

Studiul își propune investigarea în sistem experimental *in vitro* a efectelor radiației laser (domeniile infraroșu și roșu) asupra culturilor celulare și interferența dintre semnalele transmise (prin modulatorii eliberați) de aceste celule asupra funcționalității leucocitelor. Ținând cont de datele existente până în prezent, care confirmă efectele benefice ale radiației laser (diminuarea procesului inflamator local, cu favorizarea refacerii mai rapide a țesuturilor sau a plăgilor), ca și de faptul că leucocitele joacă un rol primordial în apărarea imună, în lucrarea noastră s-au luat în studiu două aspecte:

- pe de o parte, a fost studiat comportamentul la iradiere al celulelor din linia endotelială umană HUVEC, provenite din colecția ATCC;
- un alt studiu s-a referit la efectul unor modulatori, eliberați în mediul de cultură de către HUVEC iradiate, asupra leucocitelor umane normale, aflate de asemenea în cultura.

Rezultatele experimentale obținute în studiul efectului radiațiilor laser la nivel celular au fost transferate într-un studiu realizat pe model experimental animal, unde iradierea laser a fost utilizată în scop terapeutic.

STUDIUL CELULELOR NORMALE ÎN CULTURĂ

Prepararea culturilor celulare - Celulele HUVEC s-au cultivat în mediul de cultură RPMI 1640, la 37°C în atmosferă de 5%CO₂, în flacoane Falcon cu suprafața de aderare de 25 cm², la o concentrație inițială de 14.500 celule / cm².

Urmărirea evoluției unei culturi celulare se face prin determinarea zilnică a concentrației celulelor cultivate. În condiții optime de cultivare am obținut pentru o cultură de celule Huvek un aspect al curbei de viabilitate celulară ilustrat în fig.1

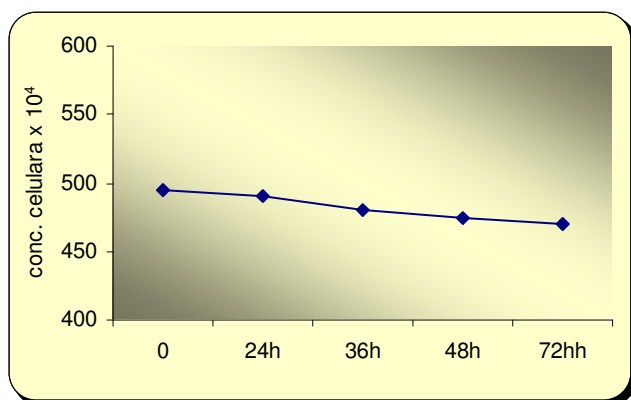


Figura 1

Aspectul curbei de concentrație celulară într-o cultură de lungă durată, din linia celulară HUVEK

Viabilitatea celulelor în cultură a fost determinată prin colorare cu albastru-tripan (20 μ l suspensie celulară + 20 μ l soluție albastru-tripan) și calculată prin raportarea numărului de celule vii la numărul total de celule. S-a obținut pentru viabilitatea celulară imaginea oferită de fig.2:

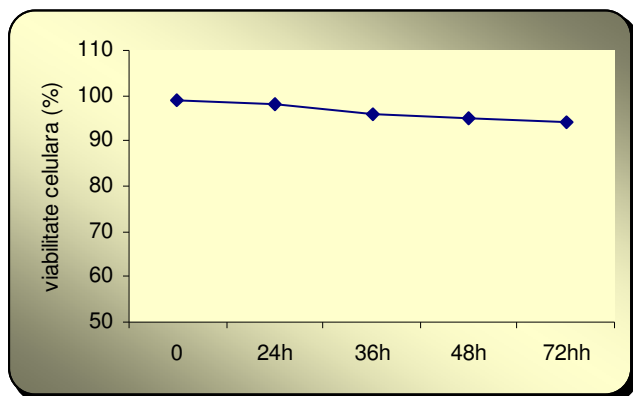


Figura 2

Dinamica viabilității celulare într-o cultură de celule aderente HUVEC

Iradieră celulelor s-a realizat în domeniu roșu ($\lambda = 650$ sau 670 nm) sau infraroșu ($\lambda = 808$ nm), timp de 900 sec sau 1800 sec, cu ajutorul unor diode laser cu emisie continuă. Schemele de iradiere au fost diferite, în funcție de scopul fiecărui studiu. Diodele laser au fost furizate de firma APEL S.R.L și INCD Optoelectronica, institutii partenere în realizarea acestui proiect.

