

LASER PARTNER



Oficiální orgán
Společnosti pro využití
laseru v medicíně CLS JEP



Official paper
of the Czech Society for
the Use of Laser in Medicine



Vydáváno s oficiální odbornou podporou EMLA



Edited under official scientific support of EMLA

www.laserpartner.cz
On-line česká verze: ISSN 1213-1156

www.laserpartner.org
On-line English version: ISSN 1213-3027

Clinixperience - všechny ročníky
2000

20. Účinek He-Ne laseru in vitro na některé imunologické funkce polymorfonukleárů a monocytů u králíků (2.11.2000)

Účinek He-Ne laseru in vitro na některé imunologické funkce polymorfonukleárů a monocytů u králíků

Jiří Luža, Katedra fyziologie, LF Univerzity Palackého, Olomouc
Jiří Hubáček, Katedra ORL, LF University Palackého, Olomouc

ABSTRAKT

Cílem této studie je porovnat in vitro účinek záření Helium-Neonového (He-Ne) laseru na životaschopnost, adherenci a fagocytickou aktivitu polymorfonukleárů (PMN) a monocytů (MO). Rovněž byla zkoumána a INT testem vyhodnocována úroveň metabolických procesů ve fagocytujících krevních buňkách. Pro vyhodnocení adherence leukocytů jsme použili MacGregorův test. Fagocytická aktivita byla zkoumána klasickou metodou za použití mikrosférických hydrofilních částic (částice HEMA). He-Ne laser v malých dávkách (< 0,8 J) zvyšuje adherenci leukocytů, adherence leukocytů po vyšších dávkách záření (> 1,2 J) je snižena. Účinky laseru na fagocytickou aktivitu obou typů krvinek, polymorfonukleárů a monocytů, je podobná. Nízká dávka laserového záření zvyšuje fagocytickou aktivitu a po vyšší dávce laserového záření se fagocytická aktivita snižuje. Stejně tak změny úrovně metabolických procesů ve fagocytujících buňkách jsou velmi podobné změnám fagocytické aktivity. Životaschopnost bílých krvinek, zkoumaných po vyšší dávce laserového záření, postupně klesá.

ÚVOD

Fagocytické buňky, polymorfonukleáry a monocyty, hrají klíčovou roli v nespecifické imunitě. Z tohoto pohledu byla studován vliv laserového záření. V literatuře existuje mnoho informací o vztahu laserového záření a reakce imunitního systému. Protože si tyto informace často odporují, bylo cílem této studie vyhodnotit in vitro účinek záření He-Ne laseru na životaschopnost, adherenci a fagocytickou aktivitu polymorfonukleárů a monocytů, stejně tak jako zhodnotit úroveň metabolických pochodů ve fagocytujících krevních buňkách.

METODA

Experiment jsme provedli se 240 krevními vzorky od 10 králíků, stříbrošedých kříženců obou pohlaví o průměrné váze 3600 + 450 g.

Krevní vzorky byly odebrány z veny marginalis. Jako antikoagulant jsme použili Heparin Spofa (15 j/ml krve).

Buněčná životaschopnost byla zkoumána jednoduchou metodou podle Hankse a Wallace, založenou na rozdílné propustnosti buněčné membrány pro trypanovou modř v živých a mrtvých buňkách.

Pro posouzení adherence leukocytů byla použita MacGregorova metoda, upravená dle K. T. Catese. Neukoagulovaná krev se vstříkne do skleněných trubic (Pasteurovy pipety) o vnitřním průměru 5 mm a nechá se v pokojové teplotě protéci přes 15 mm vysoký sloupec nylonového vlákna o váze 50 mg (LP-1 Leuko-Pak Leukocyte Filter). Každý vzorek je posuzován ve třech trubicích. Adherence je určena porovnáním počtu leukocytů v krvi, která prošla nylonovým adhezenčním sloupcem, s počtem leukocytů, který byl zjištěn v krvi před pokusem. Posuzujeme celkový počet leukocytů a různé krevní obrazy.

Fagocytická aktivita leukocytů byla stanovena klasickou rutinní metodou substrakce fagocytických buněk z krevního nátěru. Pro objektivní testování fagocytické aktivity byly použity mikrosférické hydrofilní částice.

