

**AKADEMIA WYCHOWANIA FIZYCZNEGO  
IM. POLSKICH OLIMPIJCZYKÓW  
WE WROCŁAWIU**

**mgr Katarzyna Olszewska**

**WPŁYW WYBRANYCH TERAPII  
CZYNNIKÓW FIZYKALNYCH  
NA PRZEŻYwalNOŚĆ I PROLIFERACJĘ  
KOMÓREK W MODELU *IN VITRO***

**prof. dr hab. Waldemar Andrzejewski**

**WROCŁAW 2024**

WYKAZ SKRÓTÓW .....	3
I WSTĘP .....	4
I 1. Wprowadzenie .....	4
I 2. Pole magnetyczne w fizjoterapii .....	13
I 2.1. Podstawy teoretyczne .....	13
I 2.2. Efekty biologiczne .....	14
I 3. Promieniowanie laserowe w fizjoterapii .....	15
I 3.1. Podstawy teoretyczne .....	15
I 3.2. Efekty biologiczne .....	16
II CEL PRACY .....	19
III PYTANIA BADAWCZE .....	20
IV MATERIAŁ I METODY BADAWCZE .....	21
IV 1. Materiał badany .....	21
IV 2. Metody badawcze .....	22
IV 3. Metody statystyczne .....	27
V. WYNIKI .....	28
V 1. Wyniki testu MTT na liniach komórkowych A431, NHDF i HaCaT po ekspozycji na wybrane czynniki fizykalne w zależności od zastosowanego dawkowania. ....	28
V 1.1. Wyniki testu MTT na liniach komórkowych A431, NHDF i HaCaT po ekspozycji na promieniowanie laserowe. ....	28
V 1.2. Wyniki testu MTT na liniach komórkowych A431, NHDF i HaCaT po ekspozycji na pole magnetyczne zmienne. ....	29
V 1.3. Wyniki testu MTT na liniach komórkowych A431, NHDF i HaCaT po ekspozycji na pole magnetyczne stałe. ....	30
V 2. Wyniki analizy cyklu komórkowego linii komórkowych A431, NHDF i HaCaT po ekspozycji na wybrane czynniki fizykalne w zależności od zastosowanego dawkowania. ....	31
V 2.1. Wyniki analizy cyklu komórkowego linii komórkowej A431 .....	31

V 2.1.1. Wyniki analizy cyklu komórkowego linii komórkowej A431 po ekspozycji na promieniowanie laserowe. ....	31
V 2.1.2. Wyniki analizy cyklu komórkowego linii komórkowej A431 po ekspozycji na pole magnetyczne zmienne. ....	32
V 2.1.3. Wyniki analizy cyklu komórkowego linii komórkowej A431 po ekspozycji na pole magnetyczne stałe. ....	33
V 2.2. Wyniki analizy cyklu komórkowego linii komórkowej NHDF. ....	33
V 2.2.1 Wyniki analizy cyklu komórkowego linii komórkowej NHDF po ekspozycji na promieniowanie laserowe. ....	34
V 2.2.2. Wyniki analizy cyklu komórkowego linii komórkowej NHDF po ekspozycji na pole magnetyczne zmienne. ....	35
V 2.2.3. Wyniki analizy cyklu komórkowego linii komórkowej NHDF po ekspozycji na pole magnetyczne stałe. ....	36
V 2.3. Wyniki analizy cyklu komórkowego linii komórkowej HaCaT. ....	37
V 2.3.1. Wyniki analizy cyklu komórkowego linii komórkowej HaCaT po ekspozycji na promieniowanie laserowe. ....	37
V 2.3.2. Wyniki analizy cyklu komórkowego linii komórkowej HaCaT po ekspozycji na pole magnetyczne zmienne. ....	38
V 2.3.3. Wyniki analizy cyklu komórkowego linii komórkowej HaCaT po ekspozycji na pole magnetyczne stałe. ....	39
VI DYSKUSJA.....	40
VII WNIOSKI.....	48
VIII PIŚMIENNICTWO.....	49
STRESZCZENIE.....	58
ABSTRACT.....	62
SPIS RYCIN.....	65

**WYKAZ SKRÓTÓW**

A431 - linia ludzkich komórek raka skóry

ATP - adenzynotryfosforan

Balb 3T3 - linia mysich fibroblastów

HaCaT - linia ludzkich keratynocytów

LLLT - promieniowanie laserowe niskiej mocy (Low Level Laser Therapy)

MZ - Ministerstwo Zdrowia

NFZ - Narodowy Fundusz Zdrowia

NHDF - ludzkie prawidłowe fibroblasty skórne (ang. normal human dermal fibroblast)

RZS - Reumatoidalne zapalenie stawów

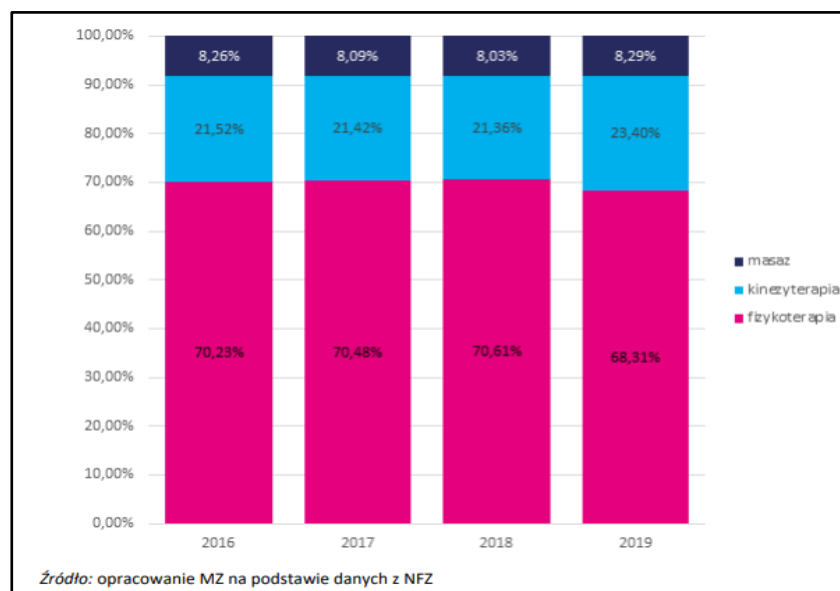
WHO - Światowa Organizacja Zdrowia (World Health Organization)

## I WSTĘP

### I 1. Wprowadzenie

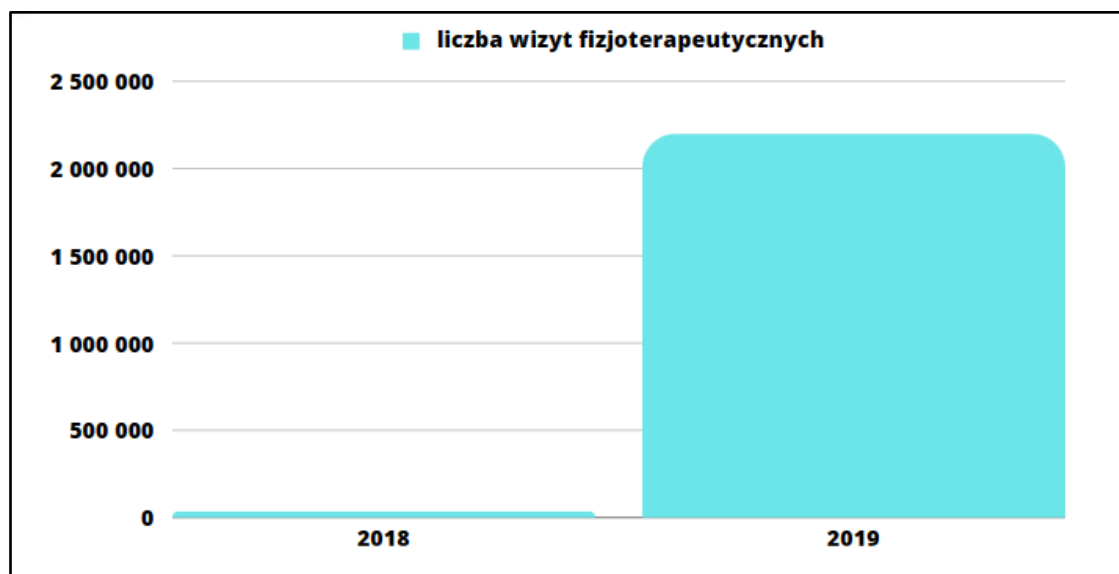
Fizjoterapia to ważna dziedzina w systemie ochrony zdrowia. Świadczenia fizjoterapeutyczne finansowane ze środków publicznych realizowane są w warunkach dziennych, stacjonarnych, domowych i ambulatoryjnych. Równocześnie, prężnie rozwija się sektor prywatnych usług w tym zakresie, które nie podlegają sprawozdawczości statystycznej w taki sposób jak zabiegi wykonywane w placówkach państwowych. Według danych Ministerstwa Zdrowia świadczenia ambulatoryjne stanowią największą ich część. W 2019 roku korzystało z nich 3 mln osób (blisko 90% wszystkich rehabilitowanych pacjentów), którym wykonano 125,5 mln zabiegów fizjoterapeutycznych (Dziennik Urzędowy Ministra Zdrowia - Mapa potrzeb zdrowotnych, MZ 2021).

Fizykoterapia to jeden z działów szeroko pojętej fizjoterapii, który jest wykorzystywany w leczeniu od wielu lat. Jak wskazują dane w latach 2016 - 2019 fizykoterapia stanowiła około 70% wykonywanych zabiegów z zakresu fizjoterapii ambulatoryjnej (ryc.1).



Ryc. 1. Struktura świadczeń w fizjoterapii ambulatoryjnej w latach 2016 - 2019 (źródło - Dziennik Urzędowy Ministra Zdrowia, poz. 69, Mapa Potrzeb Zdrowotnych).

W roku 2019 zawód fizjoterapeutów poddano prawnej regulacji i wprowadzono do ich zakresu uprawnień programowanie przebiegu procesów terapeutycznych, co miało na celu między innymi usprawnić system. Porównując liczbę wizyt fizjoterapeutycznych w latach 2018 i 2019, wzrosła ona z około 37 tys. do 2,2 mln (ryc. 2). Pomimo takich zmian, proporcje w liczbie wykonywanych zabiegów praktycznie się nie zmieniły. Nadal większość wykonywanych zabiegów w państwowym systemie ochrony zdrowia stanowią zabiegi fizykoterapeutyczne (68,3%), a kinezyterapia, której skuteczność jest znacznie bardziej udokumentowana stanowi 23,4% wykonywanych zabiegów, natomiast masaż zajmuje zaledwie 8,29% wszystkich zabiegów fizjoterapii (Dziennik Urzędowy Ministra Zdrowia - Mapa potrzeb zdrowotnych, MZ 2021).



Ryc. 2. Porównanie liczby wizyt fizjoterapeutycznych w latach 2018 i 2019 (źródło - Dziennik Urzędowy Ministra Zdrowia, poz. 69, Mapa Potrzeb Zdrowotnych).

Ważnym i wartym poruszenia aspektem społecznym jest to, że według danych statystycznych zapotrzebowanie na zabiegi fizjoterapeutyczne wzrasta ze względu na starzejące się społeczeństwo. Według danych Ministerstwa Zdrowia w 2019 r. z rehabilitacji w ramach NFZ skorzystało:

- 6,3% ludności w wieku produkcyjnym (1,44 mln osób),
- 18,6% ludności w wieku poprodukcyjnym (1,56 mln osób).

“Wśród wszystkich rehabilitowanych, osoby w wieku produkcyjnym stanowiły 43,2%, a osoby w wieku poprodukcyjnym 46,8%” (Dziennik Urzędowy Ministra Zdrowia - Mapa potrzeb zdrowotnych, MZ 2021).

Prognozuje się, że biorąc pod uwagę zmianę samej struktury demograficznej, liczba korzystających z fizjoterapii względem 2019 roku wzrośnie o:

- 4,5% do 2025 roku,
- 6,4% do 2030 roku,
- 7,1% do 2040 roku.

W związku z tym wydłuża się czas oczekiwania na zalecane zabiegi (Dziennik Urzędowy Ministra Zdrowia - Mapa potrzeb zdrowotnych, MZ 2021).

Wyżej wspomniane aspekty (wzrost zapotrzebowania na zabiegi fizjoterapeutyczne oraz wydłużony czas oczekiwania) wywierają negatywny wpływ zarówno na stan zdrowotny pacjentów jak i na kwestie gospodarcze oraz budżetowe państwa. Im dłużej pacjenci oczekują na terapię, tym czas powrotu do zdrowia jest dłuższy, spada produktywność, ale również generowane są bardziej zaawansowane problemy zdrowotne oraz powikłania. Te z kolei generują większe koszty późniejszego leczenia.

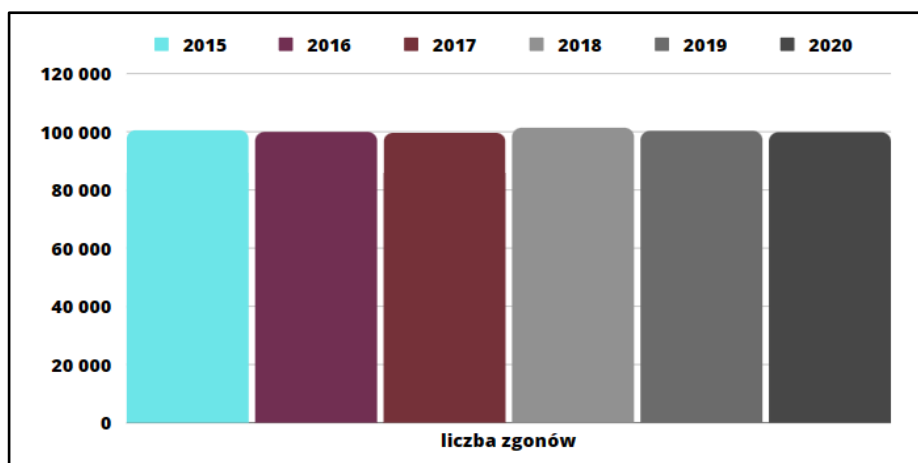
Najczęstszymi powodami rehabilitacji są:

- choroby układu mięśniowo-szkieletowego (78%),
- choroby układu nerwowego (15,3%),
- choroby układu krążenia (1,5%),
- inne choroby niezakaźne (0,9%),
- nowotwory (0,7%),
- przewlekłe choroby układu oddechowego (0,6%).

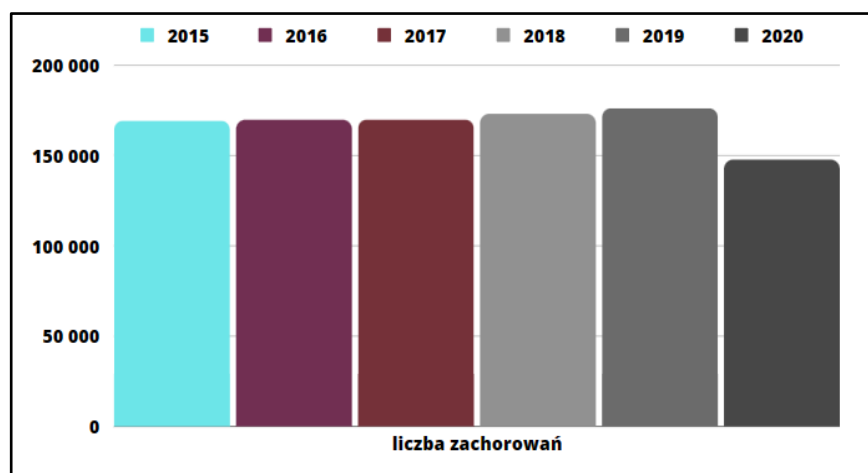
Według rekomendacji “Mapy potrzeb zdrowotnych” ważnym i koniecznym aspektem jest między innymi rehabilitacja pacjentów w dziedzinie onkologii. W 2018 roku było rehabilitowanych tylko około 3% pacjentów z grupy objętej leczeniem onkologicznym (Dziennik Urzędowy Ministra Zdrowia - Mapa potrzeb zdrowotnych, MZ 2021). Pomimo klinicznych wytycznych, które wskazują rehabilitację jako nieodzowny element terapii, pacjenci nadal nie są adekwatnie zaopiekowani w tym zakresie.

Możliwe, że wynika to m. in. właśnie z braku klarownych wytycznych postępowania z daną grupą chorych i ostrożności specjalistów kierujących pacjentów onkologicznych na fizjoterapię, którzy chorobę nowotworową traktują jako bezwzględne przeciwwskazanie do fizjoterapii.

Poniżej przedstawiono dane dotyczące liczby zgonów (ryc. 3) i zachorowań (ryc. 4) na nowotwory w Polsce w latach 2015 - 2020 oraz prognozy do 2024 roku (ryc. 5 i ryc. 6) w celu zobrazowania skali potencjalnego zapotrzebowania na objęcie wsparciem fizjoterapeutycznym pacjentów onkologicznych.

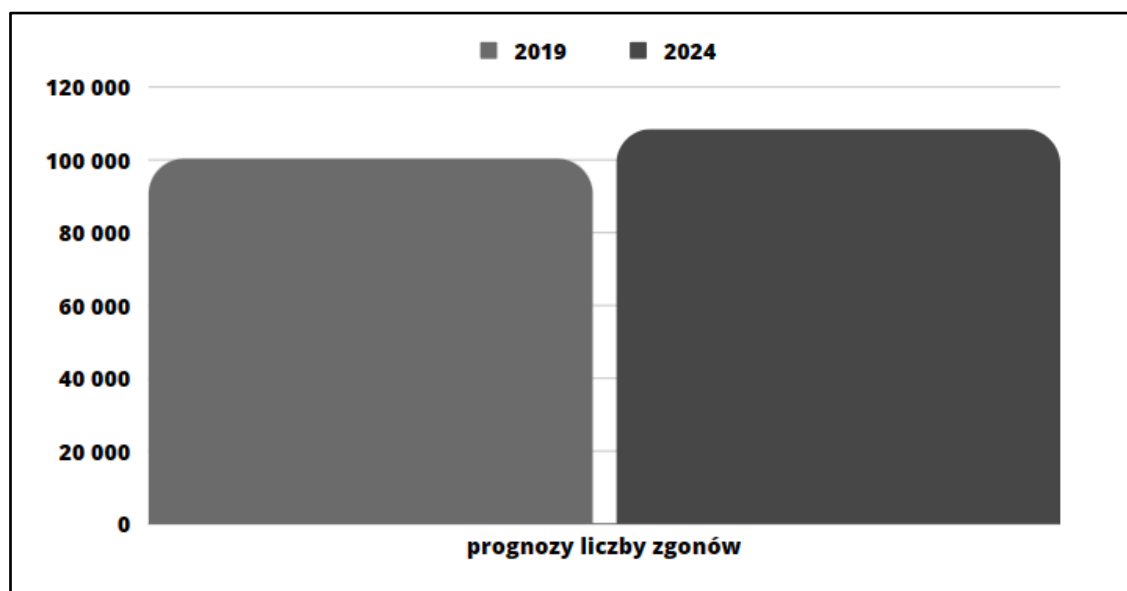


Ryc. 3. Liczba zgonów w wyniku choroby nowotworowej w latach 2015 - 2020 (źródło: Krajowy Rejestr Nowotworów <https://onkologia.org.pl/pl/raporty>)

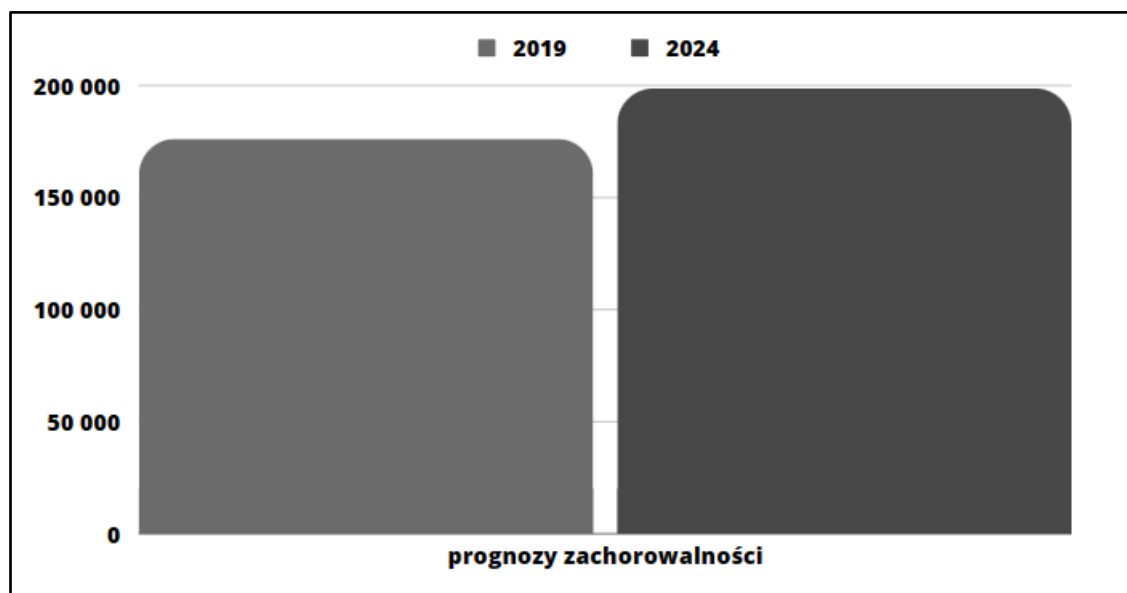


Ryc. 4. Liczba zachorowań na choroby nowotworowe w latach 2015 - 2020 (źródło: Krajowy Rejestr Nowotworów <https://onkologia.org.pl/pl/raporty>)





Ryc. 5. Prognozy liczby zgonów w wyniku choroby nowotworowej w roku 2024 (źródło: Krajowy Rejestr Nowotworów <https://onkologia.org.pl/pl/raporty>)



Ryc. 6. Prognozy zachorowalności w wyniku choroby nowotworowej w roku 2024 (źródło: Krajowy Rejestr Nowotworów <https://onkologia.org.pl/pl/raporty>)

Jednocześnie skutki uboczne, często towarzyszące leczeniu onkologicznemu, mogłyby być minimalizowane poprzez zastosowanie metod fizykoterapeutycznych.

