

**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***

Autoreferat rozprawy doktorskiej wykonanej
w Zakładzie Masażu i Fizykoterapii

Promotor:

prof. dr hab. Waldemar Andrzejewski

Recenzenci:

dr hab. Anna Ostrowska, prof. AWF

dr hab. Jan Szczepielniak, prof. PO

dr hab. n. med. Andrzej Wojnar, prof. PW

WROCŁAW 2024

I WSTĘP.....	3
I 1. Wprowadzenie.....	3
II. CEL PRACY	10
III. PYTANIA BADAWCZE	10
IV. MATERIAŁ I METODY BADAWCZE	11
IV 1. Materiał badany.....	11
IV 2. Metody badawcze	12
IV 3. Metody statystyczne	17
V. WYNIKI	18
V 1. Wyniki testu MTT na liniach komórkowych A431, NHDF i HaCaT po ekspozycji na wybrane czynniki fizyczne w zależności od zastosowanego dawkowania.....	18
V 1.1. Wyniki testu MTT na liniach komórkowych A431, NHDF i HaCaT po ekspozycji na promieniowanie laserowe.....	18
V 1.2. Wyniki testu MTT na liniach komórkowych A431, NHDF i HaCaT po ekspozycji na pole magnetyczne zmienne.	19
V 1.3. Wyniki testu MTT na liniach komórkowych A431, NHDF i HaCaT po ekspozycji na pole magnetyczne stałe.	20
V 2. Wyniki analizy cyklu komórkowego linii komórkowych A431, NHDF i HaCaT po ekspozycji na wybrane czynniki fizyczne w zależności od zastosowanego dawkowania.....	21
V 2.1. Wyniki analizy cyklu komórkowego linii komórkowej A431	21
V 2.1.1. Wyniki analizy cyklu komórkowego linii komórkowej A431 po ekspozycji na promieniowanie laserowe.....	21
V 2.1.2. Wyniki analizy cyklu komórkowego linii komórkowej A431 po ekspozycji na pole magnetyczne zmienne.....	22
V 2.1.3. Wyniki analizy cyklu komórkowego linii komórkowej A431 po ekspozycji na pole magnetyczne stałe.....	23
V 2.2. Wyniki analizy cyklu komórkowego linii komórkowej NHDF.	24
V 2.2.1 Wyniki analizy cyklu komórkowego linii komórkowej NHDF po ekspozycji na promieniowanie laserowe.....	24
V 2.2.2. Wyniki analizy cyklu komórkowego linii komórkowej NHDF po ekspozycji na pole magnetyczne zmienne.....	25
V 2.2.3. Wyniki analizy cyklu komórkowego linii komórkowej NHDF po ekspozycji na pole magnetyczne stałe.....	26
V 2.3. Wyniki analizy cyklu komórkowego linii komórkowej HaCaT.....	27
V 2.3.1. Wyniki analizy cyklu komórkowego linii komórkowej HaCaT po ekspozycji na promieniowanie laserowe.....	27
V 2.3.2. Wyniki analizy cyklu komórkowego linii komórkowej HaCaT po ekspozycji na pole magnetyczne zmienne.....	28
V 2.3.3. Wyniki analizy cyklu komórkowego linii komórkowej HaCaT po	

ekspozycji na pole magnetyczne stałe.....	29
VI WNIOSKI.....	30
VII WYBRANE PIŚMIENNICTWO	31

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. 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. 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).

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).

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.

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 (Hosseini-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 jedno 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.

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% CO₂.

Na potrzeby przeprowadzenia badań za pomocą testu MTT komórki zawieszano w 100 µl pełnego medium hodowlanego wysiewano na płytkach 96-dołkowych (Falcon), w ilości 1×10^4 komórek/dołek. W przypadku komórek przeznaczonych do analizy cyklu komórkowego za pomocą cytometrii przepływowej (FACSCantoII™, Becton Dickinson, Eysins, Szwajcaria) wysiewano na płytce 6- dołkowe w ilości 1×10^5 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 μ l roztworu MTT po czym płytki umieszczono w inkubatorze na 2 godziny. Po czasie inkubacji zlano medium, dodano do każdego dołka 100 μ 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:

IV - 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 (Piątośa 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.