Úroveň metabolických procesů ve fagocytujících krvinkách byla posuzována INT testem, který posuzuje u fagocytů tetrazolium - reduktázovou aktivitu. INT test nepřímo zjistí některé metabolické děje, k nimž dochází ve fagocytujících buňkách a které jsou spojeny s fagocytovaným krvinkovým materiálem (zymosane). Sůl tetrazolia je umělým příjemcem vodíku (který je uvolňován z NADH přes NADH-oxidázu) a redukuje se na zbarvený formazan. Množství vzniklého formazanu, t. j. míra aktivity reduktázy leukocytů, je vyhodnocována fotometricky (485 nm).

Všechny výše uvedené funkční parametry leukocytů byly hodnoceny před ozáření laserem (kontrolní skupina) a po ozáření. Doba expozice laserovému záření byla 5 s (0,2 J), 10 s (0,4 J), 20 s (0,8 J), 30 s (1,2 J), a 60 s (2,4 J).

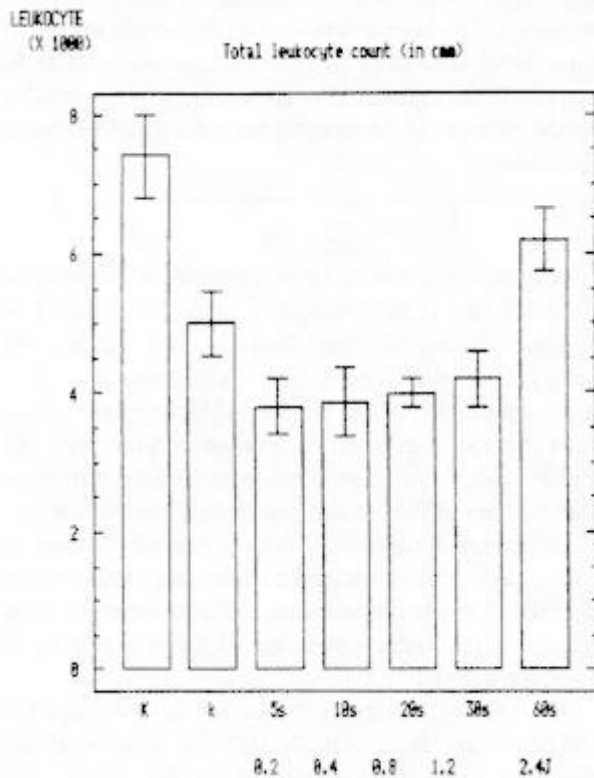
Pro ozařování jsme použili He-Ne laser s výkonem 40 mW.

Všechny získané výsledky byly podrobeny statistickému vyhodnocení (byl použit nepárový Studentův test).

VÝSLEDKY

Adherenci leukocytů v naší studii jsme prováděli tak, jak je popsáno v metodické části. Test byl proveden na vzorcích ozářených a neozářených krvinek.

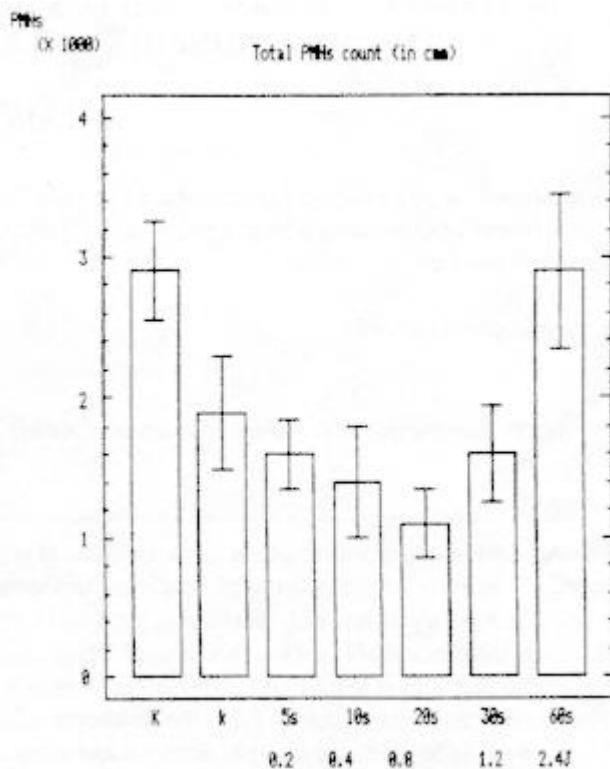
Adherence leukocytů po ozáření laserem se změnila. Adherence leukocytů po 5, 10, 20 a 30 sekundách expozice laserovému záření se zvýšila (o 15,9 %), ale všechny tyto změny byly na hranici statistické významnosti. Snížení adherence leukocytů po 60 sekundách laserového záření bylo statisticky významné ($p < 0.02$). (Obr. 1).