W zależności od rodzaju nowotworu, przebiegu i rodzaju leczenia pojawia się wiele różnorodnych dolegliwości. Są to między innymi zaburzenia immunologiczne (Volker, 2018) czy obrzęki limfatyczne (Werner, 2001). Jednym z przykładów wykorzystania zabiegów fizykoterapeutycznych w onkologii są obrzęki limfatyczne z powodu raka sutka, w których stosowane jest promieniowanie laserowe w celu ich niwelowania (Baxter i wsp. 2017; Farhan i wsp. 2023). Ból jest powszechnym zjawiskiem u pacjentów chorujących na nowotwory, szczególnie w zaawansowanym stadium choroby. Częstość występowania bólu podawana jest przez różnych autorów i mieści się w przedziale od 50% do 70% chorych (Portenoy i wsp. 2011). W literaturze można spotkać zalecenia, które podkreślają konieczność poszukiwania skutecznych metod uśmierzających ból, często wskazując na zabiegi fizjoterapii jako jedną z nich (Goodwin i wsp. 2014; Kalinowski i Krawulska, 2012).

Przydatność metod z zakresu fizykoterapii wskazuje się między innymi przy uszkodzeniach nerwów obwodowych, które mogą być następstwem stosowania radioterapii czy chemioterapii. Czynnikiem stosowanym w przypadku takich uszkodzeń są między innymi promieniowanie laserowe i pole magnetyczne (Suszyński i wsp. 2015). Podobnie sytuacja prezentuje się w przypadku zaburzeń procesów gojenia ran, które mogą pojawiać się w trakcie leczenia nowotworów (Caetano i wsp. 2009; Henry i wsp. 2008). Istnieją również pojedyncze badania poruszające powyższy problem na poziomie komórkowym, które wskazują, że stosowanie pola magnetycznego może znacznie wpływać na proces regeneracji tkanek. Przykładem jest doświadczenie przeprowadzone na mysich fibroblastach (Balb 3T3), gdzie po zaaplikowaniu zmiennego pola magnetycznego o niskiej częstotliwości odnotowano zwiększoną jak i zmniejszoną przeżywalność komórek w stosunku do kontroli. Tendencje te różniły się w zależności od liczby ekspozycji i czasu stosowania pola magnetycznego (Rusak i Rybak, 2013).

Kolejnymi problemami dotyczącymi pacjentów onkologicznych są uszkodzenia tkanki mięśniowej (Pin i wsp. 2018; Sturgeon i wsp. 2019) oraz zwiększone ryzyko osteoporozy (Drake, 2013), a co za tym idzie również podatność na uszkodzenia stawów, przykurcze, a w konsekwencji na powstawanie wad postawy ciała. Do tego typu powikłań, związanych często z bólem dochodzi aspekt zmniejszonej aktywności

fizycznej osób chorych (Szpunar, 2018; Avancini i wsp. 2020; Misiąg i wsp. 2022). Z kolei aktywność fizyczna jest czynnikiem wpływającym korzystnie na działanie układu odpornościowego (Forte i wsp. 2022), który zostaje osłabiony przez sam proces leczenia. To również wpływa na pogorszenie ogólnej wydolności organizmu poprzez osłabienie układu krążenia oraz oddechowego, których sprawność zależy od intensywności podejmowanych zajęć ruchowych (Nystoriak i Bhatnagar, 2018; Jing i wsp. 2023; Yang i wsp. 2023; Zhu i wsp. 2022).

Ponadto w literaturze można również spotkać opisy nietypowych objawów nowotworów, na przykład zapalenia stawów, wskazujących na reumatoidalne zapalenie stawów (RZS), jednak będących wczesnym objawem utajonego nowotworu złośliwego. Jednocześnie często w przypadku RZS stosuje się zarówno promieniowanie laserowe i pole magnetyczne, które stanowią przeciwwskazanie u pacjentów onkologicznych (Hossein-Khannazer i wsp. 2022; Zwolińska i wsp. 2016). Tego typu doniesienia wskazują na potrzebę dokładniejszego badania wpływu wyżej wymienionych czynników na komórki ludzkie kierując się zasadą “przede wszystkim nie szkodzić”.

Z kolei wyżej wymienione aspekty mają również powiązanie z tym, że wiele osób chorujących na nowotwory ma problemy ze snem i zmagają się z bezsennością, którą często leczy się lekami, które dodatkowo obciążają organizm (Pinucci i wsp. 2023). W kontekście możliwości wykorzystania fizjoterapii w leczeniu bezsenności istnieją doniesienia o korzystnym oddziaływaniu pola magnetycznego na jakość snu (Liao i wsp. 2023) jednak nie ma jednoznacznych doniesień i wskazań jego stosowania w tym zakresie.

Podobnie jest w przypadku blizn, które u pacjentów onkologicznych bardzo często powstają w wyniku licznych interwencji chirurgicznych i mają one znaczny wpływ na ich codzienne funkcjonowanie (Philips i wsp. 2020). W tym aspekcie warto zwrócić uwagę na to, że coraz częściej w terapii blizn używany jest laser, jednak także jego stosowanie nie jest poparte jednoznacznymi dowodami naukowymi. W literaturze podkreśla się istotę kontynuowania i rozszerzania badań na ten temat (Ohshiro i wsp. 2013).

Wszystkie wyżej wymienione czynniki łączą się również z bardzo ważnym kontekstem w całym procesie wspierania osób leczących się z powodu nowotworu, a mianowicie chodzi o szeroko pojęty aspekt psychiczny. Już sama diagnoza jest dla pacjentów dużym obciążeniem. Dodatkowo dochodzi kwestia wcześniej wspomnianego zmniejszenia poziomu aktywności fizycznej, która odgrywa ważną rolę w utrzymaniu zdrowia psychicznego. W profilaktyce i skutecznym leczeniu różnego rodzaju zaburzeń psychicznych, które często towarzyszą pacjentom onkologicznym (Wang i wsp. 2020; Boleková i wsp. 2023) może ona znacząco wpłynąć na rokowanie choroby nowotworowej (Zyzniewska-Banaszak i wsp. 2021). Zastosowanie fizykoterapii jako środka wpływającego na niwelowanie skutków ubocznych procesu leczenia onkologicznego (m. in. osłabienie siły mięśniowej, dolegliwości bólowe) jest potencjalnym narzędziem ułatwiającym pacjentom podejmowanie odpowiednio dobranej aktywności fizycznej. Stąd wynika potrzeba wnikliwego poznawania mechanizmów zachodzących w organizmie człowieka, w trakcie jej stosowania.

Ponadto, często wskazywanymi środkami w celu niwelowania skutków ubocznych leczenia onkologicznego (często spowodowanych ingerencją substancji trujących również na komórki zdrowe) jest farmakoterapia (Fallon i wsp. 2018), która również wiąże się z różnymi skutkami niepożądanymi. W literaturze jednak więcej jest doniesień odnośnie terapii ruchem, pracy manualnej w celu niwelowania skutków ubocznych leczenia onkologicznego, a stosunkowo mało wskazującej na rolę fizykoterapii jako formy wspomagającej te procesy (Pyszora, 2010). Również w raportach WHO (Stewart i Wild, 2014) brakuje wskazań i analiz odnośnie stosowania fizykoterapii w tym aspekcie.

Pole magnetyczne i promieniowanie laserowe to jedne z najczęściej stosowanych zabiegów terapeutycznych w fizykoterapii. Jednocześnie są to metody, które nie angażują tak bardzo czasowo terapeutów, jak kinezyterapia czy masaż leczniczy. Umożliwiają więc realizację większej ilości procedur terapeutycznych jednocześnie. Opublikowane dotychczas doniesienia naukowe nie wskazują jednak jednoznacznego oddziaływania wyżej wymienionych czynników fizykalnych na procesy zachodzące na poziomie komórkowym, a także nie wyjaśniają dostatecznie

ich mechanizmów działania. Dodatkowo należy zwrócić uwagę na fakt, że stosowane w różnych eksperymentach parametry obu wyżej wymienionych czynników fizykalnych są zróżnicowane ze względu na różnorodność grup badanych, wykorzystywane aparaty oraz stosowane dawki. Istnieje stosunkowo mało badań podstawowych nad procesami zachodzącymi na poziomie komórkowym, pod wpływem oddziaływania promieniowania laserowego i pola magnetycznego. Konsekwencją tego jest brak klarownych, opartych na badaniach naukowych wytycznych dotyczących ich dawkowania umożliwiającego osiągnięcie lepszych efektów terapeutycznych, jak również ewentualnych przeciwwskazań do ich stosowania. Dotyczy to zarówno oddziaływania tych czynników na komórki prawidłowe jak i komórki nowotworowe. W praktyce często przyjmuje się, że choroba nowotworowa jest bezwzględnym przeciwwskazaniem do stosowania zabiegów fizykoterapeutycznych, jednak nie jest to poparte obiektywnymi badaniami, a dostępne doniesienia nie są jednoznaczne (Kasprzak i Mika, 347-348, 2006).

Jednym z badań poruszających ten problem jest badanie, którego wyniki wykazały, że zastosowanie lasera impulsowego z emisją promieniowania podczerwonego powoduje wzmożenie procesu apoptozy komórek nowotworowych, przy jednoczesnym braku oddziaływania na komórki prawidłowe. Pomimo to, stosowanie go w obszarach, gdzie stwierdzono zmiany pierwotne lub wtórne o charakterze nowotworowym, jest odradzane. Naświetlanie laserem zalecane jest wyłącznie w terminalnych stadiach choroby, po uzyskaniu zgody lekarza specjalisty oraz pacjenta, na przykład w celu łagodzenia bólu (Van Coevorden, 2009). Tego typu doniesienia sugerujące odmienne wnioski w stosunku do innych badań, gdzie promieniowanie laserowe jest wskazywane jako metoda do niwelowania obrzęków limfatycznych (Baxter i wsp. 2017; Farhan i wsp. 2023) uniemożliwiają podjęcie jednoznacznego stanowiska w kwestii stosowania promieniowania laserowego w przypadku pacjentów chorych onkologicznie

Poznanie mechanizmów działania i wpływu na komórki pola magnetycznego i promieniowania laserowego stanowi podstawę do prowadzenia dalszych badań klinicznych mających na celu jednoznaczne określenie bezpiecznych dawek oraz ustalenie ewentualnych ograniczeń do ich stosowania w określonych stanach

klinicznych pacjentów. Weryfikacja taka umożliwiłaby dostosowywanie procesów terapeutycznych do poszczególnych jednostek chorobowych, w celu zoptymalizowania i udoskonalenia procesu leczenia, powrotu pacjentów do sprawności psychofizycznej oraz funkcjonowania w społeczeństwie. Dałoby to możliwość działania zgodnie z zasadami fizjoterapii, czyli jak najszybszego stymulowania organizmu w celu zapobiegania efektom ubocznym leczenia, a nie leczeniu samych efektów. Możliwe, że jeszcze bardziej dogłębne poznanie mechanizmów oddziaływania czynników fizykalnych na organizm ludzki umożliwiłoby zastosowanie ich w celu niwelowania skutków ubocznych leczenia farmakologicznego i chirurgicznego w przypadku chorób nowotworowych. Ponadto poprzez dokładniejsze poznawanie mechanizmów działających w trakcie stosowania tego typu czynników fizykalnych, można skuteczniej wykorzystywać je w przypadku wielu chorób, prewencji urazów oraz ogólnie pojętej profilaktyce zdrowotnej. Dotyczy to praktycznie wszystkich działów medycyny, w których fizjoterapia ma swoje zastosowanie.

## **I 2. Pole magnetyczne w fizjoterapii**

### **I 2.1. Podstawy teoretyczne**

Mechanizm oddziaływania pola magnetycznego na ustrój jest bardzo złożony i nie do końca wyjaśniony. To co charakteryzuje pole magnetyczne to przenikanie przez wszystkie struktury ciała ludzkiego. To odróżnia je od pozostałych postaci energii, które ulegają pochłonięciu tylko do określonej głębokości tkanek.

Magnetoterapia to forma stosowania pola magnetycznego o wysokich wartościach indukcji oraz niskich wartościach częstotliwości w celach terapeutycznych. Można wyróżnić stałe i zmienne (impulsowe) pole magnetyczne.

Parametrami, które dobiera się do celu zabiegu są:

- czas trwania zabiegu (min),
- częstotliwość i charakter zmian pola magnetycznego (Hz),
- natężenie pola magnetycznego (mT).

W zależności od jednostki chorobowej zalecane są różne dawki. Brakuje jednak naukowych, precyzyjnych uzasadnień stosowania takiego właśnie dawkowania,

a co za tym idzie weryfikacji najskuteczniejszych sposobów jego doboru (Kasprzak i Mika, 2006).

### **I 2.2. Efekty biologiczne**

Wpływ pola magnetycznego na poziomie komórkowym jest przedstawiany w literaturze medycznej w różny sposób. Wskazuje się, że pole magnetyczne na poziomie komórkowym i tkankowym korzystnie wpływa między innymi na krążenie krwi (Kuryliszyn-Moskal i wsp. 2012), jednak istnieją również doniesienia o zwężeniu naczyń, zmniejszeniu perfuzji lub braku efektu (Mayrovitz i wsp. 2022). Odnotowano również pozytywny wpływ na wzrost żywych komórek fibroblastów wraz z zmniejszeniem się liczby martwych, co tłumaczy się intensyfikacją procesów oddychania komórkowego (Afinogenov i wsp. 2009). Jednocześnie inne badania wskazują na brak zmian w przeżywalności komórek, a wręcz na znaczne zmniejszenie proliferacji w ciągu 24 godzin po napromieniowaniu (Pasi i wsp. 2016). Istnieją doniesienia, że pole magnetyczne nie powoduje stresu oksydacyjnego, ale stymuluje niewielką aktywność antyoksydacyjną (Glinka i wsp. 2018).

Zauważa się również wpływ statycznego pola magnetycznego na transport jonów wapniowych, sodowych i potasowych (Wu i wsp. 2022; Krylov i Osipova, 2023), co może też oddziaływać na synapsy nerwowe, a w konsekwencji na szybkość przepływu bodźców eferentnych i aferentnych. Również dotyczy to procesów na poziomie komórkowym biorących udział w regeneracji m. in. układu krwionośnego czy mięśniowo-szkieletowego w korelacji z innymi metodami leczniczymi. Badania przeprowadzone zarówno na komórkach zwierzęcych jak i ludzkich wskazują, że stałe pole magnetyczne zwiększa zarówno przeżywalność komórek jak, ich właściwości osteogenne (Marędziak i wsp. 2014; Marędziak i wsp. 2015). Ponadto stosowanie pola magnetycznego w połączeniu z terapią komórkami macierzystymi poprawia przekaz bodźców między komórkami oraz wykazuje nasilenie oddziaływania specyficznych czynników wzrostu, co może być potencjalnie stosowane w leczeniu urazów i chorób układu mięśniowo-szkieletowego (Marędziak i wsp. 2014).

Wskazuje się również przyspieszenie procesów angiogenezy, procesy anaboliczne ATP i zwiększenie wydzielania endorfin (Selvam i wsp. 2007; Gworys

i wsp. 2014; Zwolińska i wsp. 2016), z czego wynika działanie przeciwbólowe, przeciwobrzękowe oraz przeciwzapalne. Choć działanie przeciwbólowe poddawane jest w wątpliwość (Arabloo i wsp. 2017). Równocześnie w innych badaniach wskazuje się na możliwość odwrotnego wpływu na angiogenezę, mianowicie poprzez jej zmniejszenie, a w rezultacie hamujące oddziaływanie na rozrost komórek nowotworowych u myszy (Tatarov i wsp. 2011).

Aktualnie dostępne doniesienia dotyczące działania magnetycznego pola zmiennego oraz stałego nie są spójne. Przeprowadzone badania różnią się m. in. rodzajami zastosowanych parametrów urządzeń, zakresem dawek, które nierzadko odbiegają od tych stosowanych w praktyce fizjoterapeutycznej oraz rodzajami badanych linii komórkowych.

### **I 3. Promieniowanie laserowe w fizjoterapii**

#### **I 3.1. Podstawy teoretyczne**

Promieniowanie laserowe ma swoje podstawy w oddziaływaniu na tkanki poprzez emisję światła i jest jednym z podtypów światłoterapii. Stosowane lasery (wzmocnione światło przez stymulowaną emisję promieniowania) są urządzeniami, które zazwyczaj generują promieniowanie elektromagnetyczne. Pierwotnie zostały one opisane przez Theodore'a Maimana w 1960 roku. Doniesienia naukowe w tym obszarze rozpoczęły się od pracy Mester i współautorów w 1967 roku, gdzie odnotowano nietermiczny wpływ laserów na porost włosów u myszy (Farivar i wsp. 2014). Laser jest opisany jako źródło światła lub energii promieniowania (Verma i wsp. 2012). Laser niskiego poziomu (LLLT) jest rodzajem lasera, który oddziałuje na systemy biologiczne za pomocą środków nietermicznych (Lin i wsp. 2010).

Terapia laserowa niskiego poziomu (LLLT) to zastosowanie światła do układu biologicznego w celu promowania regeneracji tkanek, zmniejszenia stanu zapalnego i złagodzenia bólu. W przeciwieństwie do innych medycznych procedur laserowych, LLLT nie ma mechanizmu ablacyjnego ani termicznego, ale raczej efekt fotochemiczny, co oznacza, że światło jest absorbowane i powoduje zmianę chemiczną (Huang i wsp. 2009). Powodem, dla którego technika ta jest określana jako niski poziom, jest to, że optymalne poziomy dostarczanej gęstości energii są niskie



i nie można jej porównywać z innymi formami terapii laserowej stosowanymi do ablacji, cięcia i koagulacji termicznej tkanek (Hamblin i Demidova, 2006).

