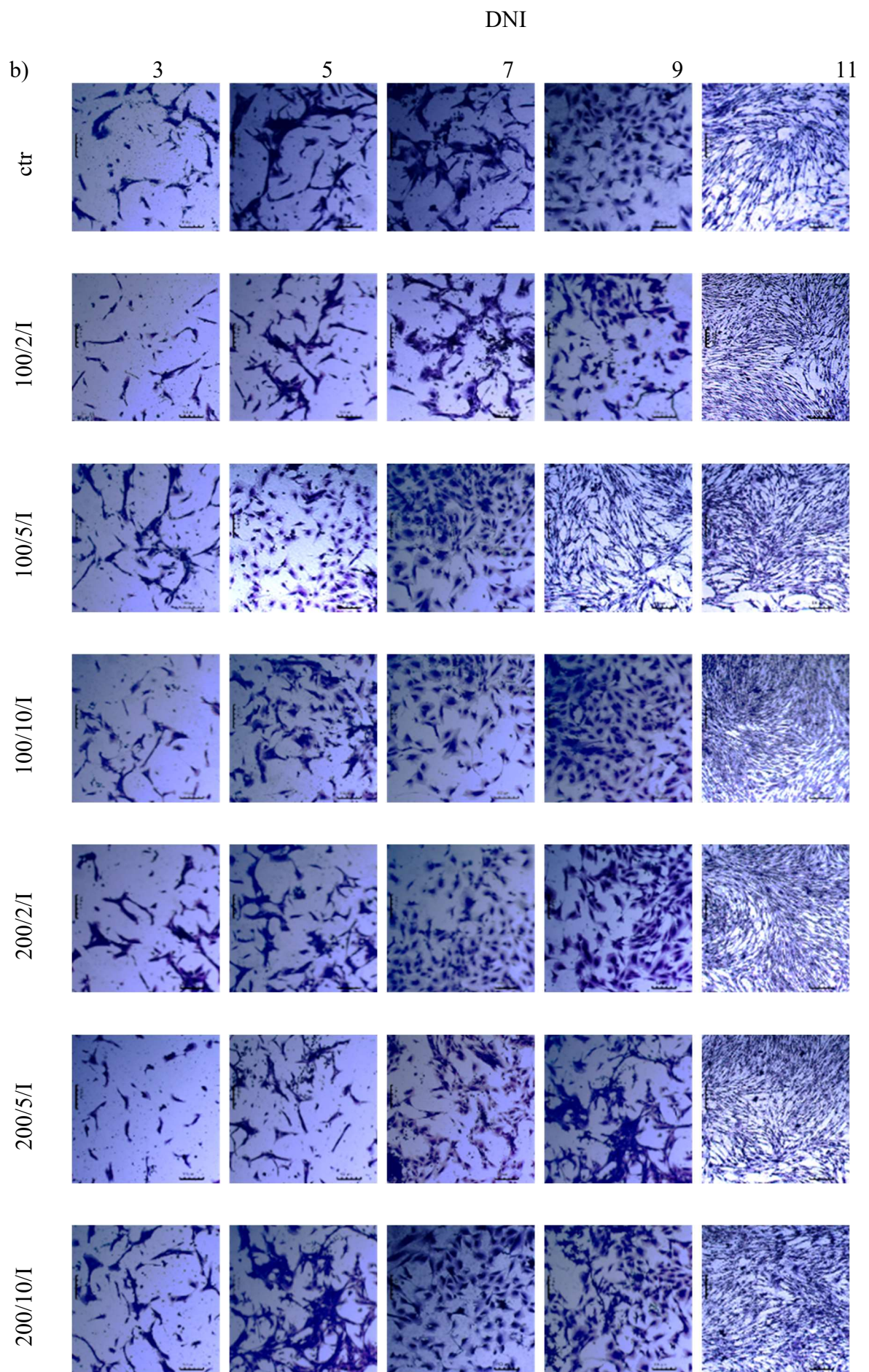
Naświetlanie 4-, 6-, oraz 8-krotne wiązką impulsową lasera o mocy 100 mW oraz dawkach 5 i 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek (grupa 100/5/I, 100/10/I) oraz mocy 200 mW i dawkach 2 i 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek (grupy 200/2/I oraz 200/10/I) spowodowało wzrost przylegania fibroblastów w porównaniu do grupy kontrolnej, nienaświetlanej (grupa ctr) (Ryc. 8b). Zwiększenie liczby naświetlań laserem o tych samych parametrach do 10 aplikacji, również skutkowało wzrostem przylegania komórek, ale tylko w przypadku komórek z grupy 100/10/I oraz 200/10/I (Ryc. 8b). Z kolei w przypadku fibroblastów naświetlanych wiązką promieniowania laserowego o mocy 200 mW i dawce 5 J/cm<sup>2</sup>/dołek zaobserwowano spadek przylegania komórek (grupa 200/5/I) (Ryc. 8b). We wszystkich badanych grupach, wyniki z przylegania komórek pozostają w zgodzie z zaobserwowanymi zmianami w morfologii fibroblastów. Zmiany te dotyczyły głównie wzrostu lub spadku zagęszczenia komórek naświetlanych oraz ilości tworzonych przez nie wypustek w stosunku do komórek kontrolnych, nienaświetlanych (grupa ctr) (Ryc. 9b).



Ryc. 8. Wpływ naświetlania ciągłą (C, 8a) i impulsową (I, 8b) wiązką promieniowania laserowego na przyleganie (CV) fibroblastów linii komórkowej Hs680. Komórki przez określoną liczbę dni były hodowane na szkiełkach i naświetlane laserem o mocy 100 lub 200 mW i dawkach promieniowania: 2, 5 lub 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek z komórkami. W kolejnych dniach eksperymentu (3, 5, 7, 9, 11) komórki barwiono filetem krystalicznym. *O.D.* – gęstość optyczna mierzono przy długości fali 570 nm. Wartości średnie ± odchylenie standardowe. \*, \*\*, \*\*\* – różnice pomiędzy fibroblastami naświetlanymi wiązką promieniowania laserowego o różnych parametrach a fibroblastami niepoddawanyymi naświetlaniu (ctr) (\* dla  $p < 0.05$ , \*\* dla  $p < 0.01$ , \*\*\* dla  $p < 0.001$ ).





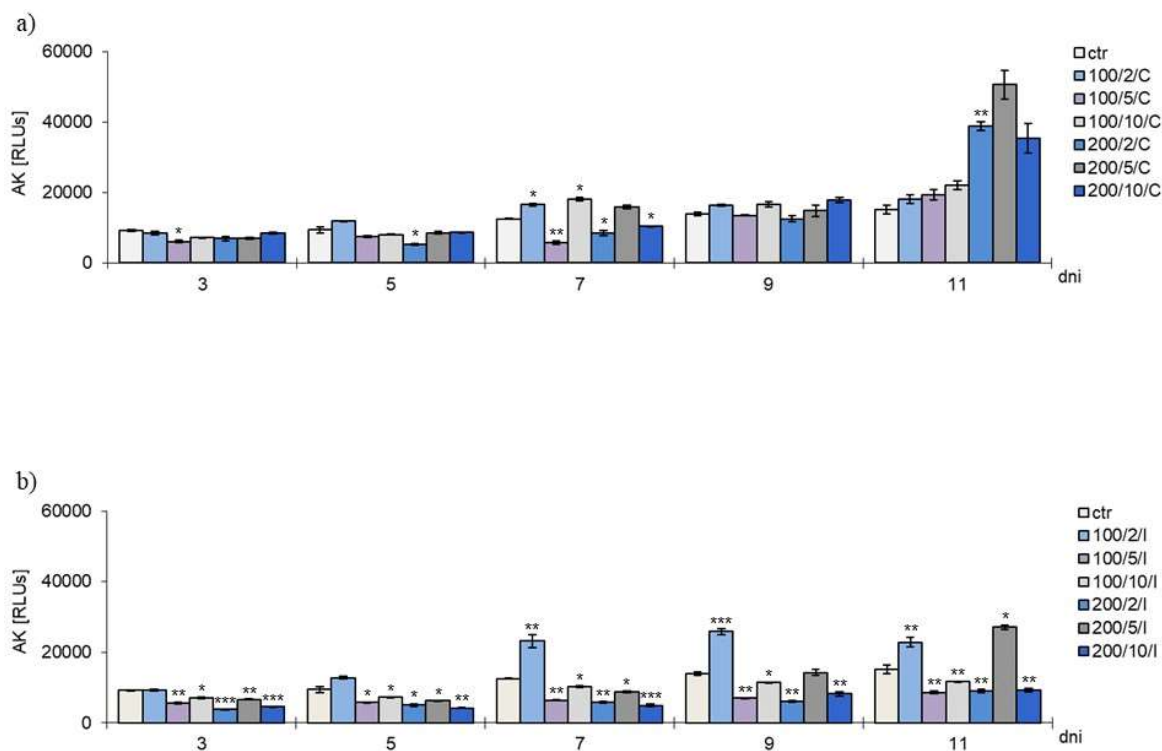


Ryc. 9. Wpływ naświetlania ciągłą (C, 9a) i impulsową (I, 9b) wiązką promieniowania laserowego na morfologię fibroblastów linii komórkowej Hs680. Komórki przez określoną liczbę dni były hodowane na szkiełkach i naświetlane laserem o mocy 100 lub 200 mW w dawkach promieniowania: 2, 5 lub 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek z komórkami, ctr - fibroblasty niepoddawane naświetlaniu. W kolejnych dniach eksperymentu (3, 5, 7, 9, 11) komórki barwiono filetem krystalicznym. Analiza w mikroskopie świetlnym, powiększenie 40x, skala 100 μm.

### **6.1.2. Wpływ działania niskoenergetycznego promieniowania laserowego na poziom uwalnianej przez fibroblasty kinazy adenylowej (AK)**

6-krotne działanie wiązką ciągłą lasera o mocy 100 mW i dawkach 2 i 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek (grupy 100/2/C oraz 100/10/C) spowodowało wzrost poziomu uwalnianej z fibroblastów AK, w porównaniu do grupy kontrolnej, nienaświetlanej (grupa ctr) (Ryc. 10a). Z kolei 2- i 6-krotne naświetlanie fibroblastów wiązką ciągłą lasera o tej samej mocy 100 mW, ale dawce 5 J/cm<sup>2</sup>/dołek spowodowało spadek poziomu uwalnianej z komórek AK (grupa 100/5/C) (Ryc. 10a). Również 4- (grupa 200/2/C) oraz 6-krotne (grupy 200/2/C i 200/10/C) naświetlanie wiązką ciągłą lasera o mocy 200 mW i dawkach 2 i 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek spowodowało spadek uwalniania z fibroblastów AK w porównaniu do grupy kontrolnej, nienaświetlanej (grupa ctr) (Ryc. 10a). Dalsze naświetlanie komórek spowodowało wzrost poziomu uwalnianej AK, ale tylko w przypadku 10-krotnego naświetlania komórek laserem o mocy 200 mW i dawce 2 J/cm<sup>2</sup>/dołek (grupa 200/2/C) (Ryc. 10a).

Działanie na fibroblasty wiązką impulsową lasera o mocy 100 mW i dawkach 5 i 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek (grupa 100/5/I oraz 100/10/C) spowodowało spadek uwalniania z komórek AK, w porównaniu do komórek kontrolnych, nienaświetlanych (Ryc. 10b). Również działanie taką samą impulsową wiązką promieniowania laserowego, ale o mocy 200 mW i dawkach 2 i 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek (grupy 200/2/I oraz 200/10/I) wywołało spadek uwalniania przez komórki AK w porównaniu do nienaświetlanej grupy kontrolnej (grupa ctr) (Ryc. 10b). Spadek uwalniania AK spowodowało także 2-, 4-, 6- krotne naświetlanie komórek laserem o mocy 200 mW i dawce 5 J/cm<sup>2</sup>/dołek (grupa 200/5/I) (Ryc. 10b). Jednakże dalsze 10-krotne naświetlanie komórek tymi samymi parametrami lasera (grupa 200/5/I) spowodowało wzrost uwalniania z fibroblastów AK w porównaniu do nienaświetlanych, komórek kontrolnych (grupa ctr) (Ryc. 10b). Podobny efekt wzrostu poziomu uwalnianej z komórek AK spowodowało także 6-, 8-, 10- krotne naświetlanie fibroblastów laserem o mocy 100 mW i dawce 2 J/cm<sup>2</sup>/dołek (grupa 100/2/I) (Ryc. 10b).



Ryc. 10. Wpływ naświetlania ciągłą (C, 10a) i impulsową (I, 10b) wiązką promieniowania laserowego na poziom uwalnianej kinazy adenylowej (AK) przez fibroblasty linii komórkowej Hs680. Komórki przez określoną liczbę dni były hodowane na szkiełkach i naświetlane laserem o mocy 100 lub 200 mW i dawkach promieniowania: 2, 5 lub 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek z komórkami. Poziom AK mierzono w kolejnych dniach eksperymentu (3, 5, 7, 9, 11). *RLUs* – jednostka strumienia świetlnego lumenometru. Wartości średnie ± odchylenie standardowe. \*, \*\*, \*\*\* – różnice pomiędzy fibroblastami naświetlanymi wiązką promieniowania laserowego o różnych parametrach a fibroblastami niepoddawany naświetlaniu (ctr) (\* dla  $p < 0.05$ , \*\* dla  $p < 0.01$ , \*\*\* dla  $p < 0.001$ ).

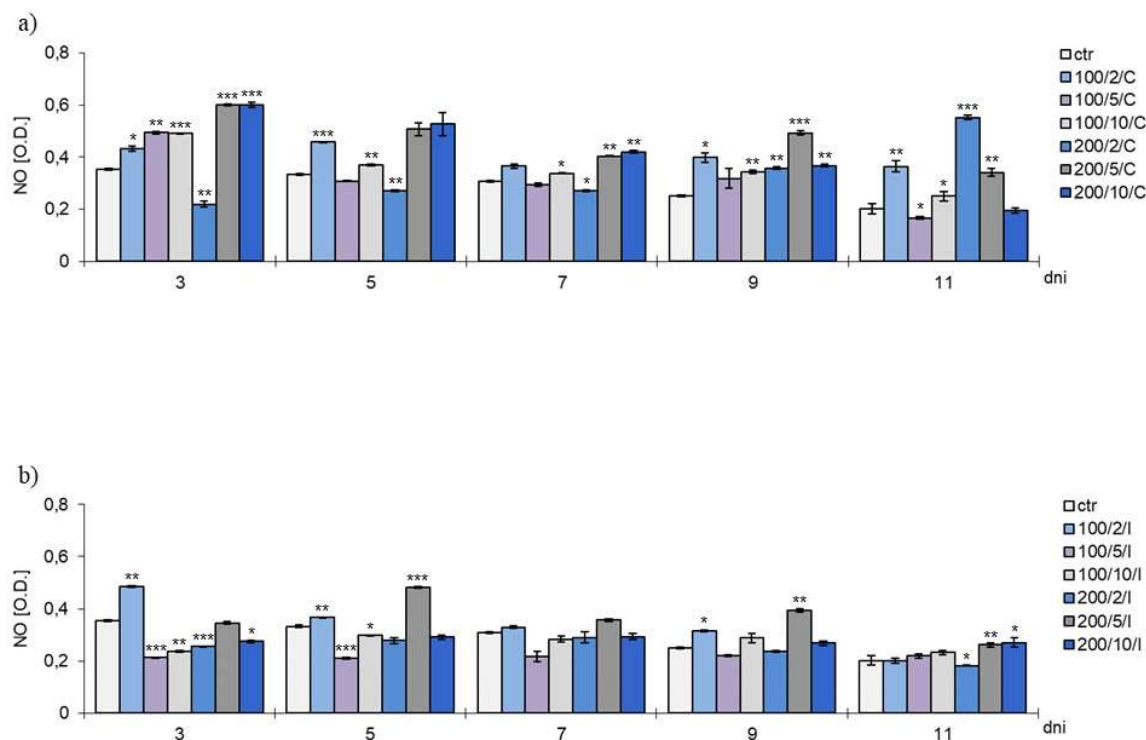
### **6.1.3. Wpływ działania niskoenergetycznego promieniowania laserowego na poziom wydzielanego przez fibroblasty NO**

W przypadku 2-krotnej aplikacji wiązką ciągłą lasera o mocy 100 mW i dawkach 2 i 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek (grupy 100/2/C, 100/10/C) oraz o mocy 200 mW i dawkach 5 i 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek (grupy 200/5/C oraz 200/10/C) stwierdzono wzrost wydzielania NO przez fibroblasty w stosunku do grupy kontrolnej, nienaświetlanej (grupa ctr). Dalsze naświetlanie komórek, tymi samymi parametrami lasera skutkowało wzrostem wydzielania NO w wybranych punktach czasowych eksperymentu: grupa 100/2/C (w 5, 9, 11 dniu), grupa 100/10/C (w 5, 7, 9 i 11 dniu), grupa 200/5/C (w 7,9 i 11 dniu) oraz grupa 200/10/C (w 7 i 9 dniu) hodowli komórek (Ryc. 11a). Również w przypadku 2-krotnego naświetlania fibroblastów laserem o mocy 100 mW i dawce 5 J/cm<sup>2</sup>/dołek (grupa 100/5/C) stwierdzono wzrost wydzielania NO, natomiast dalsze 10-krotne naświetlanie komórek tymi samymi parametrami lasera skutkowało spadkiem wydzielania NO przez fibroblasty w stosunku do grupy kontrolnej, nienaświetlanej (grupa ctr). (Ryc. 11a). Również 2-, 4-, 6-krotne naświetlanie fibroblastów wiązką promieniowania laserowego o mocy 200 mW i dawce 2 J/cm<sup>2</sup>/dołek (grupa 200/2/C) spowodowało spadek wydzielania NO przez fibroblasty, w porównaniu do grupy kontrolnej, nienaświetlanej (grupa ctr), (Ryc. 11a). W tym przypadku dalsze 8- i 10-krotne naświetlanie komórek spowodowało wzrost wydzielania NO (grupa 200/2/C) (Ryc. 11a).

Naświetlanie 2-, 4- oraz 8-krotne fibroblastów wiązką impulsową lasera o mocy 100 mW i dawce 2 J/cm<sup>2</sup>/dołek (grupa 100/2/I) spowodowało wzrost wydzielania NO w porównaniu do grupy komórek kontrolnych, nienaświetlanych (grupa ctr) (Ryc. 11b). Również naświetlanie komórek laserem o mocy 200 mW i dawce 5 J/cm<sup>2</sup>/dołek spowodowało wzrost wydzielania NO przez komórki poddane 4- i 8- i 10-krotnemu działaniu lasera (grupa 200/5/I) (Ryc. 11b). Z kolei 2- i 4-krotne naświetlanie komórek wiązką promieniowania laserowego o mocy 100 mW i dawkach 5 i 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek (grupy 100/5/I oraz 100/10/I) skutkowało spadkiem wydzielania NO w porównaniu do grupy kontrolnej, komórek niepoddawanych działaniu lasera (Ryc. 11b). Spadek wydzielania NO spowodowało także 2-krotne naświetlanie komórek laserem o mocy 200 mW i dawkach 2 i 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek (grupy 200/2/I oraz 200/10/I). Dalsze zwiększenie liczby aplikacji wiązką promieniowania laserowego o tych samych parametrach do 10 skutkowało spadkiem wydzielania NO (grupa 200/2/I) lub wzrostem wydzielania NO (grupa 200/10/I) w porównaniu do komórek nienaświetlanych (grupa ctr) (Ryc. 11b).

Uzyskane wyniki pozwoliły ocenić, które z zastosowanych parametrów lasera działały na komórki najkorzystniej, skutkując wzrostem zagęszczenia i przylegania

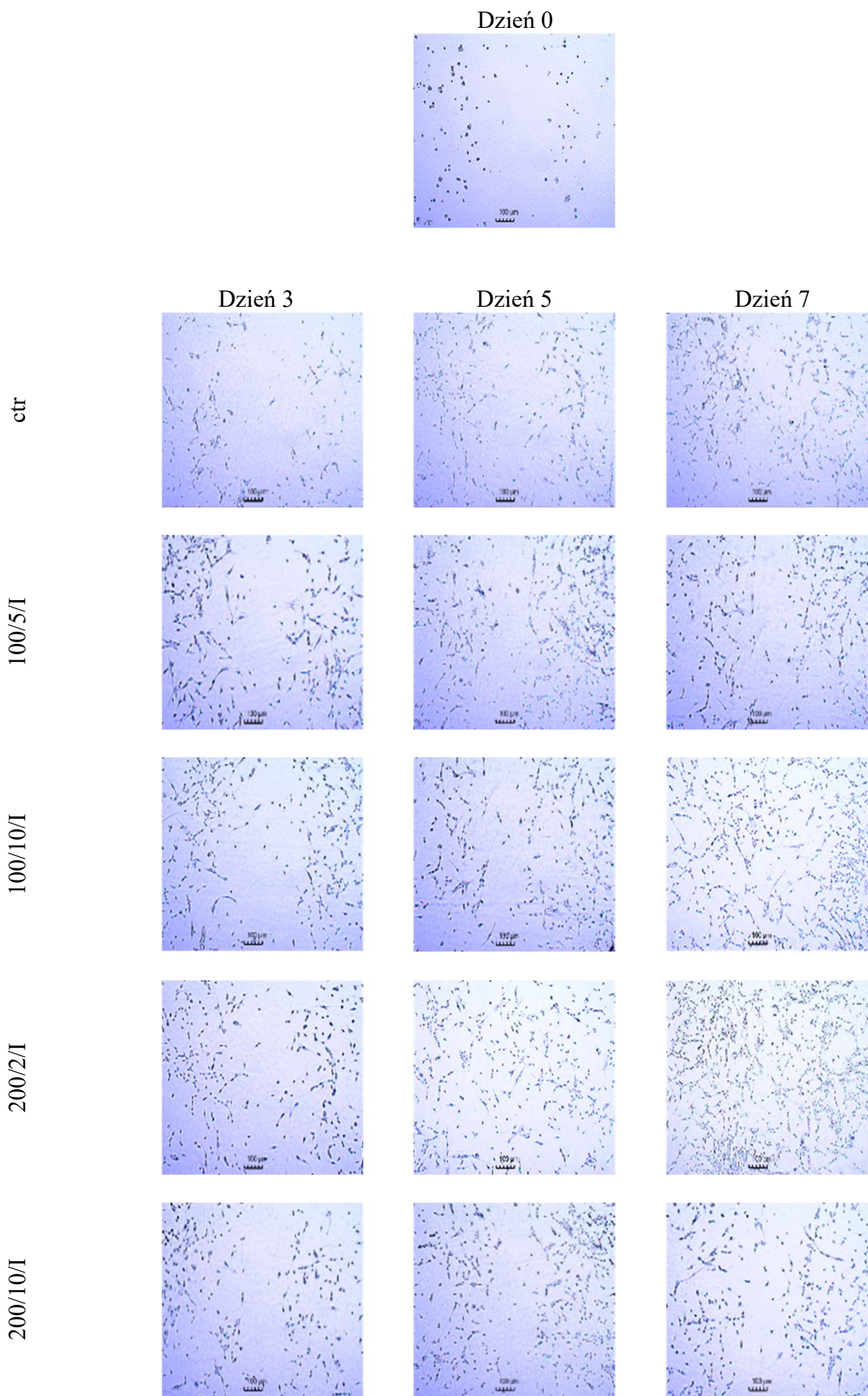
komórek oraz spadkiem wydzielania AK. Dlatego też, do dalszych badań wybrano naświetlanie wiązką impulsową lasera o mocy 100 mW i dawkach 5 i 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek oraz o mocy 200 mW i dawkach 2 i 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek. Badania kontynuowano w grupach: 100/5/I, 100/10/I oraz 200/2/I oraz 200/10/I.



Ryc. 11. Wpływ naświetlania ciągłą (C, 11a) i impulsową (I, 11b) wiązką promieniowania laserowego na poziom wydzielanego tlenku azotu (NO) przez fibroblasty linii komórkowej Hs680. Komórki przez określoną liczbę dni były hodowane na szkiełkach i naświetlane laserem o mocy 100 lub 200 mW i dawkach promieniowania: 2, 5 lub 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek z komórkami. Poziom NO oznaczono w kolejnych dniach eksperymentu (3, 5, 7, 9, 11). *O.D.* – gęstość optyczna mierzona przy długości fali 540 nm. Wartości średnie ± odchylenie standardowe. \*, \*\*, \*\*\* – różnice pomiędzy fibroblastami naświetlanymi wiązką promieniowania laserowego o różnych parametrach a fibroblastami niepoddawany naświetlaniu (ctr) (\* dla  $p < 0.05$ , \*\* dla  $p < 0.01$ , \*\*\* dla  $p < 0.001$ ).

## **6.2. Wpływ działania niskoenergetycznego promieniowania laserowego na „gojenie rany”**

Przed rozpoczęciem dalszych badań wykonano dodatkowo test „gojenia rany”. Badania przeprowadzono na komórkach naświetlanych wiązką impulsową lasera o mocy 100 mW i dawkach 5 i 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek oraz o mocy 200 mW i dawkach 2 i 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek (grupy 100/5/I, 100/10/I, 200/2/I oraz 200/10/I). Wykazano, że proces gojenia/zarastania „rany” związany z migracją/proliferacją komórek zachodził szybciej w przypadku komórek naświetlanych laserem o mocy 200 mW i dawce 2 J/cm<sup>2</sup>/dołek (grupa 200/2/I) (w 5 i 7 dniu) oraz o mocy 100 mW i dawce 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek (grupa 100/10/I) (w 7 dniu hodowli) w porównaniu do komórek kontrolnych, nienaświetlanych (grupa ctr) (Ryc. 12).





Ryc. 12. Wpływ naświetlania impulsową (I) wiązką promieniowania laserowego na proces „gojenia rany” fibroblastów linii komórkowej Hs680. Komórki przez określoną liczbę dni były hodowane na szkiełkach i naświetlane laserem o mocy 100 oraz dawkach 5 i 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek lub o mocy 200 mW oraz dawkach promieniowania 2 i 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek z komórkami. W kolejnych dniach eksperymentu (3, 5, 7) komórki barwiono filetem krystalicznym. Analiza w mikroskopie świetlnym, powiększenie 40x, skala 100 μm.

