

WPLYW ŚWIATŁA CZERWONEGO NA WYTWARZANIE REAKTYWNYCH FORM TLENU PRZEZ NEUTROFILE IN VITRO

H. NAWROCKA – BOGUSZ, F. JAROSZYK

Katedra Biofizyki, Uniwersytet Medyczny, Poznań
hnawrocka@ump.edu.pl

Celem badań było zbadanie wpływu światła czerwonego na wytwarzanie reaktywnych form tlenu przez neutrofile in vitro.

Granulocyty obojętnochłonne (neutrofile) są wysoko wyspecjalizowanymi białymi krwinkami, odpowiedzialnymi za reakcję immunologiczną organizmu. Jednym z mechanizmów zabijania patogenów jest produkcja reaktywnych form tlenu (ROS), zwana „wybuchem oddechowym”. Polegający na kilkudziesięciokrotnym wzroście zużycia tlenu, wytwarzaniu i uwalnianiu na zewnątrz komórki dużych ilości anionorodnika nadadtlenkowego. Dysmutacja tego rodnika daje nadtlenek wodoru. Wybuch oddechowy powoduje więc pojawienie się w otoczeniu komórek fagocytujących dużych ilości O_2 i H_2O_2 . Pobudzone fagocyty są jednym z głównych źródeł ROS w organizmie.

Źródłem ROS wewnątrz komórki jest również oddychanie mitochondrialne. Podczas naświetlania komórek światłem widzialnym obserwuje się różne oddziaływania stymulujące ich metabolizm. Pole elektryczne indukowane światłem jest w stanie zmienić potencjał błonowy błony mitochondrialnej poprzez transfer ładunków do wnętrza lub bezpośrednio przez polaryzację dipoli błonowych. Dehydrogenaza NADH jest uważana za prawdopodobny fotoakceptor światła czerwonego. Biologiczna odpowiedź komórek na napromieniowanie światłem widzialnym jest spowodowana zmianami fizycznymi i/lub chemicznymi cząsteczki fotoakceptora, komponentów łańcucha oddechowego i oksydazy cytochromu c.

Na potrzeby badań użyto krwi od zdrowych dawców. Badane próbki były naświetlane światłem czerwonym o długości 630 nm generowanym przez urządzenie Viofor JPS przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Kształt, częstotliwość i zależności czasowe generowanych impulsów wg urządzenia Viofor JPS są zdefiniowane jako programy, oznaczone m.in. jako P2 i P3. Natomiast metody aplikacji impulsów wg użytego generatora oznaczone są jako m.in.: M1 i M2. Do badań zastosowano cztery kombinacje programów i sposobów aplikacji: M1P2, M1P3, M2P2 i M2P3. Dla każdej kombinacji wykonano naświetlanie przy trzech różnych wartościach energii światła. Wartości gęstości energii dla P2 wynosiły 1.12, 1.17 i 1.19 $[J/cm^2]$, natomiast dla P2 były: 1.17, 1.20 i 1.23 $[J/cm^2]$. Metabolizm tlenowy pojedynczej komórki oceniany był za pomocą cytometrycznej przepływowej wykorzystującej transformację DCFH-DA (dioctan 2'7'-dichlorofluorescyny) do DCF (2'7'-dichlorofluoresceina) czyli związku, który emituje

response on visible light irradiation is caused of physical and/or chemical changes of fotoacceptor, components of respiratory chain and cytochrome c oxidase.