Lasery o małej mocy znajdują zastosowanie w biostymulacji (do 400 mW, do kilkunastu J/cm<sup>2</sup>). W terapii stosuje się lasery emitujące promieniowanie o długości fal przeważnie w zakresie od 633 do 1063 nm. Ważną cechą promieniowania laserowego jest to, że w zależności od długości fali oraz ustawionej dawki przenika ono na określoną głębokość tkanek. Istnieją różne opinie dotyczące skuteczności terapeutycznej promieniowania laserowego. Przyjęło się, że w stanach ostrych stosuje się mniejsze częstotliwości i krótsze czasy napromieniowania, a w stanach przewlekłych większe częstotliwości i dłuższe czasy napromieniowania. Stosuje się labilny i stabilny sposób poruszania głowicą laserową (Kasprzak i Mika, 137-148, 2006).

### **I 3.2. Efekty biologiczne**

Działanie biologiczne laserów zależy od długości fali emitowanego promieniowania. Głównie wskazuje się na działanie przeciwbólowe, regeneracyjne, przeciwzapalne, przeciwobrzękowe, a także udział w przyspieszeniu gojenia się ran, poprawę przewodnictwa nerwowego, zwiększenie odporności organizmu oraz poprawę krążenia (Bugajski i wsp. 2010, Zwolińska i wsp. 2007).

Zachodzące wyżej opisane efekty tłumaczy się wpływem lasera na korzystne zmiany w potencjale błony komórkowej (Hamblin i Demidova, 2006), zwiększeniem syntezy ATP, zwiększeniem proliferacji komórek (Fernandes i wsp. 2016; Ginani i wsp. 2015), zwiększeniem unaczynienia - usprawnieniem angiogenezy (Zwolińska i wsp. 2007; Cury i wsp. 2013).

Stymulacja komórek za pomocą LLLT została zbadana w wielu kontekstach. LLLT stymuluje gojenie się ran, syntezę kolagenu, regenerację nerwów, zwiększoną przebudowę i odbudowę kości, przywrócenie prawidłowej funkcji nerwowej po urazie, normalizację nieprawidłowych funkcji hormonalnych, łagodzenie bólu, stymulację uwalniania endorfin i modulację układu odpornościowego (Merigo i wsp. 2015; Hussein i wsp. 2011; Mansouri i wsp. 2020). Wpływ LLLT na kultury komórkowe był badany szeroko przez Karu. Wykazano, że napromieniowanie

komórek może aktywować specyficzne reakcje biochemiczne i zmienić metabolizm komórkowy (Karu, 1990). W kilku badaniach, w modelu *in vitro* ludzkich fibroblastów zaobserwowano również zwiększoną syntezę DNA (Lovschall i Renholt-Bindslev, 1994) oraz wzrost produkcji kolagenu (Avcı i wsp. 2013, Tatmatsu-Rocha i wsp. 2016).

Niskoenergetyczne promieniowanie laserowe od wielu lat było wykorzystywane z pozytywnym skutkiem zarówno w reumatologii, jak i w szeroko pojętej fizjoterapii, a korzystne działanie LLLT potwierdzono w licznych badaniach (Bugajski i wsp. 2010, Zwolińska i wsp. 2007). Natomiast ich rozbieżne rezultaty, odległy czas wykonywania (większość przywoływanych pochodzi z lat 90-tych) i brak większej ilości randomizowanych badań wymaga przeprowadzenia eksperymentów biorących pod uwagę usystematyzowanie metodyki aplikacji promieniowania laserowego (Pyszora i Adamczyk, 2005, Kwolek i wsp. 2011). Ponadto często bazuje się na wiedzy sprzed 20 lat i brakuje badań przybliżających mechanizmy działania promieniowania laserowego na poziomie komórkowym (Zwolińska i wsp. 2007). Aby lepiej zrozumieć przydatność LLLT w gojeniu się ran skórnych, potrzebne są dobre badania kliniczne, które korelują efekty komórkowe i procesy biologiczne. Przyszłe badania powinny być dobrze kontrolowanymi badaniami z racjonalnym doбором laserów i parametrów leczenia. Wobec braku takich badań, dostępna literatura nie wydaje się popierać powszechnego stosowania LLLT w gojeniu się ran. Choć zastosowanie laserów wysokoenergetycznych (10-100 W) jest dobrze ugruntowane ze znaczną literaturą pomocniczą i powszechnym zastosowaniem, sprzeczne badania w literaturze ograniczają stosowanie promieniowania laserowego (LLLT) tylko do zastosowań badawczych. Pomimo tego LLLT jest stosowany klinicznie w wielu innych obszarach, w tym w Kanadzie, Europie i Azji, w leczeniu różnych zaburzeń neurologicznych, chiropraktycznych, stomatologicznych i dermatologicznych. Aby zrozumieć tę rozbieżność, warto zapoznać się z badaniami nad LLLT, które do tej pory wykluczały zatwierdzenie wielu takich technologii przez Agencję ds. Żywności i Leków w Stanach Zjednoczonych. Zasadniczą kwestią jest to, czy istnieją wystarczające dowody na poparcie stosowania LLLT. Do podobnych wniosków

(systematyzacji stosowanych dawek) dochodzą również inni autorzy wykonujący przegląd przeprowadzonych do tej pory badań (AlGhamdi i wsp. 2012).

Podsumowując, powyżej opisane badania i zebrane do tej pory informacje wykazały brak jednoznacznych danych dotyczących możliwości wykorzystania pola magnetycznego i promieniowania laserowego u chorych onkologicznie. Pomimo tego, że istnieją doniesienia wskazujące na pozytywne oddziaływanie wyżej wymienionych czynników fizykalnych nie są one potwierdzone i nadal, w praktyce, choroba nowotworowa jest traktowana jako przeciwwskazanie bezwzględne do wykonywania tego typu terapii.

Ponadto, biorąc pod uwagę coraz większe zapotrzebowanie na wyżej wymienione zabiegi i możliwość nabycia sprzętu do użytku prywatnego, koniecznym jest dokładne poznanie mechanizmów działania wymienionych czynników fizykalnych oraz ich oddziaływania na organizm człowieka. W celu weryfikacji dotychczas stosowanych modeli postępowania w fizykoterapii, konieczna jest ocena wpływu różnego dawkowania promieniowania laserowego oraz pola magnetycznego zarówno na komórki prawidłowe jak i nowotworowe. Możliwe, że szczegółowe poznanie mechanizmów działania wskazanych czynników fizykalnych umożliwiłoby celowane stosowanie ich w różnego rodzaju chorobach, w bezpieczny dla pacjentów sposób.

## II CEL PRACY

Celem pracy była ocena wpływu wybranych terapii czynników fizykalnych na proliferację i przeżycie ludzkich komórek prawidłowych oraz nowotworowych. Celem szczegółowym była analiza wpływu pola magnetycznego (zmiennego i stałego pola magnetycznego niskiej częstotliwości) oraz promieniowania laserowego na proliferację oraz przeżywalność komórek w modelu *in vitro*.

### III PYTANIA BADAWCZE

Postawiono następujące pytania badawcze:

1. Czy promieniowanie laserowe wpływa na przeżywalność komórek nowotworowych skóry (A431), komórek skóry - keratynocytów (HaCaT), komórek skóry - fibroblastów (NHDF)?

2. Czy zmienne pole magnetyczne wpływa na przeżywalność komórek nowotworowych skóry (A431), komórek skóry - keratynocytów (HaCaT), komórek skóry - fibroblastów (NHDF)?

3. Czy stałe pole magnetyczne wpływa na przeżywalność komórek nowotworowych skóry (A431), komórek skóry - keratynocytów (HaCaT), komórek skóry - fibroblastów (NHDF)?

4. Czy promieniowanie laserowe wpływa na proliferację komórek nowotworowych skóry (A431), komórek skóry - keratynocytów (HaCaT), komórek skóry - fibroblastów (NHDF)?

5. Czy zmienne pole magnetyczne wpływa na proliferację komórek nowotworowych skóry (A431), komórek skóry - keratynocytów (HaCaT), komórek skóry - fibroblastów (NHDF)?

6. Czy stałe pole magnetyczne wpływa na proliferację komórek nowotworowych skóry (A431), komórek skóry - keratynocytów (HaCaT), komórek skóry - fibroblastów (NHDF)?

## IV MATERIAŁ I METODY BADAWCZE

### IV 1. Materiał badany

Badania przeprowadzono na liniach komórkowych:

- A431 (ludzkie komórki płaskonabłonkowego raka skóry),
- NHDF (prawidłowe komórki ludzkich fibroblastów),
- HaCaT (prawidłowe komórki ludzkich keratynocytów, unieśmiertelnione).

Wszystkie linie komórkowe użyte w badaniach znajdują się w repozytorium Pracowni Hodowli Komórkowych Zakładu Histologii i Embriologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Linia komórek A-431 została zakupiona w ATCC (ang. American Type Culture Collection, Cell Culture Collection), komórki NHDF w firmie Lonza, natomiast komórki HaCaT w DKFZ (niem. Deutsche Krebsforschungszentrum; Heidelberg, Niemcy) (Boukamp, 1988).

Hodowlę komórek A431 oraz HaCaT prowadzono w medium DMEM (Lonza, Bazylea, Szwajcaria) z dodatkiem roztworu 1% L-glutaminy ze streptomycyną i penicyliną oraz 10% FBS (Sigma). Do prowadzenia hodowli komórek NHDF stosowano zestaw medium z suplementami FGM-2 Bullet Kit (Lonza).

Pasażowanie komórek przeprowadzono z użyciem roztworu 0,25% trypsyny w EDTA (Sigma), gdy konfluencja komórek wynosiła ok. 70%. Media zmieniano dwa razy w tygodniu. Hodowle komórkowe prowadzono w sterylnych warunkach w inkubatorze Steri Cycle 381 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) w 37°C, w atmosferze 5% CO<sub>2</sub>.

Na potrzeby przeprowadzenia badań za pomocą testu MTT komórki zawieszano w 100 µl pełnego medium hodowlanego wysiewano na płytkach 96-dołkowych (Falcon), w ilości  $1 \times 10^4$  komórek/dołek. W przypadku komórek przeznaczonych do analizy cyklu komórkowego za pomocą cytometrii przepływowej (FACSCantoII™, Becton Dickinson, Eysins, Szwajcaria) wysiewano na płytki 6-dołkowe w ilości  $1 \times 10^5$  komórek/dołek.

## IV 2. Metody badawcze

W celu przeanalizowania przeżywalności komórek stosowano test MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide). W teście tym żółta sól tetrazolowa zostaje przeprowadzona do fioletowej pochodnej formazanu w mitochondriach żywych komórek w wyniku reakcji enzymatycznej przeprowadzanej przez oksydoreduktazy. Test ten jest testem kolorymetrycznym, który pozwala przeprowadzić ocenę przeżywalności na podstawie absorbancji (Mossmann 1983; Krzysztoń-Russjan i wsp. 2009).

MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) rozpuszczono w medium DMEM bez suplementów w ilości 5mg/ml. Po zlaniu medium do każdego dołka dodano po 100  $\mu$ l roztworu MTT po czym płytki umieszczono w inkubatorze na 2 godziny. Po czasie inkubacji zlano medium, dodano do każdego dołka 100  $\mu$ l alkoholu izopropylowego (cz.d.a) (P.P.H. Stanlab, Lublin, Polska). Płytki umieszczono na 0,5 godziny w inkubatorze, po czym zmierzono absorbancję na spektrofotometrze Epoch (Biotek, Winooski, VT, USA) przy długości fali 570 nm (długość referencyjna 650 nm).

Przeżywalność komórek obliczono w stosunku do kontroli, którą przyjęto za 100%, zgodnie ze wzorem:

$$V(\%) = (pB-pM/pK-pM) \times 100, (1)$$

gdzie:

V - przeżywalność w procentach,

pB - średnie wartości absorbancji dla próby badanej,

pK - średnie wartości absorbancji dla kontroli.

pM - absorbancja medium

W celu weryfikacji oddziaływania wybranych czynników fizykalnych na poszczególne fazy cyklu komórkowego wykonano analizę przy wykorzystaniu aparatu do cytometrii przepływowej. Jest to technika badawcza, w której ocenie poddawane są pojedyncze komórki, przepływające przez wiązki światła laserowego. Zazwyczaj bada się 50 000-500 000 komórek i poddaje się analizie na cytogramach (Piątosa i Klaudel-Dreszler, 2012). Pozwala ona dokonać szybkiego pomiaru

rozproszonego światła lub sygnałów fluorescencji, które pochodzą z naświetlonej komórki. Stwarza to możliwość oceny jakościowej i ilościowej komórek (Fabijańska-Mitek i Stachurska, 2017). Znajduje ona szerokie zastosowanie w wielu działaniach diagnostycznych, między innymi w analizie cyklu komórkowego, co umożliwia weryfikację jaki odsetek komórek znajduje się w danej fazie.

Cykl komórkowy obejmuje cztery następujące po sobie fazy: G1, S, G2 oraz M, z których trzy pierwsze stanowią interfazę. W fazie cyklu S następuje replikacja materiału genetycznego, natomiast fazy G1 oraz G2, występujące przed fazą S oraz M, to część cyklu komórkowego, w których zachodzi synteza białek, lipidów oraz enzymów. Podział całej komórki, w tym jej genomu, następuje w fazie M. Liczne zaburzenia cyklu komórkowego, przede wszystkim nieprawidłowa, nadmierna proliferacja komórek, są typowe dla procesu kancerogenezy. Liczne regulatory cyklu komórkowego, jak cykliny i kinazy cyklinozależne odgrywają kluczową rolę w punktach kontrolnych cyklu komórkowego i regulują przejścia komórki w kolejne fazy podziału (Dzięgiel i Marszałek, 134-140, 2021).

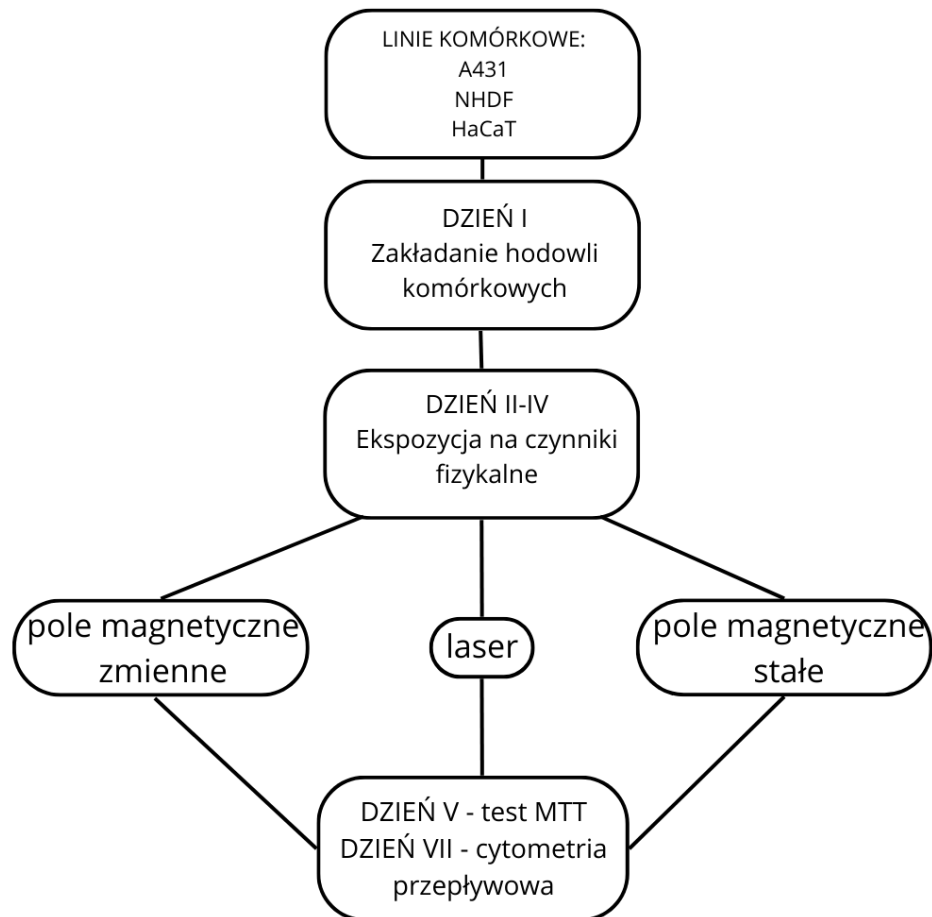
Po 3 dniach naświetlania wykonywano pasaż komórek, trzykrotne płukanie w płynie PBS, utrwalanie w zimnym (-20 st C) 70% alkoholu etylowym na czas 48 h. Następnie wykonywano analizę cyklu komórkowego, gdzie uzyskano informację o ilości komórek znajdujących się w poszczególnych fazach cyklu komórkowego (fazy: G1, S oraz G2), co umożliwiło ocenę wpływu pola magnetycznego i promieniowania laserowego na komórki.

Badania przeprowadzono po 24 godzinach od wysiania hodowli. Ze względu na opisane w literaturze różnorodne zakresy dawek zalecanych w terapii, w eksperymencie zastosowano najniższe, średnie i najwyższe rekomendowane wartości (Kasprzak i Mika, 151-188; 336-349, 2006).

W przybliżeniu stanowiło to odzwierciedlenie zalecanego w praktyce dawkowania stosowanego w fizykoterapii. Ekspozycję na promieniowanie laserowe oraz pole magnetyczne stałe i zmienne przeprowadzono przez trzy kolejne dni, w tych samych przedziałach czasowych. Eksperyment na wszystkich wyżej wskazanych liniach komórkowych (A431, NHDF, HaCaT) wykonano w przypadku komórek przeznaczonych do testu MTT w trzech powtarzalnych cyklach, a w przypadku



komórek przeznaczonych do cytometrii przepływowej w dwóch. Przez jeden cykl rozumie się założenie i wysianie hodowli, trzy dni ekspozycji na czynniki fizykalne i wykonanie testu MTT lub cytometrii przepływowej (ryc. 7). Następnie analizie poddane były uśrednione wyniki ze wszystkich trzech powtórzeń testu MTT oraz dwóch powtórzeń cytometrii przepływowej.



Ryc 7. Schemat przeprowadzonych badań.

W przypadku promieniowania laserowego komórki poddawano ekspozycji według zastosowanej dawki trzy razy dziennie przez 3 kolejne dni. Przerwy między kolejnymi naświetlaniami wynosiły czterdzieści minut. Zastosowano dawki: 1 J/cm<sup>2</sup>, 8 J/cm<sup>2</sup> i 15 J/cm<sup>2</sup>, wypełnienie: 100%, pole zabiegowe: w płytkach 96-dołkowych, przeznaczonych do testu MTT 30,912 cm<sup>2</sup>, a w płytkach 6-dołkowych, przeznaczonych do analizy cyklu komórkowego: 54 cm<sup>2</sup>, tryb emisji: ciągły. Czas trwania pojedynczej ekspozycji wynosił każdorazowo 3 minuty.

W przypadku pola magnetycznego stałego i zmiennego komórki były ekspozowane również według zastosowanej dawki dwa razy dziennie przez 3 kolejne dni. Przerwy między ekspozycjami wynosiły sześćdziesiąt minut. Komórki traktowano dawkami: wartości indukcji znamionowej przy ścianie aplikatora 2,5 mT, 6 mT i 12 mT natomiast w geometrycznym środku aplikatora 0,5 mT, 4 mT i 10 mT oraz analogicznie o częstotliwości 2 Hz, 60 Hz i 120 Hz. Zastosowano zmienne oraz stałe pole magnetyczne. W przypadku ekspozycji na pole magnetyczne zmienne spectrum wynosiło 10 Hz, czas trwania impulsu 1 s i przerwy 0,8 s, kształt pola sinusoidalny ze względu na jego uniwersalne zastosowanie. Czas oddziaływania pola magnetycznego wynosił każdorazowo 10 minut. Płytki umieszczano w geometrycznym środku aplikatora.

Kontrole w badaniach stanowiły komórki wyjmowane z inkubatora na czas potrzebny do ekspozycji komórek badanych, nie były one jednak poddawane działaniu pola magnetycznego ani promieniowania laserowego.