Eliberarea de LDH în mediul de cultură este o măsură a gradului de integritate a membranei celulare, deci implicit a *viabilității celulare*. *CytoTox⁹⁶ Non-Radioactive Cytotoxicity Assay* este un test colorimetric de determinare cantitativă a LDH, enzimă citosolică stabilă ce se eliberează în mediul de cultură în urma lizei celulare. Eliberarea LDH în mediul de cultură se determină după o perioadă de incubare de 30 min la temperatura camerei, la întuneric, timp în care se realizează reducerea sării de tetrazoliu conținută în mediul de reacție, la formazan, compus de culoare roșie, detectabil colorimetric; *intensitatea colorației mediului este direct proporțională cu numărul de celule lizate*. Se determină, cu ajutorul unui cititor de plăci standard pentru 96 godeuri, absorbanta în domeniul roșu ($\lambda = 490$ nm).

Acest aspect a fost studiat în funcție de diferiți parametri:

A - momentul realizării experimentului : imediat după iradierea laser sau la 24 ore de cultivare a celulelor iradiate

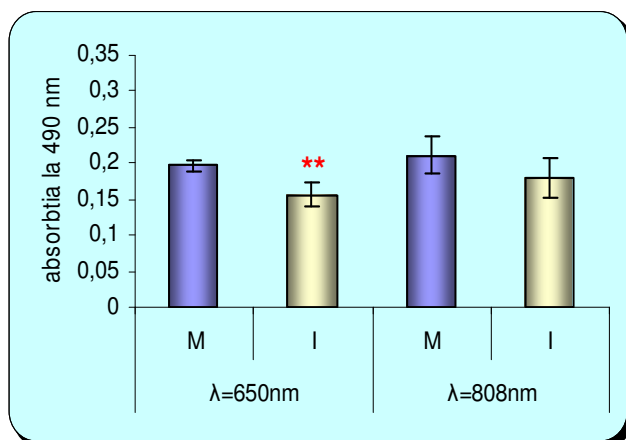


FIGURA 3

Eliberarea de LDH într-o cultură de celule HUVEC **imediat** după iradierea laser în zona roșu ($\lambda = 650$ nm) sau infraroșu ($\lambda = 808$ nm)

M = cultură neiradiată;

I = cultură iradiată;

- timp de iradiere – 1800 sec

- densitatea de energie - 46,8 J/cm²

** p < 0,05

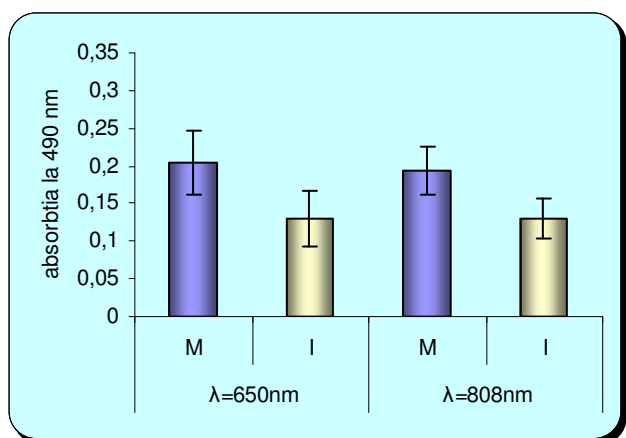


FIGURA 4

Eliberarea de LDH într-o cultură de celule HUVEC **la 24 ore după iradierea** laser în zona roșu ($\lambda = 650$ nm) sau infraroșu ($\lambda = 808$ nm)

M = cultură neiradiată;

I = cultură iradiată;

- timp de iradiere – 1800 sec

- densitatea de energie - 46,8 J/cm²

Se poate observa ca, in cazul celulelor iradiate, indiferent de momentul in care se face determinarea, cantitatea de enzima eliberata in mediu este mai mica. Acest lucru demonstrează nu numai că iradierea laser a celulelor, atât în domeniul roșu, cât și în infraroșu, nu produce leziuni majore la nivelul membranei celulare, ci din potrivă, are un efect protector la acest nivel.