### **6.3. Wpływ działania niskoenergetycznego promieniowania laserowego na fibroblasty hodowane na membranach pla**

Z uwagi na porowatą strukturę membrany pla, nie można było przeprowadzić na tym materiale testu przylegania fibroblastów do podłoża używając fioletu krystalicznego, ponieważ sama membrana chłonie ten odczynnik. Dlatego też, badając wpływ działania promieniowania laserowego na fibroblasty, hodowane na membranach pla wykonano test na żywotność komórek. Dodatkowo wykonano oznaczenia poziomu uwalnianej przez martwe komórki AK, wydzielania przez komórki NO, białka, MMP, cytokin oraz poziomu potencjału oksydacyjno-antyoksydacyjnego fibroblastów.

#### **6.3.1. Żywotność oraz aktywność wydzielnicza fibroblastów nienaświetlanych**

Jedynie w 7 dniu hodowli fibroblasty hodowane na membranach pla (grupa pla) i niepoddawane naświetlaniu laserem wykazywały niższą żywotność w porównaniu z komórkami nienaświetlanymi, kontrolnymi, hodowanymi na szkiełkach (grupa ctr) (Ryc. 13a).

Jednocześnie poziom AK uwalnianej z komórek nienaświetlanych, hodowanych na membranach pla (grupa pla) pozostawał bez zmian w porównaniu do komórek kontrolnych, nienaświetlanych rosnących na szkiełkach (grupa ctr) we wszystkich badanych dniach eksperymentu (Ryc. 14a).

Zaobserwowano natomiast wzrost wydzielania NO w 3, 5 i 7 dniu hodowli (Ryc. 15a) a także wzrost wydzielania białka w 3 dniu hodowli przez komórki nienaświetlane, hodowane na pla (grupa pla) w porównaniu z komórkami nienaświetlanymi hodowanymi na szkiełkach (grupa ctr) (Ryc. 16a).

Z kolei w przypadku oznaczanych cytokin zaobserwowano spadek wydzielania IL-6 (w 5 dniu hodowli) oraz IL-8 (w 3 i 5 dniu hodowli) przez komórki nienaświetlane, rosnące na materiale pla (grupa pla) w porównaniu do komórek nienaświetlanych, kontrolnych rosnących na szkiełkach (grupa ctr) (odpowiednio Ryc. 17a, d). W przypadku pozostałych oznaczanych cytokin, w żadnej z badanych grup (grupy pla, ctr) nie stwierdzono wydzielania IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-12p70 oraz TNF- $\alpha$  (dane niepokazywane).

Nie stwierdzono także różnic w wydzielaniu metaloproteinaz (dane niepokazywane) oraz potencjale oksydacyjno-antyoksydacyjnym pomiędzy komórkami nienaświetlanymi, hodowanymi na membranach pla (grupa pla) a komórkami nienaświetlanymi, kontrolnymi, hodowanymi na szkiełkach (grupa ctr) (dane niepokazywane).

### **6.3.2. Wpływ działania niskoenergetycznego promieniowania laserowego na żywotność fibroblastów**

Fibroblasty hodowane na membranach pla, poddawane 2-, 4-, 6-krotnie naświetlaniu wiązką impulsową lasera, mocy 100 mW oraz dawce 5 J/cm<sup>2</sup>/dołek (grupa pla-100/5/I) wykazywały obniżoną żywotność w stosunku do grupy kontrolnej, naświetlanej tymi samymi parametrami lasera, ale hodowanymi na szkiełkach (grupa ctr) (Ryc. 13b). Również 2- i 6-krotna aplikacja wiązką promieniowania laserowego o mocy 100 mW i dawce 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek (grupa pla-100/10/I) oraz o mocy 200 mW i dawkach 2 i 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek (grupy pla-200/2/I oraz pla-200/10/I) skutkowałą spadkiem żywotności fibroblastów w tych grupach w porównaniu do grupy kontrolnej, naświetlanej tymi samymi parametrami lasera (grupa ctr) (odpowiednio Ryc. 13c, d, e).

### **6.3.3. Wpływ działania niskoenergetycznego promieniowania laserowego na poziom AK**

Dwukrotne naświetlanie komórek impulsową wiązką promieniowania laserowego o mocy 100 mW i dawkach 5 i 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek (grupy pla-100/5/I oraz pla-100/10/I) zwiększyło uwalnianie z martwych komórek AK w stosunku do naświetlanej tymi samymi parametrami lasera grupy kontrolnej (grupa ctr) (Ryc. 14b, c). Wzrost poziomu AK, stwierdzono również w wyniku 2- krotnego naświetlania fibroblastów laserem o mocy 200 mW i dawkach 2 i 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek (grupy 200/2/I oraz 200/10/I). Dalsze 4-krotne (grupa 200/10/I) oraz 6-krotne (grupy 200/2/I oraz 200/10/I) naświetlanie komórek tymi samymi parametrami lasera spowodowało wzrost uwalniania z fibroblastów AK w porównaniu do grupy kontrolnej (grupa ctr) (Ryc. 14e, d).

### **6.3.4. Wpływ działania niskoenergetycznego promieniowania laserowego na poziom NO**

Naświetlanie komórek laserem, o mocy 100 mW i dawce 5 J/cm<sup>2</sup>/dołek (grupa 100/5/I) spowodowało wzrost wydzielania NO przez komórki hodowane na materiale pla (grupa pla) w porównaniu z komórkami naświetlanymi, kontrolnymi (grupa ctr) we wszystkich badanych punktach czasowych (3, 5 i 7 dniu hodowli) (Ryc. 15b). Wzrost wydzielania NO spowodowało także 4-krotne naświetlanie fibroblastów impulsową wiązką promieniowania laserowego o mocy 200 mW i dawce 2 J/cm<sup>2</sup>/dołek (grupa 200/2/I) (Ryc. 15c). Z kolei działanie na fibroblasty hodowane na membranach pla (grupa pla) 2-, 4- oraz 6-krotnie impulsową wiązką promieniowania laserowego zarówno o mocy 100 jak i 200

mW oraz dawce 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek (odpowiednio grupy pla-100/10/I oraz pla-200/10/I) nie wpłynęło na wydzielanie NO przez te komórki w porównaniu do komórek naświetlanych tymi samymi parametrami lasera, kontrolnych, hodowanych na szkiełkach (grupa ctr) (Ryc. 15d, e).

### **6.3.5. Wpływ działania niskoenergetycznego promieniowania laserowego na poziom białka**

Stwierdzono, że w przypadku fibroblastów naświetlanych impulsową wiązką promieniowania laserowego o mocy 100 mW i dawce 5 J/cm<sup>2</sup>/dołek (grupa pla-100/5/I) nie ma różnic w poziomie wydzielanego białka pomiędzy komórkami hodowanymi na materiale pla (grupa pla-100/5/I) a naświetlanymi tymi samymi parametrami lasera, hodowanymi na szkiełkach (grupa ctr) (Ryc. 16b). Wzrost wydzielania białka przez fibroblasty, stwierdzono natomiast we wszystkich badanych punktach czasowych (3, 5, 7 dniu hodowli) w przypadku naświetlania komórek laserem o mocy 100 i 200 mW oraz dawce 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek (odpowiednio grupy pla-100/10/I oraz pla-200/10/I) (Ryc. 16c, e). Wzrost wydzielania białka, stwierdzono również w przypadku komórek poddanych 4- i 6-krotnemu działaniu wiązką impulsową lasera o mocy 200 mW i dawce 2 J/cm<sup>2</sup>/dołek (grupa pla-200/2/I) (Ryc. 16d).

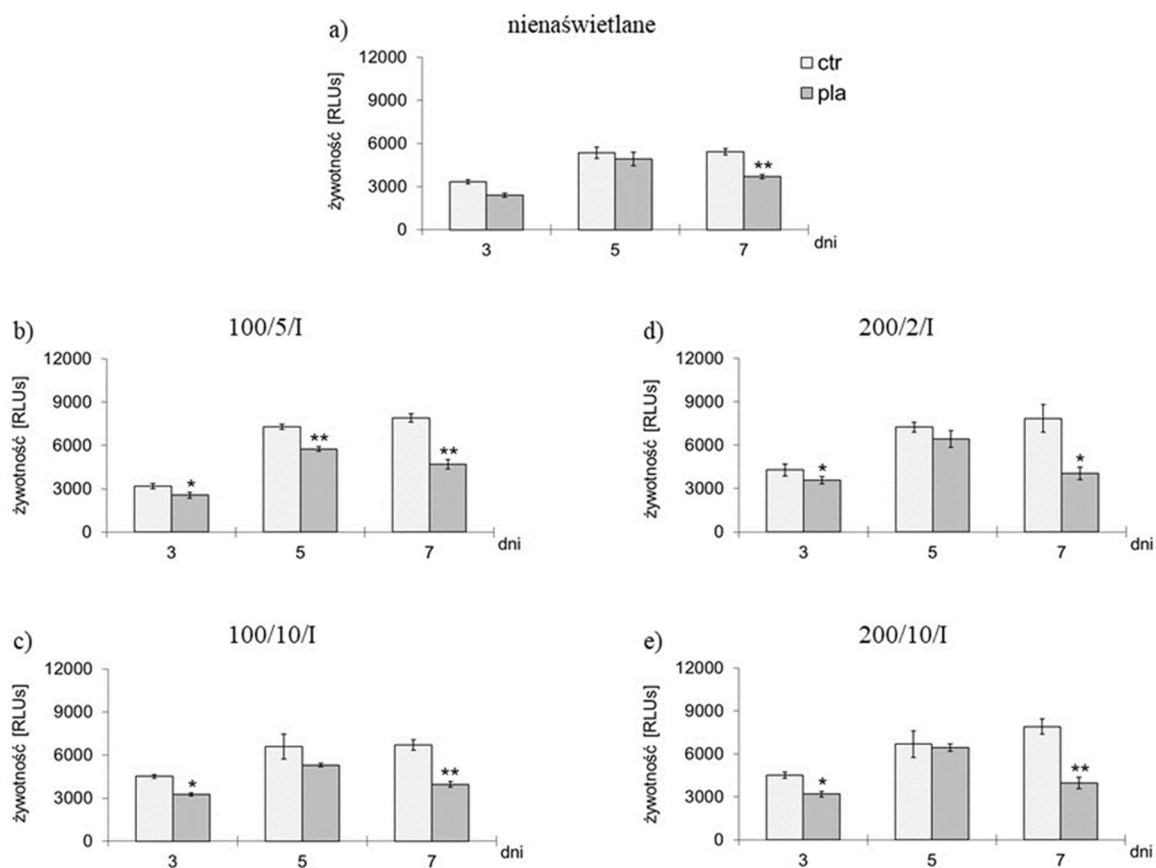
### **6.3.6. Wpływ działania niskoenergetycznego promieniowania laserowego na poziom MMP, cytokin oraz potencjał oksydacyjno-antyoksydacyjny**

W przypadku fibroblastów nienaświetlanych, hodowanych na membranach pla (grupa pla), nie stwierdzono zmian w poziomie wydzielanych metaloproteinaz (pro-MMP-9, MMP-9, MMP-2) (dane niepokazywane) oraz w potencjale oksydacyjno-antyoksydacyjnym komórek (dane niepokazywane). Wykazano także, że nienaświetlane fibroblasty hodowane przez 5 dni na membranach pla (grupa pla) wydzielają mniej IL-6 niż komórki nienaświetlane, hodowane na szkiełkach (grupa ctr) (Ryc. 17a). Z kolei zarówno w 3 jak i 5 dniu hodowli fibroblasty nienaświetlane, hodowane na pla (grupa pla) wydzielają również istotnie mniej IL-8 w porównaniu do komórek nienaświetlanych, hodowanych na szkiełkach (grupa ctr) (Ryc. 17d). W żadnej z badanych grup komórek nienaświetlanych nie stwierdzono wydzielania przez fibroblasty pozostałych, oznaczanych cytokin: IL-1β, IL-10, IL-12p70 oraz TNF-α.

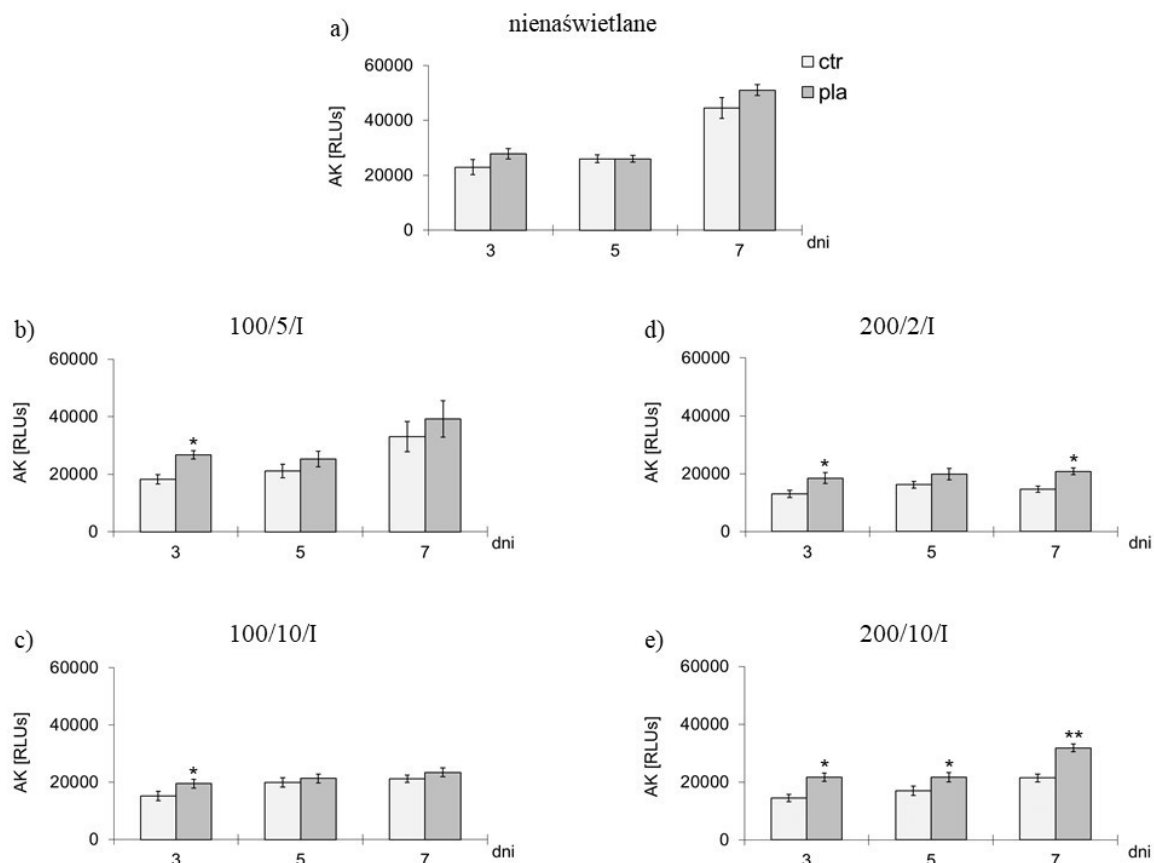
Podobnie jak w przypadku komórek nienaświetlanych nie stwierdzono różnic w wydzielaniu metaloproteinaz oraz w potencjale oksydacyjno-antyoksydacyjnym

fibroblastów naświetlanych hodowanych zarówno na materiale pla jak i na szkiełkach (dane niepokazywane).

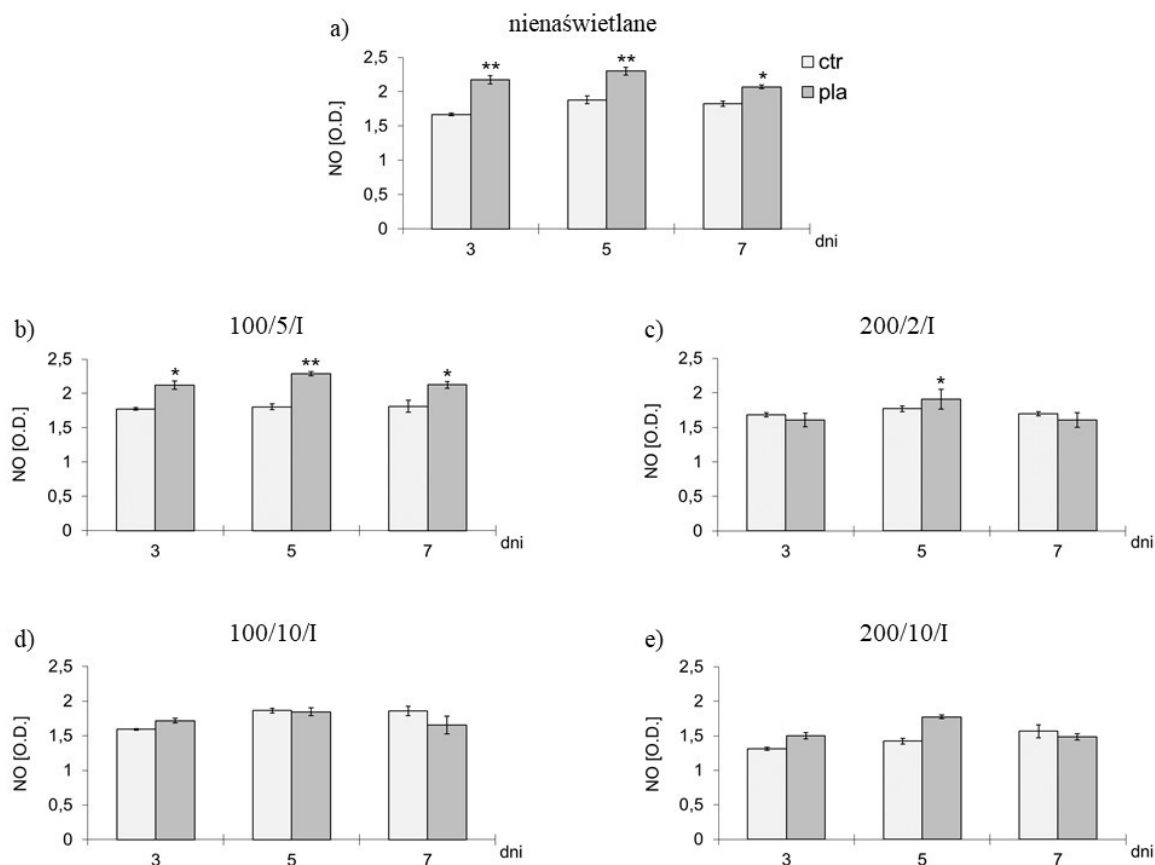
W przypadku fibroblastów poddanych naświetlaniu laserem wykazano, że zarówno 2- jak i 4-krotne naświetlanie komórek impulsową wiązką promieniowania laserowego o emisji impulsowej oraz mocy 100 mW i dawce 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek (grupa 100/10/I) jak i o mocy 200 i dawce 2 J/cm<sup>2</sup>/dołek (grupa 200/2/I) obniżyło wydzielanie IL-6 oraz IL-8 przez komórki hodowane na materiale (grupa pla) w stosunku do komórek naświetlanych tymi samymi parametrami lasera, ale hodowanymi na szkiełkach (grupa ctr) (odpowiednio Ryc. 17b, c, e, f). W żadnej z badanych grup komórek naświetlanych nie stwierdzono wydzielania przez fibroblasty IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-12p70 oraz TNF- $\alpha$ .



Ryc. 13. Wpływ naświetlania impulsową (I, 13 b-e) wiązką promieniowania laserowego na żywotność fibroblastów linii komórkowej Hs680. Komórki przez określoną liczbę dni były hodowane na szkiełkach (grupa ctr) lub membranach z polilaktonu (grupa pla) i naświetlane laserem o mocy 100 lub 200 mW i dawkach promieniowania: 2, 5 lub 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek z komórkami. Fibroblasty nienaświetlane (13a). Żywotność komórek była mierzona w kolejnych 3, 5 oraz 7 dniu eksperymentu. *RLUs* – jednostka strumienia świetlnego luminometru. Wartości średnie ± odchylenie standardowe. \*, \*\*, \*\*\* – różnice pomiędzy grupą pla i grupą ctr (\* dla  $p < 0.05$ , \*\* dla  $p < 0.01$ , \*\*\* dla  $p < 0.001$ ).

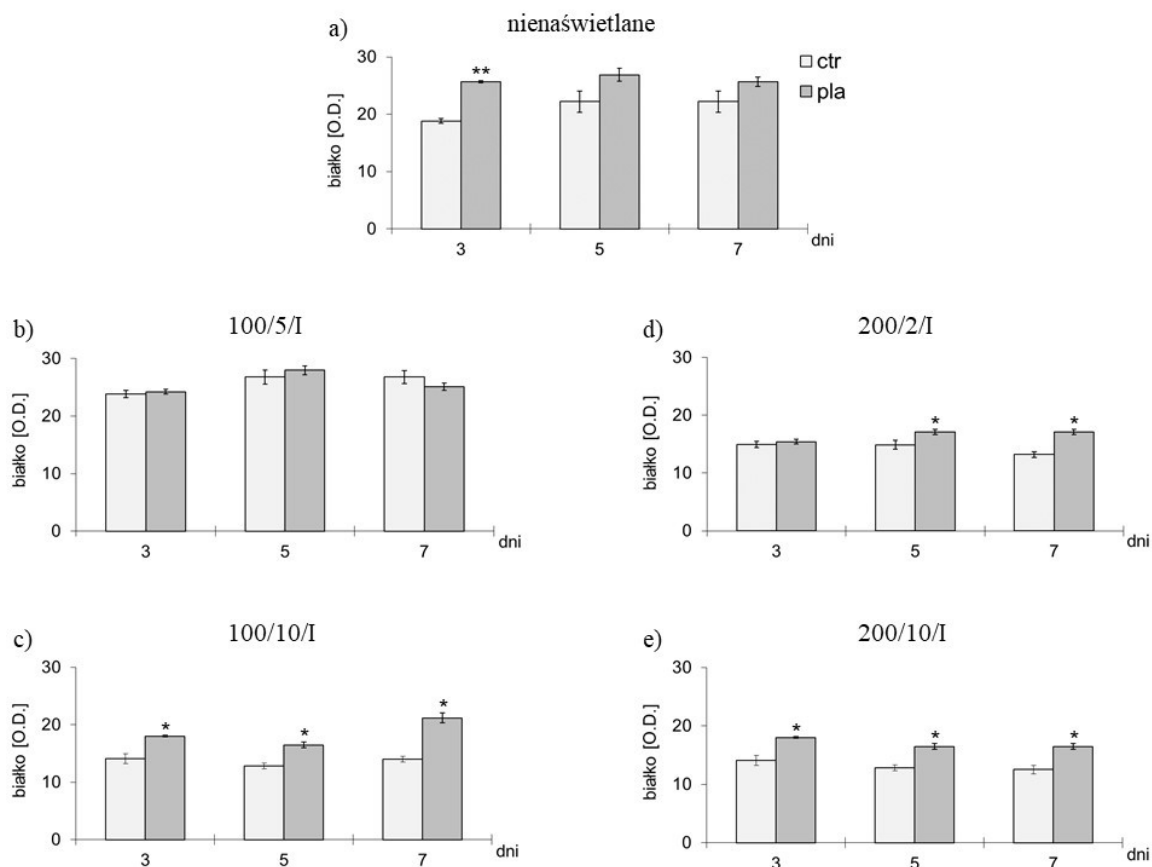


Ryc. 14. Wpływ naświetlania impulsową (I, 14 d-e) wiązką promieniowania laserowego na poziom uwalnianej kinazy adenyłowej (AK) przez fibroblasty linii komórkowej Hs680. Komórki przez określoną liczbę dni były hodowane na szkiełkach (grupa ctr) lub membranach z polilaktonu (grupa pla) i naświetlane laserem o mocy 100 lub 200 mW i dawkach promieniowania: 2, 5 lub 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek z komórkami. Fibroblasty nienaświetlane (14a). Poziom AK mierzono w kolejnych 3, 5 oraz 7 dniu eksperymentu. *RLUs* – jednostka strumienia światła lumenometru. Wartości średnie ± odchylenie standardowe. \*, \*\*, \*\*\* – różnice pomiędzy grupą pla i grupą ctr (\* dla  $p < 0.05$ , \*\* dla  $p < 0.01$ , \*\*\* dla  $p < 0.001$ ).

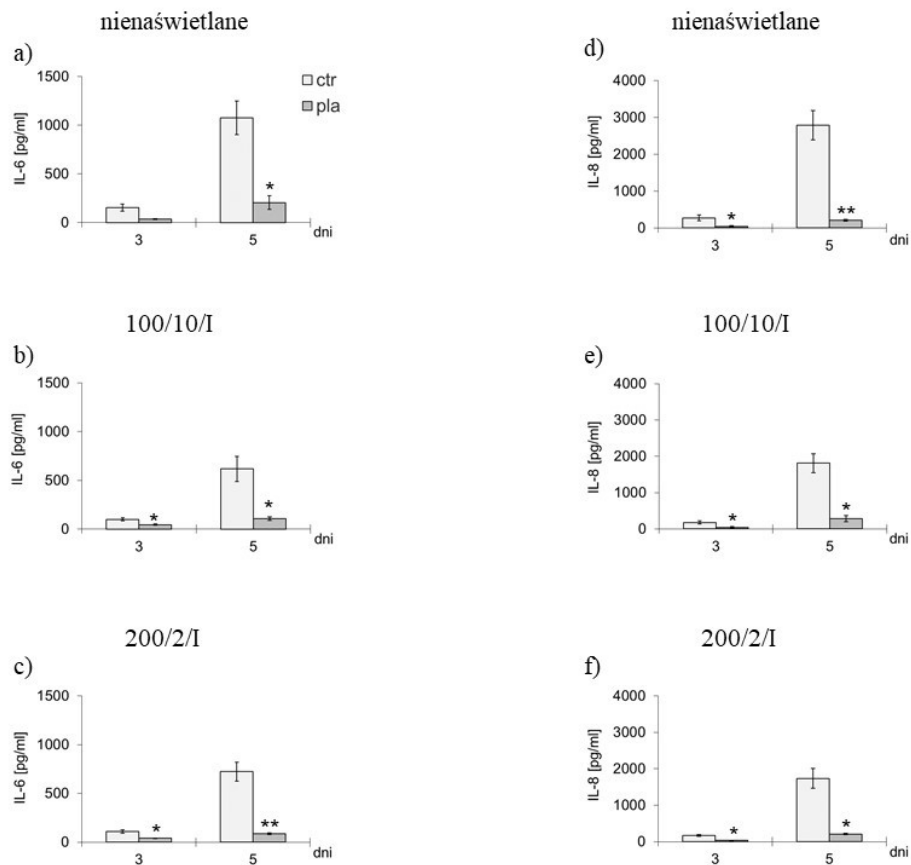


Ryc. 15. Wpływ naświetlania impulsową (I, 15 d-e) wiązką promieniowania laserowego na poziom wydzielanego tlenku azotu (NO) przez fibroblasty linii komórkowej Hs680. Komórki przez określoną liczbę dni były hodowane na szkiełkach (grupa ctr) lub membranach z polilaktonu (grupa pla) i naświetlane laserem o mocy 100 lub 200 mW i dawkach promieniowania: 2, 5 lub 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek z komórkami. Fibroblasty nienaświetlane (15 a). Poziom NO oznaczono w kolejnych dniach eksperymentu 3, 5 oraz 7. O.D. – gęstość optyczna mierzona przy długości fali 540 nm. Wartości średnie ± odchylenie standardowe. \*, \*\*, \*\*\* – różnice pomiędzy grupą pla i grupą ctr (\* dla  $p < 0.05$ , \*\* dla  $p < 0.01$ , \*\*\* dla  $p < 0.001$ ).