Eksperyment zrealizowano z wykorzystaniem aparatu do promieniowania laserowego PhysioGo Lite Laser z aplikatorem prysznicowym CL-1800 (R 5 x 40 mW - długość fali 660 nm i IR 4 x 400 mW - długość fali 808 nm) (ryc. 8), oraz aparatu do pola magnetycznego Physio MG827 z aplikatorem CS35, z aplikatorem płaskim CPEP (ryc. 9), wyprodukowanymi przez firmę Astar. Badania zostały przeprowadzone w okresie od września 2021 roku do czerwca 2022 roku, w Pracowni Hodowli Komórkowej Zakładu Histologii i Embriologii Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu.



Ryc. 8. PhysioGo Lite Laser z aplikatorem prysznicowym CL-1800.



Ryc. 9. Physio MG827 z aplikatorem CS35.

### **IV 3. Metody statystyczne**

Normalność rozkładu zmiennych przeprowadzono z zastosowaniem testu Shapiro-Wilka. Dla sprawdzenia istotności różnic w analizie liczby komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego oraz przeżywalności, pomiędzy grupami, zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji – jednoczynnikowa ANOVA (one-way ANOVA) z analizą post-hoc za pomocą testu Bonferroniego. Poziom istotności przyjęto na poziomie  $p < 0.05$ . Analizę statystyczną wykonano przy użyciu programu Statistica 13 (TIBCO Software Inc.)

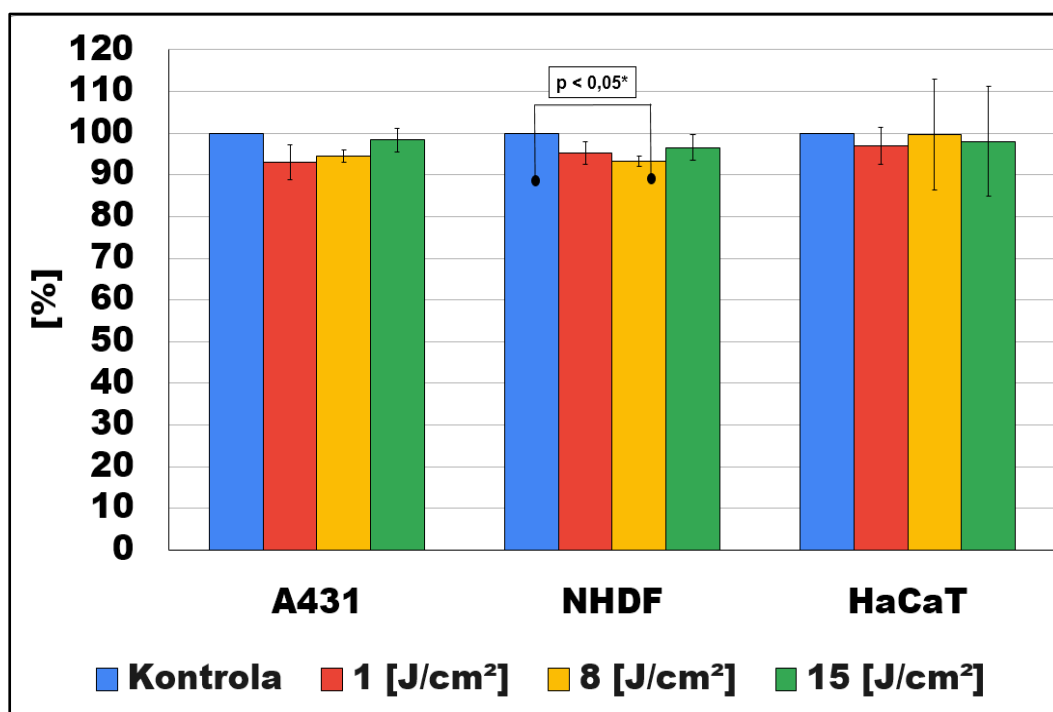
## V. WYNIKI

**V 1. Wyniki testu MTT na liniach komórkowych A431, NHDF i HaCaT po ekspozycji na wybrane czynniki fizyczne w zależności od zastosowanego dawkowania.**

**V 1.1. Wyniki testu MTT na liniach komórkowych A431, NHDF i HaCaT po ekspozycji na promieniowanie laserowe.**

Na rycinie 10 przedstawiono wyniki testu MTT przeprowadzonego po naświetlaniu laserem linii komórkowych A431, NHDF i HaCaT trzema dawkami ( $1 \text{ J/cm}^2$ ,  $8 \text{ J/cm}^2$ ,  $15 \text{ J/cm}^2$ ) w odniesieniu do grupy kontrolnej (bez naświetlania).

Wykazano istotną różnicę w przypadku naświetlania linii NHDF, gdzie przy dawce promieniowania  $8 \text{ J/cm}^2$  zaobserwowano mniejszą przeżywalność komórek w stosunku do grupy kontrolnej.

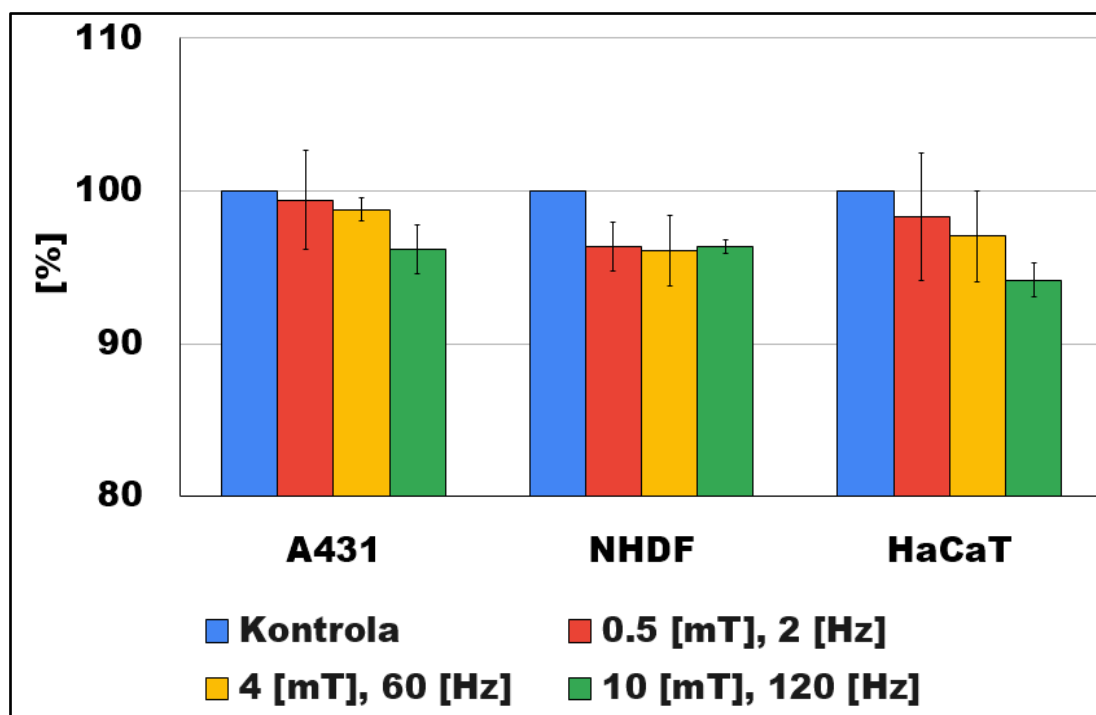


Ryc. 10. Wyniki testu MTT A431, NHDF, HaCaT po ekspozycji na promieniowanie laserowe, w zależności od dawki naświetlania.

### V 1.2. Wyniki testu MTT na liniach komórkowych A431, NHDF i HaCaT po ekspozycji na pole magnetyczne zmienne.

Na rycinie 11 przedstawiono wyniki testu MTT przeprowadzonego po ekspozycji linii komórkowych A431, NHDF i HaCaT na pole magnetyczne zmienne przy zastosowaniu trzech dawek (0,5 mT i 2 Hz; 4 mT i 60 Hz; 10 mT i 120 Hz) w odniesieniu do grupy kontrolnej (bez promieniowania).

Nie zaobserwowano istotnych różnic między badanymi grupami.

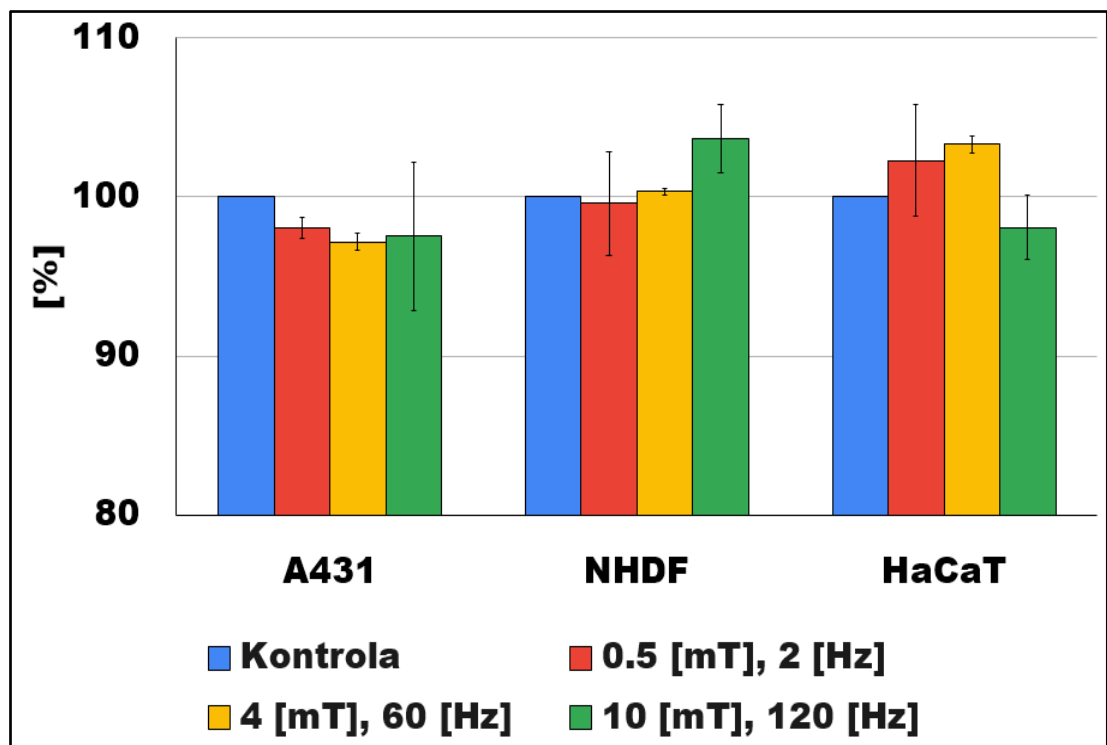


Ryc. 11. Wyniki testu MTT A431, NHDF, HaCaT po ekspozycji na pole magnetyczne zmienne, w zależności od dawki promieniowania.

### V 1.3. Wyniki testu MTT na liniach komórkowych A431, NHDF i HaCaT po ekspozycji na pole magnetyczne stałe.

Na rycinie 12 przedstawiono wyniki testu MTT przeprowadzonego po ekspozycji linii komórkowych A431, NHDF i HaCaT na pole magnetyczne stałe przy zastosowaniu trzech dawek (0,5 mT i 2 Hz; 4 mT i 60 Hz; 10 mT i 120 Hz) w odniesieniu do grupy kontrolnej (bez promieniowania).

Nie zaobserwowano istotnych różnic między badanymi grupami.



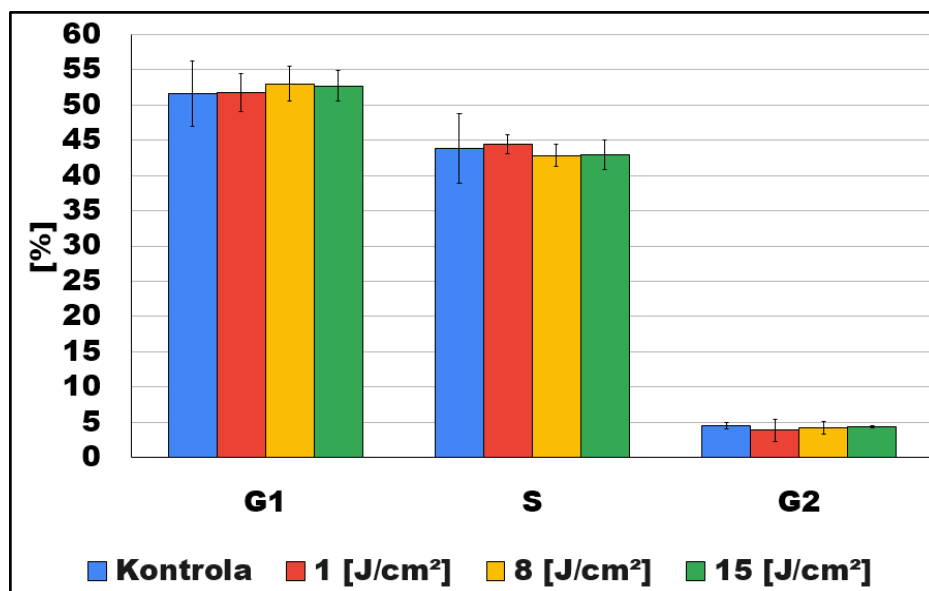
Ryc. 12. Wyniki testu MTT A431, NHDF, HaCaT po ekspozycji na pole magnetyczne stałe, w zależności od dawki promieniowania.

**V 2. Wyniki analizy cyklu komórkowego linii komórkowych A431, NHDF i HaCaT po ekspozycji na wybrane czynniki fizyczne w zależności od zastosowanego dawkowania.**

**V 2.1. Wyniki analizy cyklu komórkowego linii komórkowej A431**

**V 2.1.1. Wyniki analizy cyklu komórkowego linii komórkowej A431 po ekspozycji na promieniowanie laserowe.**

Na rycinie 13 przedstawiono wyniki analizy cyklu komórkowego przeprowadzonego po naświetlaniu laserem linii komórkowej A431 trzema dawkami ( $1 \text{ J/cm}^2$ ,  $8 \text{ J/cm}^2$ ,  $15 \text{ J/cm}^2$ ) w odniesieniu do grupy kontrolnej (bez naświetlania). Nie zaobserwowano istotnych różnic między badanymi grupami. Najwyższy odsetek komórek (powyżej 50%) we wszystkich grupach badanych oraz kontroli zaobserwowano w fazie G1, natomiast najniższy (poniżej 5%) w fazie cyklu komórkowego G2. Z kolei odsetek komórek w fazie S, w której replikowany jest materiał genetyczny wynosił blisko 45%. Wyniki analizy cyklu komórkowego wskazują, że promieniowanie laserowe nie wpłynęło na zmiany cyklu komórkowego komórek raka skóry linii A431.



Ryc. 13. Odsetek komórek linii komórkowej A431 w poszczególnych fazach cyklu komórkowego po ekspozycji na promieniowanie laserowe, w zależności od dawki naświetlania.

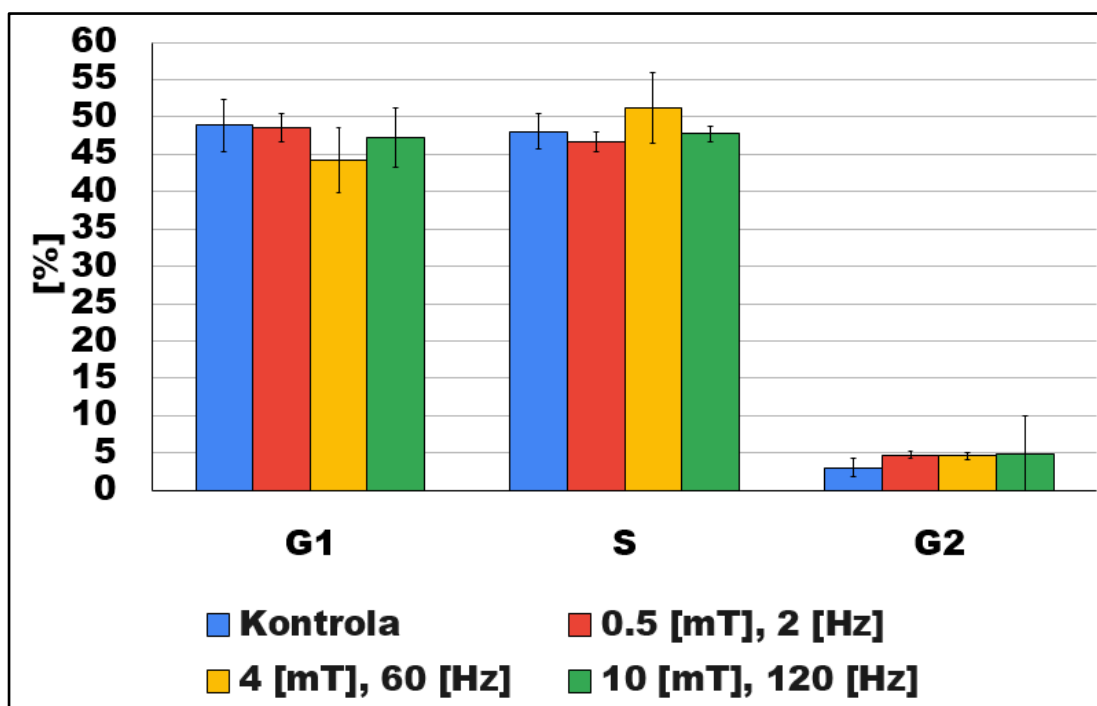


### V 2.1.2. Wyniki analizy cyklu komórkowego linii komórkowej A431 po ekspozycji na pole magnetyczne zmienne.

Na rycinie 14 przedstawiono wyniki analizy cyklu komórkowego przeprowadzonego po ekspozycji linii komórkowej A431 na pole magnetyczne zmienne przy zastosowaniu trzech dawek (0,5 mT i 2 Hz; 4 mT i 60 Hz; 10 mT i 120 Hz) w odniesieniu do grupy kontrolnej (bez promieniowania).

Nie zaobserwowano istotnych różnic między badanymi grupami.

Zaobserwowano porównywalny odsetek komórek (między 45% a 50%) we wszystkich grupach badanych oraz kontroli w fazie G1 oraz S, natomiast najniższy (poniżej 5%) w fazie cyklu komórkowego G2. Wyniki analizy cyklu komórkowego wskazują, że pole magnetyczne zmienne nie wpłynęło na zmiany cyklu komórkowego komórek raka skóry linii A431.



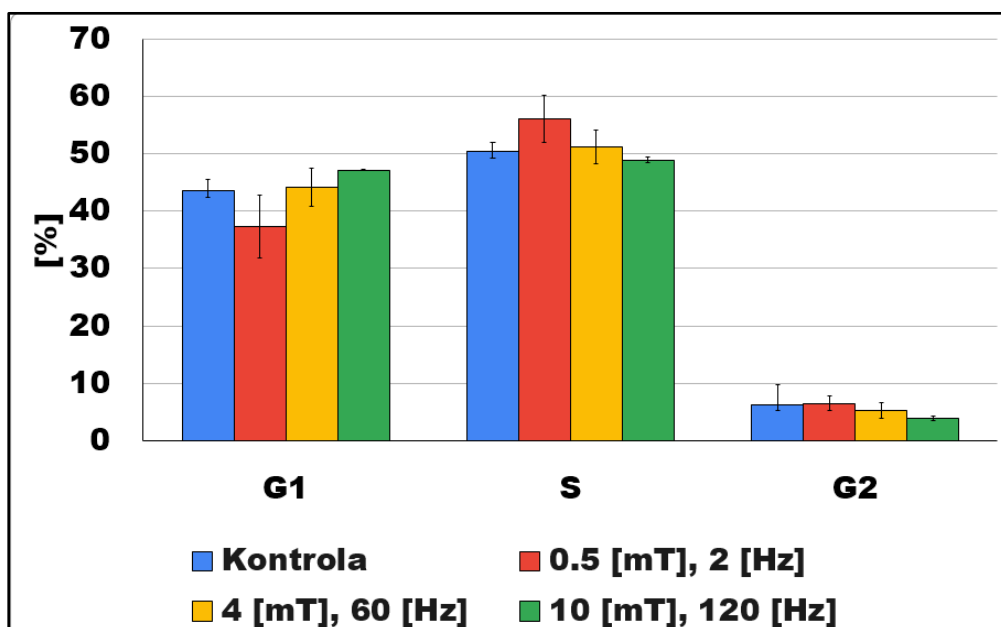
Ryc. 14. Odsetek komórek linii komórkowej A431 w poszczególnych fazach cyklu komórkowego po ekspozycji na pole magnetyczne zmienne, w zależności od dawki promieniowania.