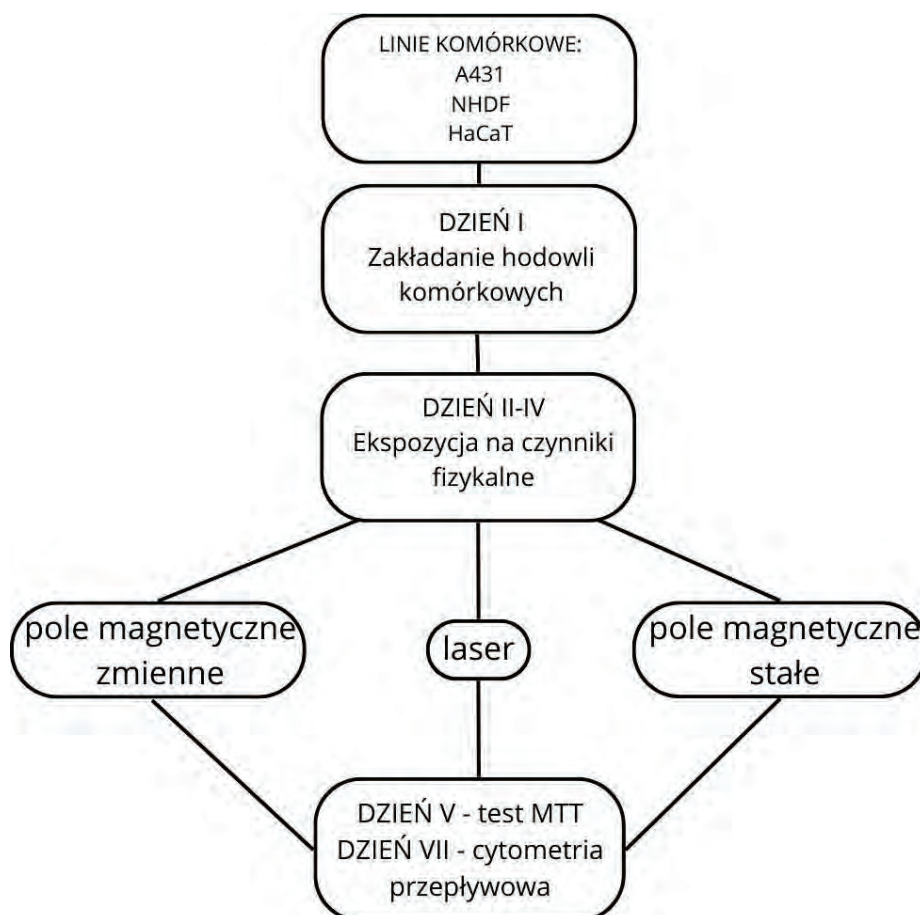
Cykl komórkowy obejmuje cztery następujące po sobie fazy: G1, S, G2 oraz M, z których trzy pierwsze stanowią interfazę. W fazie cyklu S następuje replikacja materiału genetycznego, natomiast fazy G1 oraz G2, występujące przed fazą S oraz M, to część cyklu komórkowego, w których zachodzi synteza białek, 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/cm², 8 J/cm² i 15 J/cm², wypełnienie: 100%, pole zabiegowe: w płytkach 96-dołkowych, przeznaczonych do testu MTT 30,912 cm², a w płytkach 6-dołkowych, przeznaczonych do analizy cyklu komórkowego: 54 cm², 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.)

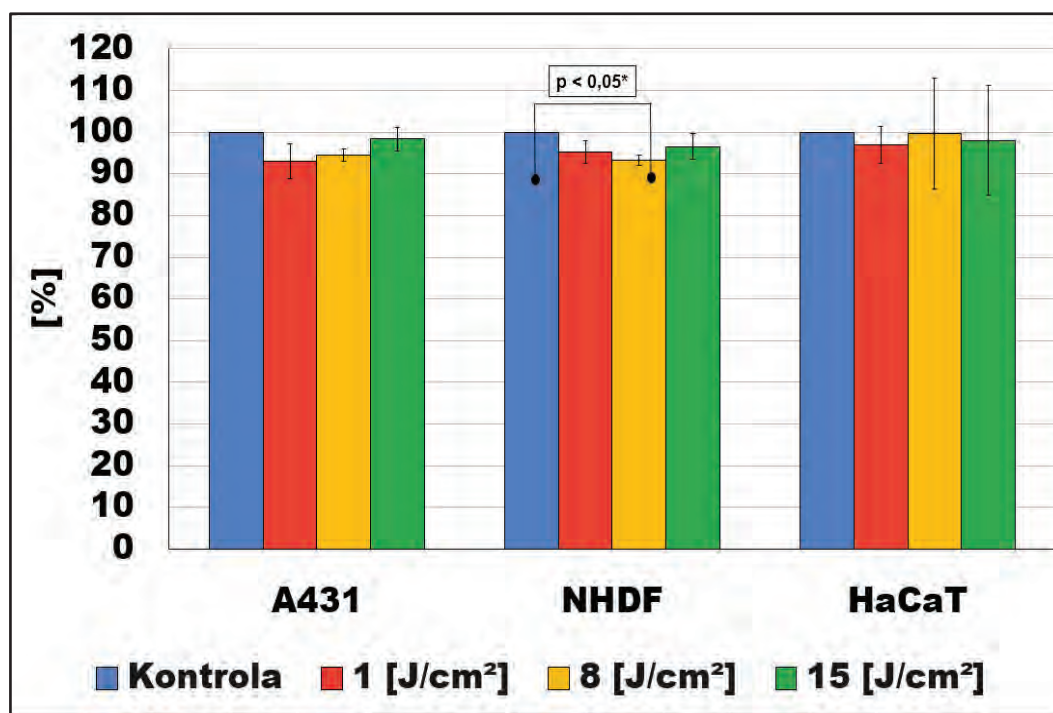
V. WYNIKI

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 J/cm², 8 J/cm², 15 J/cm²) w odniesieniu do grupy kontrolnej (bez naświetlania).

Wykazano istotną różnicę w przypadku naświetlania linii NHDF, gdzie przy dawce promieniowania 8 J/cm² zaobserwowano mniejszą przeżywalność komórek w stosunku do grupy kontrolnej.