Ryc. 16. Wpływ naświetlania impulsową (I, 15 d-e) wiązką promieniowania laserowego na poziom wydzielanego białka przez fibroblasty linii komórkowej Hs680. Komórki przez określoną liczbę dni były hodowane na szkiełkach (grupa ctr) lub membranach z polilaktonu (grupa pla) i naświetlane laserem o mocy 100 lub 200 mW i dawkach promieniowania: 2, 5 lub 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek z komórkami. Fibroblasty nienaświetlane (16 a). Poziom białka oznaczono w kolejnych dniach eksperymentu 3, 5 oraz 7. *O.D.* – gęstość optyczna mierzona przy długości fali 540 nm. Wartości średnie ± odchylenie standardowe. \*, \*\*, \*\*\* – różnice pomiędzy grupą pla i grupą ctr (\* dla  $p < 0.05$ , \*\* dla  $p < 0.01$ , \*\*\* dla  $p < 0.001$ ).



Ryc. 17. Wpływ naświetlania impulsową (I, 17 b, c, e, f) wiązką promieniowania laserowego na poziom cytokin IL-6 oraz IL-8 wydzielanych przez fibroblasty linii komórkowej Hs680. Komórki przez określoną liczbę dni były hodowane na szkiełkach (grupa ctr) lub membranach z polilaktonu (grupa pla) i naświetlane laserem o mocy 100 mW i dawce promieniowania 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek lub o mocy 200 mW i dawce 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek z komórkami. Komórki nienasświetlane (17a, d). Poziom cytokin oznaczono w kolejnych dniach eksperymentu 3 oraz 5. Wartości średnie ± odchylenie standardowe. \*, \*\*, \*\*\* – różnice pomiędzy grupą pla i grupą ctr (\* dla  $p < 0.05$ , \*\* dla  $p < 0.01$ , \*\*\* dla  $p < 0.001$ ).

#### **6.4. Wpływ działania na fibroblasty witamin i/lub niskoenergetycznego promieniowania laserowego**

W kolejnym etapie eksperymentu zbadano wpływ na fibroblasty samych witamin. W tym celu membrany pla zmodyfikowano witaminami E lub K. Następnie zbadano efekt jednoczesnego działania na komórki witamin i naświetlania komórek wybranymi parametrami lasera (zob. podrozdział 4.2.2). Fibroblasty naświetlano impulsową wiązką promieniowania laserowego o mocy 100 mW i dawkach 5 i 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek lub o mocy 200 mW i dawkach 2 i 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek (badane grupy: 100/5/I, 100/10/I, 200/2/I oraz 200/10/I).

##### **6.4.1. Żywotność i aktywność wydzielnicza (poziom AK, NO, białka) fibroblastów nienaświetlanych hodowanych na membranach pla modyfikowanych witaminami E i K**

W 7 dniu hodowli, w przypadku fibroblastów hodowanych na membranach modyfikowanych witaminą K (grupa pla-K), stwierdzono wzrost żywotności komórek w porównaniu z komórkami kontrolnymi, hodowanymi na niemodyfikowanych membranach pla (grupa pla) (Ryc. 18a). Z kolei w przypadku fibroblastów hodowanych na membranach modyfikowanych dodatkiem witaminy E (grupa pla-E) stwierdzono spadek żywotności komórek w 5 dniu hodowli, a następnie znaczny wzrost żywotności fibroblastów w 7 dniu hodowli porównaniu z komórkami kontrolnymi, hodowanymi na niemodyfikowanych membranach pla (grupa pla) (Ryc. 18a).

Jednocześnie, w porównaniu grupą kontrolną (grupa pla), modyfikacja membran pla witaminami zarówno K jak i E (gupy pla-K i pla-E) spowodowała spadek uwalniania z martwych komórek AK w 3 i 5 dniu hodowli oraz wzrost jej uwalniania w 7 dniu hodowli, ale tylko w przypadku komórek hodowanych na membranach modyfikowanych witaminą K (grupa pla-K), (Ryc. 19a).

Modyfikacja membran pla witaminą E (grupa pla-E) spowodowała wzrost wydzielania przez komórki NO w porównaniu do grupy kontrolnej pla (grupa pla) (Ryc. 20a).

Jednocześnie modyfikacja membran pla witaminą K (grupa pla-K) spowodowała w 3 dniu hodowli spadek wydzielania przez fibroblasty białka w porównaniu do grupy kontrolnej pla (grupa pla) (Ryc. 21a).

#### **6.4.2. Wpływ działania niskoenergetycznego promieniowania laserowego na żywotność fibroblastów hodowanych na membranach pla modyfikowanych witaminami E i K**

Naświetlanie komórek 6-krotnie laserem o mocy 100 mW oraz dawce 5 J/cm<sup>2</sup>/dołek skutkowało spadkiem żywotności fibroblastów hodowanych na membranach pla z dodatkiem witaminy K (grupa pla-K 100/5/I) w porównaniu z grupą komórek naświetlanych, hodowanych na materiale pla (grupa pla) (Ryc. 18b). Spadek żywotności komórek zaobserwowano także w przypadku fibroblastów naświetlanych laserem o tych samych parametrach, ale hodowanych przez 5 i 7 dni na materiale pla z dodatkiem witaminy E (grupa pla-E 100/5/I) (Ryc. 18b).

Z kolei 2- i 4-krotna aplikacja wiązką promieniowania laserowego o mocy 200 mW i dawce 2 J/cm<sup>2</sup>/dołek skutkowała wzrostem żywotności komórek hodowanych na materiale modyfikowanym witaminą K (grupa pla-K 200/2/I) w porównaniu do grupy komórek naświetlanych hodowanych na materiale pla (grupa pla) (Ryc. 18d). Natomiast dalsze, 6-krotne naświetlanie komórek tymi samymi parametrami lasera skutkowało obniżeniem żywotności fibroblastów (grupa pla-K 200/2/I) (Ryc. 18d). W przypadku fibroblastów hodowanych na membranach pla modyfikowanych witaminą E i poddanych działaniu lasera o tej samej mocy 200 mW i tej samej dawce 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek (grupa pla-E 200/2/I) stwierdzono spadek żywotności komórek na skutek 4- i 6-krotnego naświetlania laserem komórek w porównaniu do grupy kontrolnej naświetlanej, hodowanej na materiale pla (grupa pla) (Ryc. 18d). Wzrost żywotności fibroblastów hodowanych na materiale pla z dodatkiem witaminy K, zaobserwowano także na skutek 4-krotnej aplikacji wiązką promieniowania laserowego o mocy 100 i 200 mW i dawce 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek (grupa pla-K 100/10/I oraz pla-K 200/10/I), (Ryc. 17c, e). Jednakże dalsze, 6-krotne naświetlanie komórek testowanymi na tym etapie badań parametrami lasera skutkowało spadkiem żywotności komórek (grupy pla-K 100/10/I oraz pla-K 200/10/I) (Ryc. 18c, e). Z kolei w przypadku fibroblastów hodowanych na membranach pla modyfikowanych witaminą E i naświetlanych tymi samymi parametrami lasera 4- i 6-krotnie skutkowało spadkiem żywotności komórek (grupy pla-E 100/10/I oraz pla-E 200/10/I) w porównaniu do komórek kontrolnych, naświetlanych w ten sam sposób (grupa pla) (Ryc. 18c, e).

### **6.4.3. Wpływ działania niskoenergetycznego promieniowania laserowego na aktywność wydzielniczą (poziom AK, NO, białka) fibroblastów hodowanych na membranach pla modyfikowanych witaminami E i K**

W przypadku fibroblastów hodowanych na materiale pla modyfikowanym witaminą K oraz witaminą E zaobserwowano spadek uwalniania z komórek AK na skutek działania wiązką promieniowania laserowego o mocy 200 mW i dacie 2 i 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek oraz o mocy 100 mW i dawce 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek (odpowiednio grupy pla-K 200/2/I, pla-E 200/2/I, pla-K 200/10/I, pla-E 200/10/I oraz pla-K 100/10/I, pla-E 100/10/I) (Ryc. 19d, c, e). Również fibroblasty hodowane na membranach pla modyfikowanych witaminą K lub E i naświetlanych 2- i 4-krotnie laserem o mocy 100 mW i dawkach 5 J/cm<sup>2</sup>/dołek (odpowiednio grupy pla-K 100/5/I oraz pla-E 100/5/I) uwalniały mniej kinazy adenylowej w porównaniu do komórek kontrolnych naświetlanych tymi samymi parametrami lasera, ale rosnących na niemodyfikowanych membranach pla (grupa pla) (Ryc. 19b).

W przypadku komórek hodowanych na materiale pla modyfikowanym witaminą E stwierdzono wzrost wydzielania NO na skutek 4- i 6-krotnego naświetlania fibroblastów laserem o mocy 100 mW i dawce 5 J/cm<sup>2</sup>/dołek (grupa pla-E 100/5/I) (Ryc. 20b). Z kolei w przypadku fibroblastów hodowanych na membranach modyfikowanych witaminą K i naświetlanych 2- i 4-krotnie laserem o mocy 100 mW i dawce 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek (grupa pla-K 100/10/I) stwierdzono spadek wydzielania NO przez komórki w porównaniu do grupy komórek hodowanych na niemodyfikowanym materiale pla (grupa pla) (Ryc. 20d). Z kolei hodowla fibroblastów na membranach pla, modyfikowanych witaminą E i naświetlanych 4-krotnie tymi samymi parametrami lasera skutkowała wzrostem wydzielania NO przez fibroblasty (grupa pla-E 100/10/I) (Ryc. 20d). Spadek wydzielania NO stwierdzono w przypadku fibroblastów hodowanych na membranach pla, modyfikowanych witaminą K na skutek 2- i 6-krotnego naświetlania komórek laserem o mocy 200 mW i dawce 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek (grupy pla-K 200/10/I). Z kolei w przypadku komórek rosnących na materiale pla modyfikowanym witaminą E i 2-krotnie naświetlanych tymi samymi parametrami lasera (grupa pla-E 200/10/I) stwierdzono wzrost wydzielania NO w porównaniu do grupy komórek hodowanych na niemodyfikowanym materiale pla (Ryc. 20e).

Fibroblasty rosnące na membranach modyfikowanych witaminą K i naświetlane 2- i 4-krotnie laserem o mocy 100 mW i dawce 5 J/cm<sup>2</sup>/dołek (pla-K grupa 100/5/I) wydzielały mniej białka niż komórki kontrolne, rosnące na niemodyfikowanym materiale pla i naświetlane tymi samymi parametrami lasera (Ryc. 21b). Natomiast hodowla fibroblastów na tym samym materiale skutkowała wzrostem wydzielania białka na skutek

4-krotnego naświetlania komórek laserem o mocy 200 mW i dawce 2 J/cm<sup>2</sup>/dołek (grupa pla-K 200/2/I) (Ryc. 21d). Także hodowla fibroblastów na materiale z dodatkiem witaminy E i równoczesne 4- i 6-krotne naświetlanie komórek wiązką promieniowania laserowego o tej samej mocy 200 mW i tej samej dawce 2 J/cm<sup>2</sup>/dołek (grupa pla-E 200/2/I) skutkowało spadkiem wydzielania białka (Ryc. 21d). Podobny efekt spadku wydzielania białka stwierdzono w przypadku fibroblastów rosnących materiale modyfikowanym witaminą E i naświetlanych 6-krotnie laserem o mocy 100 mW i dawce 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek (grupa pla-E 100/10/I) (Ryc. 21c).

Uzyskane wyniki wykazały, że najbardziej odpowiednią dla fibroblastów modyfikacją membran pla jest dodatek witaminy K oraz jednoczesne naświetlanie rosnących na tym materiale komórek impulsową wiązką promieniowania laserowego o mocy 100 mW i dawce 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek oraz o mocy 200 mW i dawce 2 J/cm<sup>2</sup>/dołek. Dlatego też, dalsze badania dotyczące oznaczenia wydzielanych przez fibroblasty metaloproteinaz, cytokin oraz potencjału oksydacyjno-antyoksydacyjnego zostały wykonane w nadsączach znad hodowli komórek z grup: pla-K 100/10/I oraz pla-K 200/2/I.

#### **6.4.4. Wpływ działania witaminy K i naświetlania niskoenergetycznym promieniowaniem laserowym na aktywność wydzielniczą (poziom MMP, cytokin oraz potencjał oksydacyjno-antyoksydacyjny) fibroblastów**

W żadnej z badanych grup nienaświetlanych fibroblastów nie stwierdzono wydzielania MMP-9 oraz MMP-2 natomiast poziom wydzielanej pro-MMP-9 przez komórki rosnące na modyfikowanym witaminą K materiale pla (pla-K) nie różnił się od poziomu pro-MMP-9 wydzielanej przez komórki rosnące na materiale pla (grupa pla) (Ryc. 22a).

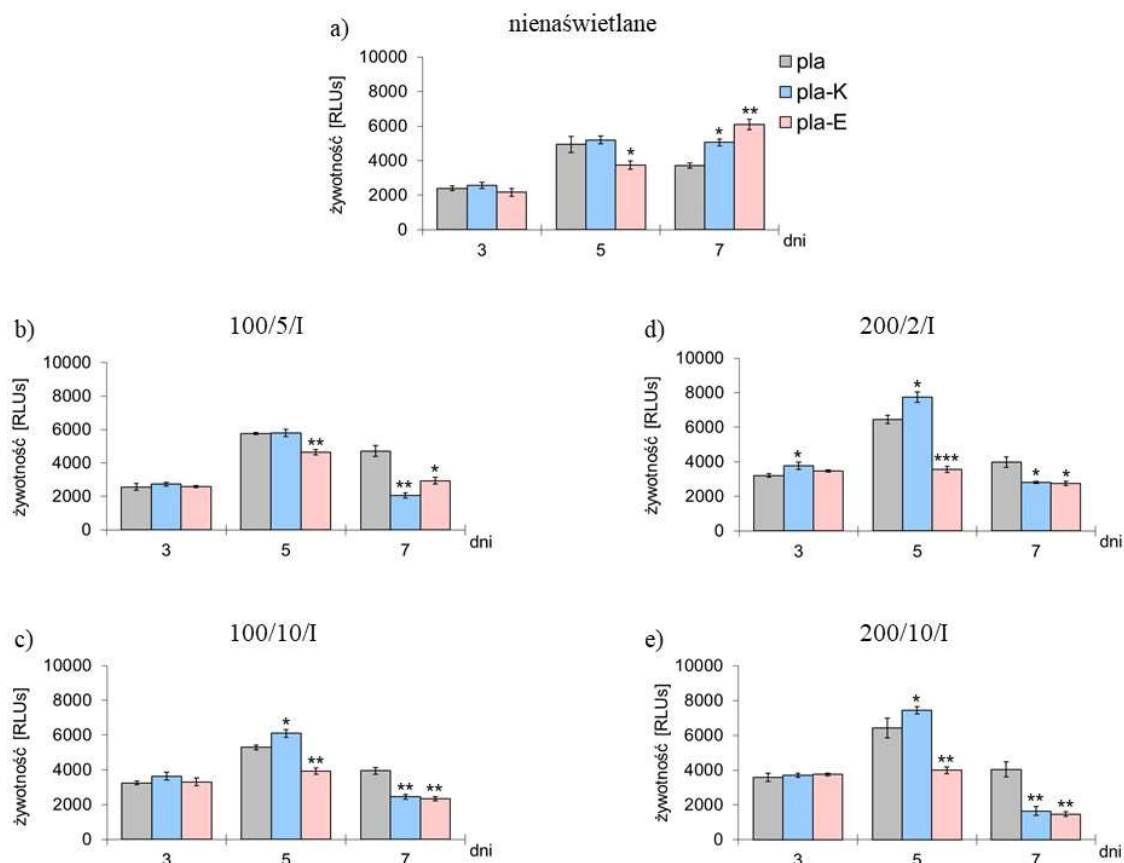
Stwierdzono również, że nienaświetlane fibroblasty hodowane na membranach pla modyfikowanych witaminą K wydzielaly mniej IL-6 oraz IL-8 niż komórki kontrolne, hodowane na materiale pla (Ryc. 23a, d). W żadnej z badanych grup komórek nienaświetlanych nie stwierdzono wydzielania przez fibroblasty oznaczanych cytokin: IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-12p70 oraz TNF- $\alpha$  (dane niepokazywane).

Nie stwierdzono również zmian w potencjale oksydacyjno-antyoksydacyjnym komórek nienaświetlanych hodowanych na materiale pla modyfikowanym witaminą K (grupa pla-K) w porównaniu z grupą kontrolną komórek hodowanych na materiale pla (grupa pla) (dane niepokazywane).

W przypadku fibroblastów naświetlanych laserem wykazano spadek wydzielania pro-MMP-9 oraz MMP-9 na skutek 4-krotnego działania wiązką promieniowania laserowego

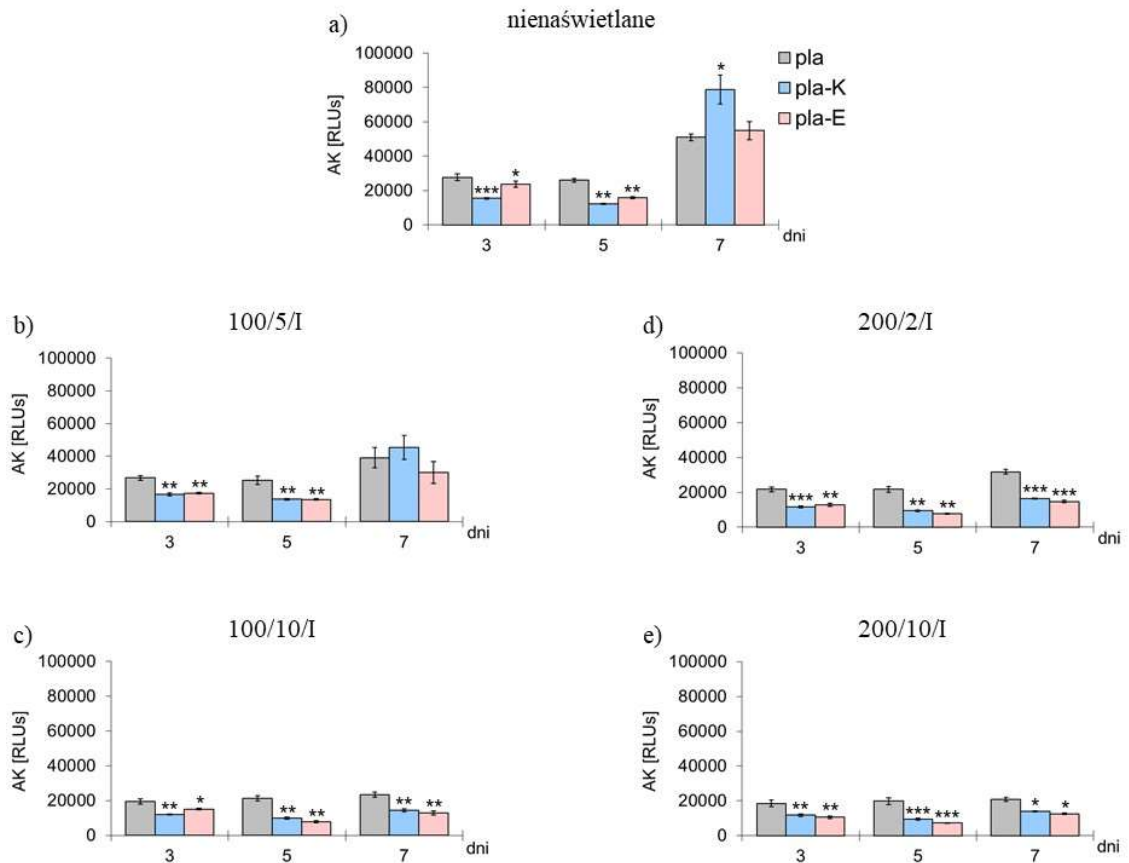
o mocy 200mW i dawce 2 J/cm<sup>2</sup>/dołek na fibroblasty hodowane na membranach pla, modyfikowanych witaminą K (grupa pla-K 200/2/I) (Ryc. 22c, e).

Fibroblasty hodowane na membranach pla, modyfikowanych witaminą K i jednocześnie naświetlane 4- krotnie impulsową wiązką promieniowania laserowego o mocy 100 mW i dawce 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek (grupa pla-K 100/10/I) oraz 2- i 4- krotnie laserem o mocy 200 mW i dawce 2 J/cm<sup>2</sup>/dołek (grupa pla-K 200/2/I) wydzielaly mniej IL-6 w porównaniu z grupą kontrolną, hodowaną na niemodyfikowanych membranach pla, naświetlanych tymi samymi parametrami lasera (grupa pla) (Ryc. 23b, c). Komórki rosnące na tym samym, modyfikowanym materiale i jednocześnie 4-krotnie naświetlane laserem o mocy 100 mw i dawce 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek (grupa pla-K 100/10/I) oraz o mocy 200 mW i dawce 2 J/cm<sup>2</sup>/dołek (grupa pla-K 200/2/I) wydzielaly mniej IL-8 (Ryc. 22e, f). W żadnej z badanych grup komórek naświetlanych, nie stwierdzono wydzielania pozostałych oznaczanych cytokin: IL-1β, IL-10, IL-12p70 oraz TNF-α (dane niepokazywane). Nie stwierdzono również różnic w potencjale oksydacyjno-antyoksydacyjnym pomiędzy fibroblastami naświetlanymi hodowanymi na membranach modyfikowanych witaminą K a fibroblastami naświetlanymi tymi samymi parametrami lasera, hodowanymi na materiale kontrolnym pla (grupa pla) (dane niepokazywane).

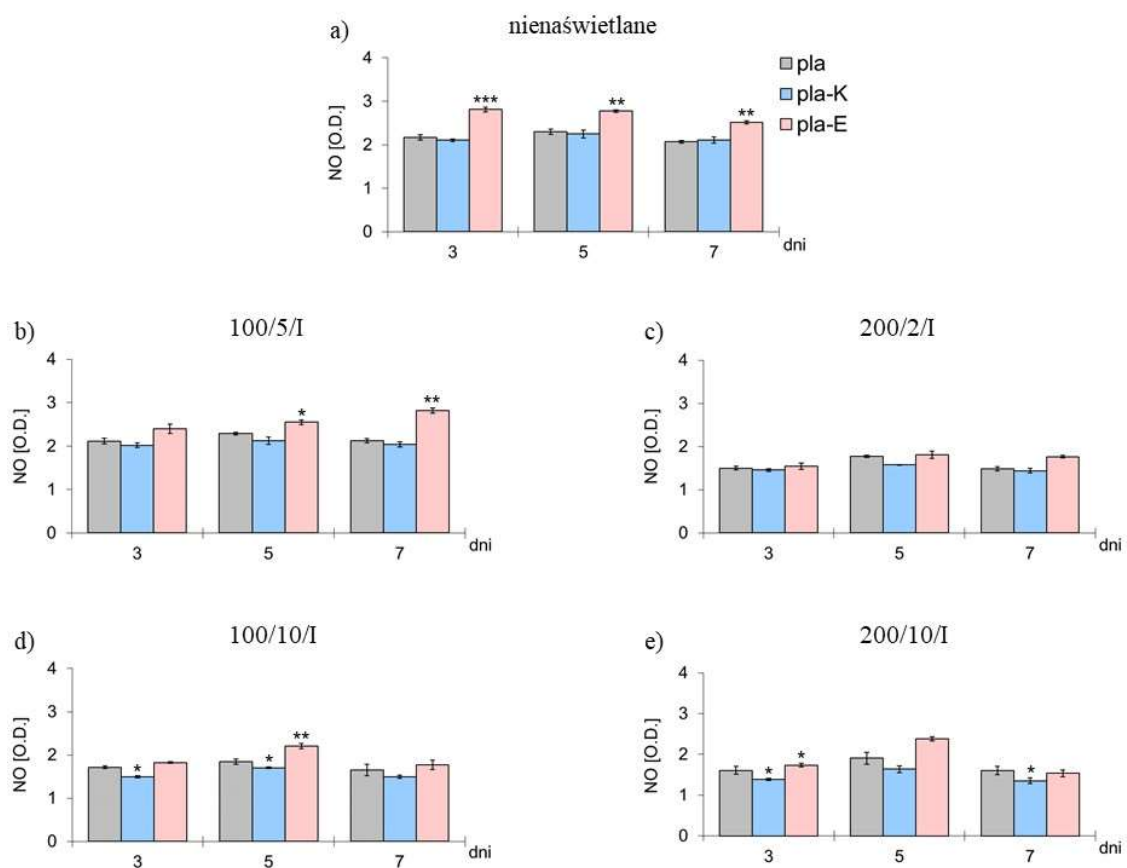


Ryc. 18. Wpływ naświetlania impulsową (I, 18 b-e) wiązką promieniowania laserowego na żywotność fibroblastów linii komórkowej Hs680. Komórki przez określoną liczbę dni były hodowane membranach z polilaktonu (grupa pla) lub membranach modyfikowanych dodatkiem witaminy K (pla-K) bądź witaminy E (grupa pla-E) i naświetlane laserem o mocy 100 mW i dawkach 5 oraz 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek lub o mocy 200 mW i dawkach promieniowania: 2 lub 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek z komórkami. Komórki nienaświetlane (18 a). Żywotność fibroblastów była mierzona w kolejnych 3, 5 oraz 7 dniu eksperymentu. *RLUs* – jednostka strumienia świetlnego luminometru. Wartości średnie ± odchylenie standardowe. \*, \*\*, \*\*\* – różnice pomiędzy grupą pla-K a pla oraz grupą pla-E a pla (\* dla  $p < 0.05$ , \*\* dla  $p < 0.01$ , \*\*\* dla  $p < 0.001$ ).