### V 2.1.3. Wyniki analizy cyklu komórkowego linii komórkowej A431 po ekspozycji na pole magnetyczne stałe.

Na rycinie 15 przedstawiono wyniki analizy cyklu komórkowego przeprowadzonego po ekspozycji linii komórkowej A431 na pole magnetyczne stałe przy zastosowaniu trzech dawek (0,5 mT i 2 Hz; 4 mT i 60 Hz; 10 mT i 120 Hz) w odniesieniu do grupy kontrolnej (bez promieniowania).

Nie zaobserwowano istotnych różnic między badanymi grupami.

Najwyższy odsetek komórek (około 50%) we wszystkich grupach badanych oraz kontroli zaobserwowano w fazie S, w której replikowany jest materiał genetyczny. Najniższy (około 5%) w fazie cyklu komórkowego G2. Z kolei odsetek komórek w fazie G1, wynosił około 40%. Wyniki analizy cyklu komórkowego wskazują, że pole magnetyczne stałe nie wpłynęło na zmiany cyklu komórkowego komórek raka skóry linii A431.



Ryc. 15. Odsetek komórek linii komórkowej A431 w poszczególnych fazach cyklu komórkowego po ekspozycji na pole magnetyczne stałe, w zależności od dawki promieniowania.

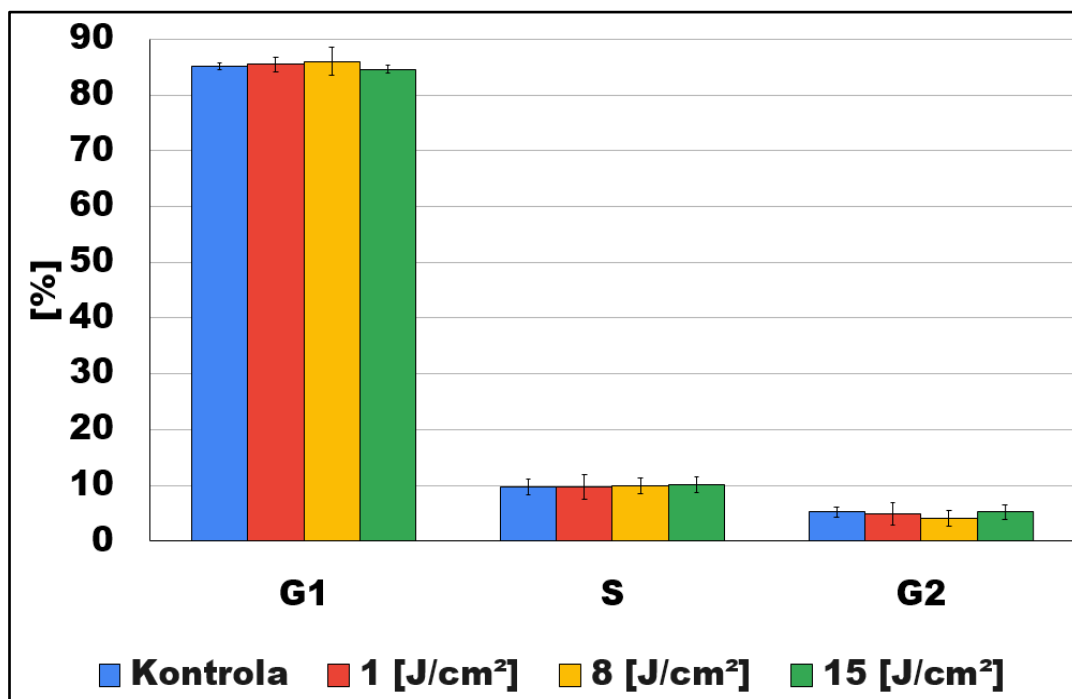
## V 2.2. Wyniki analizy cyklu komórkowego linii komórkowej NHDF.

### V 2.2.1 Wyniki analizy cyklu komórkowego linii komórkowej NHDF po ekspozycji na promieniowanie laserowe.

Na rycinie 16 przedstawiono wyniki analizy cyklu komórkowego przeprowadzonego po naświetlaniu laserem linii komórkowej NHDF trzema dawkami ( $1 \text{ J/cm}^2$ ,  $8 \text{ J/cm}^2$ ,  $15 \text{ J/cm}^2$ ) w odniesieniu do grupy kontrolnej (bez naświetlania).

Nie zaobserwowano istotnych różnic między badanymi grupami.

Najwyższy odsetek komórek (powyżej 80%) we wszystkich grupach badanych oraz kontroli zaobserwowano w fazie G1, natomiast najniższy (poniżej 5%) w fazie cyklu komórkowego G2. Z kolei odsetek komórek w fazie S, w której replikowany jest materiał genetyczny wynosił około 10%. Wyniki analizy cyklu komórkowego wskazują, że promieniowanie laserowe nie wpłynęło na zmiany cyklu komórkowego komórek skóry linii NHDF.



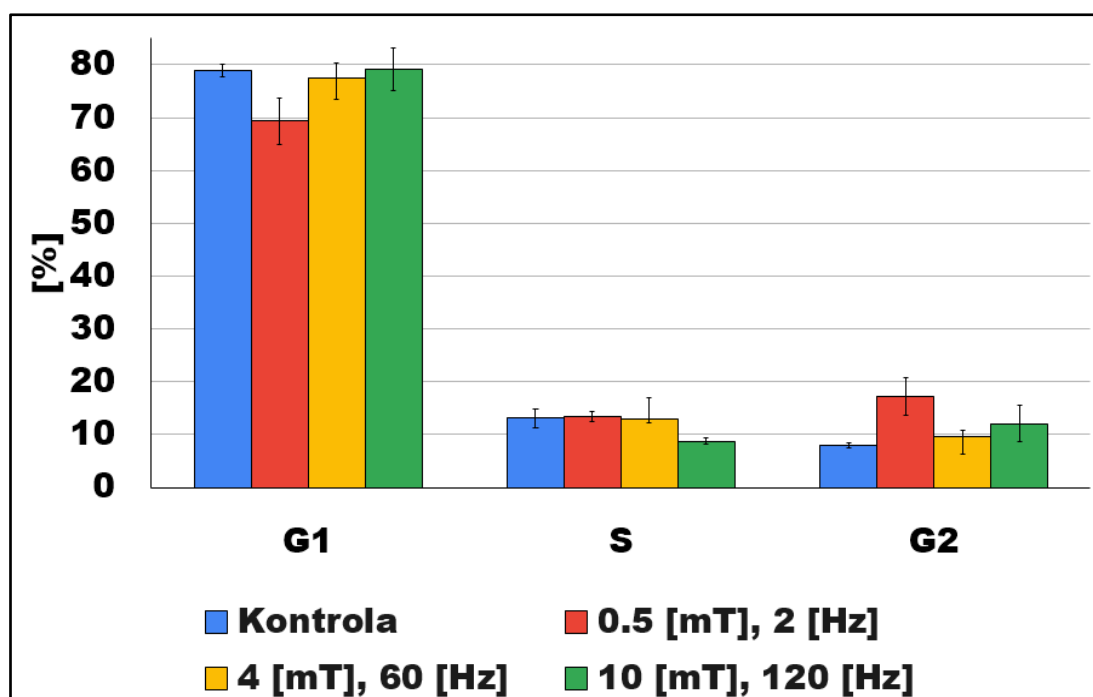
Ryc. 16. Odsetek komórek linii komórkowej NHDF w poszczególnych fazach cyklu komórkowego po ekspozycji na promieniowanie laserowe, w zależności od dawki naświetlania.

### V 2.2.2. Wyniki analizy cyklu komórkowego linii komórkowej NHDF po ekspozycji na pole magnetyczne zmienne.

Na rycinie 17 przedstawiono wyniki analizy cyklu komórkowego przeprowadzonego po ekspozycji linii komórkowej NHDF na pole magnetyczne zmienne przy zastosowaniu trzech dawek (0,5 mT i 2 Hz; 4 mT i 60 Hz; 10 mT i 120 Hz) w odniesieniu do grupy kontrolnej (bez promieniowania).

Nie zaobserwowano istotnych różnic między badanymi grupami.

Najwyższy odsetek komórek (między 70% a 80%) we wszystkich grupach badanych oraz kontroli zaobserwowano w fazie G1, natomiast w fazie cyklu komórkowego G2 wynosił on od 10% do 15%. Z kolei odsetek komórek w fazie S, w której replikowany jest materiał genetyczny wynosił około 10%. Wyniki analizy cyklu komórkowego wskazują, że pole magnetyczne zmienne nie wpłynęło na zmiany cyklu komórkowego komórek skóry linii NHDF.



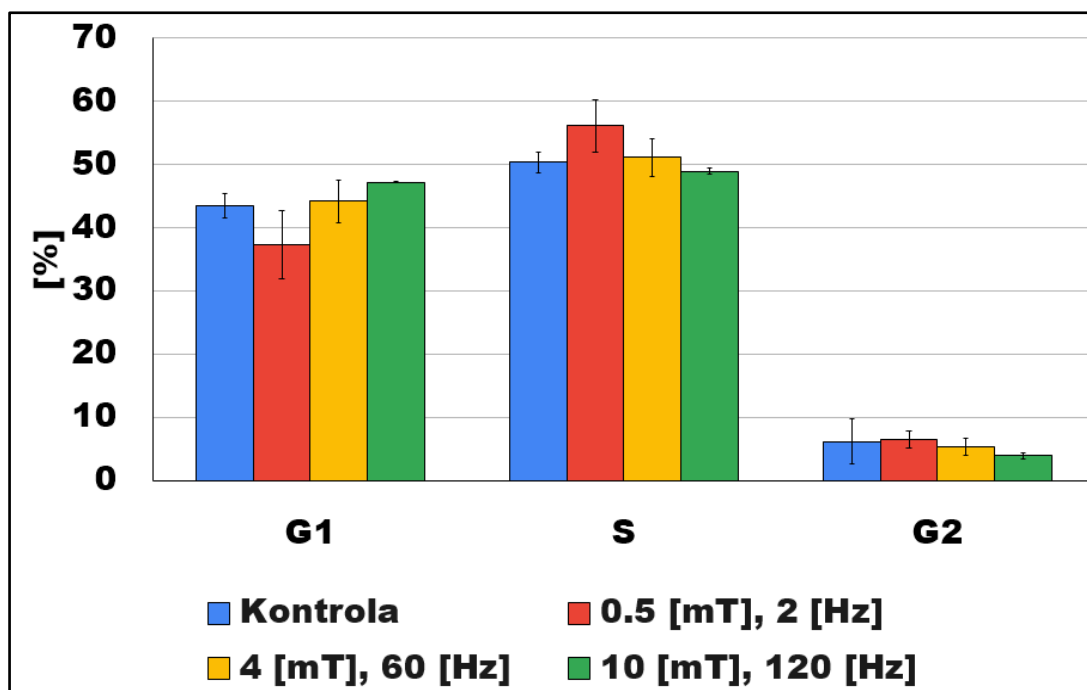
Ryc. 17. Odsetek komórek linii komórkowej NHDF w poszczególnych fazach cyklu komórkowego po ekspozycji na pole magnetyczne zmienne, w zależności od dawki promieniowania.

### V 2.2.3. Wyniki analizy cyklu komórkowego linii komórkowej NHDF po ekspozycji na pole magnetyczne stałe.

Na rycinie 18 przedstawiono wyniki analizy cyklu komórkowego przeprowadzonego po ekspozycji linii komórkowej NHDF na pole magnetyczne stałe przy zastosowaniu trzech dawek (0,5 mT i 2 Hz; 4 mT i 60 Hz; 10 mT i 120 Hz) w odniesieniu do grupy kontrolnej (bez promieniowania).

Nie zaobserwowano istotnych różnic między badanymi grupami.

We wszystkich grupach badanych oraz kontroli w fazie G1 zaobserwowano odsetek komórek w przedziale od 35% do 45%. W fazie cyklu komórkowego G2 wynosił około 5%. Z kolei odsetek komórek w fazie S, w której replikowany jest materiał genetyczny wynosił około 50%. Wyniki analizy cyklu komórkowego wskazują, że pole magnetyczne stałe nie wpłynęło na zmiany cyklu komórkowego komórek skóry linii NHDF.



Ryc. 18. Odsetek komórek linii komórkowej NHDF w poszczególnych fazach cyklu komórkowego po ekspozycji na pole magnetyczne stałe, w zależności od dawki promieniowania.

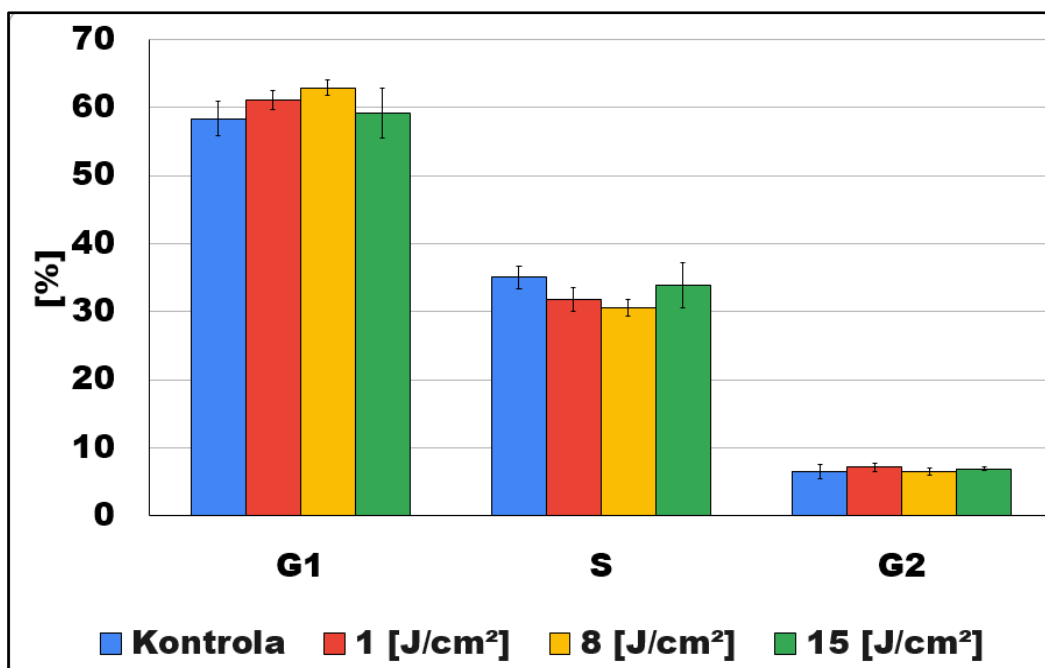
### V 2.3. Wyniki analizy cyklu komórkowego linii komórkowej HaCaT.

#### V 2.3.1. Wyniki analizy cyklu komórkowego linii komórkowej HaCaT po ekspozycji na promieniowanie laserowe.

Na rycinie 19 przedstawiono wyniki analizy cyklu komórkowego przeprowadzonego po naświetlaniu laserem linii komórkowej HaCaT trzema dawkami ( $1 \text{ J/cm}^2$ ,  $8 \text{ J/cm}^2$ ,  $15 \text{ J/cm}^2$ ) w odniesieniu do grupy kontrolnej (bez naświetlania).

Nie zaobserwowano istotnych różnic między badanymi grupami.

Najwyższy odsetek komórek (około 60%) we wszystkich grupach badanych oraz kontroli zaobserwowano w fazie G1, natomiast w fazie cyklu komórkowego G2 mieścił się poniżej 10%. Z kolei odsetek komórek w fazie S, w której replikowany jest materiał genetyczny wynosił około 30%. Wyniki analizy cyklu komórkowego wskazują, że promieniowanie laserowe nie wpłynęło na zmiany cyklu komórkowego komórek skóry linii HaCaT.



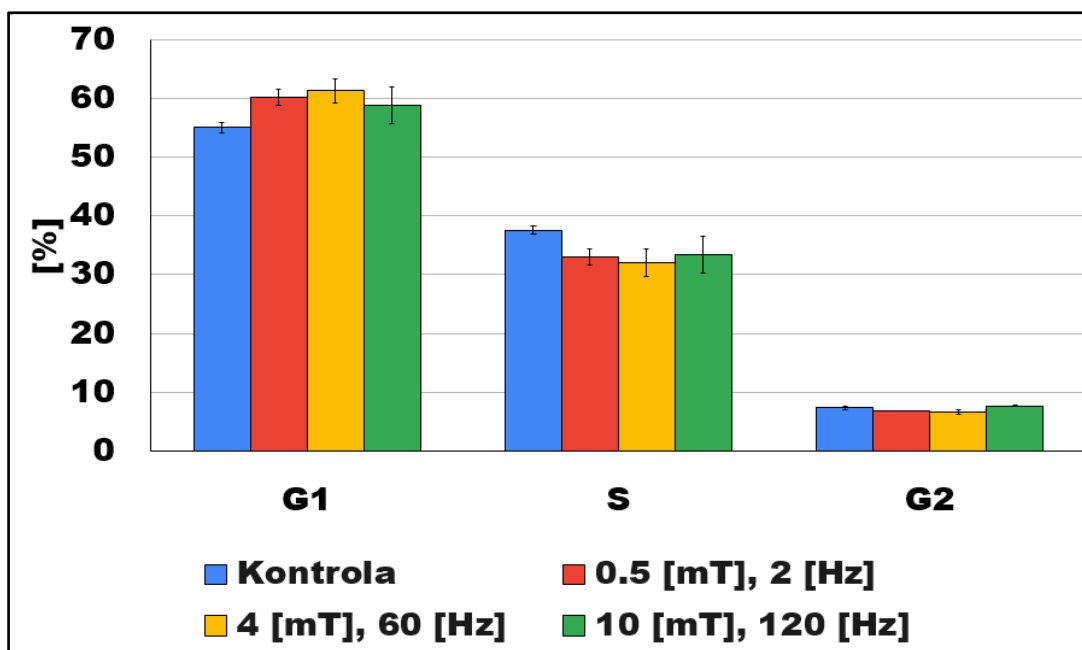
Ryc. 19. Odsetek komórek linii komórkowej HaCaT w poszczególnych fazach cyklu komórkowego po ekspozycji na promieniowanie laserowe, w zależności od dawki naświetlania.

### V 2.3.2. Wyniki analizy cyklu komórkowego linii komórkowej HaCaT po ekspozycji na pole magnetyczne zmienne.

Na rycinie 20 przedstawiono wyniki analizy cyklu komórkowego przeprowadzonego po ekspozycji linii komórkowej HaCaT na pole magnetyczne zmienne przy zastosowaniu trzech dawek (0,5 mT i 2 Hz; 4 mT i 60 Hz; 10 mT i 120 Hz) w odniesieniu do grupy kontrolnej (bez promieniowania).

Nie zaobserwowano istotnych różnic między badanymi grupami.

Najwyższy odsetek komórek (około 60%) we wszystkich grupach badanych oraz kontroli zaobserwowano w fazie G1, natomiast w fazie cyklu komórkowego G2 mieścił się poniżej 10%. Z kolei odsetek komórek w fazie S, w której replikowany jest materiał genetyczny wynosił około 30%. Wyniki analizy cyklu komórkowego wskazują, że pole magnetyczne zmienne nie wpłynęło na zmiany cyklu komórkowego komórek skóry linii HaCaT.