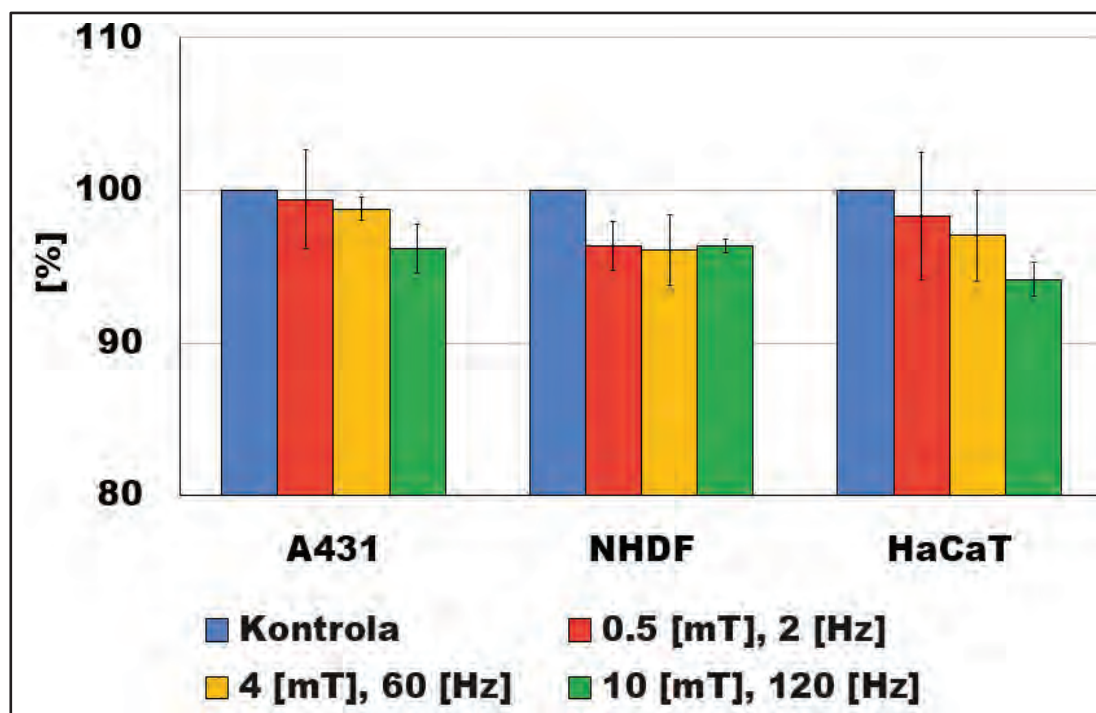


Ryc. 10. Wyniki testu MTT A431, NHDF, HaCaT po ekspozycji na promieniowanie laserowe, w zależności od dawki naświetlania.

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.

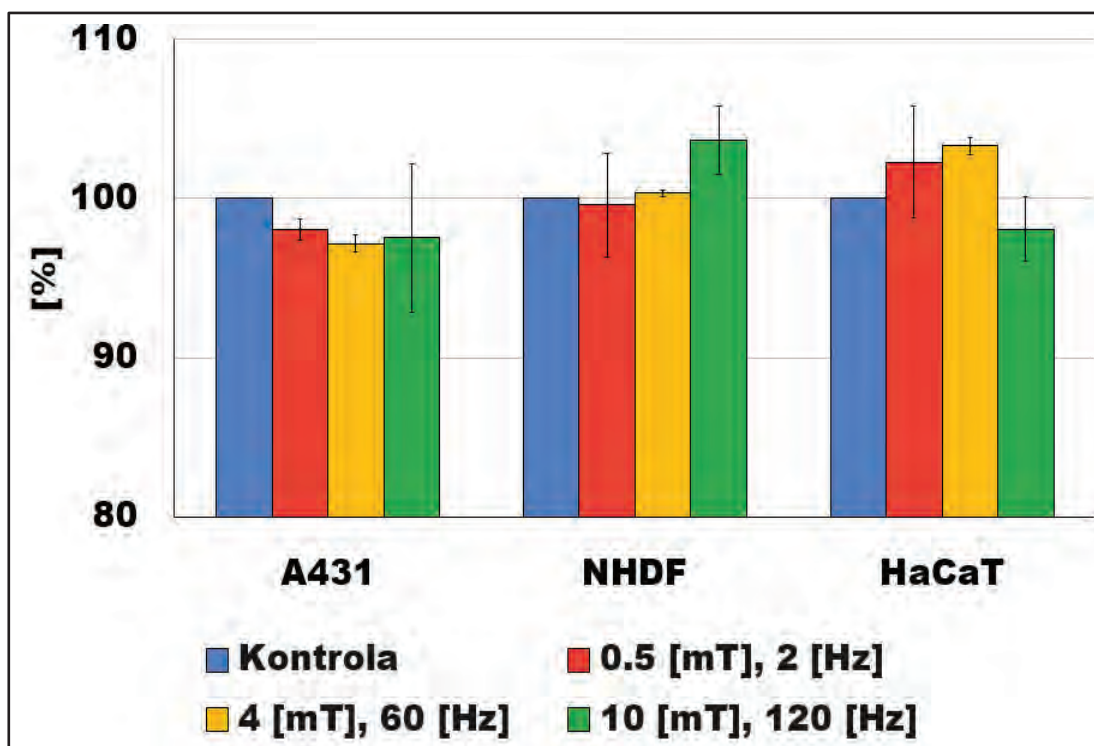


Ryc. 11. Wyniki testu MTT A431, NHDF, HaCaT po ekspozycji na pole magnetyczne zmienne, w zależności od dawki promieniowania.