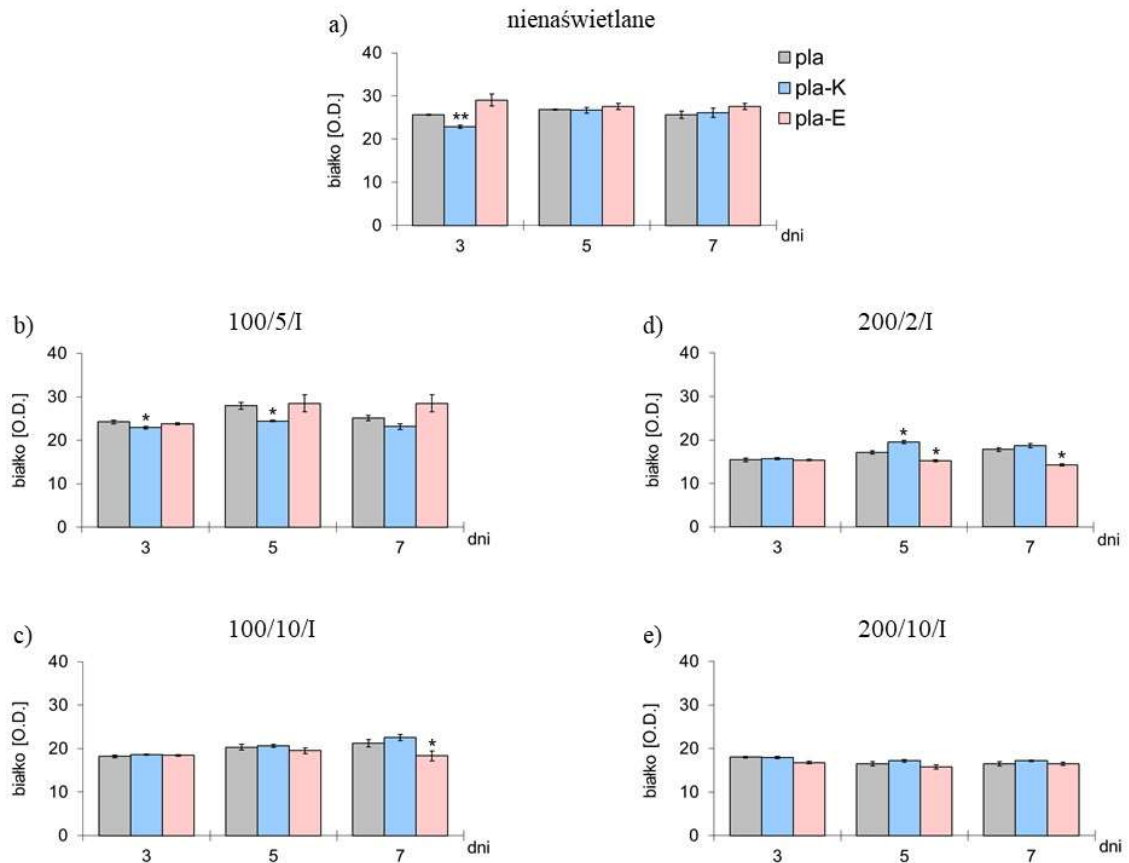




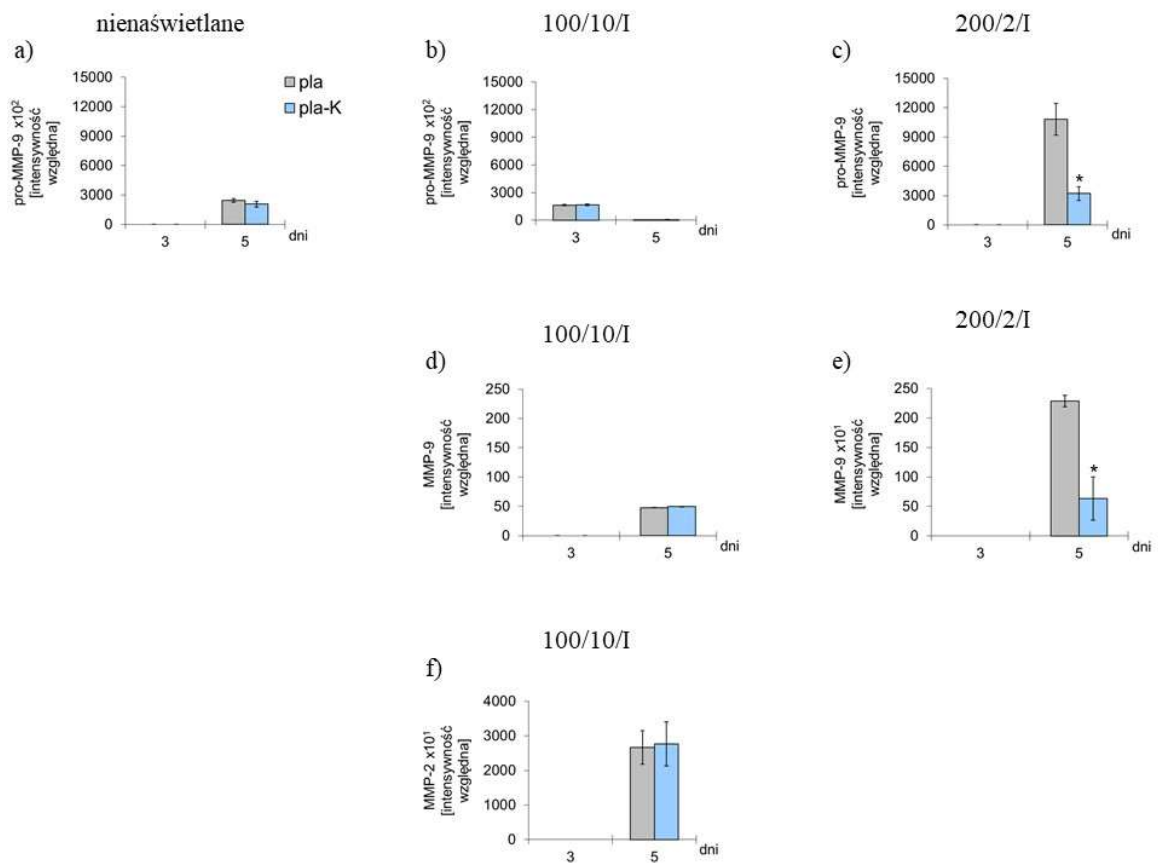
Ryc. 19. Wpływ naświetlania impulsową (I, 19 b-e) wiązką promieniowania laserowego na poziom uwalniającej kinazy adenylowej (AK) przez fibroblasty linii komórkowej Hs680. Fibroblasty przez określoną liczbę dni były hodowane membranach z polilaktonu (grupa pla) lub membranach modyfikowanych dodatkiem witaminy K (pla-K) bądź witaminy E (grupa pla-E) i naświetlane laserem o mocy 100 mW i dawkach promieniowania 5 oraz 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek lub o mocy 200 mW i dawkach promieniowania 2 lub 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek z komórkami. Komórki nienaświetlane (19 a). Poziom AK był mierzony w kolejnych 3, 5 oraz 7 dniu eksperymentu. *RLUs* – jednostka strumienia świetlnego luminometru. Wartości średnie ± odchylenie standardowe. \*, \*\*, \*\*\* – różnice pomiędzy grupą pla-K a pla i grupą pla-E a pla (\* dla  $p < 0.05$ , \*\* dla  $p < 0.01$ , \*\*\* dla  $p < 0.001$ ).



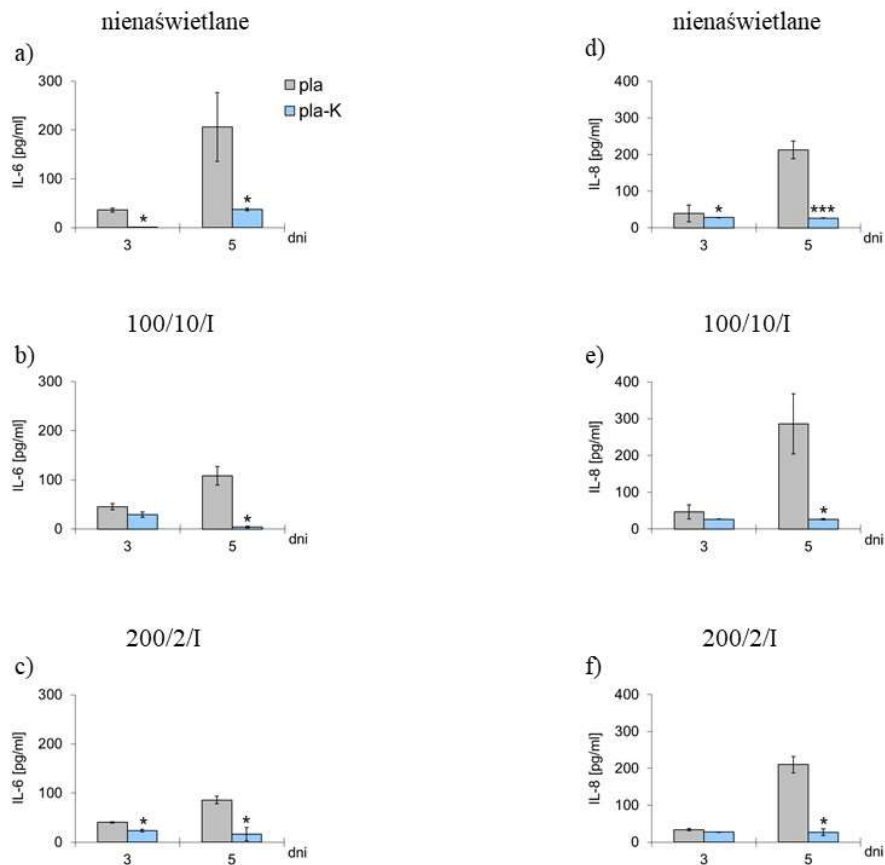
Ryc. 20. Wpływ naświetlania impulsową (I, 20b-e) wiązką promieniowania laserowego na poziom tlenu azotu (NO) wydzielanego przez fibroblasty linii komórkowej Hs680. Fibroblasty przez określoną liczbę dni były hodowane na membranach z polilaktonu (grupa pla) lub membranach modyfikowanych dodatkiem witaminy K (grupa pla-K) bądź witaminy E (grupa pla-E) i naświetlane laserem o mocy 100 mW i dawkach promieniowania 5 oraz 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek lub o mocy 200 mW i dawkach promieniowania 2 lub 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek z komórkami. Fibroblasty nienaświetlane (20 a). Poziom NO mierzono w kolejnych 3, 5 oraz 7 dniu eksperymentu. *O.D.* – gęstość optyczna mierzona przy długości fali 540 nm. Wartości średnie ± odchylenie standardowe. \*, \*\*, \*\*\* – różnice pomiędzy grupą pla-K a pla oraz grupą pla-E a pla (\* dla  $p < 0.05$ , \*\* dla  $p < 0.01$ , \*\*\* dla  $p < 0.001$ ).



Ryc. 21. Wpływ naświetlania impulsową (I, 20b-e) wiązką promieniowania laserowego na poziom białka wydzielanego przez fibroblasty linii komórkowej Hs680. Fibroblasty przez określoną liczbę dni były hodowane na membranach z polilaktonu (grupa pla) lub membranach modyfikowanych dodatkiem witaminy K (grupa pla-K) bądź witaminy E (grupa pla-E) i naświetlane laserem o mocy 100 mW i dawkach promieniowania 5 oraz 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek lub o mocy 200 mW i dawkach promieniowania 2 lub 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek z komórkami. Fibroblasty nienaświetlane (21 a). Poziom białka mierzono w kolejnych 3, 5 oraz 7 dniu eksperymentu. O.D. – gęstość optyczna mierzona przy długości fali 540 nm. Wartości średnie ± odchylenie standardowe. \*, \*\*, \*\*\* – różnice pomiędzy grupą pla-K a pla oraz grupą pla-E a pla (\* dla  $p < 0.05$ , \*\* dla  $p < 0.01$ , \*\*\* dla  $p < 0.001$ ).



Ryc. 22. Wpływ naświetlania impulsową (I, 22b-f) wiązką promieniowania laserowego na poziom metaloproteinaz: pro-MMP-9, MMP-9 oraz MMP-2 wydzielanych przez fibroblasty linii komórkowej Hs680. Fibroblasty przez określoną liczbę dni były hodowane na membranach z polilaktonu (grupa pla) lub membranach modyfikowanych dodatkiem witaminy K (grupa pla-K) i naświetlane laserem o mocy 100 mW i dawce promieniowania 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek lub o mocy 200 mW i dawce promieniowania 2 J/cm<sup>2</sup>/dołek z komórkami. Fibroblasty nienaświetlane (22 a). Poziom metaloproteinaz oznaczono w kolejnych 3 oraz 5 dniu eksperymentu. Wartości średnie ± odchylenie standardowe. \*, \*\*, \*\*\* – różnice pomiędzy grupą pla-K i grupą pla (\* dla  $p < 0.05$ , \*\* dla  $p < 0.01$ , \*\*\* dla  $p < 0.001$ ).



Ryc. 23. Wpływ naświetlania impulsową (I, 19b, c, e, f) wiązką promieniowania laserowego na poziom cytokin: IL-6 oraz IL-8 wydzielanych przez fibroblasty linii komórkowej Hs680. Fibroblasty przez określoną liczbę dni były hodowane na membranach z polilaktonu (grupa pla) lub membranach modyfikowanych dodatkiem witaminy K (grupa pla-K) i naświetlane laserem o mocy 100 mW i dawce promieniowania 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek lub o mocy 200 mW i dawce promieniowania 2 J/cm<sup>2</sup>/dołek z komórkami. Fibroblasty nienaświetlane (23 a, d). Poziom cytokin oznaczono w kolejnych dniach eksperymentu 3 oraz 5. Wartości średnie ± odchylenie standardowe. \*, \*\*, \*\*\* – różnice pomiędzy grupą pla-K i grupą pla (\* dla  $p < 0.05$ , \*\* dla  $p < 0.01$ , \*\*\* dla  $p < 0.001$ ).

## 7. Dyskusja

Gojenie ran jest wieloetapowym procesem prowadzącym do naprawy uszkodzonych tkanek a czas jego trwania jest ściśle związany z aktywnością fibroblastów, keratynocytów, komórek śródbłonna, płytek krwi oraz komórek układu odpornościowego tj. neutrofilów, makrofagów, limfocytów (Vitlianowa i wsp., 2015). Fibroblasty odgrywają szczególną rolę w procesie gojenia się ran biorąc udział w syntezie nowych składników ECM w celu przywrócenia integralności tkanek. Prawidłowy przebieg tego procesu bywa jednak często zaburzony na różnych jego etapach, prowadząc do powstawania tzw. przewlekłych, trudno gojących się ran co znacznie obniża jakość życia i utrudnia normalne funkcjonowanie każdego człowieka. Stąd też w dzisiejszych czasach obserwuje się coraz większe zainteresowanie naukowców mechanizmami działającymi podczas tego procesu. Również rozwój technologii/urządzeń stosowanych w medycynie, fizykoterapii, kosmetologii daje duże nadzieje na skrócenie czasu gojenia się ran i regeneracji skóry. Opracowywanie nowych strategii, wspomagających gojenie stanowi obecnie ogromne wyzwanie dla naukowców różnych dziedzin nauki. Szczególnie istotne wydaje się być opracowywanie metod łączonych pozwalających na zwiększanie aktywności fibroblastów w celu przyspieszenia procesu gojenia się ran a także uniknięcia ewentualnych zaburzeń w trakcie jego trwania.

Współczesne technologie otwierają duże możliwości w zakresie terapii światłem. Laseroterapia niskoenergetyczna LLLT (fotobiomodulacja) stosowana jest jako skuteczna metoda terapeutyczna od połowy lat 60 XX wieku (Chung i wsp., 2013). Aby jednak można było zastosować innowacyjne technologie w leczeniu trudno gojących się ran, pierwszym, niezbędnym etapem badań są doświadczenia *in vitro* mające na celu dobranie odpowiednich tzn. niewywołujących w stosunku do komórek efektu cytotoksycznego parametrów naświetlania laserem. Pomimo prowadzonych od ponad czterdziestu lat badań, podstawowe mechanizmy fotobiomodulacji na poziomie komórkowym pozostają nadal nie do końca wyjaśnione a wyniki badań z zastosowaniem urządzeń LLLT nie opierają jeszcze na wystarczającej liczbie wartościowych badań klinicznych i nie tłumaczą definitywnie mechanizmu działania LLLT. Nie są poznane również w pełni komórkowe i biochemiczne mechanizmy jakie biorą udział w stymulacji fibroblastów (Maldaner i wsp., 2019, Ma i wsp., 2018).

### **Działanie niskoenergetycznego promieniowania laserowego na fibroblasty**

Oslabienie aktywności biologicznej fibroblastów objawiające się spadkiem przylegania, żywotności, proliferacji czy też migracji komórek hamuje normalny proces

gojenie się ran i może powodować powstawanie ran, które są trudne do wyleczenia. Przedstawione w niniejszej pracy wyniki badań wykazały, że najkorzystniej działającymi na ludzkie fibroblasty Hs680 parametrami naświetlania laserem jest działanie na nie wiązką impulsową, o mocy 100 mW i dawkach 5 i 10 J/cm<sup>2</sup> oraz o mocy 200 mW i dawkach 2 i 10 J/cm<sup>2</sup>. Naświetlanie komórek tymi parametrami lasera spowodowało bowiem dobre ich rozplaszczanie na podłożu hodowlanym, a także wzrost ich przylegania i/lub proliferacji (Tab. 2). Ścisła adhezja fibroblastów do podłoża jest warunkiem niezbędnym do ich proliferacji, dlatego też jednym z zastosowanych w niniejszej pracy testów do oceny wpływu na komórki naświetlania laserem był test oceniający przyleganie komórek. Uzyskane wyniki pozostają w zgodzie z przeprowadzonym testem gojenia/zarastania „rany” związanym z procesem migracji komórek. Działanie na komórki wymienionymi parametrami lasera spowodowało także spadek cytotoksyczności/śmiertelności komórek mierzonej poziomem uwalnianej z martwych komórek AK (Tab. 2). Na skutek naświetlania zaobserwowano także spadek wydzielania przez komórki NO (Tab. 2).

W swoich badaniach zespół Shaikh-Kader i wsp. (2021) działając na ludzkie fibroblasty linii komórkowej WS1 laserem o długości fali 660 nm i dawce 5 J/cm<sup>2</sup> oraz o mocy 101 mW wykazał wzrost migracji komórek w teście zarastania rany (Shaikh-Kader i wsp., 2021). Badania nad wpływem działania niskoenergetycznego promieniowania laserowego na ludzkie fibroblasty dziąsłowe prowadził również Basso i wsp. (2012). W tym przypadku autorzy naświetlali komórki wiązką promieniowania laserowego o długości fali 780 nm, o mocy 40 mW i dawkach 0,5; 1,5; 3; 5; 7 J/cm<sup>2</sup>, którą aplikowali co 24 h przez 3 kolejne dni. Wykazali oni, że dwie spośród 6 badanych dawek (0,5 oraz 3 J/cm<sup>2</sup>) spowodowały wzrost proliferacji fibroblastów oraz wzrost migracji komórek w teście zarastania/gojenia rany (Basso i wsp., 2012). Również Hawkins i współautorzy (2006) przeprowadzili badania na fibroblastach SW1, które naświetlali wiązką promieniowania laserowego o długości fali 632,8 nm, o mocy 3 mW i dawkach 0,5; 2,5; 5, 10 i 16 J/cm<sup>2</sup> co 24h, przez 2 kolejne dni. I w tym przypadku stwierdzono działanie biostymulujące lasera w stosunku do komórek, ale przy zastosowaniu niższych dawek naświetlania. Autorzy wykazali bowiem wzrost liczby komórek oraz ich migracji na skutek naświetlań laserem w dawkach 2,5 oraz 5 J/cm<sup>2</sup> oraz spadek żywotności komórek i wzrost cytotoksyczności po zastosowaniu wyższych dawek promieniowania laserowego: 10 i 16 J/cm<sup>2</sup> (Hawkins i wsp., 2006). Wzrost żywotności oraz migracji fibroblastów linii komórkowej WS1 w teście zarastania rany opisał także zespół Jare i wsp. (2020). W tym przypadku komórki były naświetlane laserem o długości fali 660 nm, o mocy 100 mW i dawce 5 J/cm<sup>2</sup> (Jare i wsp., 2020). Na tej samej linii komórkowej fibroblastów prowadzili także badania Hourelid i wsp.

(2010). W tym przypadku komórki były poddawane jednorazowemu naświetlaniu wiązką promieniowania laserowego o długości fali 830 nm, mocy 40 mW i dawce 5 J/cm<sup>2</sup>. Autorzy Ci również wykazali wzrost proliferacji komórek i jednocześnie wzrost wydzielania NO (Hourelid i wsp., 2010). Podobne wyniki, zwiększenia liczby fibroblastów stwierdzono także w przypadku mysich fibroblastów linii komórkowej NIH-3T3 naświetlanych laserem o długości fali 904 nm, o mocy 120 mW i dawkach 3-5 J/cm<sup>2</sup> przez okres od 1-6 dni (Pereira i wsp., 2002). Również w badaniach Chen i wsp. (2008) na skutek naświetlania fibroblastów pobranych ze ścięgna Achillesa, laserem o długości fali 820 nm oraz 635 nm, o emisji impulsowej, o mocy 40 mW, oraz dawkach: 1, 2 lub 3 J/cm<sup>2</sup> po 24 h wykazano, że najlepsze efekty (wzrost proliferacji komórek) uzyskano po zastosowaniu dawek niższych 1 i 2 J/cm<sup>2</sup>. Zastosowanie dawki wyższej 3 J/cm<sup>2</sup> spowodowało natomiast zahamowanie proliferacji komórek (Chen i wsp., 2008). Odmienne wyniki uzyskano w badaniach Maldaner i wsp. (2019) gdzie wykazano, że naświetlanie laserem o długości fali 660 nm, o mocy 35 mW i dawkach 3, 4 J/cm<sup>2</sup> nie wpłynęło po 72h od naświetlania na żywotność fibroblastów linii komórkowej HFF-1. Wyższe dawki (5,6,8 J/cm<sup>2</sup>), podobnie jak we wcześniejszych badaniach, spowodowały wzrost śmiertelności komórek (Maldaner i wsp., 2019). Pozytywny wpływ na fibroblasty naświetlania laserem opisał również zespół Ma i wsp. (2018). W badaniach tych naświetlano komórki 2-krotnie laserem o różnych długościach fali: 635 nm, 830 nm oraz o dawce 60 J/cm<sup>2</sup>. Wzrost proliferacji fibroblastów wykazano na skutek naświetlania komórek długością fali 830 nm oraz jednocześnie dwoma długościami fali 635 i 830 nm lasera. Natomiast naświetlanie laserem o długości fali 635 nm nie miało wpływu na proliferację fibroblastów. Wszystkie badane długości fali lasera spowodowały natomiast wzrost wydzielania przez komórki kolagenu (Ma i wsp., 2018). Odmienne wyniki uzyskał Szymański i wsp. (2021). W tym przypadku fibroblasty linii komórkowej BJ-5 zostały poddane naświetlaniu laserem o długości fali 638 nm, o mocy 300 mW oraz o różnych dawkach: 13,8; 41,3; 82,7; 151,5 192,9 oraz 234,2 J/cm<sup>2</sup>. Okazało się, że w tym przypadku niższe dawki naświetlania laserem nie wpłynęły na żywotność i proliferację komórek, dawki powyżej 151 J/cm<sup>2</sup> obniżyły żywotność, natomiast powyżej 192,9 J/cm<sup>2</sup> działały na komórki cytotoksycznie (Szymański i wsp., 2021).

Podsumowując uzyskane w niniejszej pracy wyniki badań własnych oraz przytoczone powyżej wyniki badań innych autorów, można stwierdzić, że wyniki te potwierdzają koncepcję, że ekspozycja fibroblastów na niskoenergetyczne promieniowanie laserowe może modyfikować aktywność biologiczną ludzkich fibroblastów, a kierunek działania lasera jest zależny od długości fali, mocy, dawki oraz sposobu aplikacji (stałej lub impulsowej) wiązki.



Kolejnym etapem badań w niniejszej pracy było sprawdzenie w jaki sposób porowate membrany, z polimeru polilaktydu, działają na aktywność biologiczną fibroblastów i czy aktywność komórek hodowanych na tych membranach nie różni się od aktywności fibroblastów hodowanych na szkiełkach, stanowiących w niniejszej pracy grupę kontrolną. Wyniki uzyskane na tym etapie badań były tym samym niezbędne do oceny możliwości wykorzystania pla jako podłoża hodowlanego dla komórek i jednocześnie źródło powolnego uwalniania witamin E i K, co sprawdzano w następnym kroku badań.

Z przeglądu piśmiennictwa wiadomo, że materiał pla jest powszechnie używanym polimerem syntetycznym do zastosowań biomedycznych, ze względu na swoje właściwości, takie jak: biokompatybilność, biodegradowalność, czy też wytrzymałość mechaniczna. Badania prowadzone przez różne zespoły naukowców już wcześniej wykazały biozgodność materiału pla w stosunku do różnych linii komórkowych fibroblastów. Dobre przyleganie oraz wysoką żywotność i proliferację mysich fibroblastów 3T3 hodowanych na polilaktydzie wykazali Chung i wsp. (2011); Cont i wsp. (2013) oraz Hussein i wsp. (2021). Z kolei Hongyan i wsp. (2020) wykazali pozytywny wpływ polilaktydu na przyleganie i proliferację fibroblastów innej mysiej linii komórkowej L-929 (Hongyan i wsp., 2020).

