ORIGINAL ARTICLE

VLIV TERAPEUTICKÉHO LASERU NA KONCENTRACI CYTOKINŮ
V KREVNÍM SÉRU *IN VIVO* (probatorní studie)Effect of therapeutic laser on the concentration of cytokines in blood serum
in vivo (pilot study)Yulia Efremova¹, Leoš Navrátil¹, Jaroslav Racek²¹České vysoké učení technické v Praze, Fakulta biomedicínského inženýrství, katedra lékařských a humanitních oborů, Kladno²Univerzita Karlova v Praze, Fakultní nemocnice v Plzni, Ústav klinické biochemie a hematologie

Summary

Cytokines are pleiotropeous molecules and perform decisive roles in starting of immune reaction, haematopoiesis processes, neurogenesis etc. Interleucines, growth factors, factors of tumour necrosis and interferons belong among known cytokines. Literary sources document that interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-2 (IL-2), interleukin-6 (IL-6) and the factor of tumour necrosis α (TNF- α) are closely connected and play role at inflammation as well as pain. At present the low – efficient laser therapy is a wide – spread and effective physiotherapy method widely used during rehabilitation of patients with problems of movement. The basic idea of the experiment has been the assessment of changes of concentration of cytokines in the blood serum after laser therapy. We do not know that there would be a thesis concerning changes of concentration of cytokines in the ill with the diagnosis of vertebrogenic algic syndrome (VAS) and the application of a low – efficient laser. 28 probands divided into 3 groups (the first group was treated by laser, the second one – “placebo laser” and the third one was a control one) have been assessed because of changes of the mentioned cytokines and the values of C-reactive protein, rheumatological factor and iron in protoplasm. We have found out that the therapeutic laser influences neither the concentrations of inflammatory cytokines in blood serum of patients with VAS nor the values of C-reactive protein, rheumatological factor and iron.

Key words: therapeutic laser – interleukin – factor of tumour necrosis – vertebrogenic algic syndrome

Souhrn

Cytokiny jsou pleiotropní molekuly a hrají rozhodující role ve spouštění imunitní reakce, procesů hematopoézy, neurogenezy atd. Ke známým cytokinům patří interleukiny, růstové faktory, faktory nádorové nekrózy a interferony. Literární zdroje dokumentují, že interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-2 (IL-2), interleukin-6 (IL-6) a faktor nádorové nekrózy α (TNF- α) jsou úzce propojeny a hrají roli při zánětu i bolesti. V současné době nízkovýkonná laserová terapie je rozšířenou a účinnou fyzioterapeutickou metodou široce používanou při rehabilitaci pacientů s obtížemi pohybového aparátu. Základní myšlenkou experimentu bylo posouzení změn koncentrace cytokinů v krevním séru po laseroterapii. Není nám známo, že by

Submitted: 2012-09-12 • Accepted: 2013-02-05 • Published online: 2013-06-18

KONTAKT: XV/2: 203–208 • ISSN 1212-4117 (Print) • ISSN 1804-7122 (Online)

v některé práci byly popsány změny koncentrace cytokinů u nemocných s diagnózou vertebrogenní algický syndrom (VAS) a aplikaci nízkovýkonného laseru. U 28 probandů rozdělených do 3 skupin (první skupina byla léčena laserem, druhá – „placebo laserem“ a třetí byla kontrolní) jsme posuzovali změny uvedených cytokinů a hodnoty C-reaktivního proteinu, revmatoidního faktoru a železa v krevní plazmě. Zjistili jsme, že terapeutický laser neovlivňuje koncentrace prozánětlivých cytokinů v krevním séru pacientů s VAS a neovlivňuje ani hodnoty C-reaktivního proteinu, revmatoidního faktoru a železa.