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.



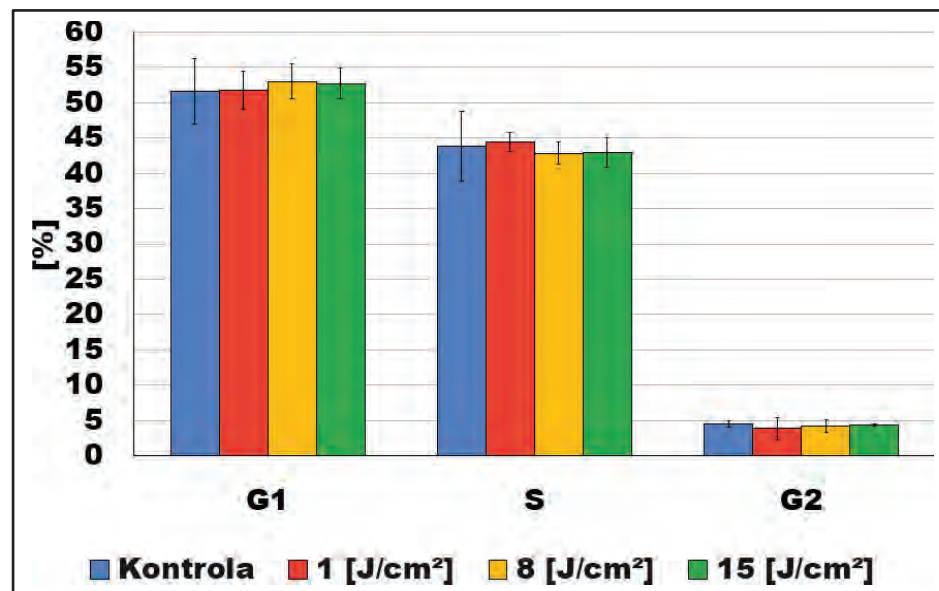
Ryc. 12. Wyniki testu MTT A431, NHDF, HaCaT po ekspozycji na pole magnetyczne stałe, w zależności od dawki promieniowania.

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 J/cm^2 , 8 J/cm^2 , 15 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.



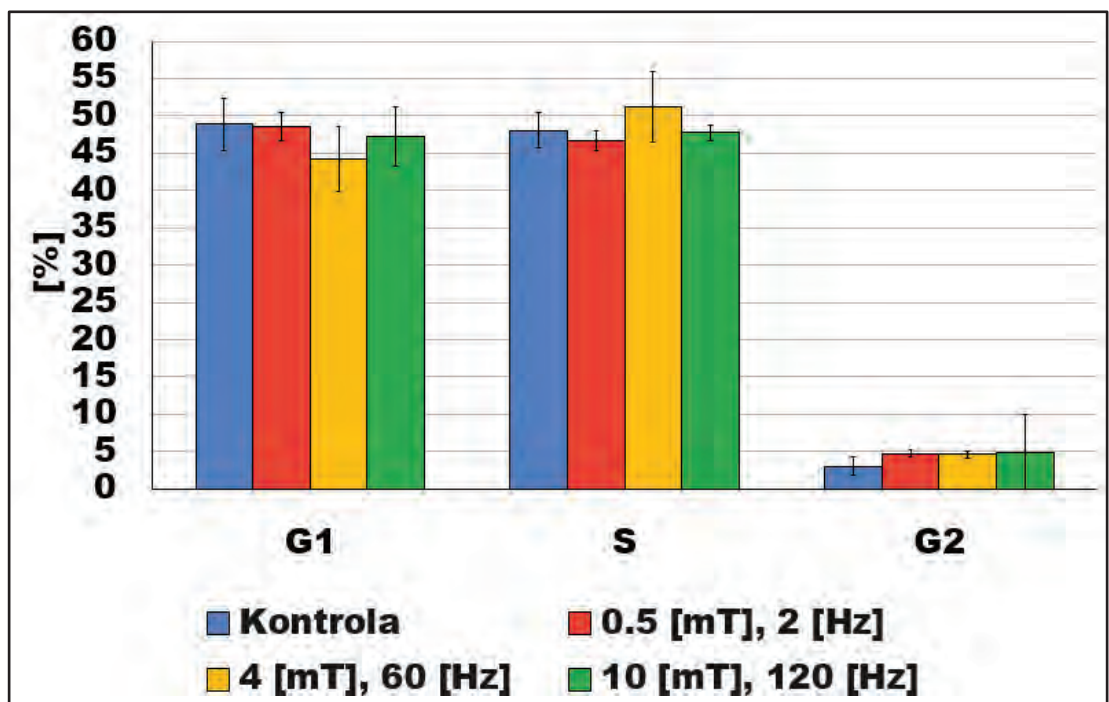
Ryc. 13. Odsetek komórek linii komórkowej A431 w poszczególnych fazach cyklu komórkowego po ekspozycji na promieniowanie laserowe, w zależności od dawki naświetlania.

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.