Obr. 1 - Adherence leukocytů

K = Celkový počet leukocytů v periferní krvi pokusných králíků. Počet leukocytů v krvi po průchodu aderenčním nylonovým sloupcem, k = před ozáření laserem, 5 s (0.2 J), 10 s (0.4 J), 20 s (0.8 J), 30 s (1.2 J), 60 s (2.4 J) = po čase ozáření laserem. Adherence leukocytů po 5, 10, 20 and 30 s ozařování laserem se zvýšila (15,9 %), ale všechny tyto změny byly na hranici statistické významnosti.

Adherence polymorfonukleárů byla výrazně zvýšená po 20 sekundovém ozáření laserem o 25,9 % ($p < 0,02$). Adherence PMN po 60 sekundách laserového záření se snížila na úroveň adherence PMN v kontrolní skupině (Obr. 2).

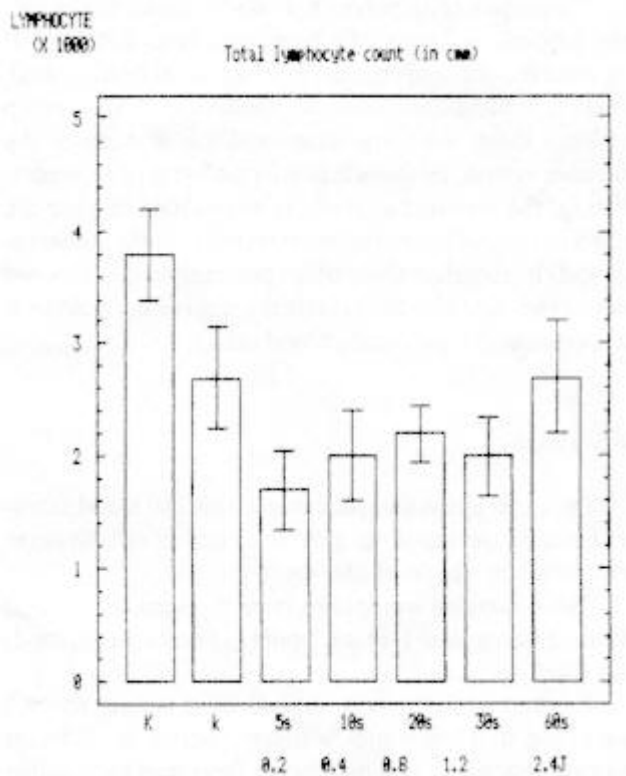


Obr. 2 - Adherence polymorfonukleárů (PMN)

K = celkový počet PMN v periferní krvi pokusných králíků. Počet PMN v krvi po průchodu

adherenčním nylonovým sloupcem, k = před ozáření laserem, 5 s (0.2 J), 10 s (0.4 J), 20 s (0.8 J), 30 s 1.2 J, 60 s (2.4 J) = po době laserového záření. Adherence PMN byla výrazně zvýšena po 20 s laserového záření (25,9 %) ($p < 0,02$).

Laserové záření neovlivnilo výrazným způsobem adhezenci lymfocytů (Obr. 3).