Klíčová slova: terapeutický laser – interleukin – faktor nádorové nekrózy – vertebrogenní algický syndrom

ÚVOD

Cytokiny jsou molekuly, s jejichž pomocí si buňky mohou vyměňovat informace mezi sebou. Funkce některých cytokinů, například IL-1, IL-2, IL-6, je těsně propojena s interakcí B-buněk a T-buněk mezi sebou (Townsend, McKenzie, 2000). IL-1 aktivuje antigen prezentující buňky a CD4+ lymfocyty, ovlivňuje diferenciaci B- a T-buněk a dalších imunokompetentních buněk a podílí se na regulaci produkce jiných cytokinů a stimulačních faktorů (Vitkovic et al., 2000; Jørgensen et al., 2008). IL-2 stimuluje proliferaci a aktivaci B-buněk a T-buněk (Xing, 2000). TNF γ jsou produkovány žírnými buňkami, podílejí se na aktivaci neutrofilů a jsou důležitou součástí ochranného účinku žírných buněk proti infestaci. Sekrece TNF-alfa a TNF-beta Th1 buňkami vede k aktivaci makrofágů, inhibuje apoptózu neutrofilů a eosinofilů a indukuje produkci vasculárními endoteliálními buňkami adhezivních molekul, na které se mohou vázat fagocyty cirkulující v krvi (Vitkovic et al., 2000; Jørgensen et al., 2008).

Tyto biologicky aktivní molekuly jsou klíčovými hráči ve spouštění imunitní odpovědi, zvláště během infekce, zánětu kloubů, ledvin, cévních a střevních onemocnění nebo během neurologických a endokrinologických autoimunitních chorob (Evans, 1993). Při zánětu dochází ke zvýšení koncentrace cytokinů, protože je produkovány rovněž buňky imunitního systému. Zánět a bolest jsou úzce spojené mezi sebou a i bolest může být vyvolána cytokiny. Je prokázána úloha IL-1 β , IL-6, TNF- α na vzniku bolesti při poškození periferních nervů (Urgellés-Lorié, 2009; Chevalier et al., 2011; Nadeau et al., 2011; Pillarisetti, 2011). Prozánětlivé cytokiny IL-1 β a TNF- α se podílejí také na přetrvávání zánětu i na vzniku bolesti u nemocných s artritidou.

Použití blokátorů těchto cytokinů se projeví ústupem zánětu (Dinarello et al., 2012; Pisetsky, Ward, 2012). Cytokiny rovněž mohou ovlivnit stav nemocného nepřímo. IL-1 a IL-2 ovlivňují expresi bolesti tím, že zánět indukují, podílejí se na zvýšení tělesné teploty a zvyšují přítok krve. Takže v tomto smyslu cytokiny mají úlohu indikátorů zánětu a bolesti.

Vertebrogenní algický syndrom (VAS) nebo též syndrom vertebrogenní bolesti (MKN 10) je definován jako bolest v různých úsecích páteře. Protože není známa etiologie tohoto syndromu, používáme pojem algický syndrom, který ale neodpovídá patologicko-anatomickému třídění chorob. Bolesti zad u nemocných s VAS jsou dané mimo jiné zánětem v oblasti výstupu míšních kořenů v meziobratlovém prostoru. Použití laseru je doporučováno s ohledem na jeho protizánětlivý a analgetický účinek. Dosud však nebylo popsáno, jak laserová terapie ovlivňuje metabolismus cytokinů u nemocných s touto diagnózou.

Cílem naší práce bylo ověřit možnosti změn cytokinů IL-1 β , IL-2, IL-6 a TNF- α u nemocných s VAS. Zároveň jsme sledovali i dynamiku C-reaktivního proteinu jako indikátoru zánětlivých procesů v těle, revmatoidního faktoru jako indikátoru autoimunitních onemocnění a železa, jehož nedostatek může ovlivnit stav nemocného.