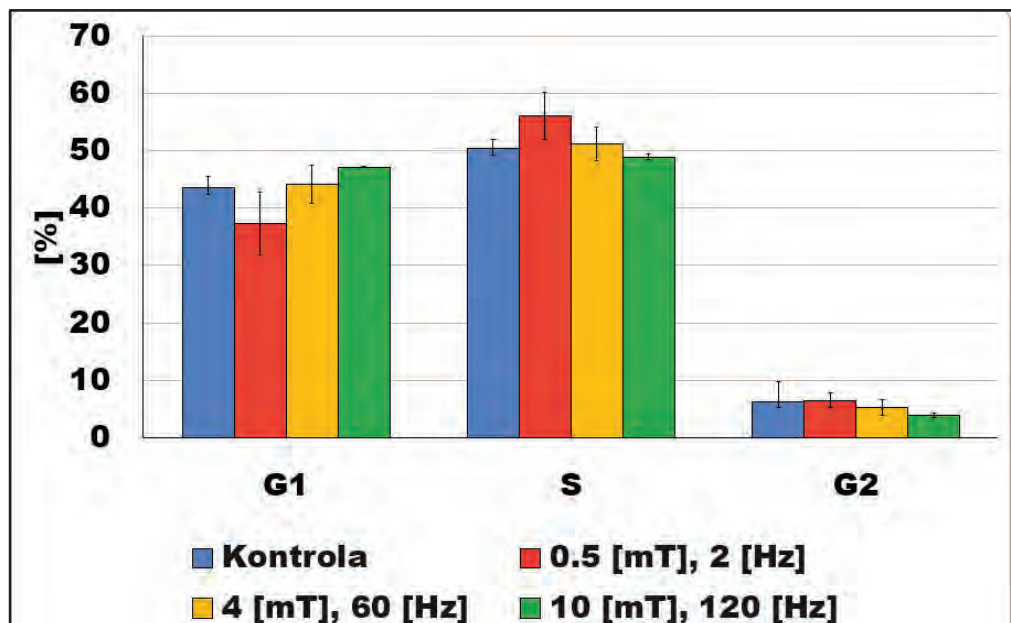
Ryc. 14. Odsetek komórek linii komórkowej A431 w poszczególnych fazach cyklu komórkowego po ekspozycji na pole magnetyczne zmienne, w zależności od dawki promieniowania.

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.

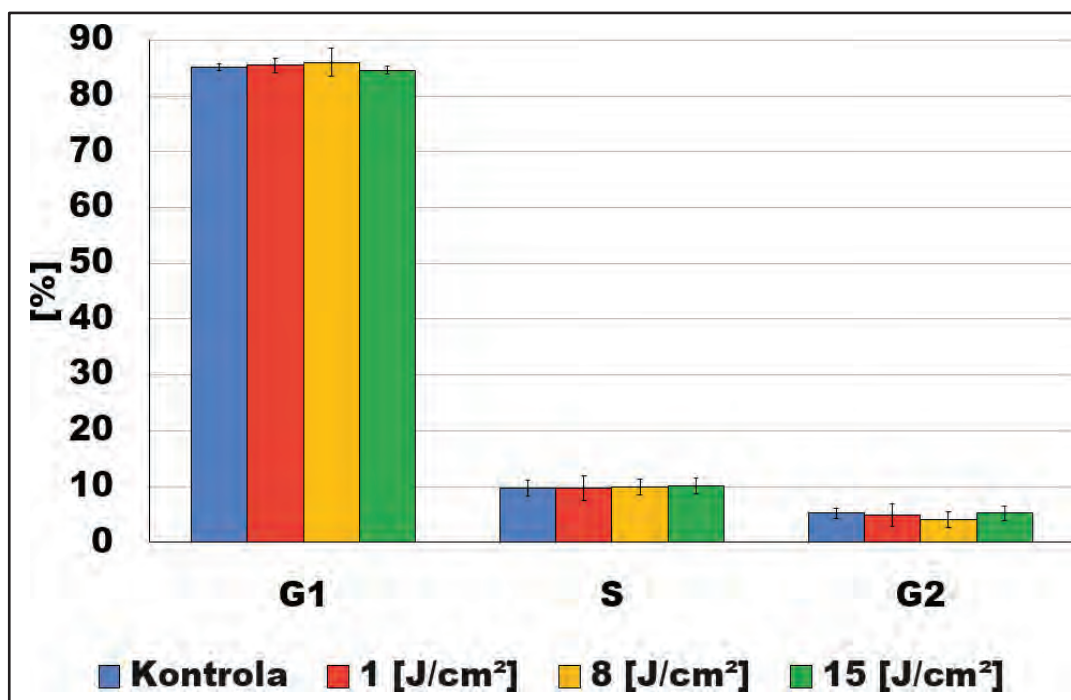
V 2.2. Wyniki analizy cyklu komórkowego linii komórkowej NHDF.

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 J/cm^2 , 8 J/cm^2 , 15 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.