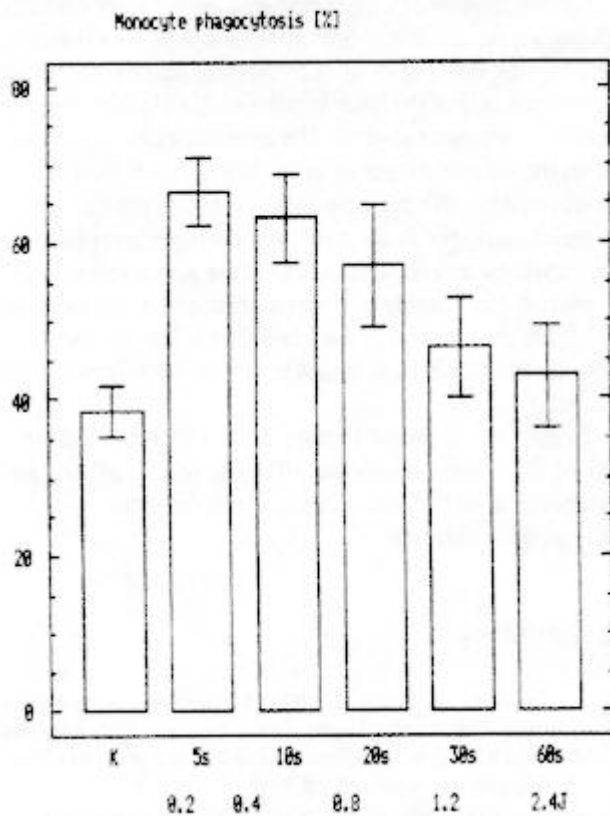


Obr. 3 - Adherence lymfocytů

K = celkový počet lymfocytů v periferní krvi pokusných králíků. Počet lymfocytů v krvi po průchodu adherenčním nylonovým sloupcem, k = před ozáření laserem, 5 s (0.2 J), 10 s (0.4 J), 20 s (0.8 J), 30 s 1.2 J, 60 s (2.4 J) = po době laserového ozáření. Laserové záření neovlivnilo podstatně adhezenci lymfocytů

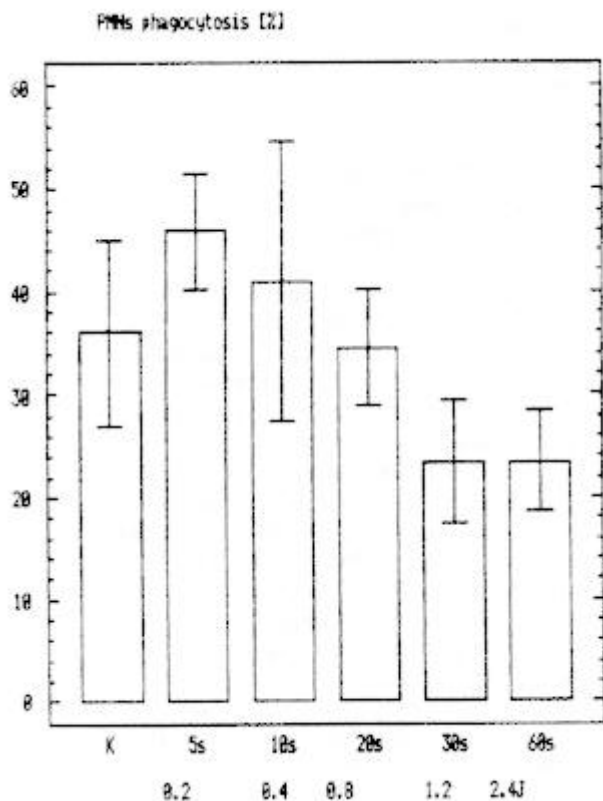
Ozáření He-Ne laserem mělo vliv na fagocytickou aktivitu PMN a rovněž MO. Nízké dávky laserového záření zvýšily fagocytickou aktivitu v obou typech leukocytů. Maximální zvýšení fagocytické aktivity PMN mohlo být naměřeno po 5 sekundách ozařování, fagocytická aktivita PMN byla výrazně ($p < 0.05$) zvýšena o 10,8 %. (Obr. 5).

Fagocytická aktivita monocytů po nízkých dávkách laserového záření byla vyšší než fagocytická aktivita PMN, o 22 % ($p < 0,02$). Postupné zvyšování dávky záření snížilo stimulační účinek laserového záření na fagocytickou aktivitu jak PMN tak i MO. Fagocytická aktivita u obou fagocytujících buněk, MO a PMN, po 60 sekundách laserového záření poklesla na úroveň fagocytické aktivity kontrolní skupiny (Obr. 4).