W obecnej pracy, badania na materiale pla rozpoczęto od oznaczenia żywotności oraz aktywności wydzielniczej fibroblastów Hs680 mierzoną poziomem uwalnianej przez komórki AK a także wydzielanego NO, białka, MMP, cytokin oraz poziomem potencjału oksydacyjno-antyoksydacyjnego komórek. Uzyskane wyniki wykazały biozgodność testowanego materiału, stwierdzono bowiem brak różnic w żywotności oraz cytotoksyczności pomiędzy komórkami hodowanymi na materiale pla a komórkami kontrolnymi (Tab. 3). Wykazano natomiast wzrost wydzielania NO przez fibroblasty hodowane na pla w porównaniu do poziomu NO wydzielanego przez komórki kontrolne (Tab. 3). W tym miejscu warto wspomnieć, że NO bierze udział w wielu fizjologicznych procesach komórkowych, ale także procesach patologicznych. Wykazano, że NO może mieć działanie zarówno pro- jak i antyapoptotyczne, w zależności od jego stężenia, a także typu komórek, na które oddziałuje (Ługowski i wsp., 2011). W wysokich stężeniach NO, reagując z białkami może powodować nitrozylację reszt aminowych, upośledzając ich funkcję i wywołując efekt cytotoksyczny/apoptotyczny w stosunku do otaczających go komórek. Może także pobudzać wydzielanie cytokin prozapalnych pobudzając komórki układu odpornościowego i inicjując stanu zapalny. Podwyższony poziom NO nie jest jednak jednoznacznie negatywnym zjawiskiem. Istnieją bowiem doniesienia naukowe, które wskazują, że podwyższony poziom NO przyspiesza proliferację fibroblastów a także

syntezę kolagenu przyczyniając się do szybszego gojenia ran (Malone-Povolny i wsp., 2019). Zgodnie z badaniami Hourelda i wsp. (2010) poziom NO jest znacznie obniżony w trudno gojących się ranach cukrzycowych, a jego podwyższenie może przyspieszyć zasklepienie się tych uszkodzeń (Hourelda i wsp., 2010). Według Hana i wsp. (2012) stężenie NO szybko wzrasta po uszkodzeniu skóry a następnie stopniowo maleje wraz z postępowaniem procesu gojenia rany. Wykazano także, że podwyższony poziom NO przyspiesza proliferację fibroblastów (Han i wsp., 2012). Z kolei Witte i wsp. (2000) wykazali, że istnieje korelacja pomiędzy indukowaną, podwyższoną w obrębie rany syntezą NO a zwiększoną produkcją kolagenu. W badaniach tych wykazano także, że NO wzmacnia wytwarzanie kolagenu również przez prawidłowe/nieuszkodzone fibroblasty (Witte i wsp., 2000). Ponieważ wyższy poziom NO może przekładać się na wzmożenie procesu tworzenia włókien kolagenowych wydaje się, że zaobserwowany wzrost poziomu NO wydzielanego przez fibroblasty hodowane na materiale pla jest zjawiskiem korzystnym.

Jak wspomniano już wcześniej główna funkcja fibroblastów związana jest z zapewnieniem tkankom integralności poprzez syntezę i wydzielanie białkowych składników ECM, w tym kolagenu, elastyny, proteoglikanów (Marques i wsp., 2004; Abonnenc i wsp., 2013). Białkami wydzielanymi przez fibroblasty są także cytokiny, czynniki wzrostu komórek i metaloproteinazy. Substancje te zaangażowane są m.in. w aktywację leukocytów i w konsekwencji w rozwój miejscowego stanu zapalnego, ale także w stymulację wzrostu, proliferacji oraz migracji komórek w trakcie procesu gojenia ran. Obniżenie wydzielania przez fibroblasty białek w postaci ECM jest zjawiskiem niekorzystnym, gdyż prowadzi do wydłużenia czasu regeneracji uszkodzonych tkanek. Uzyskane w niniejszej pracy wyniki wskazują na wzrost wydzielania białka przez fibroblasty hodowane na materiale pla, w porównaniu z komórkami kontrolnymi (Tab. 3). Jednocześnie wykazano obniżenie poziomu wydzielanych przez fibroblasty IL-6 i IL-8 (Tab. 4). W tym miejscu można jedynie przypuszczać, że materiał pla zadziałał na komórki korzystnie, zwiększając syntezę białek strukturalnych, będących składnikami ECM jednocześnie obniżając poziom cytokin prozapalnych. W przyszłości należałoby jednak uzupełnić badania o oznaczenie konkretnych rodzajów białek wydzielanych przez fibroblasty, zwłaszcza kolagenu I i III, odgrywających kluczową rolę w procesie gojenia ran.

Naświetlanie 4-krotne fibroblastów hodowanych na materiale pla wiązką promieniowania laserowego o mocy 100 mW i dawce 10 J/cm<sup>2</sup> oraz o mocy 200 mW i dawce 2 J/cm<sup>2</sup> nie wpłynęło na żywotność komórek oraz na wydzielanie AK przy 4-krotnym naświetlaniu. W przypadku naświetlania laserem o mocy 100 mW i dawce 10

J/cm<sup>2</sup> również 6-krotne naświetlanie komórek nie spowodowało zmian w poziomie uwalnianej AK, w porównaniu do grupy kontrolnej, hodowanej na szkiełkach. W wybranych punktach czasowych, na skutek zadziałania pozostałymi, badanymi w pracy parametrami lasera stwierdzono natomiast spadek żywotności fibroblastów oraz wzrost poziomu AK. W wybranych punktach czasowych stwierdzono także, że na skutek naświetlania komórek laserem o mocy 100 mW i dawce 5 J/cm<sup>2</sup> oraz o mocy 200 i dawce 2 J/cm<sup>2</sup> doszło do wzrostu wydzielania NO. Z kolei w przypadku naświetlania parametrami lasera o mocy 100 mW i dawce 10 J/cm<sup>2</sup> oraz o mocy 200 mW i dawce 2 lub 10 J/cm<sup>2</sup> doszło do wzrostu wydzielania białka (Tab. 3). Zważywszy na uzyskane na tym etapie badań wyniki, poziom cytokin oznaczono w nadsączach z nad hodowli komórek naświetlanych parametrami lasera, które działy na komórki pozytywnie, czyli laserem o mocy 100 mW i dawce 10 J/cm<sup>2</sup> oraz o mocy 200 mW i dawce 2 J/cm<sup>2</sup>.

Warto jednak zauważyć, że naświetlanie komórek tymi parametrami lasera skutkowało spadkiem wydzielania IL-6 i IL-8 nie pobudzając jednocześnie fibroblastów do wydzielania pozostałych, badanych cytokin (Tab. 4). Wyniki te mogą zatem sugerować, że działanie pla w powiązaniu z naświetlaniem laserem (wiązką promieniowania laserowego o mocy 100 mW i dawce 10 J/cm<sup>2</sup> oraz o mocy 200 mW i dawce 2 J/cm<sup>2</sup>) ma działanie przeciwzapalne.

Podobne wyniki badań uzyskali Shaikh-Kader i wsp. (2021) działając na fibroblasty WS1 światłem lasera o długości fali 660 nm, o mocy 101 mW i dawce 5 J/cm<sup>2</sup>. W tak potraktowanych komórkach zaobserwowali bowiem spadek wydzielania IL-6 oraz TNF- $\alpha$  (Shaikh-Kader i wsp., 2021). IL-6 jest cytokiną, która działa na wszystkich etapach gojenia rany. Prawdopodobnie bierze ona udział w aktywacji fibroblastów do wydzielania kolagenu w tworzeniu niedojrzałej tkanki ziarninowej. Wykazano, że poziomy IL-6 w wysięku z rany u zwierząt z cukrzycą są znacznie niższe niż u zdrowych. U zwierząt tych występują również zaburzenia w organizacji ziarniny i angiogenezie, co może wskazywać na znaczenie IL-6 w tych procesach (Mrozikiewicz-Rakowska i wsp., 2015). Z drugiej jednak strony przedłużający się, podniesiony poziom IL-6 a także innych cytokin prozapalnych jest jedną z prawdopodobnych przyczyn wydłużenia czasu gojenia się ran i powstawania ran przewlekłych (Shaikh-Kader i wsp., 2021). Wydaje się zatem, że obniżony poziom IL-6 w naszych badaniach może być zjawiskiem pożądanym. Badania innych naukowców również wskazują na zmiany w poziomie wydzielanych przez naświetlane laserem fibroblasty białek, w tym cytokin. Z piśmiennictwa tematu wiadomo, że w niskich stężeniach cytokiny prozapalne stymulują proliferację i migrację komórek podczas początkowej fazy gojenia się ran (Reinke i wsp., 2012). Hararli i wsp. (2019) działając na

fibroblasty wiązką ciągłą lasera o długości fali 940 nm i dawkach 0,84 J/cm<sup>2</sup> (moc 0,04 W/cm<sup>2</sup>), 1,4 J/cm<sup>2</sup> (moc 0,07 W/cm<sup>2</sup>) oraz 1,97 J/cm<sup>2</sup> (moc 0,09 W/cm<sup>2</sup>) wykazali, że niższe dawki lasera (0,84 oraz 1,4 J/cm<sup>2</sup>) spowodowały wzrost wydzielania IL-6 i IL-8, podczas gdy wyższa dawka (1,97 J/cm<sup>2</sup>) spowodowała spadek wydzielania tych cytokin przez naświetlane fibroblasty (Hararli i wsp., 2019). Podobne badania prowadzili także Houreld i wsp (2010), którzy naświetlali fibroblasty linii komórkowej SW1 jednorazowo, wiązką promieniowania laserowego o długości fali 830 nm, o mocy 40 mW i dawce 5 J/cm<sup>2</sup>. Autorzy stwierdzili, że komórki te wydzielały mniej prozapalnych cytokin takich jak TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$  (Houreld i wsp., 2010). Inny zespół Maldaner i wsp. (2019) badając fibroblasty linii komórkowej HFF-1 naświetlając je laserem o długości fali 660 nm, o mocy 35 mW i dawkach 3, 4, 5, 6 oraz 8 J/cm<sup>2</sup> zaobserwował, że wszystkie zastosowane dawki lasera spowodowały wzrost wydzielania prozapalnej IL-1, natomiast wyższe dawki (6 i 8 J/cm<sup>2</sup>) spowodowały wzrost wydzielania IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  (Maldaner i wsp., 2019). Z kolei, jednocześnie naświetlanie tych komórek niższymi dawkami lasera (3,4,5 J/cm<sup>2</sup>) spowodowało wzrost poziomu przeciwzapalnej IL-10 a wyższymi dawkami (6 i 8 J/cm<sup>2</sup>) spadek jej wydzielania (Maldaner i wsp., 2019). Inny zespół Basso i wsp. (2015) prowadzili badania na fibroblastach dziąsłowych, naświetlając komórki laserem o długości fali 780 nm, o mocy 25 mW oraz dawkach 0,5; 1,5 oraz 3 J/cm<sup>2</sup>. W przypadku komórek traktowanych dawką 1,5 J/cm<sup>2</sup> oraz 3 J/cm<sup>2</sup> zaobserwowano niewielki wzrost ekspresji genów dla TNF- $\alpha$  oraz IL-8. Wzrost wydzielania TNF- $\alpha$  zaobserwowano przy naświetlaniu komórek dawką lasera 0,5 J/cm<sup>2</sup> (Basso i wsp., 2015).

Metaloproteiny to enzymy zdolne do rozkładania macierzy pozakomórkowej oraz aktywacji chemokin, cytokin i czynników wzrostu komórek. W warunkach fizjologicznych MMP odgrywają istotną rolę w proces gojenia ran, dlatego też w niniejszej pracy przeprowadzono badania wydzielania MMP przez fibroblasty. Wykazano brak różnic w poziomie MMP pomiędzy naświetlanymi fibroblastami, hodowanymi na materiale pla i kontrolnymi (Tab. 4). Badania pokazują, że w przypadku owrzodzeń w zespole stopy cukrzycowej w wysięku zapalnym stwierdza się wysoki poziom MMP, szczególnie MMP-9. Skutkuje to spowolnieniem procesu gojenia rany a usuwanie wysięku przyczynia się do zmniejszenia ilości krążących MMP i przyspieszenia tego procesu (Mrozikiewicz-Raczkowska i wsp., 2015). Wydaje się więc, że brak stymulacji fibroblastów do wydzielania MMP jest zjawiskiem korzystnym. Również Ayuk i wsp. (2018) prowadzili badania na fibroblastach linii komórkowej WS1, które naświetlano laserem o dawce 5 J/cm<sup>2</sup> stosując dwie długości fali 660 nm (o mocy 108 mW) lub 830 nm (o mocy 94 mW). W tym przypadku naświetlane komórki w porównaniu z kontrolą wydzielały mniej MMP-9

niezależnie od zastosowanych parametrów naświetlania, co również wydaje się być w świetle piśmiennictwa zjawiskiem korzystnym (Ayuk i wsp., 2018). Istnieją jednak doniesienia, które przedstawiają wyniki badań wskazujące na wzrost MMP na skutek naświetlania komórek laserem. Przykładowo Dang i wsp. (2010) naświetlali ludzkie fibroblasty HSF laserem o długości fali 1064 nm, o dawce 5J/cm<sup>2</sup> wykazując wzrost ekspresji genów dla MMP-1 oraz MMP-2 w naświetlanych komórkach, w porównaniu z kontrolą (Dang i wsp., 2010).

### **Działanie witamin E i K oraz niskoenergetycznego promieniowania laserowego na fibroblasty**

Witamina E oraz witamina K oprócz zdolności antyoksydacyjnych wykazują właściwości przeciwzapalne i przeciwnowotworowe. Dodatkowo witamina E może pobudzać wydzielanie czynników wzrostu komórek a witamina K działa przeciwkrzepliwie (Zielińska i wsp., 2014, He i wsp., 2015; Dasari i wsp., 2018; Miyazawa i wsp., 2019). Dzięki wspomnianym właściwościom witaminy te mogą wpływać na przyspieszenie procesu gojenie ran (Rashid i wsp., 2008; Salinthone i wsp., 2013; Hemmati i wsp., 2014; Rush i wsp., 2016).

Wyniki badań opisane w piśmiennictwie to głównie wyniki dotyczące wpływu witamin E oraz K na komórki nowotworowe (Boscoboinik i wsp., 1991; Vivarelli i wsp., 2019; Ahmadi i wsp., 2022; Hekazy i wsp., 2020; Lu i wsp., 2021; Kandhasamy i wsp., 2021; Dasari i wsp., 2018; He i wsp., 2015, Hegazy i wsp., 2020). Zgodnie z moją najlepszą wiedzą, dotychczas nie opublikowano natomiast żadnej pracy, której celem było zbadanie jednoczesnego wpływu na ludzkie fibroblasty witamin E i K oraz naświetlania laserem niskiej mocy. Dlatego też, w pierwszej kolejności w niniejszej pracy oceniono wpływ na ludzkie fibroblasty Hs680 działania uwalnianych z polimeru pla witamin E oraz K.

Wykazano, że w 7 dniu hodowli zarówno witamina K jak i witamina E spowodowały wzrost żywotności fibroblastów w porównaniu z komórkami kontrolnymi (Tab. 5). Dodatek witamin skutkował spadkiem poziomu uwalnianego AK, za wyjątkiem 7 dnia eksperymentu, kiedy to dodatek witaminy K wywołał wzrost poziomu AK (Tab. 5). Witamina K nie miała jednak wpływu na wydzielanie przez komórki NO, natomiast wywołała spadek wydzielania przez fibroblasty białka oraz IL-6 i IL-8 (Tab. 5, Tab. 6). Z kolei dodatek witaminy E skutkował wzrostem wydzielania przez komórki NO (Tab. 5). Można więc przypuszczać, że dodatek witaminy K do hodowli fibroblastów w tym wypadku miał silniejsze działanie przeciwzapalne niż dodatek witaminy E.

W piśmiennictwie istnieje niewiele prac, w których badano wpływ witamin E i K na ludzkie fibroblasty i badania te dotyczą głównie ich wpływu na żywotność i proliferację tych komórek. Badania takie prowadził min. zespół Hu i współautorzy (2018), którzy ocenili wpływ na ludzkie fibroblasty witaminy E uwalnianej w trakcie hodowli z kopolimeru poliglikolaktydu. Kopolimer ten zawiera w swoim składzie badany przez nas polimer pla. Autorzy wykazali pozytywny wpływ witaminy E, która spowodowała wzrost proliferacji fibroblastów w 3 i 7 dniu eksperymentu (Hu i wsp., 2018). Z kolei inni naukowcy badali wpływ witaminy E na mysie fibroblasty linii komórkowej L-929. W tym przypadku jako źródło witaminy E zastosowano nanowłókna na bazie fibroiny jedwabiu (Kheradvar i wsp., 2018). Również i w tym przypadku wykazano, że witamina E wpłynęła na wzrost przylegania i proliferacji komórek a także spowodowała wzrost syntezy kolagenu. Również Sheng i wsp. (2013) wykazali, że modyfikacja fibroiny jedwabiu dodatkiem witaminy E skutkowała wzrostem przylegania, żywotności i proliferacji fibroblastów L-929 (Sheng i wsp., 2013). Wyniki tych badań pozostają w zgodzie z obecnymi badaniami, w których wykazaliśmy wzrost żywotności komórek pod wpływem tej witaminy w 7 dniu hodowli.

Z kolei, zespół Liu i wsp. (1996) badając wpływ różnych stężeń witaminy K (0,5-10 mg/l) na fibroblasty spojówkowe królika wykazał, że wraz ze wzrostem stężenia witaminy K dochodziło do spadku aktywności proliferacyjnej komórek. Wyższe stężenia witaminy K negatywnie wpływały też na morfologię komórek (Liu i wsp., 1996). Wyniki badań Pinilla i wsp. (2014) pokazały natomiast, że witamina K niezależnie od zastosowanej dawki (1, 2, 4, 6 mg/l) działa na fibroblasty niekorzystnie. Dawki niższe hamowały proliferację komórek oraz ich migrację spowalniając tym samym (w modelu *in vitro*) czas gojenia rany. Z kolei wyższe dawki (4 i 6 mg/l) witaminy działały cytotoksycznie (Pinilla i wsp., 2014). Z kolei badania Kandhasamy i wsp. (2021) pokazały, że witamina K może pozytywnie modulować odpowiedź biologiczną fibroblastów. Wykazali oni bowiem, że ludzkie fibroblasty linii komórkowej NIH T3T oraz FF1 pod wpływem dodatku do hodowli witaminy K wykazują wzrost przylegania, proliferacji oraz migracji (Kandhasamy i wsp., 2021). Wyniki badań Kandhasamy i wsp. (2021) pozostają w zgodzie z wynikami naszych badań dotyczących pozytywnego wpływu witaminy K na ludzkie fibroblasty Hs680.

Nasze dalsze badania wykazały, że naświetlania fibroblastów laserem o mocy 200 mW oraz dawce 2 J/cm<sup>2</sup> miało najkorzystniejszy wpływ na komórki hodowane na pla z dodatkiem witaminy K. Naświetlanie skutkowało bowiem wzrostem żywotności komórek i jednocześnie spadkiem cytotoksyczności (spadek poziomu uwalnianej AK) (Tab. 5). Naświetlanie komórek laserem o tych parametrach skutkowało również przejściowym

wzrostem poziomem wydzielanego białka, co może sugerować wzrost aktywności fibroblastów w kierunku syntezy białkowych składników macierzy zewnątrzkomórkowej w tym kolagenu typu I i III (Tab. 4). Aby jednak można było wyciągnąć jednoznaczny wniosek, należałoby, jak już wcześniej wspomniano, dokonać oznaczeń konkretnych typów białek a nie jego ogólnego poziomu. Naświetlanie komórek skutkowało również spadkiem poziomu wydzielanych cytokin IL-6, IL-8 oraz metaloproteinaz (pro-MMP-9 i MMP-9) (Tab. 6). Można więc przypuszczać, że naświetlanie laserem komórek hodowanych z dodatkiem witaminy K może dodatkowo wyciszać stan zapalny, skracając czas fazy zapalenia w procesie gojenia rany. Korzystny wpływ na komórki wydaje się mieć również ich hodowla z dodatkiem witaminy K i jednoczesne naświetlanie laserem o mocy 100 oraz 200 mW oraz o dawce 10 J/cm<sup>2</sup>. W tym przypadku stwierdzono przejściowy wzrost żywotności komórek po 2-krotnym naświetleniu, spadek cytotoxyczności oraz spadek poziomu wydzielanego NO (Tab. 5). Stwierdzono również, że naświetlanie komórek laserem o mocy 100 mW i dawce 10 J/cm<sup>2</sup> skutkowało spadkiem poziomu wydzielanych IL-6 oraz IL-8 (Tab. 6). Można więc przypuszczać, że i w tym przypadku parametry naświetlania laserem mogą działać w kierunku wyciszenia stanu zapalnego i tym samym przyspieszenia procesu gojenia rany. Z kolei naświetlanie komórek hodowanych z dodatkiem witaminy E wydaje się mieć działanie niekorzystne, gdyż spowodowało przede wszystkim spadek żywotności fibroblastów oraz w wybranych punktach czasowych spadek poziomu wydzielanego białka (Tab. 5). Niestety nie udało mi się znaleźć w piśmiennictwie prac, które pozwoliłyby na przedyskutowanie uzyskanych wyników tej części badań, tzn. na temat jednoczesnego wpływu witamin E lub K oraz niskoenergetycznego promieniowania laserowego na fibroblasty.

## **Podsumowanie**

Podsumowując można stwierdzić, że w warunkach *in vitro* najkorzystniej na fibroblasty działało naświetlanie impulsową wiązką promieniowania laserowego o mocy 100 mW oraz dawkach 5 i 10 J/cm<sup>2</sup> oraz o mocy 200 mW i dawkach 2 i 10 J/cm<sup>2</sup>. Wykazano także pozytywny wpływ jednoczesnego działania na komórki witaminy K i naświetlania komórek laserem o mocy 100 mW i dawce 10 J/cm<sup>2</sup> oraz o mocy 200 i dawce 2 J/cm<sup>2</sup>.

Wydaje się więc, że wytypowane w trakcie badań niniejszej pracy parametry działania niskoenergetycznym promieniowaniem laserowym mogą sprzyjać procesowi gojenia ran poprzez aktywację proliferacji fibroblastów i ich ogólnej aktywności wydzielniczej przy równoczesnym obniżeniu ich aktywności prozapalnej.

## **Wnioski końcowe**

1. Cztery spośród dwunastu badanych parametrów naświetlania laserem miało korzystny wpływ na odpowiedź biologiczną fibroblastów modulując przyleganie/proliferyzację, migrację oraz aktywności wydzielniczą komórek w kierunku przyspieszenia procesu gojenia rany.
2. Modyfikacja polimeru pla witaminą K w przypadku większości badanych wskaźników miała pozytywny wpływ na fibroblasty, powodując wzrost ich żywotności oraz modulując aktywność wydzielniczą komórek w kierunku sprzyjającym procesowi gojenia rany.
3. Równoczesne działanie na fibroblasty witaminą K i naświetlanie niskoenergetycznym promieniowaniem laserowym może mieć pozytywny wpływ na proces gojenia rany mierzony wzrostem żywotności oraz obniżeniem aktywności prozapalnej fibroblastów.

## **Wniosek ogólny**

Wydaje się, że modyfikacja membran pla dodatkiem witaminy K (jako potencjalny opatrunek) i jednoczesne naświetlanie fibroblastów wytypowanymi w niniejszej pracy parametrami lasera może skracać czas trwania procesu gojenia rany.



Tabela 2. Wpływ naświetlania ciągłą (C) i impulsową (I) wiązką promieniowania laserowego na odpowiedź komórkową fibroblastów linii komórkowej Hs680 hodowanych na szkiełkach.

| komórki<br>naświetlane<br>grupa ctr | badany<br>wskaźnik | dzień eksperymentu<br>liczba aplikacji wiązką promieniowania laserowego |                        |                        |                        |                          |
|-------------------------------------|--------------------|---|------------------------|------------------------|------------------------|--------------------------|
|                                     |                    | 3 dzień<br>2 aplikacje  | 5 dzień<br>4 aplikacje | 7 dzień<br>6 aplikacje | 9 dzień<br>8 aplikacje | 11 dzień<br>10 aplikacje |
| 100/2/C                             | przyleganie        | ↓   | ↓                      | –                      | ↓                      | ↓                        |
|                                     | AK                 | –   | –                      | ↑                      | –                      | –                        |
|                                     | NO                 | ↑   | ↑                      | –                      | ↑                      | ↑                        |
| 100/5/C                             | przyleganie        | –   | –                      | –                      | ↑                      | ↑                        |
|                                     | AK                 | ↓   | –                      | ↓                      | –                      | –                        |
|                                     | NO                 | ↑   | –                      | –                      | –                      | ↓                        |
| 100/10/C                            | przyleganie        | –   | –                      | –                      | –                      | ↓                        |
|                                     | AK                 | –   | –                      | ↑                      | –                      | –                        |
|                                     | NO                 | ↑   | ↑                      | ↑                      | ↑                      | ↑                        |
| 200/2/C                             | przyleganie        | ↓   | –                      | –                      | ↓                      | –                        |
|                                     | AK                 | –   | ↓                      | ↓                      | –                      | ↑                        |
|                                     | NO                 | ↓   | ↓                      | ↓                      | ↑                      | ↑                        |
| 200/5/C                             | przyleganie        | ↓   | –                      | ↓                      | ↓                      | ↓                        |
|                                     | AK                 | –   | –                      | –                      | –                      | –                        |
|                                     | NO                 | ↑   | –                      | ↑                      | ↑                      | ↑                        |
| 200/10/C                            | przyleganie        | –   | –                      | –                      | ↓                      | –                        |
|                                     | AK                 | –   | –                      | ↓                      | –                      | –                        |
|                                     | NO                 | ↑   | –                      | ↑                      | ↑                      | –                        |
| 100/2/I                             | przyleganie        | –   | –                      | –                      | –                      | –                        |
|                                     | AK                 | –   | –                      | ↑                      | ↑                      | ↑                        |
|                                     | NO                 | ↑   | ↑                      | –                      | ↑                      | –                        |
| 100/5/I                             | przyleganie        | –   | ↑                      | ↑                      | ↑                      | –                        |
|                                     | AK                 | ↓   | ↓                      | ↓                      | ↓                      | ↓                        |
|                                     | NO                 | ↓   | ↓                      | –                      | –                      | –                        |
| 100/10/I                            | przyleganie        | –   | ↑                      | ↑                      | ↑                      | ↑                        |
|                                     | AK                 | ↓   | ↓                      | ↓                      | ↓                      | ↓                        |
|                                     | NO                 | ↓   | ↓                      | –                      | –                      | –                        |
| 200/2/I                             | przyleganie        | –   | ↑                      | ↑                      | ↑                      | –                        |
|                                     | AK                 | ↓   | ↓                      | ↓                      | ↓                      | ↓                        |
|                                     | NO                 | ↓   | –                      | –                      | –                      | ↓                        |
| 200/5/I                             | przyleganie        | ↓   | ↓                      | ↓                      | ↓                      | ↓                        |
|                                     | AK                 | ↓   | ↓                      | ↓                      | –                      | ↑                        |
|                                     | NO                 | –   | ↑                      | –                      | ↑                      | ↑                        |
| 200/10/I                            | przyleganie        | –   | ↑                      | ↑                      | ↑                      | ↑                        |
|                                     | AK                 | ↓   | ↓                      | ↓                      | ↓                      | ↓                        |
|                                     | NO                 | ↓   | –                      | –                      | –                      | ↑                        |

Komórki przez określoną liczbę dni były hodowane na szkiełkach i naświetlane laserem o mocy 100 lub 200 mW oraz dawkach 2, 5 lub 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek z komórkami. W kolejnych 3, 5, 7, 9, 11 dniu eksperymentu oznaczano: przyleganie komórek, poziom kinazy adenylowej (AK), poziom tlenu azotu (NO). Różnice dla poszczególnych grup naświetlanych różnymi parametrami lasera względem nienaświetlanej kontroli oznaczono strzałkami, gdzie: ↑ oznacza wzrost; ↓ oznacza spadek; – oznacza brak istotnych różnic statystycznych.