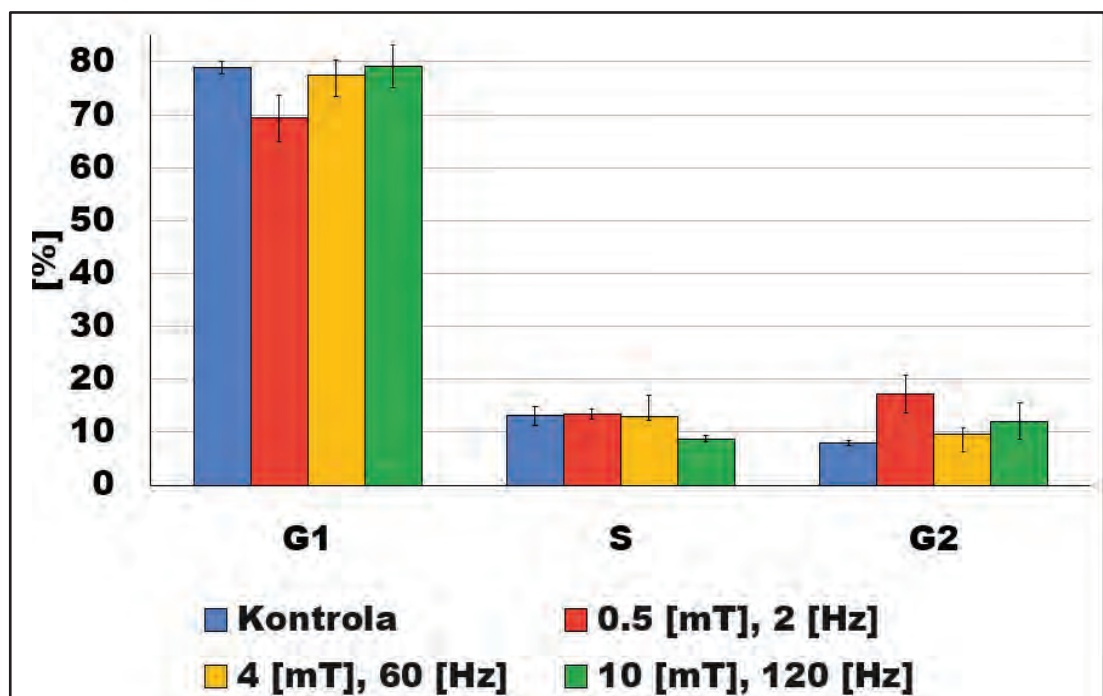
Ryc. 16. Odsetek komórek linii komórkowej NHDF w poszczególnych fazach cyklu komórkowego po ekspozycji na promieniowanie laserowe, w zależności od dawki naświetlania.

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.



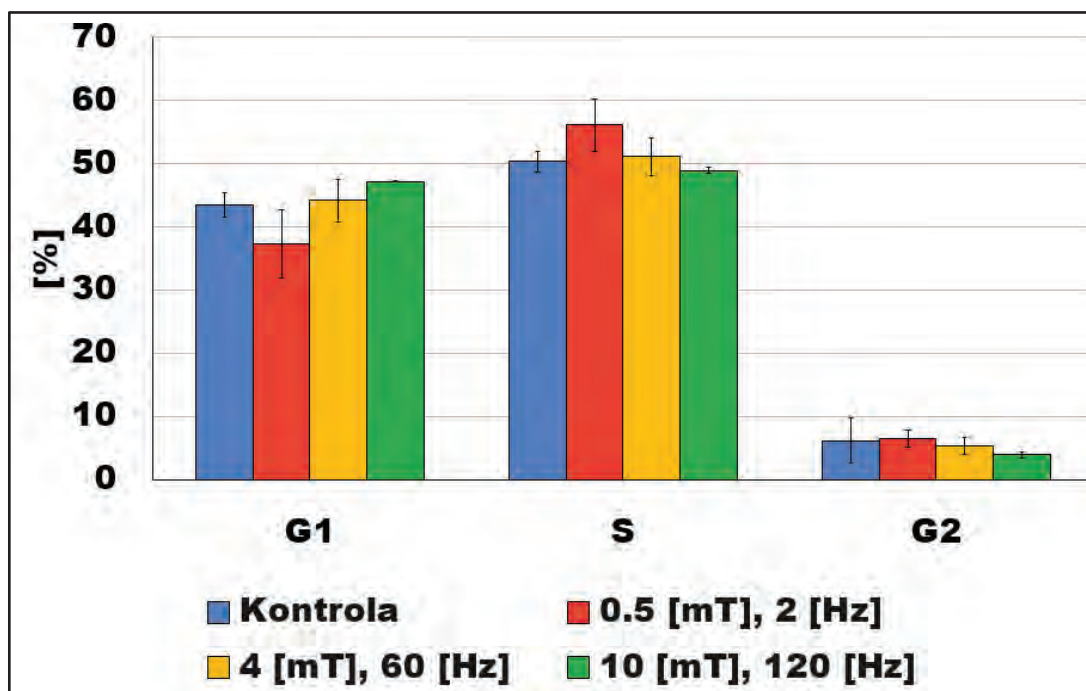
Ryc. 17. Odsetek komórek linii komórkowej NHDF w poszczególnych fazach cyklu komórkowego po ekspozycji na pole magnetyczne zmienne, w zależności od dawki promieniowania.

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.