Obr. 4 - Fagocytická aktivita monocytů in vitro

K = fagocytóza před ozářením laserem, 5 s (0.2 J), 10 s (0.4 J), 20 s (0.8 J), 30 s (1.2 J), 60 s (2.4 J) = délka ozáření laserem. Fagocytická aktivita MO po nízkých dávkách laserového záření se zvýšila o více než o 22 % ($p < 0,02$)

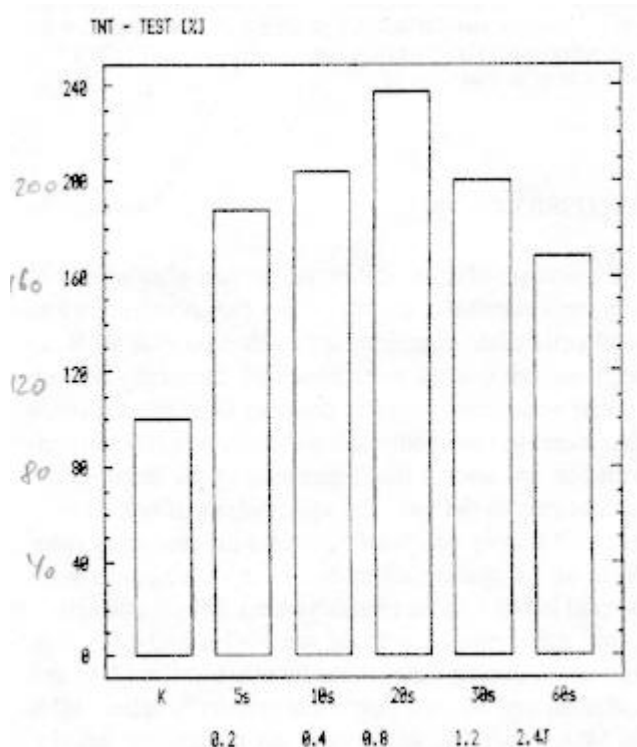


Obr. 5 - Fagocytická aktivita PMN in vitro

K = fagocytóza před ozářením laserem, 5 s (0.2 J), 10 s (0.4 J), 20 s (0.8 J), 30 s (1.2 J), 60 s (2.4 J) = po době ozáření laserem. Nejvýznamější růst fagocytické aktivity PMN byl naměřen po 5 s ozařování (10,8 %, $p < 0.05$).

Oba funkční parametry leukocytů, které jsme studovali, jejich adherence i fagocytická aktivita, se zvyšovaly po malých dávkách laserového záření.

V souladu s modifikací adherence a fagocytické aktivity bílých krvinek po ozáření laserem INT test, který sledoval změny v metabolické aktivitě fagocytujících buněk, rovněž ukázal znatelné zvýšení produkce formazanu v bílých krvinkách, které byly vystaveny nižším dávkám laserového záření. Největší zvýšení tvorby formazanu mohlo být sledováno v krevních vzorcích, které byly ozářeny na 20 sekund (o 137 %). Tyto změny byly na hranici statistické významnosti. Při zvyšování dávek laserového záření tvorba formazanu postupně klesala (Obr. 6).