Tabela 3. Wpływ naświetlania impulsową (I) wiązką promieniowania laserowego na żywotność oraz aktywność wydzielniczą (mierzoną poziomem AK, NO, białka) fibroblastów linii komórkowej Hs680 hodowanych na membranach pla.

| komórki<br>nienaświetlane<br>grupa pla                  | badany wskaźnik | dzień eksperymentu  |                        |                        |
|---|-----------------|---|------------------------|------------------------|
|   |                 | 3 dzień   | 5 dzień                | 7 dzień                |
|   | żywotność       | –   | –                      | ↓                      |
|   | AK              | –   | –                      | –                      |
|   | NO              | ↑   | ↑                      | ↑                      |
|   | białko          | ↑   | –                      | –                      |
| komórki<br>naświetlane<br>grupa pla<br>parametry lasera | badany wskaźnik | dzień eksperymentu<br>liczba aplikacji wiązką promieniowania laserowego |                        |                        |
|   |                 | 3 dzień<br>2 aplikacje  | 5 dzień<br>4 aplikacje | 7 dzień<br>6 aplikacje |
| 100/5/I   | żywotność       | ↓   | ↓                      | ↓                      |
|   | AK              | ↑   | –                      | –                      |
|   | NO              | ↑   | ↑                      | ↑                      |
|   | białko          | –   | –                      | –                      |
| 100/10/I  | żywotność       | ↓   | –                      | ↓                      |
|   | AK              | ↑   | –                      | –                      |
|   | NO              | –   | –                      | –                      |
|   | białko          | ↑   | ↑                      | ↑                      |
| 200/2/I   | żywotność       | ↓   | –                      | ↓                      |
|   | AK              | ↑   | –                      | ↑                      |
|   | NO              | –   | ↑                      | –                      |
|   | białko          | –   | ↑                      | ↑                      |
| 200/10/I  | żywotność       | ↓   | –                      | ↓                      |
|   | AK              | ↑   | ↑                      | ↑                      |
|   | NO              | –   | –                      | –                      |
|   | białko          | ↑   | ↑                      | ↑                      |

Komórki przez określoną liczbę dni były hodowane na referencyjnych membranach z polilaktonu (grupa pla) i naświetlane laserem o mocy 100 lub 200 mW oraz dawkach 2, 5 i 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek z komórkami. W kolejnych 3, 5, 7 dniu eksperymentu oznaczono: żywotność komórek, poziom kinazy adenylowej (AK), oraz poziom tlenu azotu (NO) i białka. Różnice dla poszczególnych grup nienaświetlanych oraz naświetlanych różnymi parametrami lasera względem kontroli (grupa ctr) odpowiednio nienaświetlanej i naświetlanej, hodowanej na szkiełkach oznaczono strzałkami, gdzie: ↑ oznacza wzrost; ↓ oznacza spadek; – oznacza brak istotnych różnic statystycznych.

Tabela 4. Wpływ naświetlania impulsową (I) wiązką promieniowania laserowego na aktywność wydzielniczą (mierzona poziomem MMP, cytokin, TAS/TAC, TOS/TOC) fibroblastów linii komórkowej Hs680 hodowanych na membranach pla.

|  | badany wskaźnik                         | dzień eksperymentu |   |
|--|---|--------------------|---|
|  |   | 3 dzień            | 5 dzień   |
| <b>komórki nienaświetlane</b><br>grupa pla | pro-MMP-9                               | –                  | –   |
|  | MMP-9                                   | –                  | –   |
|  | MMP-2                                   | –                  | –   |
|  | IL-6                                    | –                  | ↓   |
|  | IL-8                                    | ↓                  | ↓   |
|  | IL-1β                                   | –                  | –   |
|  | IL-10                                   | –                  | –   |
|  | IL-12p70                                | –                  | –   |
|  | TNF-α                                   | –                  | –   |
|  | TOS/TOC                                 | –                  | –   |
|  | TAS/TAC                                 | –                  | –   |
|  | <b>komórki naświetlane</b><br>grupa pla | badany wskaźnik    | dzień eksperymentu<br>liczba aplikacji wiązką promieniowania laserowego |
| 3 dzień<br>2 aplikacje                     |   |                    | 5 dzień<br>4 aplikacje  |
| parametry lasera                           | pro-MMP-9                               | –                  | –   |
|  | MMP-9                                   | –                  | –   |
|  | MMP-2                                   | –                  | –   |
|  | IL-6                                    | ↓                  | ↓   |
|  | IL-8                                    | ↓                  | ↓   |
|  | IL-1β                                   | –                  | –   |
|  | IL-10                                   | –                  | –   |
|  | IL-12p70                                | –                  | –   |
|  | TNF-α                                   | –                  | –   |
|  | TOS/TOC                                 | –                  | –   |
|  | TAS/TAC                                 | –                  | –   |
|  | 100/10/I                                | pro-MMP-9          | –   |
| MMP-9                                      |   | –                  | –   |
| MMP-2                                      |   | –                  | –   |
| IL-6                                       |   | ↓                  | ↓   |
| IL-8                                       |   | ↓                  | ↓   |
| IL-1β                                      |   | –                  | –   |
| IL-10                                      |   | –                  | –   |
| IL-12p70                                   |   | –                  | –   |
| TNF-α                                      |   | –                  | –   |
| TOS/TOC                                    |   | –                  | –   |
| TAS/TAC                                    |   | –                  | –   |
| 200/2/I                                    |   | pro-MMP-9          | –   |
|  | MMP-9                                   | –                  | –   |
|  | MMP-2                                   | –                  | –   |
|  | IL-6                                    | ↓                  | ↓   |
|  | IL-8                                    | ↓                  | ↓   |
|  | IL-1β                                   | –                  | –   |
|  | IL-10                                   | –                  | –   |
|  | IL-12p70                                | –                  | –   |
|  | TNF-α                                   | –                  | –   |
|  | TOS/TOC                                 | –                  | –   |
|  | TAS/TAC                                 | –                  | –   |

Komórki przez określoną liczbę dni były hodowane na referencyjnych membranach z polilaktonu (grupa pla) i naświetlane laserem o mocy 100 lub 200 mW oraz dawkach 2 i 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek z komórkami. W kolejnych 3 i 5 dniu eksperymentu oznaczono poziom metaloproteinaz: pro-MMP-9, MMP-9, MMP-2, poziom cytokin: IL-6, IL-8, IL-1β, IL-10, IL-12p70, TNF-α oraz poziom potencjału oksydacyjnego (TOS/TOC) i antyoksydacyjnego (TAS/TAC) komórek. Różnice dla poszczególnych grup nienaświetlanych oraz naświetlanych różnymi parametrami lasera względem kontroli grupa ctr) odpowiednio nienaświetlanej i naświetlanej hodowanej na szkiełkach oznaczono strzałkami, gdzie: ↑ oznacza wzrost; ↓ oznacza spadek; – oznacza brak istotnych różnic statystycznych.

Tabela 5. Wpływ witamin i naświetlania impulsową (I) wiązką promieniowania laserowego na żywotność oraz aktywność wydzielniczą (mierzoną poziomem AK, NO, białka) fibroblastów linii komórkowej HS680.

| komórki<br>nienaświetlane                     | badany<br>wskaźnik | dzień eksperymentu  |                           |                           |                           |                           |                           |
|---|--------------------|---|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
|   |                    | Grupa<br>pla-K  |                           |                           | Grupa<br>pla-E            |                           |                           |
|   |                    | 3 dzień   | 5 dzień                   | 7 dzień                   | 3 dzień                   | 5 dzień                   | 7 dzień                   |
| żywotność                                     | –                  | –   | ↑                         | –                         | ↓                         | ↑                         |                           |
| AK  | ↓                  | ↓   | ↑                         | ↓                         | ↓                         | –                         |                           |
| NO  | –                  | –   | –                         | ↑                         | ↑                         | ↑                         |                           |
| białko  | ↓                  | –   | –                         | –                         | –                         | –                         |                           |
| komórki<br>naświetlane<br>parametry<br>lasera | badany<br>wskaźnik | dzień eksperymentu<br>liczba aplikacji wiązki promieniowania laserowego |                           |                           |                           |                           |                           |
|   |                    | Grupa<br>pla-K  |                           |                           | Grupa<br>pla-E            |                           |                           |
|   |                    | 3 dzień<br>2<br>aplikacje   | 5 dzień<br>4<br>aplikacje | 7 dzień<br>6<br>aplikacji | 3 dzień<br>2<br>aplikacje | 5 dzień<br>4<br>aplikacje | 7 dzień<br>6<br>aplikacji |
| żywotność                                     | –                  | –   | ↓                         | –                         | ↓                         | ↓                         |                           |
| AK  | ↓                  | ↓   | –                         | ↓                         | ↓                         | –                         |                           |
| NO  | –                  | –   | –                         | –                         | ↑                         | ↑                         |                           |
| białko  | ↓                  | ↓   | –                         | –                         | –                         | –                         |                           |
| żywotność                                     | –                  | ↑   | ↓                         | –                         | ↓                         | ↓                         |                           |
| AK  | ↓                  | ↓   | ↓                         | ↓                         | ↓                         | ↓                         |                           |
| NO  | ↓                  | ↓   | –                         | –                         | ↑                         | –                         |                           |
| białko  | –                  | –   | –                         | –                         | –                         | ↓                         |                           |
| żywotność                                     | ↑                  | ↑   | ↓                         | –                         | ↓                         | ↓                         |                           |
| AK  | ↓                  | ↓   | ↓                         | ↓                         | ↓                         | ↓                         |                           |
| NO  | –                  | –   | –                         | –                         | –                         | –                         |                           |
| białko  | –                  | ↑   | –                         | –                         | ↓                         | ↓                         |                           |
| żywotność                                     | –                  | ↑   | ↓                         | –                         | ↓                         | ↓                         |                           |
| AK  | ↓                  | ↓   | ↓                         | ↓                         | ↓                         | ↓                         |                           |
| NO  | ↓                  | –   | ↓                         | ↑                         | –                         | –                         |                           |
| białko  | –                  | –   | –                         | –                         | –                         | –                         |                           |

Komórki przez określoną liczbę dni były hodowane na membranach z polilaktonu (pla) modyfikowanego witaminą K (pla-K) lub witaminą E (pla-E) i naświetlane laserem o mocy 100 lub 200 mW oraz dawkach 2, 5, 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek z komórkami. W kolejnych 3, 5, 7 dniu eksperymentu oznaczono: żywotność komórek, cytotoksyczność, poziom: tlenku azotu i białka. Różnice istotne statystycznie dla poszczególnych grup pla-K i pla-E nienaświetlanej i naświetlanej względem grupy pla odpowiednio nienaświetlanej i naświetlanej oznaczono strzałkami, gdzie: ↑ oznacza wzrost; ↓ oznacza spadek; – oznacza brak istotnych różnic statystycznych.

Tabela 6. Wpływ witaminy K oraz naświetlania impulsową (I) wiązką promieniowania laserowego na aktywność wydzielniczą (mierzoną poziomem MMP, cytokin, TAS/TAC, TOS/TOC) fibroblastów linii komórkowej Hs680.

|                                   | badany wskaźnik   | dzień eksperymentu<br>grupa <b>pla-K</b> |   |
|-----------------------------------|---|--|---|
|                                   |   | 3 dzień                                  | 5 dzień   |
| <b>komórki<br/>nienaświetlane</b> | pro-MMP-9   | –  | –   |
|                                   | MMP-9   | –  | –   |
|                                   | MMP-2   | –  | –   |
|                                   | IL-6  | ↓  | ↓   |
|                                   | IL-8  | ↓  | ↓   |
|                                   | IL-1β   | –  | –   |
|                                   | IL-10   | –  | –   |
|                                   | IL-12p70  | –  | –   |
|                                   | TNF-α   | –  | –   |
|                                   | TOS/TOC   | –  | –   |
|                                   | TAS/TAC   | –  | –   |
|                                   | <b>komórki<br/>naświetlane</b><br><br>parametry<br>lasera | badany wskaźnik                          | dzień eksperymentu<br>liczba aplikacji wiązką promieniowania laserowego<br>grupa <b>pla-K</b> |
| 3 dzień<br>2 aplikacje            |   |  | 5 dzień<br>4 aplikacje  |
| 100/10/I                          | pro-MMP-9   | –  | –   |
|                                   | MMP-9   | –  | –   |
|                                   | MMP-2   | –  | –   |
|                                   | IL-6  | –  | ↓   |
|                                   | IL-8  | –  | ↓   |
|                                   | IL-1β   | –  | –   |
|                                   | IL-10   | –  | –   |
|                                   | IL-12p70  | –  | –   |
|                                   | TNF-α   | –  | –   |
|                                   | TOS/TOC   | –  | –   |
|                                   | TAS/TAC   | –  | –   |
|                                   | 200/2/I   | pro-MMP-9                                | –   |
| MMP-9                             |   | –  | ↓   |
| MMP-2                             |   | –  | –   |
| IL-6                              |   | ↓  | ↓   |
| IL-8                              |   | –  | ↓   |
| IL-1β                             |   | –  | –   |
| IL-10                             |   | –  | –   |
| IL-12p70                          |   | –  | –   |
| TNF-α                             |   | –  | –   |
| TOS/TOC                           |   | –  | –   |
| TAS/TAC                           |   | –  | –   |

Komórki przez określoną liczbę dni były hodowane na membranach z polilaktonu (pla) modyfikowanego witaminą K (pla-K) i naświetlane laserem o mocy 100 lub 200 mW oraz dawkach 2, 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek z komórkami. W kolejnych 3 i 5 dniu eksperymentu oznaczono poziom metaloproteina: pro-MMP-9, MMP-9, MMP-2, poziom cytokin: IL-6, IL-8, IL-1β, IL-10, IL-12p70, TNF-α oraz poziom: potencjału oksydacyjnego (TOS/TOC) i antyoksydacyjnego (TAS/TAC) komórek. Różnice istotne statystycznie dla poszczególnych grup pla-K i pla-E nienaświetlanej i naświetlanej względem grupy pla odpowiednio nienaświetlanej i naświetlanej oznaczono strzałkami, gdzie: ↑ oznacza wzrost; ↓ oznacza spadek; – oznacza brak istotnych różnic statystycznych.

## 8. Piśmiennictwo

1. Abonnenc M., Nabeebaccus A.A., Mayr U. i wsp. 2013. Extracellular matrix secretion by cardiac fibroblasts: role of microRNA-29b and microRNA-30c. "Circulation Research." 113(10), s. 1138-47.
2. Ahmadi M., Hedayatizadeh-Omran A., Alizadeh-Navaei R., Saeedi M., Zaboli E., Amjadi O., Kelidari H., Besharat Z. 2022. Effects of Vitamin E on Doxorubicin Cytotoxicity in Human Breast Cancer Cells in Vitro. "Asian Pac. J. Cancer Prev." 1, 23(1), s. 201–205, DOI: 10.31557/APJCP.2022.23.1.201.
3. Akgul A., Tarakci E., Arman N., Civi T., Irmak S. 2020. A Randomized Controlled Trial Comparing Platelet-Rich Plasma, Low-Level Laser Therapy, and Complex Decongestive Physiotherapy in Patients with Lower Limb Lymphedema. „Lymphat Res. Biol.” 19. DOI: 10.1089/lrb.2019.0064.
4. AlGhamdi K., Kumar A., Moussa N. 2012. Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. „Lasers Med. Sci.” 27(1), s. 237–249.
5. Alhadj M., Bansal P., Goyal A. 2021. Physiology, Granulation Tissue. "Stat. Pearls Publishing, Treasure Island (FL)." 30.
6. Antończak P.P., Adamczyk K., Garnarczyk A., Jurzak M. 2018. The effect of tranilast on MMP-2 and MMP-9 mRNA levels in normal and keloid fibroblasts. "Dermatol Rev." 105, s. 384–396. DOI: doi.org/10.5114/dr.2018.77109.
7. Arda O., Goksugur N., Tuzun Y. 2014. Basic histological structure and functions of facial skin. „Clinics in Dermatology". 1(32), s. 3–13. DOI: 10.1016/j.clindermatol.2013.05.021.
8. Assis L., Moretti A.I.S., Abrahão T.B., de Souza H.P., Hamblin M.R., Parizotto N.A. 2013. Low-level laser therapy (808 nm) contributes to muscle regeneration and prevents fibrosis in rat tibialis anterior muscle after cryolesion. „Lasers Med. Sci.” 28(3), s. 947–55, DOI: 10.1007/s10103-012-1183-3.
9. Avci P., Gupta A., Sadasivam M., Vecchio D., Pam Z., Pam N., Hamblin M. 2013. Low-level laser (light) therapy (LLLT) in skin: stimulating, healing, restoring. "Semin Cutan Med Surg." Mar., 32(1), s. 41–52.
10. Ayuk S.M., Abrahamse H., Houreld N.N. 2018. Photobiomodulation alters matrix protein activity in stressed fibroblast cells in vitro. "J. Biophotonics". Mar., 11(3).
11. Basso F.G., Pansani T.N., Turrioni A.P.S., Bagnato V.S, Hebling J., de Souza Costa C.A. 2012. In Vitro Wound Healing Improvement by Low-Level Laser Therapy

- Application in Cultured Gingival Fibroblasts. "International Journal of Dentistry" 15, 719452.
12. Basso F.G., Pansani T.N., Soares D.G., Scheffel D.L., Bagnato V.S., de Souza Costa C.S., Hebling J. 2015. Biomodulation of Inflammatory Cytokines Related to Oral Mucositis by Low-Level Laser Therapy. "Photochemistry and Photobiology" 91, 4, s. 952-956.
  13. Belli M., Fernandes C.R., Neves L.M.G., Mourão V., Barbieri R., Esquisatto M.A.M., Amaral M.E.C., Santos G.M.T., Mendonça F.A.S. 2015. Application of 670nm InGaP laser and microcurrent favors the healing of second-degree burns in Wistar rats. „Laser Phys.” 25: 025602.
  14. Bhattacharyya A., Chattopadhyay R., Mitra S., Crowe S.E. 2014. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. „Physiol. Rev.” 94(2), s. 329–354.
  15. Bieniek J., Brończyk-Puzoń A., Nowak J., Koszowska A., Dziąbek E., Kulik K., Dittfeld A. 2015. Witamina K a klasyfikacja naczyń krwionośnych. „Choroby Serca i Naczyń”. 12(3), s. 165–171.
  16. Borena B.M., Martens A., Broeckx S.Y., Meyer E., Chiers K., Duchateau L., Spaas J.H. 2015. Regenerative Skin wound healing in mammals: State of the art on growth factor and stem cell based treatments. "Cell Physiol. Biochem." 36(1), s. 1–23.
  17. Boscoboinik D., Szewczyk A., Hensey C., Azzi A. 1991. Inhibition of cell proliferation by alpha-tocopherol. Role of protein kinase C. "J. Biol. Chem." 266, s. 6188–6194.
  18. Brown T.B., Krishnamurthy K. 2021. Histology, Dermis. "Stat. Pearls Publishing, Treasure Island (FL)". 19.
  19. Caley M.P., Martins V.L.C., O'Toole E.A. 2015. Metalloproteinases and wound healing. „Adv. Wound Care”. 4, s. 225–234.
  20. Catarino H.R., de Godoy N.P., Scharlack N.K., Neves L.M., de Gaspi F.O., Esquisatto M.A. et al. 2015. InGaP 670-nm laser therapy combined with a hydroalcoholic extract of *Solidago chilensis* Meyen in burn injuries. „Lasers Med. Sci.” 30(3), s. 1069–79. DOI: 10.1007/s10103-014-1707-0.
  21. Chaudary S., Karner L., Weidinger A., Meixner B., Rieger S., Metzger M., Zipperle J., Dungal P. 2020. In vitro effects of 635 nm photobiomodulation under hypoxia/reoxygenation culture conditions. „Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology”. 209.

22. Chaves M.E., Araujo A.R., Piancastelli A.C., Pinotti M. 2014. Effects of low-power light therapy on wound healing: LASER×LED. „An. Bras. Dermatol.” 89(4), s. 616–23.
23. Chen C.-H., Tsai J.N., Wang Y.-H. i wsp. 2008. Low-Level Laser Irradiation Promotes Cell Proliferation and mRNA Expression of Type I Collagen and Decorin in Porcine Achilles Tendon Fibroblasts In Vitro. “Journal Of Orthopaedic.” s. 646–650.
24. Chiarotto G.B., Neves L.M., Esquisatto M.A., do Amaral M.E., dos Santos G.M.T., Mendonça F.A.S. 2014. Effects of laser irradiation (670-nm InGaP and 830-nm GaAlAs) on burn of second-degree in rats. „Lasers Med. Sci.” 29, s. 1685–93.
25. Chung H., Dai T., Sharma S.K., Huang Y.Y., Carroll J.D., Hamblin M.R. 2013. The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy. “Ann Biomed Eng.” Feb., 40(2), s. 516–533.
26. Chung S., Gamcsik M.P., Novel M.W.K. 2011. Scaffold design with multi-grooved PLA fibers. “Biomed Mater.” 6 (4), 045001, DOI: 10.1088/1748-6041/6/4/045001.
27. Cont L., Grant D., Scotchford C., Todea M., Popa C. 2013. Composite PLA scaffolds reinf. “J. Biomater Appl.” 27, s. 707, DOI: 10.1177/0885328211423792.
28. Crisan B., Soritau O., Baciut M., Campian R., Crisan L., Baciut G. 2013. Influence of three laser wavelengths on human fibroblasts cell culture. „Lasers Med. Sci.” 28(2), s. 457–63.
29. Cunha J.L.S., de Andrade de Carvalho F.M., Filho R.N.P., Ribeiro M.A.G., de Albuquerque-Júnior R.L.C. 2019. Effects of Different Protocols of Low-Level Laser Therapy on Collagen Deposition in Wound Healing. „Braz. Dent. J.” 30(4), DOI: doi.org/10.1590/0103-6440201902400.
30. Dalia A.M., Loh T.C., Sazili A.Q., Jahromi M.F., Samsudin A.A. 2018. Effects of vitamin E, inorganic selenium, bacterial organic selenium, and their combinations on immunity response in broiler chickens. “BMC Vet. Res.” 14, s. 249. DOI: 10.1186/s12917-018-1578-x.
31. Dang Y., Ye X., Weng Y., Tong Z., Ren Q. 2010. Effects of the 532-nm and 1064-nm Q-switched Nd: YAG lasers on collagen turnover of cultured human skin fibroblasts: a comparative study. “Lasers Med. Sci.” 25, s. 719–726, DOI: 10.1007/s10103-009-0657-4.
32. Dasari S., Samy A.L.P.A., Kajdacsy-Balla A., Bosland M.C., Munirathinam G. 2018. Vitamin K2, a menaquinone present in dairy products targets castration-resistant prostate cancer cell-line by activating apoptosis signaling. “Food and chemical toxicology.” 115, s. 218–227.