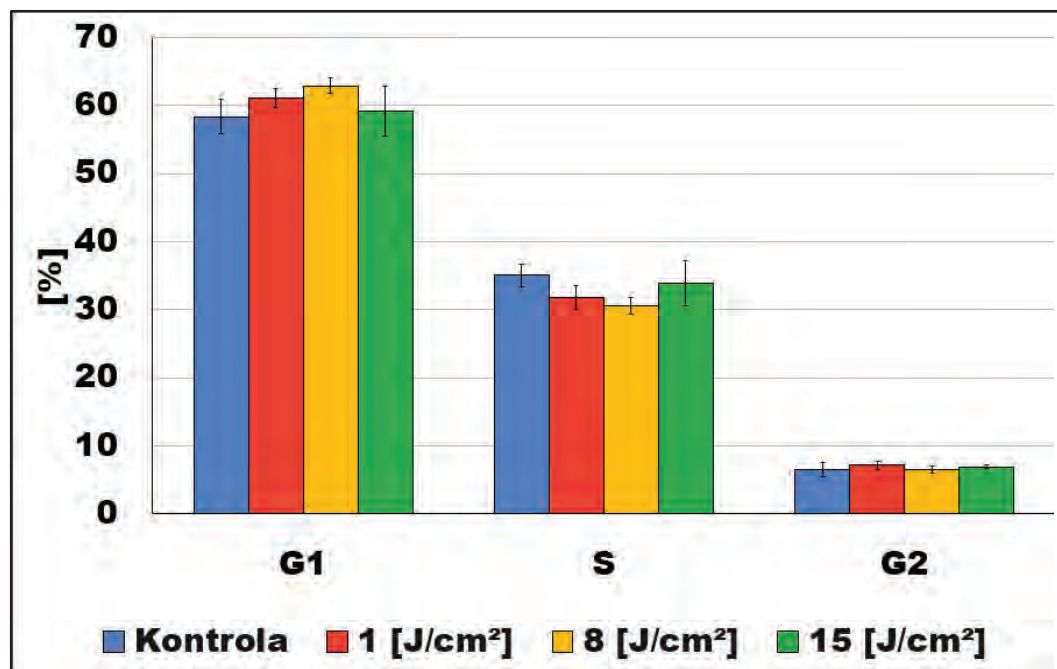
V 2.3. Wyniki analizy cyklu komórkowego linii komórkowej HaCaT.

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 J/cm^2 , 8 J/cm^2 , 15 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.



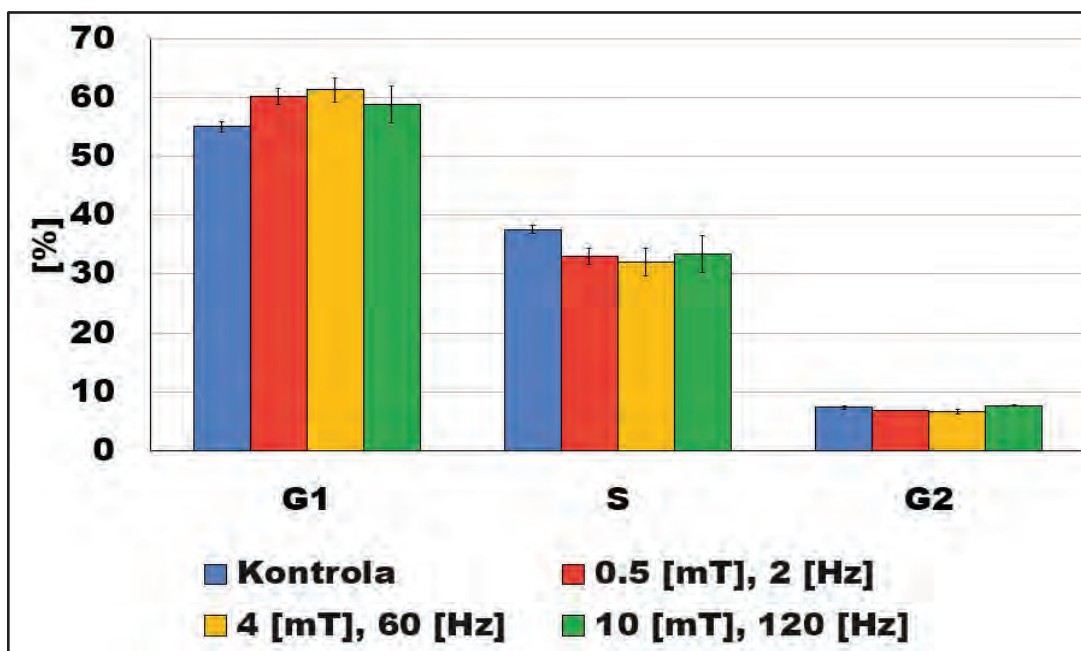
Ryc. 19. Odsetek komórek linii komórkowej HaCaT w poszczególnych fazach cyklu komórkowego po ekspozycji na promieniowanie laserowe, w zależności od dawki naświetlania.

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.