METODIKA A CHARAKTERISTIKA SOUBORU

Studii jsme provedli u 28 probandů. U devatenácti nemocných byl diagnostikován VAS (4 muži a 15 žen). Devět jedinců (3 muži a 6 žen) tvořilo kontrolní skupinu. Průměrný věk nemocných byl 54,4 $\pm$ 11,4 let, v kontrolní skupině 48,6 $\pm$ 4,2 let. Nemocné jsme rozlosovali do dvou

skupin. U deseti nemocných (skupina L) byl aplikován v místě bolesti (lumbosakrální část) terapeutický laser při hustotě energie 3 J/cm², frekvenci 10 Hz, na plochu 10 cm². V experimentu jsme použili terapeutický laser BTL 10 osazený diodou o vlnové délce 830 nm o výkonu 200 mW. Skupině devíti nemocných (skupina P) byl aplikován „placebo laser“, kde po dohodě s výrobcem byla vyřazena z činnosti laserová dioda. Ostatní funkce přístroje byly zachovány. Všem nemocným byl aplikován laser 10×, 3× týdně

(pondělí, středa, pátek). Odběry krve byly provedeny před zahájením terapie, po 5. a 10. aplikaci. U kontrolní skupiny (skupina K) byla krev odebrána 1×. Koncentrace IL-1β, IL-2, IL-6 a TNF-α byly stanoveny kity společnosti BioVendor metodou ELISA. Statistická významnost byla vypočítána pomocí Mann-Whitneyho U testu (hladina významnosti <0,05) a testu podle Friedmana (hladina významnosti <0,05). Míru bolesti v průběhu studie jsme stanovovali pomocí NRS (numeric rating scale, číselná škála, graf 1).

Graf 1 Číselná škála

VÝSLEDKY

Z hodnot míry bolesti, udávaných nemocnými, byla spočítána střední intenzita bolesti. Trend snižování bolesti je zobrazen v grafu 2. Naměřené koncentrace cytokinů uvádíme v tabulce 1.

V tabulce 2 vyhodnocujeme změny hodnot CRP, revmatoidního faktoru a železa. Námi zjištěné změny koncentrace nebyly u žádného ze sledovaných parametrů na statisticky významné úrovni ($p < 0,05$).

Graf 2 Snižování intenzity bolesti u pokusných skupin během laserové terapie

Tabulka 1 Změny koncentrací cytokinů v krevním séru pacientů s VAS

Hodnocený parametr	Sledovaná skupina	N	Doba odběru		
			<i>před zahájením LLLT</i>	<i>po 5. aplikaci LLLT</i>	<i>po 10. aplikaci LLLT</i>
IL-1 β (pg/ml)	L	9	<0,3	<0,3	<0,3
	P	10	<0,3	<0,3	<0,3
	K	9	<0,3	<0,3	<0,3
IL-2 (pg/ml)	L	9	<10	<10	<10
	P	10	<10	<10	<10
	K	9	<10	<10	<10
IL-6 (pg/ml)	L	9	<0,1	<0,1	<0,1
	P	10	<0,1	<0,1	<0,1
	K	9	<0,1	<0,1	<0,1
TNF- α (pg/ml)	L	9	<2,3	<2,3	<2,3
	P	10	<2,3	<2,3	<2,3
	K	9	<2,3	<2,3	<2,3

Vysvětlivky: LLLT – neinvazivní laserová terapie

Tabulka 2 Dynamika změn C-reaktivního proteinu, revmatoidního faktoru a železa v krvi pacientů s VAS (p<0,05)

Hodnocený parametr	Sledovaná skupina	N	Doba odběru		
			<i>před zahájením LLLT</i>	<i>po 5. aplikaci LLLT</i>	<i>po 10. aplikaci LLLT</i>
			x $\pm$ s	x $\pm$ s	x $\pm$ s
C-reaktivní protein (mg/l)	L	9	2,10 $\pm$ 1,42	1,81 $\pm$ 1,37	3,93 $\pm$ 3,83
	P	10	1,54 $\pm$ 0,75	3,19 $\pm$ 2,16	1,49 $\pm$ 0,90
	K	9	2,14 $\pm$ 2,07	2,14 $\pm$ 2,07	2,14 $\pm$ 2,07
revmatoidní faktor (U/ml)	L	9	23,5 $\pm$ 20,6	26,78 $\pm$ 22,77	26,44 $\pm$ 21,93
	P	10	8,1 $\pm$ 1,7	8,2 $\pm$ 2,0	7,78 $\pm$ 1,53
	K	9	6,78 $\pm$ 1,14	6,78 $\pm$ 1,14	6,78 $\pm$ 1,14
železo (U/ml)	L	9	17,05 $\pm$ 3,93	14,47 $\pm$ 2,96	15,88 $\pm$ 5,58
	P	10	15,66 $\pm$ 2,28	15,83 $\pm$ 3,24	17,2 $\pm$ 3,47
	K	9	16,6 $\pm$ 5,84	16,6 $\pm$ 5,84	16,6 $\pm$ 5,84