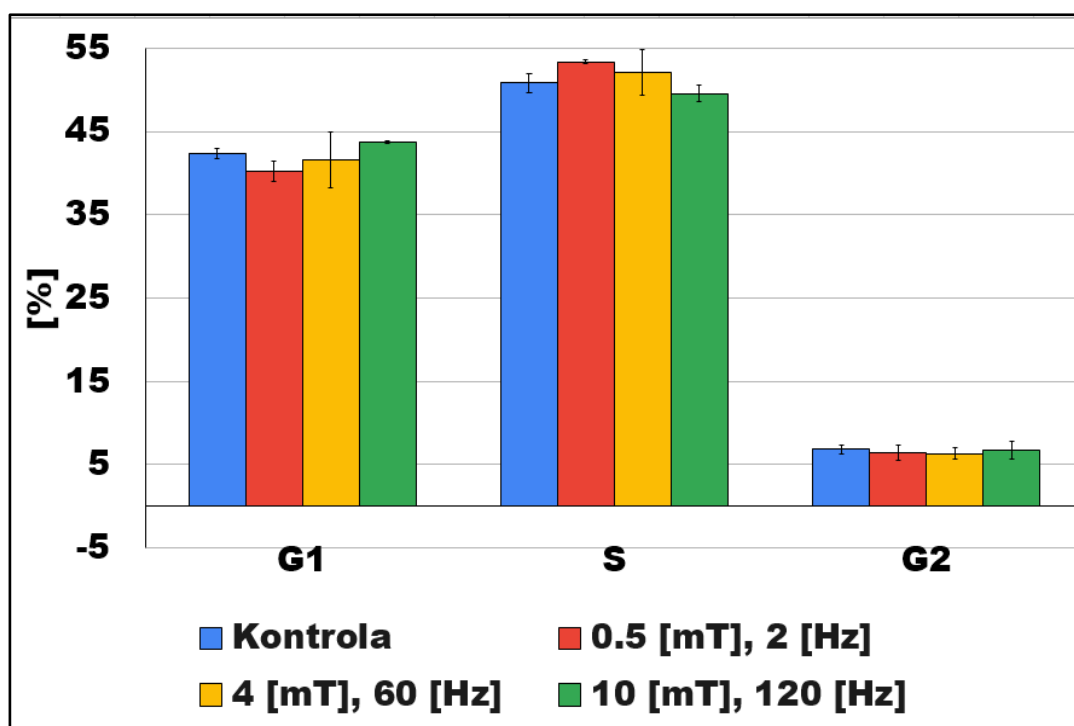
Ryc. 20. Odsetek komórek linii komórkowej HaCaT w poszczególnych fazach cyklu komórkowego po ekspozycji na pole magnetyczne zmienne, w zależności od dawki promieniowania.

### V 2.3.3. Wyniki analizy cyklu komórkowego linii komórkowej HaCaT po ekspozycji na pole magnetyczne stałe.

Na rycinie 21 przedstawiono wyniki analizy cyklu komórkowego przeprowadzonego po ekspozycji linii komórkowej HaCaT na pole magnetyczne stałe przy zastosowaniu trzech dawek (0,5 mT i 2 Hz; 4 mT i 60 Hz; 10 mT i 120 Hz) w odniesieniu do grupy kontrolnej (bez promieniowania).

Nie zaobserwowano istotnych różnic między badanymi grupami.

Najwyższy odsetek komórek w fazie S, w której replikowany jest materiał genetyczny wynosił około 50%. Odsetek komórek około 40% we wszystkich grupach badanych oraz kontroli zaobserwowano w fazie G1, natomiast w fazie cyklu komórkowego G2 wynosił około 5%. Wyniki analizy cyklu komórkowego wskazują, że pole magnetyczne stałe nie wpłynęło na zmiany cyklu komórkowego komórek skóry linii HaCaT.



Ryc. 21. Odsetek komórek linii komórkowej HaCaT w poszczególnych fazach cyklu komórkowego po ekspozycji na pole magnetyczne stałe, w zależności od dawki promieniowania.



## VI DYSKUSJA

Badania własne przedstawione w prezentowanej pracy wykazały, że ekspozycja na pole magnetyczne zmienne i stałe nie wpływa na przeżywalność oraz cykl komórkowy linii komórkowych A431, NHDF i HaCaT w modelu *in vitro*. Dotyczy to wszystkich zastosowanych w eksperymencie parametrów.

Biorąc pod uwagę powszechne zastosowanie pola magnetycznego w procesach leczniczych, stosunkowo niewiele badań naukowych podejmuje tematykę weryfikacji oddziaływania tego czynnika na komórki organizmu człowieka. Jednocześnie wartość rocznej sprzedaży urządzeń do terapii polem magnetycznym szacuje się na ponad miliard dolarów na całym świecie. Natomiast faktem jest, że wpływ pola magnetycznego na organizm człowieka nie jest rzetelnie sprawdzony naukowo. Istnieje wiele doniesień zwracających uwagę na to, że dawkowanie, wskazania, przeciwwskazania oraz efekty stosowania pola magnetycznego są formułowane na wątpliwych podstawach (Valentinuzzi, 2008).

Istnieją doniesienia sugerujące, że pole magnetyczne jest bezpieczne dla tkanek prawidłowych i nieprawidłowych, a dodatkowo potencjalnie może być stosowane jako terapia przeciwnowotworowa (Vadalà i wsp. 2016). Wymaga to jednak dalszych badań klinicznych, w celu precyzyjnego określenia mechanizmów działania. Z przeprowadzonych przeglądów dostępnej literatury odnoszącej się do możliwości potencjalnego wykorzystania pola magnetycznego w onkologii, zarówno u zwierząt jak i ludzi, wynika, że przy stosowaniu różnego dawkowania, pole magnetyczne hamuje rozwój komórek nowotworowych. Tłumaczy się to modulacją ekspresji genów i syntezy białek oraz hamowaniem angiogenezy w tkankach nowotworowych (Tatarov i wsp. 2011, Mayrovitz i wsp. 2022). Potwierdzeniem tej hipotezy mogą być wyniki uzyskane w doświadczeniu *in vivo* przeprowadzonych na modelu mysim. Myszom zostały zaszczerpione komórki nowotworowe raka gruczołu piersiowego, po czym podzielono je na cztery grupy. Trzy grupy, przez cztery tygodnie, wystawiano na ekspozycję pola magnetycznego. Różniły się one czasem ekspozycji. Czwarta grupa - kontrolna nie była poddawana promieniowaniu. Wyniki eksperymentu pokazały, że u myszy w grupie kontrolnej odnotowano największy rozrost nowotworu, a w przypadku grupy badanej poddanej ekspozycji na pole magnetyczne najdłużej

wykazano jego zmniejszenie się (Tatarov i wsp. 2011). Wyniki badań własnych zdają się potwierdzać, że pole magnetyczne w zakresie dawek terapeutycznych jest bezpieczne w aspekcie bezpośredniego oddziaływania na komórki prawidłowe i nowotworowe, bowiem nie powoduje zmian proliferacji i przeżywalności komórek. W przeprowadzonych przez Afinogenov badaniach odnotowano korzystny wpływ pola magnetycznego na fibroblasty z ludzkich płuc. Komórki te poddawano oddziaływaniu pola magnetycznego przez czas dwóch godzin, stosując częstotliwość 50 Hz i indukcję o wartości 0,1 mT. Wykazały one wzmożoną aktywność proliferacji i jednocześnie zmniejszenie liczby martwych komórek (Afinogenov i wsp. 2009). Ponadto weryfikowano wpływ pola magnetycznego na mysie fibroblasty (Balb/3T3). Były one poddawane ekspozycji na pole magnetyczne zmienne w sześciu grupach o różnych dawkach i porównywane do kontroli. Przy zastosowaniu różnych parametrów pola magnetycznego, komórki były poddane jednokrotnej lub dwukrotnej magnetostymulacji. Te poddawane dwukrotnej były eksponowane na pole magnetyczne co godzinę, trzy razy dziennie. Eksperyment przeprowadzano od trzech do pięciu razy, w ciągu dwóch dni. Wykazano wzrost przeżywalności komórek w przeciwieństwie do uzyskanych wyników w badaniach własnych, gdzie nie odnotowano znaczących zmian w tym zakresie. (Rusak i Rybak, 2013)

W celu weryfikacji wpływu pola magnetycznego na proliferację ludzkich naskórkowych komórek macierzystych przeprowadzono badania, w których komórki te poddano przez 30 minut dziennie ekspozycji na działanie pola magnetycznego o wartości indukcji 5 mT przy częstotliwościach: 1, 10, i 50 Hz przez 3, 5 lub 7 dni. Najwyższy wskaźnik proliferacji komórek wykazano przy zastosowaniu częstotliwości 50 Hz. Ekspozycja na pole magnetyczne o niskiej częstotliwości znacząco zwiększyła odsetek komórek w fazie S cyklu komórkowego, w połączeniu ze spadkiem liczby komórek w fazie G1, ale efekt ten nie był zależny od częstotliwości (Zhang i wsp. 2012). Badania własne nie wykazały analogicznych, istotnych zmian proliferacji komórek A431, HaCaT i NHDF w fazie S i G1. Różnica ta może wynikać m.in. z odmienności zastosowanych parametrów oraz rodzaju linii komórkowych poddanych ekspozycji.

Z kolei w badaniu przeprowadzonym przez Pasi i współpracowników zweryfikowano biologiczne skutki półtoragodzinnej ekspozycji ludzkich fibroblastów skóry na pole magnetyczne o częstotliwości 5 Hz i wartościach indukcji: 0.25 mT, 0.5 mT i 0.8 mT oraz częstotliwości 50 Hz i wartościach indukcji: 0.5 mT, 0.8 mT oraz 1.6 mT. Wykazano, że ekspozycja na pole magnetyczne nie spowodowała zmian w przeżywalności komórek ludzkich fibroblastów, ale spowodowała znaczny spadek proliferacji po 24 godzinach niezależnie od zastosowanych parametrów (Pasi i wsp. 2016). Podobny brak zmian w przeżywalności komórek na ekspozycje pola magnetycznego wykazały również przeprowadzone badania własne. Należy jednak nadmienić, że wyżej opisane eksperymenty zostały wykonane na odmiennych liniach komórkowych, przy zastosowaniu innego dawkowania niż te w badaniach własnych.

Interesującym aspektem jest zróżnicowanie stosowanych parametrów pola magnetycznego pomiędzy przeprowadzonymi eksperymentami, jednocześnie znacznie różniących się od tych stosowanych w praktyce terapeutycznej, co z kolei zostało zastosowane w badaniach własnych. Wydaje się, że duży wpływ na zróżnicowanie efektów stosowania pola magnetycznego ma czas oddziaływania na materiał badany oraz modulowanie pozostałych parametrów. Również ważnym aspektem, który utrudnia porównywanie przeprowadzanych badań, a co za tym idzie, jednoznaczne określenie wpływu pola magnetycznego na organizm człowieka jest brak rozgraniczania pola magnetycznego zmiennego i stałego, rozróżniania magnetoterapii i magnetostymulacji oraz precyzyjnej specyfikacji używanych urządzeń. Zauważalny jest równocześnie deficyt badań jednoznacznie weryfikujących mechanizmy działania pola magnetycznego na organizm człowieka oraz określających w sposób jednoznaczny wytyczne do jego stosowania. Szczególnie istotne jest poznanie mechanizmów działania pola magnetycznego na poziomie komórkowym, co może stanowić punkt wyjścia do rozważań dotyczących jego działania w tkankach i w całym organizmie. Przeprowadzony w prezentowanej pracy eksperyment zdaje się być potwierdzeniem potrzeby weryfikacji standardów dawkowania i zaleceń do jego stosowania. Dalsze badania wydają się konieczne dla oceny skuteczności i bezpieczeństwa wykorzystania tej metody w fizjoterapii. Ważnym jest jednocześnie badanie wpływu pola magnetycznego zarówno na linie komórkowe prawidłowe jak

i nowotworowe ze względu na ich potencjalne odmienne reakcje na czynniki zewnętrzne.

Badania własne wykazały także, podobnie jak miało to miejsce po ekspozycji na pole magnetyczne, że również promieniowanie laserowe nie wpływa na przeżywalność oraz cykl komórkowy linii komórkowych A431, NHDF i HaCaT w modelu *in vitro*. Dotyczy to wszystkich zastosowanych parametrów w eksperymencie. Biorąc pod uwagę powszechne zastosowanie lasera w procesach leczniczych, stosunkowo niewiele badań naukowych podejmuje tematykę weryfikacji oddziaływania tego czynnika na komórki organizmu człowieka. Naukowcy podejmujący tę tematykę wiele lat temu doszli do wniosków wskazujących, że stymulacja proliferacji komórek zależy od dawki promieniowania laserowego, gdzie niższe dawki zwiększają szybkość proliferacji komórek i inne funkcje komórkowe, podczas gdy wyższe dawki zmniejszają je (Karu, 1990).

Z analizy dostępnych badań naukowych nad wpływem promieniowania laserowego na różnego typu komórki wnioskuje się, że w zakresie od 0,5 do 4,0 J/cm<sup>2</sup> i widmie od 600 do 700 nm zwiększa ono proliferację różnych linii komórkowych ludzkich i zwierzęcych (AlGhamdi i wsp. 2012). Tłumaczone jest to wpływem promieniowania laserowego na DNA i RNA, syntezę i produkcję kolagenu, a ponadto na mitozę w hodowanych komórkach (Lovschall i Renholt-Bindslev, 1994). LLLT stymuluje receptory obecne na błonach mitochondrialnych i komórkowych do przekształcania energii świetlnej w energię chemiczną w postaci ATP w komórce, która wzmacnia funkcje komórkowe i tempo proliferacji. Według AlGhamdi i współautorów LLLT ma wpływ na proliferację kultur komórkowych w zależności od gęstości zastosowanej energii, średnicy wiązki lub obszaru napromieniowanego, typu lasera oraz typu komórek. Istnieją raporty wskazujące, że promieniowanie laserowe powoduje wzrost proliferacji w hodowlach komórek, podczas gdy inne donoszą o odwrotnych skutkach (AlGhamdi i wsp. 2012). Wyniki badań własnych natomiast wykazały, że promieniowanie laserowe nie wpływa na przeżywalność i proliferację komórek w hodowli *in vitro*.

Przykładem badań dotyczących wpływu promieniowania laserowego na komórki mięśniowe myszy jest eksperyment Ferraresiego i współautorów. Celem

tego badania było zbadanie potencjału błony mitochondrialnej i syntezy ATP komórek mięśniowych myszy poddanych ekspozycji na promieniowanie laserowe. Komórki były poddawane ekspozycji na promieniowanie laserowe o następujących parametrach: 20 diod LED ze światłem czerwonym ( $630 \pm 10$  nm, 25 mW) i 20 diod z podczerwienią ( $850 \pm 10$  nm, 50 mW) o mocy  $2,5 \text{ J/cm}^2$ . Czas ekspozycji wynosił 90 sekund. Analizę przeprowadzano po 5 minutach oraz 3, 6 i 24 godzinach od momentu ekspozycji na komórki. Wyniki wykazały największy potencjał błony mitochondrialnej i największą intensywność syntezy ATP 6 godzin po aplikacji promieniowania, a następnie w kolejności 3 i 24 godziny oraz 5 minut po napromieniowaniu. Na tej podstawie autorzy eksperymentu doszli do wniosku, że optymalne okno czasowe dla stymulacji komórek mięśniowych promieniowaniem laserowym wynosi 3–6 godzin (Ferraresi i wsp. 2015). Badania własne wskazują natomiast, że promieniowanie laserowe w dawkach terapeutycznych nie oddziałuje bezpośrednio na proliferację komórek NHDF, HaCaT i A431, co nie potwierdza przedstawionej hipotezy.

Do odmiennych wniosków doszli badacze wpływu promieniowania laserowego na komórki z ludzkich złuszczonego zębów mlecznych. Oddziaływaniu promieniowania było poddawane komórki podzielone na pięć grup. Grupy różniły się zastosowanymi dawkami promieniowania laserowego. Reakcje komórek we wszystkich grupach były porównywane z grupą kontrolną, która nie była poddana ekspozycji na promieniowanie. Zastosowano następujące dawkowanie:  $1.2 \text{ J/cm}^2 - 0.5 \text{ mW} - 10 \text{ s}$ ;  $2.5 \text{ J/cm}^2 - 10 \text{ mW} - 10 \text{ s}$ ;  $3.7 \text{ J/cm}^2 - 15 \text{ mW} - 10 \text{ s}$ ;  $5.0 \text{ J/cm}^2 - 20 \text{ mW} - 10 \text{ s}$ ;  $6.2 \text{ J/cm}^2 - 25 \text{ mW} - 10 \text{ s}$ .

Wyniki pokazały, że dawki promieniowania laserowego, stosowane w tym badaniu, nie powodowały spadku przeżywalności komórek zębów ludzkich, a co więcej stymulowały ich proliferację w grupach poddanych ekspozycji (Fernandes i wsp. 2016). Podobnych zmian nie wykazały natomiast prezentowane w pracy badania własne. Różnica ta może wynikać m.in. z odmienności zastosowanych parametrów oraz rodzaju linii komórkowych poddanych ekspozycji.

Ważnym aspektem rozważań dotyczących wpływu promieniowania laserowego na organizm ludzki jest możliwość jego stosowania u chorych onkologicznie.

W dostępnej literaturze można znaleźć przeglądy badań naukowych wskazujące na skuteczność stosowania promieniowania laserowego w leczeniu obrzęków limfatycznych powstałych w wyniku chorób nowotworowych (Baxter i wsp. 2017; Farhan i wsp. 2023; Yilmaz i wsp. 2023). Pomimo badań wskazujących na możliwości wykorzystania promieniowania laserowego w terapii u pacjentów z chorobami nowotworowymi poprzez wykorzystanie nasilenia apoptozy w komórkach nowotworowych, przy jednoczesnym korzystnym wpływie na komórki prawidłowe, to jego zastosowanie nadal wzbudza wątpliwości w aspekcie bezpieczeństwa (Van Coevorden, 2009). W badaniach własnych nie stwierdzono jakichkolwiek reakcji komórek prawidłowych jak i nowotworowych na promieniowanie laserowe w proliferacji i przeżywalności. Daje to przesłanki do potencjalnej możliwości stosowania zabiegów z użyciem promieniowania laserowego u chorych onkologicznie, co obecnie nie jest zalecane, przy czym otrzymane w badaniach wyniki mają charakter badań wstępnych i wymagają kontynuacji w celu doprecyzowania bezpiecznego poziomu ekspozycji na wymienione czynniki fizyczne pacjentów onkologicznych. Sytuacja ta stanowi problem zarówno dla lekarzy jak i terapeutów, którzy nie mają jednoznacznych wytycznych dotyczących zlecenia tego typu zabiegów u pacjentów onkologicznych.

Do podobnych wniosków doszli badacze analizujący, dostępne dane literaturowe, gdzie różnorodność stosowanych dawek w różnych eksperymentach wykluczała możliwość uzyskania wiedzy pozwalającej na jednoznaczną ocenę wpływu promieniowania laserowego na procesy zachodzące w komórkach. Autorzy prowadzonych w tym kierunku badań zwracają uwagę na to, że niezbędne jest zweryfikowanie właściwego doboru dawek w celu uzasadnionego naukowo stosowania promieniowania laserowego do działania przeciwzapalnego, biostymulacyjnego lub redukującego dolegliwości bólowe (Taylor i wsp. 2020).

Istnieją również opinie zwracające uwagę na to, że pomimo stosowania promieniowania laserowego w praktyce klinicznej przez dziesięciolecia, mechanizmy jego oddziaływania są nadal wątpliwe. Brak jest standardowych protokołów opartych na rzetelnych badaniach naukowych. Mimo to nadal wskazywana jest potencjalna zdolność LLLT do indukowania produkcji czynnika wzrostu, hamowania stanu

zapalnego, stymulacji angiogenezy i bezpośredniego wpływu na komórki, co sugeruje pilną potrzebę dokładnej analizy oraz poznania mechanizmów zachodzących pod wpływem promieniowania laserowego na poziomie komórkowym w przypadku komórek macierzystych (Lin i wsp. 2010). We wszystkich wyżej wymienionych badaniach poddawane analizie parametry stosowanych czynników różnią się i wykazują często odmienne rezultaty w porównaniu do wyników uzyskanych w badaniach własnych. Otrzymane wyniki wskazują na potrzebę dalszego analizowania problemu badawczego dotyczącego promieniowanie laserowego na poziomie komórkowym.