33. de Vasconcellos L., Barbara M., Deco C., Junqueira J., do Prado R., Anbinder A., de Vasconcellos L., Cairo C., Carvalho Y. 2013. Healing of normal and osteopenic bone with titanium implant and low-level laser therapy (GaAlAs): a histomorphometric study in rats. "Lasers Med Sci," 29(2),575-80. DOI: 10.1007/s10103-013-1326-1.
34. de Vasconcellos Catão M.H.C., Nonaka C.F.W., de Albuquerque R.L.C., Bento P.M., de Oliveira Costa R. 2015. Effects of red laser, infrared, photodynamictherapy, and green LED on the healing process of third-degree burns: clinical and histologicalstudy in rats. „Lasers Med. Sci.” 30(1), s. 421–8, DOI: 10.1007/s10103-014-1687-0.
35. Draelos Z.D; Pugliese P.T. 2014. Podstawy nauki o laserach. [w:] Pytrus B., Chlebus E. Fizjologia skóry teoria i praktyka. Wydawnictwo Med Pharm Polska Wrocław, s. 505–511.
36. Enoch S., Price P. 2004. Cellular, molecular and biochemical differences in the pathophysiology of healing between acutewounds, chronic wounds and wounds in the aged. "World Wide Wounds".
37. Etemadi A., Sadatmansouri S., Sodeif F., Jalalishirazi F., Chiniforush N. 2021. Photobiomodulation Effect of Differen Diode Wavelengths on the Proliferation of Human Gingival Fibroblast Cells. "Photochemistry and Photobiology". DOI: doi.org/10.1111/php.13463.
38. Freitas L.F., Hamblin M.R. 2016. Proposed mechanisms of photobiomodulation or low-level light therapy. „IEEE J. Sel. Top Quantum Electron”. 22(3), 7000417.
39. Frozanfar A., Ramezani M., Rahpeyma A., Khajehahmadi S., Arbab H.R. 2013. The Effects of Low Level Laser Therapy on the Expression of Collagen Type I Gene and Proliferation of Human Gingival Fibroblasts (Hgf3-Pi 53): in vitro Study. „Iran J. Basic Med. Sci.” 16(10), s. 1071–1074.
40. Gałczyk M., van Damme-Ostapowicz K. 2016. Fizjoterapia w trudno gojących się ranach. „Polski Przegląd Nauk o Zdrowiu”. 2(47), s. 180–182.
41. Gao X., Chen T., Xing D., Wang F., Pei Y. 2006. Single cell analysis of PKC activation during proliferation and apoptosis induced by laser irradiation, "J Cell Physiol." 206(2), s. 441-448
42. Gethin G. 2012. Understanding the inflammatory process in woundhealing. „Br. J. Community Nurs”. 17(8), s. 20–22, DOI: 10.12968/bjcn.2012.17.sup3.s17.
43. Gołąb J., Jakóbisiak M., Lasek W. 2016. Immunologia. Wydawnictwo Naukowe PWN Warszawa, s. 35–40.

44. Gupta A., Keshri G.K., Yadav A., Gola S., Chauhan S., Salhan A.K. et al. 2015. Superpulsed (Ga-As, 904 nm) low-level laser therapy (LLLT) attenuates inflammatory response and enhances healing of burn wounds. „J. Biophotonics.” 8(6), s. 489–501, DOI: 10.1002/jbio.201400058.
45. Hamblin M.R. 2016. Photobiomodulation or low-level laser therapy. „J. Biophotonics”. 9(11–12), s. 1122–1124.
46. Han G., Ceilley R. 2017. Chronic wound healing: a review of current management and treatments. “Adv Ther.” 34(3), s. 599–610.
47. Han G., Nguyen L., Macherla C. i wsp. 2012. Nitric Oxide–Releasing Nanoparticles Accelerate Wound Healing by Promoting Fibroblast Migration and Collagen Deposition. “The American Journal of Pathology.” 180(4), s. 1465–1473.
48. Hanafiah O.A., Angga D., Ilyas S., Poravi R., Abidin T., Nainggolan M. 2018. The Role of TGF Beta 1 and PDGF BB in Wound Healing of the Palate. “Advances in Health Science Research”. 8, s. 219–225.
49. Harorli O.T., Hatipoglu M., Erin N. 2019. Effect of Photobiomodulation on Secretion of IL-6 and IL-8 by Human Gingival Fibroblasts In Vitro. “Photobiomodul Photomed Laser Surg.” 37(8), s. 457–464.
50. Hawkins D.H.M., Abrahamse T.H. 2006. The Role of Laser Fluence in Cell Viability, Proliferation, and Membrane Integrity of Wounded Human Skin Fibroblasts Following Helium-Neon Laser Irradiation. “Lasers in Surgery and Medicine”. 38, s. 74–83.
51. He L., He T., Farrar S., Ji L., Liu T., Ma X. 2017. Antioxidants maintain cellular redox homeostasis by elimination of reactiveoxygenspecies. „Cell Physiol. Biochem.” 44, s. 532–53.
52. He T., Hatem E., Vernis L., Lei M., Huang M.-E. 2015. PRX1 knockdown potentiates vitamin K3 toxicity in cancer cells: a potential new therapeutic perspective for an old drug. “Journal of Experimental & Clinical Cancer Research.” 34, s. 152, DOI: 10.1186/s13046-015-0270-2.
53. He Y., Leng J., Li K., Xu K., Lin C., Yuan Z., Zhang R., Wang D., Tao B., Huang T.J. 2021. Cai K. A multifunctional hydrogel coating to direct fibroblast activation and infected wound healing via simultaneously controllable photobiomodulation and photodynamic therapies. “Biomaterials”. 278.
54. Hegazy M.E.F, Fukaya M., Dawood M., Yan G., Klinger A., Fleischer E., Zagloul A.W., Efferth T. 2020. Vitamin K<sub>3</sub> thio-derivative: a novel specific apoptotic

- inducer in the doxorubicin-sensitive and -resistant cancer cells. “Invest New Drugs.” 38(3), s. 650–661, DOI: 10.1007/s10637-019-00810-7.
55. Hemmati A.A., Houshmand G., Ghorbanzadeh B., Nemati M., Behmanesh M.A. 2014. Topical vitamin K1 promotes repair of full thickness wound in rat. “Indian J. Pharmacol.” 46(4), s. 409–12, DOI: 10.4103/0253-7613.135953.
  56. Hinz B. 2007. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. „J. Invest. Dermatol.” 127, s. 526–537.
  57. Hinz B. 2015. The extracellular matrix and transforming growth factor- $\beta$ 1: Tale of a strained relationship. „Matrix Biol.” 47, s. 54–65, DOI: 10.1016/j.matbio.2015.05.006.
  58. Hinz B., Gabbiani G. 2003. Cell–matrix and cell–cell contacts of myofibroblasts: role in connective tissue remodelling. „Thromb. Haemost.” 90, s. 993–1002.
  59. Hodges S.J., Pitsillides A.A., Ytrebø L.M., Soper R. 2017. Anti-Inflammatory Actions of Vitamin K. W: Vitamin K2 – Vital for Health and Wellbeing, red. J.O. Gordeladze. InTech: Rijeka, Croatia, DOI: 10.5772/63891.
  60. Höhn A., Weber D., Jung T., Ott C., Hugo M., Kochlik B., Kehm R., König J., Grune T., Castro J.P. 2017. Happily (n)ever after: Aging in the context of oxidative stress, proteostasis loss and cellular senescence. „Redox Biology.” 11, s. 482–501, DOI: 10.1016/j.redox.2016.12.001.
  61. Hongyan B., Tianyi F., Binbin L., Yingchao H. 2020. In Vitro and In Vivo Comparison Study of Electrospun PLA and PLA/PVA/SA Fiber Membranes for Wound Healing. “Polymers (Basel).” 6, 12(4), s. 839.
  62. Houreld N., Sekhejane P., Abrahamse H. 2010. Irradiation at 830 nm stimulates nitric oxide production and inhibits pro-inflammatory cytokines in diabetic wounded fibroblast cells. “Lasers in Surgery and Medicine.” 42, s. 494–502.
  63. Hu P., Yang Q., Wang Q., Shi C., Wang D., Armato U., Prà I. D., Chiarini A. 2019. Mesenchymal stromal cells-exosomes: a promising cell-free therapeutic tool for wound healing and cutaneous regeneration. Burns & Trauma, DOI: doi.org/10.1186/s41038-019-0178-8.
  64. Hu H., Tang Y., Pang L., Lin C., Huang W., Wang D., Jia W. 2018. Angiogenesis and Full-Thickness Wound Healing Efficiency of a Copper-Doped Borate Bioactive Glass/Poly(lactic- co-glycolic acid) Dressing Loaded with Vitamin E in Vivo and in Vitro ACS. “Appl Mater Interfaces.” Jul., 11, 10(27), s. 22939–22950, DOI: 10.1021/acsami.8b04903.

65. Huang L., Wu S., Xing D. 2011. High fluence low-power laser irradiation induces apoptosis via inactivation of Akt/GSK3 $\beta$  signaling pathway. "J Cell Physiol." 226(3), s. 588-601.
66. Huang Y.Y., Sharma S.K., Carroll J., Hamblin M.R. 2011a. Biphasic dose response in low level light therapy update. „Dose-Response.” 9(4), s. 602–618.
67. Hussein M.A.M., Su S., Ulag S., Woźniak A., Grinholc M., Kuruca S. E., Gunduz O., Muhammed M., El-Sherbiny I. M., Megahed M. 2021. Development and In Vitro Evaluation of Biocompatible PLA-Based Trilayer Nanofibrous Membranes for the Delivery of Nanoceria: A Novel Approach for Diabetic Wound Healing. "Polymers (Basel)." 21, 13(21), s. 3630.
68. Ighodaro O.M., Akinloye O.A. 2018. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. „Alexandria Journal of Medicine”. 54(4), s. 287–293, DOI: 10.1016/j.ajme.2017.09.001.
69. Illescas-Montes R., Melguizo-Rodríguez L., García-Martínez O., de Luna-Bertos E., Manzano-Moreno F.J., Ruiz C., Ramos-Torrecillas J. 2019. Human Fibroblast Gene Expression Modulation Using 940 NM Diode Laser. „Sci. Rep.” 9, 12037.
70. Jácomo A.C., de Andrade Velozo K., Lotti R.G., Neves L.M., de Gaspari de Gaspi F.O., Esquisatto M.A.M., do Amaral M.E.C., Mendonça F.A.S., dos Santos G.M.T. 2015. Activity of Porophyllum ruderale leaf extract and 670-nm InGaP laser during burns repair in rats. „BMC Complement Altern. Med.” 15, 274.
71. Jang D.H., Song D.H., Chang E.J., Jeon J.Y. 2016. Anti-inflammatory and lymphangiogenic effects of low-level laser therapy on lymphedema in an experimental mouse tail model. „Lasers Med. Sci.” 31(2), s. 289–96, DOI: 10.1007/s10103-015-1854-y.
72. Jeffrey R., Basford M., Charles G. 2000. Laser therapy: a randomized, controlled trial of the effects of low intensity Nd: YAG laser irradiation on lateral epicondylitis. "Arch Phys Med Rehabil." 81,11, s. 1504–1510.
73. Jenkins P.A., Carroll J.D. 2011. How to report low-level laser therapy (LLLT)/ photomedicine dose and beam parameters in clinical and laboratory studies. „Photomedicine and laser surgery.” 29(12), s. 785–787.
74. Jinghe X., Mizuta T., Ozaki I. 2015. Vitamin K and hepatocellular carcinoma: The basic and clinic. „World Journal of Clinical Cases.” 3 (9), s. 757–764.

75. Jurkowski P., Kostrzewa-Janicka J., Mierzwińska-Nastalska E. 2011. Zastosowanie lasera biostymulacyjnego w leczeniu stanu zapalnego w chorobach stawów skroniowo-żuchwowych. „Dent. Med. Probl.” 48, 2, s. 208–216.
76. Kajagar B.M., Godhi A.S., Pandit A., Khatri S. 2012. Efficacy of lowlevel laser therapy on woundhealing in patients with chronicdiabeticfootulcers - a randomisedcontroltrial. „Indian J. Surg.” 74(5), s. 359–63, DOI: 10.1007/s12262-011-0393-4.
77. Kandhasamy S., Liang B., Yang D.-P., Zeng Y. 2021. Antibacterial Vitamin K3 Carnosine Peptide-Laden Silk Fibroin Electrospun Fibers for Improvement of Skin Wound Healing in Diabetic Rats. “ACS Appl. Bio Mater.” 4, s. 4769–4788, online: <https://doi.org/10.1021/acsabm.0c01650>.
78. Karl J.P., Meydani M., Barnett J.B., Vanegas S.M., Barger K., Fu X., Goldin B., Kane A., Rasmussen H., Vangay P. Knights D., Jonnalagadda S.S, Saltzman E., Roberts S.B., Meydani S.N., Booth S.L. 2017. Fecal concentrations of bacterially derived vitamin K forms are associated with gut microbiota composition but not plasma or fecal cytokine concentrations in healthy adults. „The American Journal of Clinical Nutrition.” 106(4), s. 1052–1061, DOI: [doi.org/10.3945/ajcn.117.155424](https://doi.org/10.3945/ajcn.117.155424).
79. Karu T.I., Pyatibrat L.V., Kolyakov S.V., Afanasyeva N.I. 2005. Absorption measurements of a cell monolayer relevant to phototherapy: Reduction of cytochrome C oxidase under near IR radiation “J. Photochem. Photobiol. Biol.” 81, s. 98–106.
80. Kassák P, Sikurová L, Kvasnicka P, Bryszewska M, The response of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> -ATPase of human erythrocytes to green laser light treatment, *Physiol Res*, 2006, 55(2), s. 189-194.
81. Keen M. A., Hassan I. 2016. Vitamin E in dermatology. „Indian Dermatol Online Journal.” 7(4), s. 311–315.
82. Kheradvar S.A., Nourmohammadi J., Tabesh H., Bagheri B. 2018. Starch nanoparticle as a vitamin E-TPGS carrier loaded in silk fibroin-poly(vinyl alcohol)-Aloe vera nanofibrous dressing. “Colloids Surf B Biointerfaces”. 1, 166, s. 9-16.
83. Kholoosy L., Elyaspour D., Akhgari M.R., Razzaghi Z., Khodamardi Z., Bayat M.J. 2020. Evaluation of the Therapeutic Effect of Low Level Laser in Controlling Low Back Pain: A Randomized Controlled Trial. „Lasers Med. Sci.” 11(2), s. 120–125.
84. Kilmartin L., Denham T., Fu M.R., Yu G., Kuo T.T., Axelrod D., Guth A.A. 2020. Complementary low-level laser therapy for breast cancer-related lymphedema: a pilot,

- double-blind, randomized, placebo-controlled study. „Lasers Med. Sci.” 35(1), s. 95–105.
85. Kołaczowska E., Chadzinska M., Scislowska-Czarnecka A., Plytycz B., Opdenakker G., Arnold B. 2006. Gelatinase B/matrix metalloproteinase-9 contributes to cellular infiltration in a murine model of zymosan peritonitis. „Immunobiology.” 211, s. 137–148.
86. Komi D.E.A., Khomtchouk K., Santa Maria P.L. 2020. A Review of the Contribution of Mast Cells in Wound Healing: Involved Molecular and Cellular Mechanisms. „Clin. Rev. Allergy Immunol.” 58(3), s. 298–312, DOI: 10.1007/s12016-019-08729.
87. Kosińska J., Billing-Marczak K., Krotkiewski M. 2008. Nowopoznana rola witaminy K w patogenezie chorób cywilizacyjnych. „Medycyna Rodzinna.” 2, s. 48–60.
88. Kucharz J., Stajszczyk M., Kotulska A., Brzosko M., Leszczyński P., Pawlak-Buś K., Samborski W., Wiland P. 2018. Rola witaminy K w metabolizmie kości i innych procesach patofizjologicznych – znaczenie profilaktyczne i terapeutyczne. „Forum Reumatologiczne.” 4(2), s. 71–86.
89. Kulbacka J., Saczko J., Chwiłkowska A. 2009. Stres oksydacyjny w procesach uszkodzenia komórek, „Pol. Merk. Lek.” XXVII, 157, 44.
90. Lee G.Y., Han S.N. 2018. The Role of Vitamin E in Immunity. „Nutrients.” 10(11).
91. Leyane T.S, Jere S.W., Houreld N.N. 2021. Cellular Signalling and Photobiomodulation in Chronic Wound Repair. “Int J Mol Sci.” 18, 22(20), s. 11223, DOI: 10.3390/ijms222011223.
92. Liu X.H., Song X.W., Xu Y., Zhang C. 1996. The inhibition of vitamin K3 on rabbit fibroblast proliferation in vitro. “Ophthalmologica.” 210(3), s. 180–2, DOI: 10.1159/000310703.
93. Lopatina E., Yachnev I., Penniyaynen V., Plakhova V., Podzorova S., Shelykh T., Rogachevsky I., Butkevich I., Mikhailenko V., Kipenko A., Krylov B 2012. Modulation of signal-transducing function of neuronal membrane Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase by endogenous ouabain and low-power infrared radiation leads to pain relief. “Med Chem.” 8(1), s. 33-39.
94. Lopez-Ojeda W., Pandey A., Alhajj M., Oakley A.M. 2021. Anatomy, Skin (Integument). Stat. Pearls Publishing, Treasure Island (FL).
95. Loreti E.H., Pascoal V.L., Nogueira B.V., Silva I.V., Pedrosa D.F. 2015. Use of laser therapy in the healing process: a literature review. „Photomed Laser Surg.” 33, s. 104–16.

96. Lu H., Mei Ch., Yang L., Zheng J., Tong J., Duan F., Liang H., Hong L. 2021 . PPM-18, an Analog of Vitamin K, Induces Autophagy and Apoptosis in Bladder Cancer Cells Through ROS and AMPK Signaling Pathways *Front. "Pharmacol".* 9, 12, 684915, DOI: 10.3389/fphar.2021.684915.
97. Ługowski M., Saczko J., Kulbacka J. 2011. Reaktywne formy tlenu i azotu. „Polski Merkuriusz Lekarski.” 185, s. 313–317.
98. Ma H., Yang J.P., Tan R.K., Lee H.W., Han S.K. 2018. Effect of Low-Level Laser Therapy on Proliferation and Collagen Synthesis of Human Fibroblasts in Vitro. “*Journal of Wound Management and Research.*” 14(1), s. 1–6.
99. Maldaner D.R., Azzolin V.F., Barbisan F., Mastela M.H., Teixeira C.F., Dihel A., Duarte T., Pellenz N.L., Lemos I. F.C., Negretto C.M.U. 2019. In vitro effect of low-level laser therapy on the proliferative, apoptosis modulation, and oxi-inflammatory markers of premature-senescent hydrogen peroxide-induced dermal fibroblasts. “*Lasers Med. Sci.*” 34, s. 1333–1343.
100. Malla N., Sjoli S., Weinberg J.O. Hadler-Olsen E., Uhlin-Hansen L. 2008. Biological and pathobiological functions of gelatinase dimers and complexes. „*Connective Tissue Research.*” 49, s. 180–84.
101. Malone-Povolny M.J., Maloney S.E., Schoenfish M.H. 2019. Nitric Oxide Therapy for Diabetic Wound Healing. “*Advanced Healthcare Materials.*” 1801210–. DOI: 10.1002/adhm.201801210.
102. Maquart F.X., Monboisse J.C. 2014. Extracellular matrix and woundhealing Matriceextracellulaire et cicatrisation. „*Pathologie Biologie.*” 62, s. 91–95, DOI: 10.1016/j.patbio.2014.02.007.
103. Marchewka Z., Gielniak M., Piwowar A. 2018. Rola wybranych mediatorów procesu zapalnego w patogenezie chorób nowotworowych. Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, Wrocław, s. 70–75.
104. Marques M.M., Pereira A.N., Fujihara N.A., Nogueira F.N., Eduardo C.P. 2004. Effect of low-power laser irradiation on protein synthesis and ultrastructure of human gingival fibroblasts. “*Lasers in Surgery and Medicine.*” 34, s. 260–265.
105. Martin P., Nunan R. 2015. Cellular and molecular mechanisms of repair in acute and chronic wound healing. *Pub. Med.*, s. 370–378.
106. Mathur R.K., Khageswar S., Siddharth S., Pooja P., Fareed K., Gupta P.K. 2017. Low-level laser therapy as an adjunct to conventional therapy in the treatment of diabetic footulcers. „*Lasers in Medical Science.*” 32, s. 275–282.

107. Matias M., Saunus J.M., Ivanovski S., Walsh L.J., Farah C.S. 2011. Accelerated wound healing phenotype in Interleukin 12/23 deficient mice. „*J. Inflamm (Lond)*.” 20(8)39, DOI: 10.1186/1476-9255-8-39.
108. Ming-Yuan Y., Di X., Jin-Cen L., Hao-Pin L., Ye X., Jie-Tao H., Hong-Yan H., Kai-kai Z., Xiao-Li X., Qi W. 2018. IL-6 and IL-20 as potential markers for vitality of skin contusion. „*J. Forensic Leg. Med.*” 59, s. 8–12.
109. Miyazawa T., Burdeos G.C., Itaya M., Nakagawa K., Miyazawa T. 2019. Vitamin E: Regulatory Redox Interactions. “*IUBMB Life*”. 71,4 s. 430-441. DOI: 10.1002/iub.2008.
110. Molski M. 2021. *Chemia piękna*. Wydawnictwo Naukowe PWN.
111. Mosca R.C., Ong A.A., Albasha O., Bass K., Arany P. 2019. Photobiomodulation Therapy for Wound Care: A Potent, Noninvasive, Photoceutical Approach. „*Adv. Skin Wound Care.*” 32(4), s. 157–167.
112. Mrozikiewicz-Rakowska B., Kania J., Bucior E., Nowak A. 2015. The role of angiopoietic factors in wound healing among patients with diabetes treated with negative-pressure wound therapy. “*Leczenie ran*”. 11(4):171-178 DOI:10.15374/LR2015015.
113. Murphrey M.B., Miao J.H., Zito P.M. 2021. *Histology, Stratum Corneum*. StatPearls. Treasure Island (FL).
114. Murray P.J. Wynn T.A. 2011. Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization. „*J. Leukoc. Biol.*” 89, s. 557–563.
115. Musstaf R.A., Jenkins D.F.L., Jha A. 2019. Assessing the impact of low level laser therapy (LLLT) on biological systems: a review. „*Int. J. Radiat.Biol.*” 95(2), s. 120–143.
116. Muthusubramaniam L., Zaitseva T., Paukshto M., Martin G., Desai T. 2014. Effect of Collagen Nanotopography on Keloid Fibroblast Proliferation and Matrix Synthesis: Implications for Dermal Wound Healing. „*Tissue Engineering. Part A.*” 1, 20(19–20), s. 2728–2736, DOI: 10.1089/ten.tea.2013.0539.
117. Naderi M.S., Razzaghi M., Esmaeeli Djavid G., Hajebrahimi Z. 2017. A Comparative Study of 660 nm Low-Level Laser and Light Emitted Diode in Proliferative Effects of Fibroblast Cells. „*J. Lasers Med. Sci.*” 8, 1, s. 46–50.
118. Nadhreen A.A., Alamoudi N.M., Elkhodary H.M. 2019. Low-level laser therapy in dentistry: Extra-oral applications. „*Nigerian Journal of Clinical Practice.*” 22(10), s. 1313–1318.



119. Nazimek K., Bryniarski K. 2012. Aktywność biologiczna makrofagów w zdrowiu i chorobie. „J. Postepy Hig. Med. Dosw.” 66, s. 507–520.
120. Nilforoushzadeh M.A., Ashtiani H.R.A., Jaffary F. i wsp. 2017. Dermal Fibroblast Cells: Biology and Function in Skin Regeneration. “Journal of Skin and Stem Cell.” 4, 2, s. 1–5.
121. Nilforoushzadeh M.A., Kazemikhoo N. Mokmeli S., Zare S., Dahmardehei M., Doost R.V., Momeni M., Ansari F. 2019. An Open-Label Study of Low-Level Laser Therapy Followed by Autologous Fibroblast Transplantation for Healing Grade 3 Burn Wounds in Diabetic Patients. „J. Lasers Med. Sci.” 10, 1, s. 7–12.
122. Nizam N., Discioglu F., Saygun I., Bal V., Avcu F., Ozkan C.K., Serdari M.A. 2014. The Effect of a-Tocopherol and Selenium on Human Gingival Fibroblasts and Periodontal Ligament Fibroblasts in Vitro. “J. Periodontol.” 85, s. 636–644, DOI: 10.1902/jop.2013.130184.
123. Núñez S.C., França C.M., Silva D.F., Nogueira G.E., Prates R.A., Ribeiro M.S. 2013. The influence of red laser irradiation time line on burn healing in rats. „Lasers Surg. Med.” 28, s. 633–41.
124. Omasa S., Motoyoshi M., Arai Y., Ejima K. 2012, Low-level laser therapy enhances the stability of orthodontic mini-implants via bone formation related to BMP-2 expression in a rat model, *Photomed Laser Surg*, 30(5), s. 255-261.
125. Opendakker G., Van Den Steen P.E., Dubois B., Nelissen I., Van Coillie E., Proost P. Van Damme J. 2001. Gelatinase b functions as regulator and effector in leukocyte biology. „Biol.” 69, s. 851–859.
126. Palta S., Saroa R., Palta A. 2014. Overview of the coagulation system. „Indian Journal of Anaesthesia.” 58(5), s. 515–523.
127. Park K. 2015. Role of micronutrients in skin health and function. „Biomol. Ther. (Seoul).” 23(3), s. 207–217.
128. Pereira A.N., Eduardo C.de P., Matson E. et al. 2002. Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. “Lasers Surg. Med.” 31(4), s. 263–7.
129. Pereira A.N., Eduardo C.P., Matson E., Marques M.M. 2002. Effect of Low-Power Laser Irradiation on Cell Growth and Procollagen Synthesis of Cultured Fibroblasts. “Lasers in Surgery and Medicine”. 31, s. 263–267.
130. Piłka M., Langa P., Kosikowska P., Trzonkowski P. 2015. Komórki macierzyste i czynniki wzrostu w gojeniu ran. „Postepy Hig. Med. Dosw.”; 69, s. 874–885.