DISKUSE

Bolesti zad jsou nejčastější diagnózou u nemocných léčených na fyzioterapeutických pracovištích. Statistiky uvádí (Back Pain Facts & Statistics, 2012), že až u 80 % jedinců v určitém období života mají tyto bolesti trvalý charakter. Příčin je celá řada, jejich výčet však není předmětem náplně tohoto sdělení. Příčinou bolesti je vždy iritace míšních kořenů a zde probíhajících ste-

rilních zánětlivých procesů. Protože bolest každého značně indisponuje, je cílem léčby ji nejen zmírnit, ale, je-li to možné, i odstranit její příčinu. Protože bolest je spojena se zánětlivým procesem, dochází i ke změnám některých působků imunitního systému. Námi sledované cytokiny patří mezi klíčové. Jejich vzájemnou komunikaci se zvyšuje jejich koncentrace v místě bolesti. Nejnovější publikace úlohu těchto cytokinů po-

tvrzují (Inoue, Nishimura, 2001; Albertini et al., 2008; Urgellés-Lorié, 2009; Yamaura et al., 2009; Chevalier et al., 2011; Nadeau et al., 2011; Pillarissetti, 2011). Terapeutický laser je s úspěchem používán na řadě pracovišť pro jeho protizánětlivý účinek (Inoue, Nishimura, 2001; Yamaura et al., 2009; Chevalier et al., 2011), lze proto předpokládat, že ovlivňuje rovněž hladinu protizánětlivých cytokinů v plazmě. Tuto skutečnost jsme se rozhodli v naší pilotní studii ověřit.

ZÁVĚR

Účinnost neinvazivní terapie ve smyslu analgetického efektu jsme potvrdili pomocí NRS. V naší studii jsme neprokázali statisticky významné změny u sledovaných cytokinů; i v průběhu léčby byla jejich koncentrace ve fyziologických hodnotách. Důvodem, že proti jiným sterilním zánětům nedochází k odpovědi zkoumaných cytokinů, je pravděpodobně skutečnost, že zánět v místě výstupu míšních kořenů má malý rozsah, a proto i odpověď organismu je minimální. Přestože námi získané výsledky nepotvrdily předpokládaný vliv terapeutického

laseru na metabolismus cytokinů, nelze vyloučit interakci světelného záření a cytokinů. Příčinou může být i nižší citlivost kitů, které jsme v naší práci použili. Rovněž jsme neprokázali možný vliv železa jako faktoru, který může ovlivnit pocit bolesti a stavu pacienta. Hodnoty CRP a revmatoidního faktoru dokumentují, že v průběhu léčby nedošlo ke zhoršení zdravotního stavu sledovaných nemocných. Revmatoidní faktor se značně liší mezi skupinami L a P. Tento faktor je nespecifický, a proto je pro jeho sledování důležitá dynamika, a ne absolutní hodnota. Statisticky významné změny dynamiky u revmatoidního faktoru prokázány nebyly ($p < 0,05$).

Další práci zaměříme na hledání modelu, který by námi získané poznatky v pilotní studii potvrdil, nebo naopak odhalil příslušný mechanismus.

Tento projekt byl podpořen grantem Studentská grantová soutěž, České vysoké učení technické v Praze (SGS11/144/OHK4/2T/17).