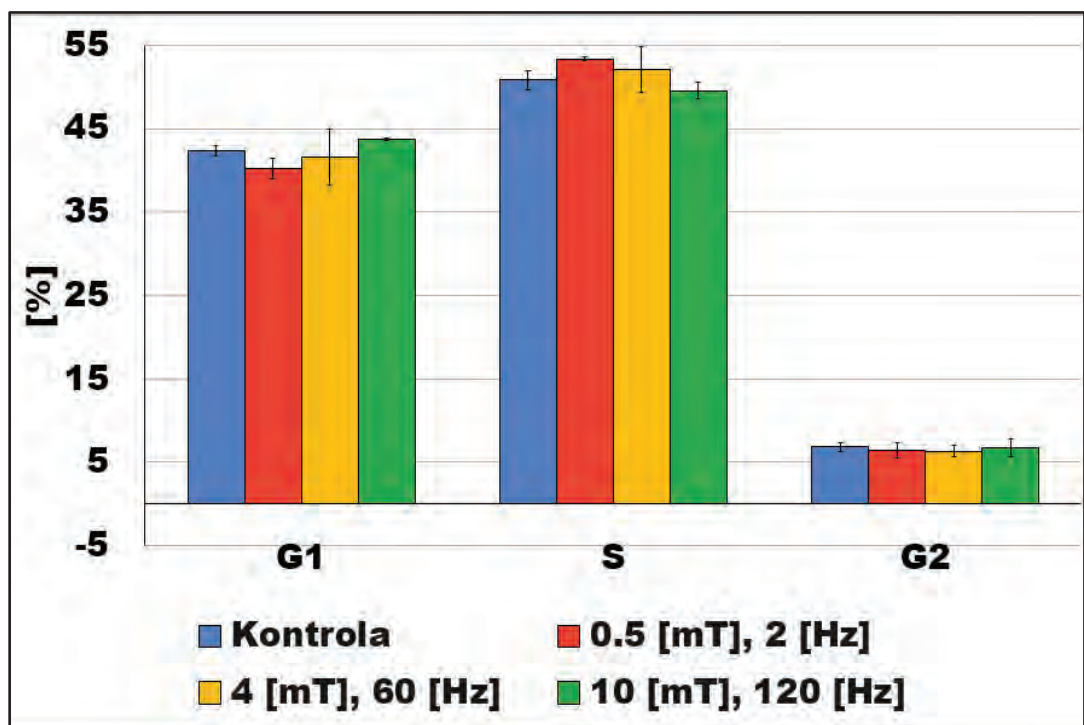
Ryc. 20. Odsetek komórek linii komórkowej HaCaT w poszczególnych fazach cyklu komórkowego po ekspozycji na pole magnetyczne zmienne, w zależności od dawki promieniowania.

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 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.

VII WYBRANE PIŚMIENNICTWO

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Drake M T. Osteoporosis and cancer. *Current Osteoporosis Reports* 2013, 11(3): 163–170.
7. Fabijańska-Mitek J, Stachurska A. Zastosowanie cytometrii przepływowej w badaniach immunohematologicznych krwinek czerwonych. *Acta Haematologica Polonica* 2017, 48(3): 183–188).
8. 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.
9. 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.
10. 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.

11. 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.
12. 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).
13. Goodwin PJ, Bruera E, Stockler M. Pain in patients with cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2014, 32(16): 1637–1639.
14. 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
15. Hossein-Khannazer N, Arki MK, Keramatinia 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

16. 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
17. Kalinowski P, Krawulska A. Rola fizjoterapii po mastektomii w opinii pacjentek. *Medycyna Ogólna i Nauki o Zdrowiu* 2012, 18(4): 291-296.
18. 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.
19. 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.
20. Mika T, Kasprzak W. *Fizykoterapia*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa - wydanie 4 2006, ss. 85-128; 329-347.
21. Misiąg W, Piszczyk A, Szymańska-Chabowska A, Chabowski M. Physical

- Activity and Cancer Care—A Review. *Cancers* 2022, 14(4154): 1-14.
22. Mosmann T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods* 1983, 65: 55-63.
23. Nystoriak MA, Bhatnagar A. Cardiovascular Effects and Benefits of Exercise. *Frontiers in Cardiovascular Medicine* 2018, 5 (135): 1-11.
24. Ohshiro T, Ohshiro T, Sasaki K. Laser Scar Management Technique. *Laser Therapy* 2013, 22(4): 255-260.
25. 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.
26. 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.
27. Piątosza B, Klaudel-Dreszler M. Zastosowanie cytometrii przepływowej w diagnostyce neutropenii. *Postępy Nauk Medycznych* 2012, 25(7) 569-575.
28. 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.
29. 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.
30. Portenoy RK. Treatment of cancer pain. *The Lancet* 2011, 377(9784), 2236-2247.
31. Pyszora A. Kompleksowa fizjoterapia pacjentów z obrzękiem limfatycznym. *Medycyna Paliatywna w Praktyce* 2010, 4(1): 23–29.
32. 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.
33. Stewart BW, Wild CP. World cancer report 2014. International Agency for Research on Cancer.
34. Sturgeon KM, Mathis KM, Rogers CJ, Schmitz KH, Waning DL. Cancer- and Chemotherapy-Induced Musculoskeletal Degradation. *JBMR Plus* 2019,

- 3(3): 1-11.
35. 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.
 36. Szpunar J, Karczmarek-Borowska B. Aktywność fizyczna w chorobie nowotworowej. *Problemy Nauk Stosowanych* 2018, 8: 185 – 192.
 37. Van Coevorden RS. *The Netherlands Advances in Palliative Medicine* 2009, 8(3): 83–88.
 38. 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.
 39. 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.
 40. Werner GT. Das Lymphödem in Diagnostik und Therapie Physikalische Entstauungstherapie. *Physikalische Rehabilitationsmedizin Kurortmedizin*, 2001, 11: 71-76.
 41. 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.
 42. 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.
 43. 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.
 44. 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