Prezentowane w pracy badania własne pozwalają stwierdzić, że zastosowanie lasera, pola magnetycznego zmiennego i stałego w dawkach terapeutycznych nie oddziałuje na przeżywalność oraz cykl komórkowy komórek linii A431, NHDF, HaCaT w hodowli *in vitro*. Na tej podstawie można wnioskować, że są to zabiegi bezpieczne w aspekcie bezpośredniego i miejscowego oddziaływania na komórki prawidłowe i nowotworowe w zakresie zaaplikowanych w eksperymencie parametrów i rodzaju badanych komórek. Jednak uzyskane wyniki, jednocześnie nie wyjaśniają wystarczająco mechanizmów oddziaływania lasera i pola magnetycznego na organizm człowieka, poddając w wątpliwość powszechnie przyjęte opinie, wskazujące na ich oddziaływanie na zmiany w cyklu komórkowym, np. poprzez wpływ na replikację DNA czy mRNA. Należy jednak pamiętać, że prezentowany w pracy eksperyment był przeprowadzony w warunkach *in vitro*, które różnią się od tych występujących w żywym organizmie. Do weryfikacji hipotezy dotyczącej bezpieczeństwa stosowania w fizjoterapii pola magnetycznego i promieniowania laserowego szczególnie u pacjentów z chorobą nowotworową, należy w pierwszej kolejności wyjaśnić mechanizmy ich działania na komórki, tkanki, narządy i w konsekwencji na cały organizm, co wymaga prowadzenia dalszych badań w tym zakresie. Należy także wziąć pod uwagę fakt, że u części pacjentów poddanych fizykoterapii mogą występować niezdiagnozowane zmiany nowotworowe np. w obrębie skóry. W związku z tym badania te należałoby rozszerzać i brać pod uwagę różnego rodzaju linie komórkowe.

## VII WNIOSKI

1. Promieniowanie laserowe w zakresie dawek terapeutycznych nie wpływa na przeżywalność prawidłowych i nowotworowych komórek skóry w warunkach *in vitro*.
2. Promieniowanie laserowe w zakresie dawek terapeutycznych nie wpływa na proliferację prawidłowych i nowotworowych komórek skóry w warunkach *in vitro*.
3. Stałe i zmienne pole magnetyczne w zakresie dawek terapeutycznych nie wpływa na przeżywalność prawidłowych i nowotworowych komórek skóry w warunkach *in vitro*.
4. Stałe i zmienne pole magnetyczne w zakresie dawek terapeutycznych nie wpływa na proliferację prawidłowych i nowotworowych komórek skóry w warunkach *in vitro*.

Przeprowadzone badania pokazały, że ekspozycja na stałe oraz zmienne pole magnetyczne, a także promieniowanie laserowe w zakresie dawek terapeutycznych nie wpływa na proliferację oraz zmiany w cyklu komórkowym ludzkich komórek raka skóry (A431), a także prawidłowych komórek skóry keratynocytów (HaCaT) oraz fibroblastów (NHDF). Na podstawie przeprowadzonych badań wysnuć należy wnioski, że ekspozycja na ww. czynniki fizykalne może przynosić pozytywne stymulacje prozdrowotne u pacjentów na drodze innych mechanizmów molekularnych, niż zmiany badane w niniejszej pracy. Dodatkowo, otrzymane wyniki mogą sugerować także, że terapia fizykalna jest stosunkowo bezpieczna dla pacjentów, ponieważ nie stymuluje miejscowo komórek skóry do niekontrolowanych podziałów, co mogłoby być początkiem indukowania procesu kancerogenezy. Z drugiej strony, wyniki badań zaprezentowanych w niniejszej monografii mają charakter wstępny, i należy zaznaczyć, że na ich podstawie nie można potwierdzić bezpieczeństwa stosowania terapii fizykalnych u pacjentów onkologicznych.

Kontynuacja i rozszerzenie badań dotyczących wpływu promieniowania laserowego oraz pola magnetycznego na komórki zdrowe i nieprawidłowe jest niezbędne w celu ustalenia ewentualnych przeciwwskazań do ich stosowania.



## VIII PIŚMIENNICTWO

1. Afinogenov G, Afinogenova A, Kalinin A. Influence of constant, alternating and cyclotron low-intensity electromagnetic fields on fibroblast proliferative activity *in vitro*. *GMS Krankenhaushygiene Interdisziplinär* 2009; 4(2): 1-4.
2. AlGhamdi KM, Kumar A, Moussa NA. Low-level laser therapy. A useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. *Lasers in Medical Science* 2012, 27(1): 237–249.
3. Arabloo J, Hamouzadeh P, Eftekharizadeh F, Mobinizadeh M, Olyaeemanesh A, Nejati M, Doaee S. Health technology assessment of magnet therapy for relieving pain. *Medical Journal of the Islamic Republic of Iran* 2017, 31(1): 184–188.
4. Avancini A, Pala V, Trestini I, Tregnago D, Mariani L, Sieri S, Krogh V, Boresta M, Milella M, Pilotto S, Lanza M. Exercise levels and preferences in cancer patients: A cross-sectional study. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2020, 17(15): 1–22.
5. Avci P, Gupta A, Sadasivam M, Vecchio D, Pam Z, Pam N, Hamblin MR. Low-level laser (light) therapy (LLLT) in skin: stimulating, healing, restoring. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery* 2013, 32(1): 41–52.
6. Baxter GD, Liu L, Petrich S, Gisselman AS, Chapple C, Anders JJ, Tumilty S. Low level laser therapy (Photobiomodulation therapy) for breast cancer-related lymphedema: a systematic review. *BMC cancer* 2017, 17(1): 833-846.
7. Bolekova V, Nanistova E, Chlebcova V. Wybrane wskaźniki i przeżycia depresyjnego i lęku u osób, które przeżyły nowotwór (cancer survivors). *Studia Mazowieckie* 2023, 18(1): 11–27.
8. Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. Normal Keratinization in a Spontaneously Immortalized Aneuploid Human Keratinocyte Cell Line. *The Journal of Cell Biology* 1988, (106): 761-771.
9. Bugajski M, Krukowska J, Czernicki J. Biostymulacyjne promieniowanie laserowe i możliwości jego zastosowania w fizjoterapii. *Przegląd Medyczny*

- Uniwersytetu Rzeszowskiego i Narodowego Instytutu Leków w Warszawie 2010, (3): 343-348.
10. Caetano KS, Frade MAC, Minatel DG, Santana LÁ, Enwemeka CS. Phototherapy improves healing of chronic venous ulcers. *Photomedicine and Laser Surgery* 2009, 27(1): 111–118.
  11. Cury V, Moretti AIS, Assi L, Bossini P, De Souza Crusca J, Neto CB, Fangel R, De Souza HP, Hamblin MR, Parizotto NA. Low level laser therapy increases angiogenesis in a model of ischemic skin flap in rats mediated by VEGF, HIF-1 $\alpha$  and MMP-2. *Journal of Photochemistry and Photobiology* 2013, (125): 164–170.
  12. Drake M T. Osteoporosis and cancer. *Current Osteoporosis Reports* 2013, 11(3): 163–170.
  13. Fabijańska-Mitek J, Stachurska A. Zastosowanie cytometrii przepływowej w badaniach immunohematologicznych krwinek czerwonych. *Acta Haematologica Polonica* 2017, 48(3): 183–188).
  14. Fallon M, Giusti R, Aielli F, Hoskin P, Rolke R, Sharma M, Ripamonti CI. (Management of cancer pain in adult patients: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Annals of Oncology* 2018, (29): 166–191.
  15. Farhan F, Same, M, Abdshah A, Kazemian A, Shahriarian S, Amouzegar-Hashemi F, Farzin M, Ghalehtaki R, Jafari F, Cuccia F. Investigation of the effect of Low-Level Laser Therapy on arm lymphedema in breast cancer patients: A noninvasive treatment for an intractable morbidity. *Health Science Reports* 2023, 6(5): 1-9.
  16. Farivar S, Malekshahabi T, Shiari R. Biological Effects of Low Level Laser Therapy. *Journal of Lasers in Medical Sciences* 2014, 5(2): 58-62.
  17. Fernandes AP, Junqueira MDA, Marques NCT, Machado MAAM, Santos CF, Oliveira TM, Sakai VT. Effects of low-level laser therapy on stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Journal of Applied Oral Science* 2016, 24(4): 332–337.
  18. Ferraresi C, Kaippert B, Avci P, Huang YY, De Sousa MVP, Bagnato VS, Parizotto NA, Hamblin MR. Low-level laser (light) therapy increases

- mitochondrial membrane potential and ATP synthesis in C2C12 myotubes with a peak response at 3-6 h. *Photochemistry and Photobiology* 2015, 91(2): 411–416.
19. Forte P, Branquinho L, Ferraz R. The Relationships between Physical Activity, Exercise, and Sport on the Immune System. W *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2022, 19(11) :1-6.
  20. Ginani F, Soares DM, Barreto MPV, Barboza CAG. Effect of low-level laser therapy on mesenchymal stem cell proliferation: a systematic review. W *Lasers in Medical Science* 2015, 30(8): 2189–2194.
  21. Glinka M, Gawron S, Sieroń A, Pawłowska-Góral K, Cieślak G, Sieroń K. Impact of Static Magnetic Field on the Antioxidant Defence System of Mice Fibroblasts. *BioMed Research International* 2018, ID: 5053608.
  22. Goodwin PJ, Bruera E, Stockler M. Pain in patients with cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2014, 32(16): 1637–1639.
  23. Gworys K, Teske D, Gworys P, Puzder A, Adamczewski T, Kujawa J. Wpływ magnetoterapii stosowanej w leczeniu zespołów bólowych kręgosłupa lędźwiowego na ciśnienie tętnicze krwi u pacjentów z oraz bez nadciśnienia tętniczego. *Przegląd Medyczny Uniwersytetu Rzeszowskiego i Narodowego Instytutu Leków w Warszawie Rzeszów* 2014, 1: 74–83
  24. Hamblin MR, Demidova TN. Mechanisms of low level light therapy. *The International Society for Optical Engineering* 2006, 6140: 614001-1-614001-12.
  25. Henry SL, Concannon MJ, Yee GJ. The Effect of Magnetic Fields on Wound Healing. *Experimental Study and Review of the Literature. Journal of Plastic Surgery* 2008, 8: 393-399
  26. Hossein-Khannazer N, Arki MK, Keramatnia A, Rezaei-Tavirani M. Low-Level Laser Therapy for Rheumatoid Arthritis: A Review of Experimental Approaches. W *Journal of Lasers in Medical Sciences* 2022, 13: 1-7.
  27. Huang YY, Chen ACH, Carroll JD, Hamblin MR. Biphasic dose response in low level light therapy. *Dose-Response* 2009, 7(4): 358–383.

28. Hussein AJ, Alfars AA, Falih MAJ, Hassan ANA. Effects of a low level laser on the acceleration of wound healing in rabbits. *North American Journal of Medical Sciences* 2011, 3(4): 193–197.
29. Jing Z, Wang X, Zhang P, Huang J, Jia Y, Zhang J, Wu H, Sun X. Effects of physical activity on lung function and quality of life in asthmatic children: An updated systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Pediatrics* 2023, 11: 1-13
30. Kalinowski P, Krawulska A. Rola fizjoterapii po mastektomii w opinii pacjentek. *Medycyna Ogólna i Nauki o Zdrowiu* 2012, 18(4): 291-296.
31. Karu TI. Effects of visible radiation on cultured cells. *Photochemistry and Photobiology* 1990, 52(6): 1089–1098.
32. Krylov VV, Osipova EA. Molecular Biological Effects of Weak Low-Frequency Magnetic Fields: Frequency–Amplitude Efficiency Windows and Possible Mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences* 2023, 24(13): 1-14.
33. Krzysztoń-Russjan J, Książek I, Anuszevska E. Porównanie użyteczności testów MTT i EZ4U stosowanych do oceny cytotoksyczności ksenobiotyków. *Farm Pol* 2009, 65(6): 395-402.
34. Kuryliszyn-Moskal A, Kita J, Dakowicz A, Klimiu, P, Kowal-Bielecka O. Ocena skuteczności biostymulacji laserowej oraz impulsowego pola magnetycznego niskiej częstotliwości w leczeniu zaburzeń mikrokrążenia u pacjentów z objawem Raynauda. *Reumatologia* 2012, 50(5): 410–415.
35. Kwolek A, Zwolińska J, Weres A. Wpływ dawki terapeutycznej na skuteczność laseroterapii nisko- i wysokoenergetycznej (HILT). The influence of the therapeutic dose on the efficacy of the low and High Intensity Laser Therapy (HILT). *Acta Bio-Optica et Informatica Medica* 2011, 17 (3): 171-178.
36. Liao J, Wang S, Zhou B, Liang W, Ma P, Lin M, Lin W, Li C, Zhang X, Li H, Cui Y., Hu J, Qin Y, Deng Y, Fu A, Zhu T, Zhang S, Qu Y, Xing L, Pan J. Efficacy and Safety of Pulse Magnetic Therapy System in Insomnia

- Disorder: A Multicenter, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Psychiatry Investigation* 2023, 20(6): 559–566.
37. Lin F, Josephs SF, Alexandrescu DT, Ramos F, Bogin V, Gammill V, Dasanu CA, De Necochea-Campion R, Patel AN, Carrier E, Koos DR. Lasers, stem cells, and COPD. *Journal of Translational Medicine* 2010, 8(16): 1- 10.
38. Lovschall H. Effects of low level laser (LLL) irradiation in cultures of human oral mucosa. (1994). Rozprawa doktorska.. Department of Oral Pathology, Medicine and Toxicology. The Royal Dental College Faculty of Health Sciences. University of Aarhus. Denmark 1994
39. Mansouri V, Arjmand B, Tavirani MR, Razzaghi M, Rostami-Nejad M, Hamdih M. Evaluation of Efficacy of Low-Level Laser Therapy. *Journal of Lasers in Medical Sciences* 2020, 11(4): 369–380.
40. Marędziak M, Marycz K, Śmieszek A, Lewandowski D, Toker NY. The influence of static magnetic fields on canine and equine mesenchymal stem cells derived from adipose tissue. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal* 2014, 50(6): 562–571.
41. Marędziak M, Marycz K, Lewandowski D, Siudzińska A, Śmieszek A. Static magnetic field enhances synthesis and secretion of membrane-derived microvesicles (MVs) rich in VEGF and BMP-2 in equine adipose-derived stromal cells (EqASCs)—a new approach in veterinary regenerative medicine. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal* 2015, 51(3): 230–240.
42. Mayrovitz HN, Maqsood R, Tawakalzada AS. Do Magnetic Fields Have a Place in Treating Vascular Complications in Diabetes? *Cureus* 2022, 14(5): 1-9.
43. Merigo E, Vescovi P, Margalit M, Ricotti E, Stea S, Meleti M, Manfredi M, Fornaini C. Efficacy of LLLT in swelling and pain control after the extraction of lower impacted third molars. *Laser Therapy* 2015, 24(11): 39-46.
44. Mika T, Kasprzak W. Fizykoterapia. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa - wydanie 4 2006, ss. 85-128; 329-347.
45. Misiąg W, Piszczyk A, Szymańska-Chabowska A, Chabowski M. Physical

- Activity and Cancer Care—A Review. *Cancers* 2022, 14(4154): 1-14.
46. Mosmann T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods* 1983, 65: 55-63.
  47. Nystoriak MA, Bhatnagar A. Cardiovascular Effects and Benefits of Exercise. *Frontiers in Cardiovascular Medicine* 2018, 5 (135): 1-11.
  48. Ohshiro T, Ohshiro T, Sasaki K. Laser Scar Management Technique. *Laser Therapy* 2013, 22(4): 255-260.
  49. Pasi F, Sanna S, Paolini A, Alquati M, Lascialfari A, Corti ME, Liberto R, Di Cialdai F, Monici M, Nano R. Effects of extremely low-frequency magnetotherapy on proliferation of human dermal fibroblasts. *Electromagnetic Biology and Medicine* 2016, 35(4): 343–352.
  50. Pecorino L. red wyd polskiego: Dzięgiel P, Marszałek A. *Biologia molekularna nowotworów w praktyce klinicznej*. Edra Urban & Partner, Wrocław - wydanie 4 2021, ss. 134-140.
  51. Phillips JD, Wong SL. Patient-Reported Outcomes in Surgical Oncology: An Overview of Instruments and Scores. *Annals of Surgical Oncology* 2020, 27(1): 45–53.
  52. Piątosza B, Klaudel-Dreszler M. Zastosowanie cytometrii przepływowej w diagnostyce neutropenii. *Postępy Nauk Medycznych* 2012, 25(7) 569-575.
  53. Pin F, Couch ME, Bonetto A. Preservation of muscle mass as a strategy to reduce the toxic effects of cancer chemotherapy on body composition. *Current Opinion in Supportive and Palliative Care* 2018, 12(4): 420-426.
  54. Pinucci I, Maraone A, Tarsitani L, Pasquini M. Insomnia among Cancer Patients in the Real World: Optimising Treatments and Tailored Therapies. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2023, 20(3785): 1-12.
  55. Portenoy RK. Treatment of cancer pain. *The Lancet* 2011, 377(9784), 2236-2247.
  56. Pyszora A, Adamczyk A. Zastosowanieiskoenergetycznego promieniowania laserowego w leczeniu bólu. *Application of Low Level*

- Laser Therapy (LLLT) for pain relief. *Polska Medycyna Paliatywna* 2005, 4(3): 127–132.
57. Pyszora A. Kompleksowa fizjoterapia pacjentów z obrzękiem limfatycznym. *Medycyna Paliatywna w Praktyce* 2010, 4(1): 23–29.
58. Rusak A, Rybak Z. Czy magnetostymulacja może mieć wpływ na gojenie ran? Badania *in vitro* Does Magnetic Stimulation Affect Wound Healing? *In vitro Studies*. Wrocław Medical University Press, *Polymers in Medicine* 2013, 43(3): 147–152.
59. Selvam R, Ganesan K, Narayana Raju KVS, Gangadharan AC, Manohar, BM, Puvanakrishnan R. Low frequency and low intensity pulsed electromagnetic field exerts its antiinflammatory effect through restoration of plasma membrane calcium ATPase activity. *Life Sciences* 2007, 80(26): 2403–2410.
60. Stewart BW, Wild CP. World cancer report 2014. International Agency for Research on Cancer.
61. Sturgeon KM, Mathis KM, Rogers CJ, Schmitz KH, Waning DL. Cancer- and Chemotherapy-Induced Musculoskeletal Degradation. *JBMR Plus* 2019, 3(3): 1-11.
62. Suszyński K, Marcol W, Górka D. Physiotherapeutic techniques used in the management of patients with peripheral nerve injuries. *Neural Regeneration Research* 2015, 10 (11): 1770–1772.
63. Szpunar J, Karczmarek-Borowska B. Aktywność fizyczna w chorobie nowotworowej. *Problemy Nauk Stosowanych* 2018, 8: 185 – 192.
64. Tatarov I, Panda A, Petkov D, Kolappaswamy K, Thompson K, Kavirayani A, Lipsky MM, ELson E, Davis CD, MArtin SS, DeTolla LJ. Effect of Magnetic Fields on Tumor Growth and Viability. *Comparative Medicine* 2011, 61 (4): 339-345.
65. Tatmatsu-Rocha JC, Ferraresi C, Hamblin MR, Damasceno Maia F, do Nascimento NRF, Driusso P, Parizotto NA. Low-level laser therapy (904 nm) can increase collagen and reduce oxidative and nitrosative stress in

- diabetic wounded mouse skin. *Journal of Photochemistry and Photobiology* 2016, 164: 96–102.
66. Taylor DN, Winfield T, Wynd S. Low-Level Laser Light Therapy Dosage Variables vs Treatment Efficacy of Neuromusculoskeletal Conditions: A Scoping Review. *Journal of Chiropractic Medicine* 2020, 19(2): 119–127.
67. Vadalà M, Morales-Medina JC, Vallelunga A, Palmieri B, Laurino C, Lannitti T. Mechanisms and therapeutic effectiveness of pulsed electromagnetic field therapy in oncology. *Cancer Medicine* 2016, 5(11): 3128-3139.
68. Valentinuzzi ME. Magnetotherapy, alternative medicines, Hippocratic oath. *BioMedical Engineering Online* 2008, 7(1): 1-3.
69. Van Coevorden RS. *The Netherlands Advances in Palliative Medicine* 2009, 8(3): 83–88.
70. Verma S, Maheshwari S, Singh R, Chaudhari P. Laser in dentistry: an innovative tool in modern dental practice. *National Journal of Maxillofacial Surgery* 2012, 3(2): 124-132.
71. Volker S. From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment (Review). *International Journal of Oncology*, 2018, 54(2): 407-419.
72. Wang Y, Duan Z, Ma Z, Mao Y, Li X, Wilson A, Qin H, Ou J, Peng K, Zhou F, Li C, Liu Z, Chen R. Epidemiology of mental health problems among patients with cancer during COVID-19 pandemic. *Translational Psychiatry* 2020, 10(1): 263.
73. Werner GT. Das Lymphödem in Diagnostik und Therapie Physikalische Entstauungstherapie. *Physikalische Rehabilitationsmedizin Kurortmedizin*, 2001, 11: 71-76.
74. Wu H, Li C, Masood M, Zhang Z, González-Almela E, Castells-Garcia A, Zou G, Xu,X. Wang L, Zhao G, Yu S, Zhu P, Wang B, Qin D, Liu J. Static Magnetic Fields Regulate T-Type Calcium Ion Channels and Mediate Mesenchymal Stem Cells Proliferation. *Cells*, 2022, 11(15): 2460.