LITERATURA

1. Albertini R, Balbin Villaverde A, Aimbire F, Bjordal J, Brugnera A, Mittmann J, Silva JA Costa A (2008). Cytokine mRNA expression is decreased in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan-induced inflammation after low-level laser therapy. *Photomedicine and Laser Surgery*. 26/1: 19–24. ISSN 1549-5418.
2. Back Pain Facts & Statistics (2012). American Chiropractic Association. [online] [cit. 2012-08-13]. Dostupné z: http://www.acatoday.org/level2_css.cfm?T1ID=13&T2ID=68
3. Dinarello ChA, Simon A, van der Meer JWM (2012). Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*. 11/8: 633–652. ISSN 1474-1784.
4. Evans Ch (1993). Cytokines: molecular keys to homeostasis, development, and pathophysiology. *J Cell Biochem*. 53/4: 277–279. ISSN 1097-4644.
5. Chevalier X, Conrozier Th, Richette P (2011). Desperately looking for the right target in osteoarthritis: the anti-IL-1 strategy. *Arthritis Research*. 13/4: 124. ISSN 1465-9913.
6. Inoue K, Nishimura T (2001). Effects of laser irradiation on cytokine production of rheumatoid synovial cells. In: Gerber BE, Knight MTN, Siebert WE (eds.). *Lasers in the musculoskeletal system*. Springer, p. 61–64. ISBN 978-3-642-62955-6 (Print); 978-3-642-56420-8 (Online).
7. Jørgensen KT, Wiik A, Pedersen M, Hedegaard CJ, Vestergaard BF, Gislefoss RE, Kvien TK, Wohlfahrt J, Bendtzen K, Frisch M (2008). Cytokines, autoantibodies and viral antibodies in premonitory and postdiagnostic sera from patients with rheumatoid arthritis: case-control study nested in a cohort of Norwegian blood donors. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 67/6: 860–866. ISSN 1468-2060.
8. Nadeau S, Filali M, Zhang J, Kerr BJ, Rivest S, Soulet D, Iwakura Y, De Rivero Vaccari JP, Keane RW, Lacroix S (2011). Functional recovery after peripheral nerve injury is dependent on the pro-inflammatory cytokines IL-1 and TNF: implications for neuropathic pain. *Journal Of Neuroscience*. 31/35: s. 12533–12542. ISSN 0270-6474.
9. Pillarissetti S (2011). Targeting interleukin-1 beta for pain. *CNS*. 10/5: 571–575. ISSN 1996-3181.

10. Pisetsky DS, Ward MM (2012). Advances in the treatment of inflammatory arthritis. *Best Practice*. 26/2: 251–261. ISSN 1862-8559.
11. Townsend MJ, McKenzie AN (2000). Untravelling the net? Cytokines and diseases. *J Cell Sci*. 113/20: 3549–3550. ISSN 1477-9137.
12. Urgellés-Lorié LA (2009). NEFIDA: dolor y cáncer. *Dol Clin Ter*. 6/V: 22–24. ISSN 1665-3238.
13. Vitkovic L, Bockaert J, Jacque C (2000). „Inflammatory“ cytokins: neuromodulators in normal brain? *J Neurochem*. 74/2: 457–471. ISSN 1471-4159.
14. Xing Z (2000). Current understanding of macrophage type 1 cytokine responses during intracellular infection. *Histol Histopathol*. 15/1: 199–205. ISSN 1699-5848.
15. Yamaura M, Yao M, Yaroslavsky I, Cohen R, Smotrich M, Kochevar I (2009). Low level light effects on inflammatory cytokine production by rheumatoid arthritis synoviocytes. *Lasers in Surgery and Medicine*. 41/4: 282–290. ISSN 0196-8092.

✉ **Kontakt:**

Ing. Yulia Efremova, České vysoké učení technické v Praze, Fakulta biomedicínského inženýrství,
katedra lékařských a humanitních oborů, Nám. Sítná 3105, 272 01 Kladno
E-mail: efremyul@fbmi.cvut.cz