131. Pinilla I., Izaguirre L.B., Gonzalvo F.J., Piazuolo E., Garcia-Gonzalez M.A., Sanchez-Cano A.I., Sopeña F. 2014. In Vitro Vitamin K3 Effect on Conjunctival Fibroblast Migration and Proliferation. "The Scientific World Journal." Article ID 916713, online: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/916713>.
132. Pitzurra L., Ineke D.C.J., Teun J., de Vries M., Hoogenkamp A., Loos B.G. 2020. Effects of L-PRF and A-PRF+ on periodontal fibroblasts in in vitro wound healing experiments. "Journal of Periodontal Research." April, 55(2), s. 287–295, DOI: <https://doi.org/10.1111/jre.12714>.
133. Pop A. 2015. Witaminy w kosmetykach – cz. II Od czego zależy ich skuteczność. „Kosmetologia Estetyczna.” 5, s. 423–426.
134. Pyszora A., Adamczyk A. 2005. Zastosowanie niskoenergetycznego promieniowania laserowego w leczeniu bólu. "Polska medycyna Paliatywna". 4, 3, s. 127-132.
135. Rai V., Abdo J., Agrawal S. 2018. Low-Level Laser Therapy. History, Mechanisms and Medical Uses. Nova Biomedical, s. 20–26.
136. Ramirez H., Patel S.B., Pastar I. 2014. The Role of TGFβ Signaling in Wound Epithelialization. „Advances in Wound Care.” 1, 3(7), s. 482–491, DOI: 10.1089/wound.2013.0466.
137. Ranjbar R, Ashrafzadeh Takhtfooladi M. 2016. The effects of lowlevel laser therapy on Staphylococcus aureus infected third-degree burns in diabetic rats. „Acta Cir Bras.” 31(4), s. 250–5, DOI: 10.1590/S0102-865020160040000005.
138. Rashid S.A., Halim A.S., Muhammad N.A. 2008. The effect of vitamin E on basic fibroblast growth factor level in human fibroblast cell culture. "Med J. Malaysia." 63, s. 69–70.
139. Rehfeld A., Nylander M., Karnov K. 2017. The Integumentary System. Compendium of Histology, s. 411–432, DOI: [doi.org/10.1007/978-3-319-41873-5\\_20](https://doi.org/10.1007/978-3-319-41873-5_20).
140. Reinke J. M., Sorg H. 2012. Wound repair and regeneration. "Eur. Surg. Res." 9, s. 35–43.
141. Rizvi S., Raza S. T., Faizal A., Ahmad A., Abbas S., Mahdi F. 2014. The Role of Vitamin E in Human Health and Some Diseases. „Sultan Qaboos Univ. Med. Journal.” 14(2), s. 157–165.
142. Rodrigues M., Kosaric N., Bonham C.A., Gurtner G.C. 2019. Wound Healing: A Cellular Perspective. „Physiol. Rev.” 1, 99(1), s. 665–706, DOI: 10.1152/physrev.00067.2017.

143. Rubira M.C., Rubira L.A., Comachio J., Magalhães M.O., Marques A.P. 2019. Comparison of the effects of low-level laser and pulsed and continuous ultrasound on pain and physical disability in chronic non-specific low back pain: a randomized controlled clinical trial. „*Adv. Rheumatol.*” 17, 59(1), s. 57.
144. Rush J.S., Bingaman D.P., Chaney P.G., Wax M.B., Ceresa B.P. 2016. Administration of Menadione, Vitamin K3, Ameliorates Off-Target Effects on Corneal Epithelial Wound Healing Due to Receptor Tyrosine Kinase Inhibition. “*Investigative Ophthalmology & Visual Science.*” 57(14), s. 5864–, DOI: 10.1167/iovs.16-19952.
145. Sadick N.S., Cardona A. Laser treatment for facial acne scars. 2018. “*A review J Cosmet Laser Ther.*” 20(7-8), s. 424-435. DOI: 10.1080/14764172.2018.1461230.
146. Salinthon S., Kerns A.R., Tsang V., Carr D.W. 2013.  $\alpha$ -Tocopherol (vitamin E) stimulates cyclic AMP production in human peripheral mononuclear cells and alters immune function. “*Mol. Immunol.*” 53, s. 173–178.
147. Sang Won C., Rudra P., Dai Hyun J., Su Jung K., Jin Woo P. 2018. Construction and Characterization of Cell-Penetrating Peptide-Fused Fibroblast Growth Factor and Vascular Endothelial Growth Factor for an Enhanced Percutaneous Delivery System. „*J. Nanosci Nanotechnol.*” 1, 18(2), s. 842–847.
148. Santos C.M.D., Rocha R.B.D., Hazime F.A., Cardoso V.S. 2020. A Systematic Review and Meta-Analysis of the Effects of Low-Level Laser Therapy in the Treatment of Diabetic Foot Ulcers. „*Int. J. Low. Extrem. Wounds.*” 12, 1534734620914439.
149. Santos H. L., Rigos C., Tedesco A., Ciancaglini P. 2007. Biostimulation of Na, K-ATPase by lowenergy laser irradiation (685 nm, 35 mW): comparative effects in membrane, solubilized and DPPC: DPPE-liposome reconstituted enzyme. “*J Photochem Photobiol B.*” 89(1), s. 22-28.
150. Santos J.A.F., Campelo M.B.D., de Oliveira R.A., Nicolau R.A., Rezende V.E.A., Arisawa E.Â.L. 2018. Effects of Low-Power Light Therapy on the Tissue Repair Process of Chronic Wounds in Diabetic Feet. „*Photomed Laser Surg.*” 36(6), s. 298–304.
151. Shaikh-Kader A., Houreld N.N., Rajendran N.K., Abrahamse H. 2021. Levels of Cyclooxygenase 2, Interleukin-6, and Tumour Necrosis Factor- $\alpha$  in Fibroblast Cell Culture Models after Photobiomodulation at 660nm. “*Oxidative Medicine and Cellular Longevity*”. Article ID 6667812, 13 p., <https://doi.org/10.1155/2021/6667812>.
152. Sheng X. Fan L., He Ch., Zhang K., Mo X., Wang H. 2013. Vitamin E-loaded silk fibroin nanofibrous mats fabricated by green process for skin care application.

- “International Journal of Biological Macromolecules.” 56, s. 49–56, DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2013.01.029.
153. Sies H. 2020. Oxidative Stress: Concept and Some Practical Aspects. „Antioxidants (Basel).” 9(9), s. 852, DOI: 10.3390/antiox9090852.
154. Sies H., Jones D.P. 2020. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. „Nature Reviews Molecular Cell Biology.” 21, s. 363–383.
155. Singampalli K.L., Balaji S., Wang X., Parikh U.M., Kaul A., Gilley J., Birla R.K., Bollyky P.L., Keswani S.G. 2020. The Role of an IL-10/ Hyaluronan Axis in Dermal Wound Healing. „Front Cell Dev. Biol.” 17, 8, s. 636, DOI: 10.3389/fcell.2020.00636, eCollection 2020.
156. Skotnicka M., Golan M., Szmukała N. 2017. Rola naturalnych przeciwutleniaczy w profilaktyce nowotworowej. *Ann. Acad. Med. Gedan.*; 47: 119-127.
157. Solé-Boldo L., Raddatz G., Schütz S., Mallm J.P., Rippe K., Lonsdorf A.S., Rodriguez-Paredes M., Lyko F. 2020. Single-cell transcriptomes of the human skin reveal age-related loss of fibroblast priming. *Communications Biology*, s. 188.
158. Sorg H., Tilkorn D.J., Hager S., Hauser J., Mirastschijskin U. 2017. Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. „European Surgical Research.” 58, s. 81–94, DOI: doi.org/10.1159/000454919.
159. Sun X., Wu S., Xing D., 2010. The reactive oxygen species-Src-Stat3 pathway provokes negative feedback inhibition of apoptosis induced by high-fluence low-power laser irradiation, “FEBS J.” 277(22), s. 4789-4802.
160. Szymanska J., Goralczyk K., Klawe J.J., Lukowicz M., Michalska M., Goralczyk B., Zalewski P., Newton J.L., Gryko L., Zajac A., Rosc D., 2013, Phototherapy with low-level laser influences the proliferation of endothelial cells and vascular endothelial growth factor and transforming growth factor-beta secretion. „Journal of Physiology and Pharmacology.” 64(3), s. 387–391.
161. Tantawy S.A., Abdelbasset W.K., Kamel D.M., Alrawaili S.M. 2018. A randomized controlled trial comparing helium-neon laser therapy and infrared laser therapy in patients with diabetic foot ulcer. „Lasers Med. Sci.” Dec, 33(9), s. 1901–1906.
162. Tantawy S.A., Abdelbasset W.K., Kamel D.M., Alrawaili S.M., Alsubaie S.F. 2019. Laser photobiomodulation is more effective than ultrasound therapy in patients with chronic nonspecific low back pain: a comparative study. „Lasers Med. Sci.” 34(4), s. 793–800.
163. Taradaj J., Shay B., Dymarek R., Sopol M., Walewicz K., Beeckman D., Schoonhoven L., Gefen A., Rosińczuk J. 2018. Effect of laser therapy on expression of angio- and

- fibrogenic factors, and cytokine concentrations during the healing process of human pressure ulcers. „Int. J. Med. Sci.” 13, 15(11), s. 1105–1112.
164. Tottoli E.M., Dorati R., Genta I., Chiesa E., Pisani S., Conti B. 2020. Skin Wound Healing Process and New Emerging Technologies for Skin Wound Care and Regeneration. „Pharmaceutics.” 12(8), s. 735, DOI: doi.org/10.3390/pharmaceutics12080735.
165. Tripodi N., Corcoran D., Antonello P., Balic N., Caddy D., Knight A., Meehan C., Sidiroglou F., Fraser S., Kiatos D., Husaric M., Apostolopoulos V., Feehan J. 2021. The effects of photobiomodulation on human dermal fibroblasts in vitro: A systematic review. “Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology.” 214, s. 1–10.
166. Turck D., Jean-Louis J.L., Burlingame B., Dean T., Fairweather-Tait S., Heinonen M., Hirsch-Ernst K.I., Mangelsdorf I., McArdle H.J., Naska A., Nowicka G., Pentieva K., Sanz Y. 2017. Dietary reference values for vitamin K. „EFSA Journal.” 15(5), s. 4780, DOI: doi/10.2903/sp.efsa.2017.EN-1220/full.
167. Vaghardoost R., Momeni M., Kazemikhoo N., Mokmeli S., Dahmardehei M., Ansari F., Nilforoushzadeh M.A., SabrJoo P., MeyAbadi S., Naderi Gharagheshlagh S., Sassani S. 2018. Effect of low-level laser therapy on the healing process of donor site in patients with grade 3 burn ulcer after skin graft surgery (a randomized clinical trial). „Lasers Med. Sci.” 33(3), s. 603–607.
168. Velnar T., Bailey T., Smrkolj V. 2009. The wound healing process: An overview of the cellular and molecular mechanisms. „J. Int. Med. Res.” 37, s. 1528–1542.
169. Vivarelli F., Canistro D., Cirillo S., Papi A., Spisni E., Vornoli A., Croce C.M.D., Longo V., Franchi P., Filippi S., Lucarini M., Zanzi C., Rotondo F., Lorenzini A., Marchionni S., Paolini M. 2019. Co-carcinogenic effects of vitamin E in prostate. “Sci. Rep.” 12, 9(1), s. 11636, DOI: 10.1038/s41598-019-48213-1.
170. Wawrzyniak A., Mincer-Chojnacka I., Kalicki B., Lipińska-Opałka A., Jobs K., Stelmasiak A. 2015. Plejotropowe działanie witamin D i K. „Pediatria i Medycyna Rodzinna.” 11(4), s. 374–381.
171. Witte M., Thornton F., Efron D. i wsp. 2000. Enhancement of fibroblast collagen synthesis by nitric oxide. “Nitric Oxide.” 4(6), s. 572–582.
172. Yang H., Villani R.M., Wang H., Simpson M.J., Roberts M.S., Tang M., Liang X. 2018. The role of cellular reactive oxygen species in cancer chemotherapy. „Journal of Experimental and Clinical Cancer Research.” 37(1), s. 1–10, DOI: 10.1186/s13046-018-0909-x.

173. Yousef H., Alhaji M., Sharma S. 2020. *Anatomy, Skin (Integument), Epidermis*. Stat Pearls Publishing, Treasure Island (FL).
174. Yousef M., Mansouri P., Partovikia M., Esmaili M., Younespour S., Hassani L. 2017. The Effect of Low Level Laser Therapy on Pemphigus Vulgaris Lesions: A Pilot Study. „*J. Lasers Med. Sci.*” Autumn. 8(4), s. 177–180.
175. Zhang J., Xing D., Gao X. 2008. Low-power laser irradiation activates Src tyrosine kinase through reactive oxygen species-mediated signaling pathway. “*J Cell Physiol.*” 2008, 217(2), s. 518-528.
176. Zielińska A., Nowak I. 2014. Tokoferole i tokotrienole jako witamina E. „*Chemik.*” 68, 7, s. 585–591.

## Streszczenie

**Wstęp:** Gojenie rany jest procesem, który przebiega w czterech zachodzących na siebie fazach: hemostazy, zapalnej, proliferacyjnej i przebudowy tkankowej. Jednymi z głównych komórek zaangażowanych w ten proces są fibroblasty, odpowiedzialne za produkcję i przebudowę macierzy zewnątrzkomórkowej. Proces gojenia ran może być wspomagany przez niskoenergetyczne promieniowanie laserowe, które działa na podstawowe funkcje komórki. Jednym z efektów tego oddziaływania jest fotobiostymulacja objawiająca się aktywacją komórek w kierunku skrócenia czasu gojenia. Proces gojenia ran może być także wspomagany przez zastosowanie substancji aktywnych, w tym witamin takich jak E i K.

**Cel:** Celem niniejszej pracy było określenie optymalnych dla fibroblastów parametrów naświetlań laserem, a następnie stwierdzenie, czy istnieją wzajemne interakcje pomiędzy wpływem naświetlania laserem fibroblastów, witamin (witaminy E lub witaminy K) a odpowiedzią komórkową ludzkich fibroblastów w warunkach hodowli *in vitro*.

**Materiały i metody:** Ludzkie fibroblasty Hs680 naświetlano laserem o długości fali 808 nm oraz mocy 100 mW lub 200 mW. Zastosowano dawki promieniowania: 2, 5 lub 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek z komórkami. Wiązkę lasera aplikowano w sposób ciągły (C) lub pulsacyjny (I) co 24 godziny, odpowiednio 2, 4, 6, 8 i 10 razy. Oceniono morfologię, przyleganie, żywotność komórek oraz cytotoksyczność. W celu zbadania wpływu witamin na fibroblasty, komórki hodowano na membranach z polilaktydu (pla) modyfikowanych witaminą E (pla-E) lub witaminą K (pla-K) i dodatkowo naświetlano laserem. Oceniono żywotność, cytotoksyczność oraz aktywność wydzielniczą fibroblastów mierzona poziomem wydzielanych: tlenku azotu (NO), białka, metaloproteinaz (MMP), cytokin oraz poziomem potencjału oksydacyjno-antyoksydacyjnego komórek.

**Wyniki:** Wykazano, że najkorzystniej działającymi na ludzkie fibroblasty Hs680 parametrami naświetlania laserem jest działanie na nie impulsową wiązką promieniowania laserowego, o mocy 100 mW i dawkach 5 oraz 10 J/cm<sup>2</sup> oraz o mocy 200 mW i dawkach 2 oraz 10 J/cm<sup>2</sup>. Naświetlanie komórek tymi parametrami lasera spowodowało ich dobre rozpląszczenie na podłożu hodowlanym, wzrost ich przylegania i/lub proliferacji, spadek cytotoksyczności (spadek poziomu kinazy adenyłowej AK) oraz spadek wydzielania NO. Wykazano także, że w 7 dniu hodowli witamina K oraz witamina E spowodowały wzrost żywotności fibroblastów w porównaniu z komórkami kontrolnymi oraz, że witamina K nie wpłynęła na wydzielanie przez komórki NO i spowodowała spadek wydzielania przez nie białka oraz IL-6 i IL-8. Jednoczesna hodowla fibroblastów na membranach pla-K i naświetlanie laserem o mocy 100 mW oraz dawce 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek oraz o mocy 200 mW oraz dawce 2 J/cm<sup>2</sup>/dołek spowodowała wzrost żywotności fibroblastów oraz poziomu wydzielanego przez komórki białka oraz spadek wydzielania AK, IL-6, IL-8, pro-MMP-9 oraz MMP-9 w wybranych punktach czasowych eksperymentu.

**Wnioski:** 1) Cztery spośród dwunastu badanych parametrów naświetlania laserem miało korzystny wpływ na odpowiedź biologiczną fibroblastów modulując przyleganie/proliferyzację, migrację oraz aktywności wydzielniczą komórek w kierunku przyspieszenia procesu gojenia rany. 2) Modyfikacja polimeru pla witaminą K w przypadku większości badanych wskaźników miała pozytywny wpływ na fibroblasty, powodując wzrost ich żywotności oraz modulując aktywność wydzielniczą komórek w kierunku sprzyjającym procesowi gojenia rany. 3) Równoczesne działanie na fibroblasty witaminą K i naświetlanie niskoenergetycznym promieniowaniem laserowym może mieć pozytywny wpływ na proces gojenia rany mierzony wzrostem żywotności oraz obniżeniem aktywności prozapalnej fibroblastów.

**Wniosek ogólny:** Wydaje się, modyfikacja membran pla dodatkiem witaminy K (jako potencjalny opatrunek) i jednoczesne naświetlanie fibroblastów wytypowanymi w niniejszej pracy parametrami lasera może sprzyjać/skracać proces gojenia ran.

## Abstract

**Introduction:** Wound healing is a process that takes place in four overlapping phases: hemostasis, inflammatory, proliferative and tissue remodeling. One of the main cells involved in this process are fibroblasts, responsible for the production and remodeling of the extracellular matrix. The wound healing process can be aided by low-energy laser radiation that acts on the basic functions of the cell. One of the effects of this interaction is photobiostimulation manifested by the activation of cells to shorten the healing time. The wound healing process can also be supported by using active substances, including vitamins such as E and K.

**Aim:** The aim of this study was to determine the optimal parameters of laser irradiation for fibroblasts, and then to determine whether there are interactions between the action of laser irradiation, vitamins (vitamin E or vitamin K) on fibroblasts and the cellular response of human fibroblasts in in vitro culture conditions.

**Materials and methods:** Human Hs680 fibroblasts were irradiated with a laser with a wavelength of 808 nm and a power of 100 mW or 200 mW. The radiation doses were: 2, 5 or 10 J/cm<sup>2</sup>/well with cells. The laser beam was applied continuously (C) or in pulses (I) every 24 hours 2, 4, 6, 8 and 10 times, respectively. The morphology, adherence, cell viability and cytotoxicity were assessed. In order to study the effect of vitamins on fibroblasts, cells were grown on polylactide (pla) membranes modified with vitamin E (pla-E) or vitamin K (pla-K) and additionally irradiated with a laser. The viability, cytotoxicity and secretory activity of fibroblasts measured by the level of secreted nitric oxide (NO), protein, metalloproteinases (MMP), cytokines and the level of oxidative and antioxidant potential of cells were assessed.

**Results:** It was shown that the most beneficial parameters of laser irradiation on human Hs680 fibroblasts are the action of a pulsed laser beam with the power of 100 mW and doses of 5 and 10 J/cm<sup>2</sup> and with the power of 200 mW and doses of 2 and 10 J/cm<sup>2</sup>. Irradiation of cells with these laser parameters resulted in their good flattening on the culture medium, an increase in their adherence and/or proliferation, a decrease in cytotoxicity (decrease in the level of adenylate kinase AK) and a decrease in NO secretion. It was also shown that on day 7 of cultivation, vitamin K and vitamin E increased the viability of fibroblasts as compared to control cells, and that vitamin K did not affect the secretion of NO by cells and caused a decrease in their secretion of proteins and IL-6 and IL-8. Simultaneous cultivation of fibroblasts on pla-K membranes and irradiation with a 100 mW, laser and a dose of 10 J/cm<sup>2</sup>/well, and a dose of 200 mW and a dose of 2 J/cm<sup>2</sup>/well resulted in an increase in the viability of fibroblasts and the level of protein secreted by cells and a decrease in secretion of AK, IL-6, IL-8, pro-MMP-9 and MMP-9 at selected time points of the experiment.

**Conclusions:** 1) Four out of twelve tested parameters of laser irradiation had a beneficial effect on the biological response of fibroblasts by modulating adhesion/proliferation, migration and secretory activity of cells towards accelerating the wound healing process. 2) Modification of the polymer pla with vitamin K, in the case of most of the examined indicators, had a positive effect on fibroblasts, increasing their viability and modulating the secretory activity of cells in the direction favoring the wound healing process. 3) Simultaneous action on fibroblasts with vitamin K and irradiation with low-energy laser radiation may have a positive effect on the wound healing process, measured by the increase in viability and the decrease in the pro-inflammatory activity of fibroblasts.

**General conclusion:** It seems that the modification of pla membranes with the addition of vitamin K (as a potential dressing) and simultaneous irradiation of fibroblasts with the laser parameters selected in this study may favor/shorten the wound healing process.



## Spis rycin

- Ryc. 1. Budowa skóry.
- Ryc. 2. Wzór strukturalny witaminy E.
- Ryc. 3. Wzór strukturalny witamin: K1, K2, K3.
- Ryc. 4. Schemat I etapu badań dotyczącego wpływu na hodowane na szkiełkach fibroblasty Hs680 naświetlania ciągłą (C) lub impulsową (I) wiązką promieniowania laserowego o mocy 100 lub 200 mW oraz dawkach 2, 5 lub 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek.
- Ryc. 5. Schemat II etapu badań dotyczącego wpływu na fibroblasty Hs680 różnych podłoży hodowlanych: szkiełka hodowlanego (ctr), membran polilaktydu (pla), membran polilaktydu modyfikowanych witaminą E (pla-E), membran polilaktydu modyfikowanych witaminą K (pla-K) oraz naświetlania impulsową (I) wiązką promieniowania laserowego o mocy 100 mW i dawkach 5 lub 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek oraz o mocy 200 mW i dawkach 2 lub 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek.
- Ryc. 6. Schemat III etapu badań dotyczącego wpływu na fibroblasty Hs680 różnych podłoży hodowlanych: szkiełka hodowlanego (ctr), membran polilaktydu (pla), membran polilaktydu modyfikowanych witaminą K (pla-K) oraz naświetlania impulsową (I) wiązką promieniowania laserowego o mocy 100 mW i dawce 10 J/cm<sup>2</sup>/dołek oraz o mocy 200 mW i dawce 2 J/cm<sup>2</sup>/dołek.
- Ryc. 7. Membrana polimerowa z polilaktonu (pla). Obraz ze skaningowego mikroskopu elektronowego.
- Ryc. 8. Wpływ naświetlania ciągłą (C, 8a) i impulsową (I, 8b) wiązką promieniowania laserowego na przyleganie (CV) fibroblastów linii komórkowej Hs680.
- Ryc. 9. Wpływ naświetlania ciągłą (C, 9a) i impulsową (I, 9b) wiązką promieniowania laserowego na morfologię fibroblastów linii komórkowej Hs680.
- Ryc. 10. Wpływ naświetlania ciągłą (C, 10a) i impulsową (I, 10b) wiązką promieniowania laserowego na poziom uwalnianej kinazy adenyłowej (AK) przez fibroblasty linii komórkowej Hs680.
- Ryc. 11. Wpływ naświetlania ciągłą (C, 11a) i impulsową wiązką promieniowania laserowego (I, 11b) na poziom wydzielanego tlenu azotu (NO) przez fibroblasty linii komórkowej Hs680.
- Ryc. 12. Wpływ naświetlania impulsową (I) wiązką promieniowania laserowego na proces „gojenia rany” fibroblastów linii komórkowej Hs680.

- Ryc. 13. Wpływ naświetlania impulsową (I, 13 b-e) wiązką promieniowania laserowego na żywotność fibroblastów linii komórkowej Hs680.
- Ryc. 14. Wpływ naświetlania impulsową (I, 14 d-e) wiązką promieniowania laserowego na poziom uwalnianej kinazy adenyłowej (AK) przez fibroblasty linii komórkowej Hs680.
- Ryc. 15. Wpływ naświetlania impulsową (I, 15 d-e) wiązką promieniowania laserowego na poziom wydzielanego tlenku azotu (NO) przez fibroblasty linii komórkowej Hs680.
- Ryc. 16. Wpływ naświetlania impulsową (I, 15 d-e) wiązką promieniowania laserowego na poziom wydzielanego białka przez fibroblasty linii komórkowej Hs680.
- Ryc. 17. Wpływ naświetlania impulsową (I, 17 b, c, e, f) wiązką promieniowania laserowego na poziom cytokin IL-6 oraz IL-8 wydzielanych przez fibroblasty linii komórkowej Hs680.
- Ryc. 18. Wpływ naświetlania impulsową (I, 18 b-e) wiązką promieniowania laserowego na żywotność fibroblastów linii komórkowej Hs680.
- Ryc. 19. Wpływ naświetlania impulsową (I, 19 b-e) wiązką promieniowania laserowego na poziom uwalnianej kinazy adenyłowej (AK) przez fibroblasty linii komórkowej Hs680.
- Ryc. 20. Wpływ naświetlania impulsową (I, 20b-e) wiązką promieniowania laserowego na poziom tlenku azotu (NO) wydzielanego przez fibroblasty linii komórkowej Hs680.
- Ryc. 21. Wpływ naświetlania impulsową (I, 20b-e) wiązką promieniowania laserowego na poziom białka wydzielanego przez fibroblasty linii komórkowej Hs680.
- Ryc. 22. Wpływ naświetlania impulsową (I, 22b-f) wiązką promieniowania laserowego na poziom metaloproteinaz: pro-MMP-9, MMP-9 oraz MMP-2 wydzielanych przez fibroblasty linii komórkowej Hs680.
- Ryc. 23. Wpływ naświetlania impulsową (I, 19b, c, e, f) wiązką promieniowania laserowego na poziom cytokin: IL-6 oraz IL-8 wydzielanych przez fibroblasty linii komórkowej Hs680.

## Spis tabel

- Tabela 1. Klasy bezpieczeństwa laserów.
- Tabela 2. Wpływ naświetlania ciągłą (C) i impulsową (I) wiązką promieniowania laserowego na odpowiedź komórkową fibroblastów linii komórkowej Hs680 hodowanych na szkiełkach.
- Tabela 3. Wpływ naświetlania impulsową (I) wiązką promieniowania laserowego na żywotność oraz aktywność wydzielniczą (mierzoną poziomem AK, NO, białka) fibroblastów linii komórkowej Hs680 hodowanych na membranach pla.
- Tabela 4. Wpływ naświetlania impulsową (I) wiązką promieniowania laserowego na aktywność wydzielniczą (mierzoną poziomem MMP, cytokin, TAS/TAC, TOS/TOC) fibroblastów linii komórkowej Hs680 hodowanych na membranach pla.
- Tabela 5. Wpływ witamin i naświetlania impulsową (I) wiązką promieniowania laserowego na żywotność oraz aktywność wydzielniczą (mierzoną poziomem AK, NO, białka) fibroblastów linii komórkowej HS680.
- Tabela 6. Wpływ witaminy K oraz naświetlania impulsową (I) wiązką promieniowania laserowego na aktywność wydzielniczą (mierzoną poziomem MMP, cytokin, TAS/TAC, TOS/TOC) fibroblastów linii komórkowej Hs680.