75. Yang G, Li Z, Li Z, Huang L, Liang P, Liu L, Li D. Meta-analysis of the impact of physical activity on the recovery of physical function in COVID-19 patients. *Heliyon* 2023, 9 (9): 1-13.
76. Yilmaz SS, Ayhan FF. The Randomized Controlled Study of Low-Level Laser Therapy, Kinesio-Taping and Manual Lymphatic Drainage in Patients with Stage II Breast Cancer-Related Lymphedema. *European Journal of Breast Health* 2023, 19(1): 34–44.
77. Zhang M, Li X, Bai L, Uchida K, Bai W, Wu B, Xu W, Zhu H, Huang H. Effects of low frequency electromagnetic field on proliferation of human epidermal stem cells: An *in vitro* study. *Bioelectromagnetics* 2012, 34(1): 74–80.
78. Zhu Q, Zhu J, Wang X, Xu Q. A Meta Analysis of Physical Exercise on Improving Lung Function and Quality of Life Among Asthma Patients. *Journal of Asthma and Allergy* 2022, 15: 939–955.
79. Zwolińska J, Weres A, Magoń G, Skalska-Izdebska R. Wykorzystanie biostymulacji laserowej i światła VIP w leczeniu chorób narządów ruchu. *Przegląd Medyczny Uniwersytetu Rzeszowskiego Rzeszów* 2007, 3: 275–288.
80. Zwolińska J, Gąsior M, Śnieżek E, Kwolek A. The use of magnetic fields in treatment of patients with rheumatoid arthritis. Review of the literature. *Reumatologia* 2016, 54(4): 201–206.
81. Zyzniewska-Banaszak E, Kucharska-Mazur J, Mazur A. Physiotherapy and Physical Activity as Factors Improving the Psychological State of Patients With Cancer. *Frontiers in Psychiatry* 2021, 12 (772694): 1-8.

## STRESZCZENIE

Wpływ wybranych terapii czynników fizycznych na przeżywalność i proliferację komórek w modelu *in vitro*.

Słowa kluczowe: promieniowanie laserowe, pole magnetyczne, MTT, cytometria przepływowa, *in vitro*.

Celem pracy była ocena wpływu wybranych czynników fizycznych na proliferację i przeżycie ludzkich komórek prawidłowych oraz nowotworowych. Celem szczegółowym była analiza wpływu pola magnetycznego (zmiennego i stałego pola magnetycznego niskiej częstotliwości) oraz promieniowania laserowego na proliferację oraz przeżywalność komórek w hodowli *in vitro*.

Postawiono następujące pytania badawcze:

1. Czy promieniowanie laserowe wpływa na przeżywalność komórek nowotworowych skóry (A431), komórek skóry - keratynocytów (HaCaT), komórek skóry - fibroblastów (NHDF)?
2. Czy zmienne pole magnetyczne wpływa na przeżywalność komórek nowotworowych skóry (A431), komórek skóry - keratynocytów (HaCaT), komórek skóry - fibroblastów (NHDF)?
3. Czy stałe pole magnetyczne wpływa na przeżywalność komórek nowotworowych skóry (A431), komórek skóry - keratynocytów (HaCaT), komórek skóry - fibroblastów (NHDF)?
4. Czy promieniowanie laserowe wpływa na proliferację komórek nowotworowych skóry (A431), komórek skóry - keratynocytów (HaCaT), komórek skóry - fibroblastów (NHDF)?
5. Czy zmienne pole magnetyczne wpływa na proliferację komórek nowotworowych skóry (A431), komórek skóry - keratynocytów (HaCaT), komórek skóry - fibroblastów (NHDF)?
6. Czy stałe pole magnetyczne wpływa na proliferację komórek nowotworowych skóry (A431), komórek skóry - keratynocytów (HaCaT), komórek skóry - fibroblastów (NHDF)?

Metoda i materiał badawczy: Badania przeprowadzono na liniach komórkowych: A431 (ludzkie komórki płaskonabłonkowego raka skóry), NHDF (prawidłowe komórki ludzkich fibroblastów), HaCaT (prawidłowe komórki ludzkich keratynocytów). Ekspozycję na promieniowanie laserowe oraz pole magnetyczne stałe i zmienne przeprowadzono przez trzy kolejne dni, w tych samych przedziałach czasowych. Eksperyment na wszystkich wyżej wskazanych liniach komórkowych (A431, NHDF, HaCaT), przeznaczonych do testu MTT powtarzano w trzech cyklach, a do cytometrii przepływowej w dwóch. Następnie analizie poddane były uśrednione wyniki ze wszystkich trzech powtórzeń testu MTT oraz dwóch powtórzeń cytometrii przepływowej. W przypadku promieniowania laserowego komórki poddawano ekspozycji według zastosowanej dawki trzy razy dziennie przez 3 kolejne dni. Przerwy między kolejnymi naświetlaniami wynosiły czterdzieści minut. Zastosowano dawki:  $1 \text{ J/cm}^2$ ,  $8 \text{ J/cm}^2$  i  $15 \text{ J/cm}^2$ , wypełnienie: 100%, pole zabiegowe: w płytkach 96-dołkowych, przeznaczonych do testu MTT  $30,912 \text{ cm}^2$ , a w płytkach 6-dołkowych, przeznaczonych do analizy cyklu komórkowego:  $54 \text{ cm}^2$ , tryb emisji: ciągły. Czas trwania pojedynczej ekspozycji wynosił każdorazowo 3 minuty.

W przypadku pola magnetycznego stałego i zmiennego komórki były ekspozowane również według zastosowanej dawki dwa razy dziennie przez 3 kolejne dni. Przerwy między ekspozycjami wynosiły sześćdziesiąt minut. Komórki traktowano dawkami: wartości indukcji znamionowej przy ścianie aplikatora 2,5 mT, 6 mT i 12 mT natomiast w geometrycznym środku aplikatora 0,5 mT, 4 mT i 10 mT oraz analogicznie o częstotliwości 2 Hz, 60 Hz i 120 Hz. Zastosowano zmienne oraz stałe pole magnetyczne. W przypadku ekspozycji na pole magnetyczne zmienne spectrum wynosiło 10 Hz, czas trwania impulsu 1 s i przerwy 0,8 s, kształt pola sinusoidalny ze względu na jego uniwersalne zastosowanie. Czas oddziaływania pola magnetycznego wynosi każdorazowo 10 minut. Płytki umieszczano w geometrycznym środku aplikatora.

Kontrole w badaniach stanowiły komórki wyjmowane z inkubatora na czas potrzebny do ekspozycji komórek badanych, nie były one jednak poddawane działaniu pola magnetycznego ani promieniowania laserowego.

Normalność rozkładu zmiennych przeprowadzono z zastosowaniem testu Shapiro-Wilka. Dla sprawdzenia istotności różnic w analizie cyklu komórkowego oraz przeżywalności pomiędzy grupami zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji – jednoczynnikowa ANOVA (one-way ANOVA). Analizę post-hoc wykonano za pomocą testu Bonferroniego. Poziom istotności przyjęto na poziomie  $p < 0.05$ . Analizę statystyczną wykonano przy użyciu programu Statistica 13 (TIBCO Software Inc.)

Wyniki: Wykazano brak zmian w proliferacji i przeżywalności ocenianych komórek pod wpływem promieniowania laserowego i pola magnetycznego zmiennego oraz stałego.

#### Wnioski:

1. Promieniowanie laserowe w zakresie dawek terapeutycznych nie wpływa na przeżywalność prawidłowych i nowotworowych komórek skóry w warunkach *in vitro*.
2. Promieniowanie laserowe w zakresie dawek terapeutycznych nie wpływa na proliferację prawidłowych i nowotworowych komórek skóry w warunkach *in vitro*.
3. Stałe i zmienne pole magnetyczne w zakresie dawek terapeutycznych nie wpływa na przeżywalność prawidłowych i nowotworowych komórek skóry w warunkach *in vitro*.
4. Stałe i zmienne pole magnetyczne w zakresie dawek terapeutycznych nie wpływa na proliferację prawidłowych i nowotworowych komórek skóry w warunkach *in vitro*.

Przeprowadzone badania pokazały, że ekspozycja na stałe oraz zmienne pole magnetyczne, a także promieniowanie laserowe w zakresie dawek terapeutycznych nie wpływa na proliferację oraz zmiany w cyklu komórkowym ludzkich komórek raka skóry (A431), a także prawidłowych komórek skóry keratynocytów (HaCaT) oraz fibroblastów (NHDF). Na podstawie przeprowadzonych badań wysnuć należy wnioski, że ekspozycja na ww. czynniki fizykalne może przynosić pozytywne stymulacje prozdrowotne u pacjentów na drodze innych mechanizmów molekularnych, niż zmiany badane w niniejszej pracy. Dodatkowo, otrzymane wyniki mogą sugerować także, że terapia fizykalna jest stosunkowo bezpieczna

dla pacjentów, ponieważ nie stymuluje miejscowo komórek skóry do niekontrolowanych podziałów, co mogłoby być początkiem indukowania procesu kancerogenezy. Z drugiej strony, wyniki badań zaprezentowanych w niniejszej monografii mają charakter wstępny, i należy zaznaczyć, że na ich podstawie nie można potwierdzić bezpieczeństwa stosowania terapii fizykalnych u pacjentów onkologicznych.

Kontynuacja i rozszerzenie badań dotyczących wpływu promieniowania laserowego oraz pola magnetycznego na komórki zdrowe i nieprawidłowe jest niezbędne w celu ustalenia ewentualnych przeciwwskazań do ich stosowania.

## ABSTRACT

Influence of selected therapies of physical factors on cell survival and proliferation *in vitro* model.

Key words: laser radiation, magnetic field, MTT test, flow cytometry, *in vitro*.

The aim of the study was to evaluate the influence of selected physical factors on the proliferation and viability of healthy and cancerous human cells. The specific objective was to analyse the effects of magnetic fields (variable and constant low frequency magnetic fields) and laser radiation on cell proliferation and viability *in vitro* culture.

The following research questions were asked:

1. Does laser radiation affect the viability of skin cancer cells (A431), skin cells - keratinocytes (HaCaT), skin cells - fibroblasts (NHDF)?
2. Does the variable magnetic field affect the viability of skin cancer cells (A431), skin cells - keratinocytes (HaCaT), skin cells - fibroblasts (NHDF)?
3. Does the permanent magnetic field affect the viability skin cancer cells (A431), skin cells - keratinocytes (HaCaT), skin cells - fibroblasts (NHDF)?
4. Does laser radiation affect the proliferation of skin cancer cells (A431), skin cells - keratinocytes (HaCaT), skin cells - fibroblasts (NHDF)?
5. Does the variable magnetic field affect the proliferation of skin cancer cells (A431), skin cells - keratinocytes (HaCaT), skin cells - fibroblasts (NHDF)?
6. Does the permanent magnetic field affect the proliferation of skin cancer cells (A431), skin cells - keratinocytes (HaCaT), skin cells - fibroblasts (NHDF)?

Research Method and Material: The studies were conducted on cell lines: A431 (human squamous cell skin cancer), NHDF (normal cells of human fibroblasts), HaCaT (normal cells of human keratinocytes). Exposure to laser radiation and constant and variable magnetic fields was carried out for three consecutive days at the same time intervals. The experiment on all the above indicated cell lines (A431, NHDF, HaCaT) intended for the MTT assay was repeated in three cycles and for flow cytometry in two cycles. The mean results of all three replicates of the MTT test and two replicates of flow cytometry were then analysed. In the case of laser radiation,

the cells were exposed at the applied dose three times a day for 3 consecutive days. Intervals between successive exposures were forty minutes. Doses: 1 J/cm<sup>2</sup>, 8 J/cm<sup>2</sup> and 15 J/cm<sup>2</sup>, filling: 100%, treatment area: 96-hole plates, intended for MTT test 30,912 cm<sup>2</sup>, and 6-hole plates, intended for cell cycle analysis: 54 cm<sup>2</sup>, emission mode: continuous. The duration of a single exposure was 3 minutes each time.

For constant and variable magnetic fields, the cells were also exposed at the applied dose twice daily for 3 consecutive days. The intervals between exposures were sixty minutes. Cells were treated at doses of: nominal induction values at the applicator wall of 2.5 mT, 6 mT and 12 mT and at the geometric centre of the applicator of 0.5 mT, 4 mT and 10 mT and analogously at frequencies of 2 Hz, 60 Hz and 120 Hz. Variable and permanent magnetic fields were used. For magnetic field exposure, the variable spectrum was 10 Hz, the pulse duration of 1 s and the interval of 0.8 s, the shape of the sinusoidal field due to its universal application. The duration of the magnetic field is 10 minutes each time. The plates were placed in the geometric center of the applicator.

Controls in the studies were cells removed from the incubator for the time needed to expose the test cells, but were not exposed to magnetic fields or laser radiation.

To test the significance of differences in cell cycle analysis and viability between groups, one-way ANOVA (one-way ANOVA) was used. The post-hoc analysis was performed using the Bonferroni test. The level of significance was taken at  $p < 0.05$ . Statistical analysis was performed using the program: TIBCO Software Inc. (2017). Statistica (data analysis software system), version 13. <https://www.tibco.com/>.

Results: There were no changes in proliferation and survival of the evaluated cells under the influence of laser radiation and variable and constant magnetic fields.

#### Conclusions:

1. Laser radiation in the therapeutic dose range does not affect the survival of normal and cancerous skin cells *in vitro*.
2. Laser radiation in the therapeutic dose range does not affect the proliferation of normal and cancerous skin cells *in vitro*.
3. The constant and variable magnetic field within the therapeutic dose range does not affect the survival of normal and cancerous skin cells *in vitro*.

4. The constant and variable magnetic field within the therapeutic dose range does not affect the proliferation of normal and cancerous skin cells *in vitro*.

Studies have shown that exposure to permanent and variable magnetic fields as well as laser radiation in the therapeutic dose range does not affect proliferation and cell cycle changes of human skin cancer cells (A431) as well as normal skin keratinocytes (HaCaT) and fibroblasts (NHDF). Based on the conducted studies, it should be concluded that exposure to the above-mentioned physical factors may bring positive pro-health stimuli in patients through different molecular mechanisms than the changes studied in this paper. In addition, the results obtained may also suggest that physical therapy is relatively safe for patients, as it does not locally stimulate skin cells to divide uncontrolledly, which could be the beginning of inducing the process of carcinogenesis. On the other hand, the results of the studies presented in this monograph are preliminary, and it should be noted that on their basis it is not possible to confirm the safety of the use of physical therapies in cancer patients.

Continuation and extension of studies on the effects of laser radiation and magnetic field on healthy and abnormal cells is necessary in order to establish possible contraindications to their use.



**SPIS RYCIN**

Ryc. 1. Struktura świadczeń w fizjoterapii ambulatoryjnej w latach 2016 - 2019 (źródło - Dziennik Urzędowy Ministra Zdrowia, poz. 69, Mapa Potrzeb Zdrowotnych).	4
Ryc. 2. Porównanie liczby wizyt fizjoterapeutycznych w latach 2018 i 2019 (źródło - Dziennik Urzędowy Ministra Zdrowia, poz. 69, Mapa Potrzeb Zdrowotnych).	5
Ryc. 3. Liczba zgonów w wyniku choroby nowotworowej w latach 2015 - 2020 (źródło: Krajowy Rejestr Nowotworów <a href="https://onkologia.org.pl/pl/raporty">https://onkologia.org.pl/pl/raporty</a> )	7
Ryc. 4. Liczba zachorowań na choroby nowotworowe w latach 2015 - 2020 (źródło: Krajowy Rejestr Nowotworów <a href="https://onkologia.org.pl/pl/raporty">https://onkologia.org.pl/pl/raporty</a> )	7
Ryc. 5. Prognozy liczby zgonów w wyniku choroby nowotworowej w roku 2024 (źródło: Krajowy Rejestr Nowotworów <a href="https://onkologia.org.pl/pl/raporty">https://onkologia.org.pl/pl/raporty</a> )	8
Ryc. 6. Prognozy zachorowalności w wyniku choroby nowotworowej w roku 2024 (źródło: Krajowy Rejestr Nowotworów <a href="https://onkologia.org.pl/pl/raporty">https://onkologia.org.pl/pl/raporty</a> )	8
Ryc 7. Schemat przeprowadzonych badań.	24
Ryc. 8. PhysioGo Lite Laser z aplikatorem prysznicowym CL-1800.	26
Ryc. 9. Physio MG827 z aplikatorem CS35.	26
Ryc. 10. Wyniki testu MTT A431, NHDF, HaCaT po ekspozycji na promieniowanie laserowe, w zależności od dawki naświetlania.	28
Ryc. 11. Wyniki testu MTT A431, NHDF, HaCaT po ekspozycji na pole magnetyczne zmienne, w zależności od dawki promieniowania.	29
Ryc. 12. Wyniki testu MTT A431, NHDF, HaCaT po ekspozycji na pole magnetyczne stałe, w zależności od dawki promieniowania.	30
Ryc. 13. Odsetek komórek linii komórkowej A431 w poszczególnych	

- fazach cyklu komórkowego po ekspozycji na promieniowanie laserowe, w zależności od dawki naświetlania. 31
- Ryc. 14. Odsetek komórek linii komórkowej A431 w poszczególnych fazach cyklu komórkowego po ekspozycji na pole magnetyczne zmienne, w zależności od dawki promieniowania. 32
- Ryc. 15. Odsetek komórek linii komórkowej A431 w poszczególnych fazach cyklu komórkowego po ekspozycji na pole magnetyczne stałe, w zależności od dawki promieniowania. 33
- Ryc. 16. Odsetek komórek linii komórkowej NHDF w poszczególnych fazach cyklu komórkowego po ekspozycji na promieniowanie laserowe, w zależności od dawki naświetlania. 34
- Ryc. 17. Odsetek komórek linii komórkowej NHDF w poszczególnych fazach cyklu komórkowego po ekspozycji na pole magnetyczne zmienne, w zależności od dawki promieniowania. 35
- Ryc. 18. Odsetek komórek linii komórkowej NHDF w poszczególnych fazach cyklu komórkowego po ekspozycji na pole magnetyczne stałe, w zależności od dawki promieniowania. 36
- Ryc. 19. Odsetek komórek linii komórkowej HaCaT w poszczególnych fazach cyklu komórkowego po ekspozycji na promieniowanie laserowe, w zależności od dawki naświetlania. 37
- Ryc. 20. Odsetek komórek linii komórkowej HaCaT w poszczególnych fazach cyklu komórkowego po ekspozycji na pole magnetyczne zmienne, w zależności od dawki promieniowania. 38
- Ryc. 21. Odsetek komórek linii komórkowej HaCaT w poszczególnych fazach cyklu komórkowego po ekspozycji na pole magnetyczne stałe, w zależności od dawki promieniowania. 39