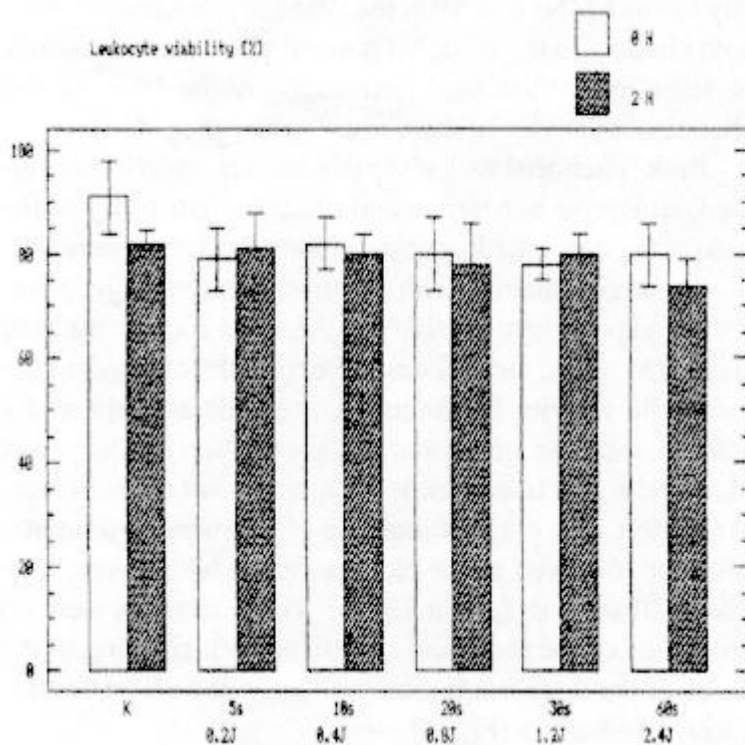


Obr. 6 - Intenzita metabolických změn fagocytujících bílých krvinek

K = hodnoty testu INT u bílých krvinek před ozářením laserem, 5 s (0.2 J), 10 s (0.4 J), 20 s (0.8 J), 30 s 1.2 J, 60 s (2.4 J) = Po době ozáření laserem. Největší nárůst tvorby formazanu mohl být pozorován v krevních vzorcích ozařovaných po 20 s (137 %), 5 s (0.2 J), 10 s (0.4 J), 20 s (0.8 J), 30 s 1.2 J, 60 s (2.4 J) = po době ozáření laserem.

V průběhu vizuálního vyhodnocování fagocytické aktivity jsme mohli sledovat že mnoho leukocytů, PMN a MO bylo poškozeno. Rovněž jsme mohli pozorovat mnoho forem leukocytů, které Netoušek nazývá krevní nebo buněčné stíny.

Z tohoto důvodu jsme provedli vyhodnocení životaschopnosti buněk. Celkový počet bílých krvinek ve všech experimentálních skupinách po ozáření laserem se snížil, ale až po 60 sekundách ozařování bylo snížení životaschopnosti leukocytů statisticky významné ($p < 0,02$). (Obr. 7).



Obr. 7 - Životaschopnost leukocytů in vitro vyjádřená v %

Levý sloupec = životaschopnost leukocytů testovaná okamžitě po ozáření laserem. Pravý sloupec = životaschopnost leukocytů testovaná 2 hodiny po ozáření laserem. K = před ozářením laserem, 5 s (0.2 J), 10 s (0.4 J), 20 s (0.8 J), 30 s (1.2 J), 60 s (2.4 J) = doba ozařování laserem.

DISKUSE

Hodnocení životaschopnosti, adherence, fagocytické a metabolické aktivity fagocytujících bílých krvinek po ozáření laserem ukázalo, že všechny tyto funkční parametry se změnilo. Obecně lze říci, že vystavení nižším dávkám laserového záření in vitro významně zvýšilo adherenci (podle současných informací v literatuře se ukázalo, že adherence neutrofilických granulocytů k vaskulárnímu endotelu je jedním z důležitých faktorů, které mají vliv na zánětlivou reakci ve všech jejích fázích; adherence neutrofilů je prvním základním krokem fagocytózy), stejně jako fagocytickou aktivitu a metabolickou aktivitu PMN a MO. Vystavení větším dávkám laserového záření (2,4 J a více) změnilo všechny tyto funkční vlastnosti PMN a MO; životaschopnost, adherence a fagocytická aktivita byly výrazně sníženy ($p < 0,02$).

Informace v literatuře vysvětlují účinek laserového záření na živé biologické subjekty jako výsledek komplexního působení termálních a fotochemických složek laserového světla (u He-Ne laseru není termální složka přítomna). Výsledný efekt je závislý na době vystavení tomuto záření. Stimulativní účinek může být patrně spojován s reversibilními funkčními změnami v buňkách, např. se zvýšením enzymatické aktivity nebo se změnami vlastností plasmatické membrány (např. permeabilita plasmatické membrány). Na druhé straně inhibiční efekt má co do činění s morfologickými změnami, které mají nevratný charakter.

Navzdory vším současné literatuře je vysvětlení stimulativního účinku laseru velmi obtížné a terapeutické využití stimulujícího laserového záření má stále empirický charakter.

Literatura u autorů.

Sponzorováno / Sponsored by:  MediCom