Blood samples from healthy volunteers were used for the study. The examined samples were irradiated with the red light of 630 nm wavelength generated by the device Viofor JPS for 30 minutes at room temperature. The shape, frequency, timing dependence of impulses generated by the device are defined as programs: P2, P3. However, application methods used by generator are described as: M1 and M2. Four combinations of programs and methods of application were used for the research: M1P2, M1P3, M2P2 and M2P3. Three different values of light energy were applied for each combination. The energy density values for P2 were: 1.12, 1.17 and 1.19 [J/cm²], while for P3 were: 1.17, 1.20 and 1.23 [J/cm²]. The efficiency of the production of H₂O₂ in individual cells was estimated via the flow cytometry by using the intracellular oxidative transformation of DCHF-DA (2'-dichlorofluorescein diacetate) to the fluorescent DCF (2'-dichlorofluorescein) ($\lambda_{\text{excitation}}=498\text{nm}$, $\lambda_{\text{emission}}=522\text{nm}$). The intensity of DCF fluorescence refers to quantity of produced hydrogen peroxide. Cytofluorometer FACScan Becton Dickinson equipped with 15 mW argon laser was used in case of this research. Within steady-state neutrophils, the ROS production is low, therefore PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) was used to stimulate the respiratory burst.

For statistical analysis, Wilcoxon test and descriptive statistics were used.

A statistically significant decrease of ROS production by neutrophils was observed. The level of the decrease for the PMA stimulated neutrophils and for the unstimulated neutrophils was different and dependent on the kind of applied programs and ways of applications. According to the reports in the literature red light influences the activity of mitochondria. However, DCF fluorescence measurements showed that the respiratory burst components may also be "objective" for the red light.

sygnał fluorescencyjny ($\lambda_{\text{wzbudzenia}}=498\text{nm}$, $\lambda_{\text{emisji}}=522\text{nm}$). Do badań został użyty cytofluorymetr przepływowy FACScan Becton Dickinson wyposażony w 15 mW laser argonowy.

W stanie niepobudzonym, wytwarzanie ROS jest niskie, dlatego zastosowano stymulator wybuchu ooddechowego: PMA (12-myristynian, 13- octan forbolu).

Do analizy statystycznej wyników badań użyto programu STATISTICA 6.0. Zostały wykonane statystyki opisowe oraz test Wilcoxon.

Zaobserwowano istotne statystycznie obniżenie wytwarzania ROS przez neutrofile pod wpływem światła czerwonego. Poziom obniżenia dla stymulowanych PMA i niestymulowanych neutrofilów był różny dla różnych kombinacji programów i sposobów aplikacji oraz użytych wartości gęstości energii. Według doniesień literaturowych mitochondria są pierwszym „celem” napromieniowania światłem o długości 630 nm. Natomiast pomiary fluorescencji DCF pokazały, że elementy mechanizmu wybuchu ooddechowego mogą być również „celem” dla światła czerwonego.

THE EFFECT OF THE RED LIGHT ON REACTIVE OXYGEN SPECIES PRODUCTION BY NEUTROPHILES IN VITRO

H. NAWROCKA – BOGUSZ, F. JAROSZYK

The Department of Biophysics, University of Medical Science, Poznań, Poland
hnawrocka@ump.edu.pl

The aim of this study was to investigate the effect of the red light (630 nm) upon reactive oxygen species (ROS) production by neutrophils in vitro.

Neutrophils are highly specialized white blood cells, contributing to the immune response. One of intercellular destruction mechanisms of pathogens is production of reactive oxygen species (ROS), called respiratory burst. The mechanism of the respiratory burst consists in a more than ten times increase in the consumption of oxygen, in the production and release of large quantities of superoxide radical anion (O_2^-) outside the cell. The dismutation of this radical causes the formation of hydrogen peroxide (H_2O_2). The respiratory burst causes the formation of large quantities of O_2^- and H_2O_2 around of the phagocyte cells. Activated neutrophils are one of the main sources of ROS in the organism.

The source of hydrogen peroxide inside the cells is also mitochondrial activity. When cells are irradiated with visible wavelengths a variety of stimulatory effects are observed in their metabolism. The light-induced electric field is able to change the membrane potentials in the mitochondrial membrane by transferring charges from the outer side to the inner side or directly by a polarization of membrane dipoles. NADH dehydrogenase is considered as probably fotoacceptor of the red light. Biological cell