B – durata timpului de expunere la radiatii laser - Studiarea efectului timpului de iradiere asupra eliberării de LDH într-o cultură iradiată în domeniul infraroșu (fig.5) arată că un timp îndelungat de iradiere are efecte benefice foarte bine evidențiate, atât la momentul zero al culturii, cât și la o cultură de 24 ore. Diferențele sunt înalt semnificative statistic la o cultură de 24 ore.

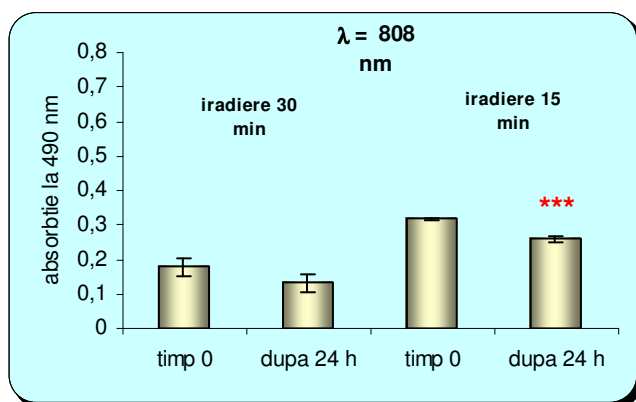


FIGURA 5

Comparatie între eliberarea de LDH într-o cultura de celule HUVEC iradiata laser în domeniul infraroșu, utilizându-se **timpi diferiți de iradiere**

*** $p < 0,001$

Studiul proliferării celulare în culturi de celule HUVEC a fost realizat cu ajutorul kitului *CellTiter 96^R AQ_{ueous} Non-radioactive Cell Proliferation Assay* (Promega). Kitul permite utilizarea unei metode colorimetrice pentru determinarea numărului celulelor viabile într-un test de proliferare. Compusul principal al kitului este (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium salt (*MTS*). *MTS* este bioreduct de către celule la un produs formazan, solubil în mediul de cultură. Absorbanța formazanului la 490nm poate fi măsurată direct în plăci-test cu 96 godeuri, fără procesări adiționale. Conversia *MTS* la formazan solubil este realizată de dehidrogenaze ce se găsesc în celulele metabolic active. *Cantitatea de formazan măsurată prin absorbanta la 490nm este direct proporțională cu numărul de celule vii din cultură.*

Determinarea gradului de proliferare a fost făcută prin aplicarea testului *MTS* la 24 ore după iradiere. În domeniul roșu ($\lambda = 650\text{nm}$), la culturile iradiate timp de 900 sec, nu există diferențe între gradul de proliferare a celulelor din culturile iradiate și neiradiate (fig.6). Același aspect apare și în cazul iradiării în domeniul infraroșu ($\lambda = 808\text{ nm}$), cu deosebirea că valorile absorbantei la 490nm sunt mai scăzute decât în domeniul roșu, deci numărul de celule viabile, implicit gradul de proliferare celulară este mai scăzut.

După 15 min de iradiere, valorile absorbantei sunt mai ridicate decât în cazul iradierii de 30 min, diferențele fiind puternic semnificative statistic ($p < 0,001$) (fig.7).

Aceste date arată că proliferarea celulară în cazul iradierii laser este dependentă mai mult de timpul de expunere a culturilor celulare la iradiere decât de faptul că o cultură a fost iradiată sau nu.

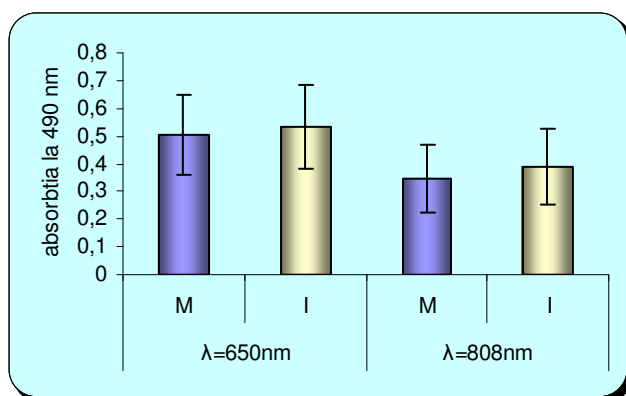


FIGURA 6

Proliferarea celulară într-o cultură de celule HUVEC iradiată laser în zona roșu, $\lambda = 650 \text{ nm}$) sau infraroșu $\lambda = 808 \text{ nm}$).

M = cultură neiradiată;

I = cultură iradiată;

timp de iradiere – 1800 sec

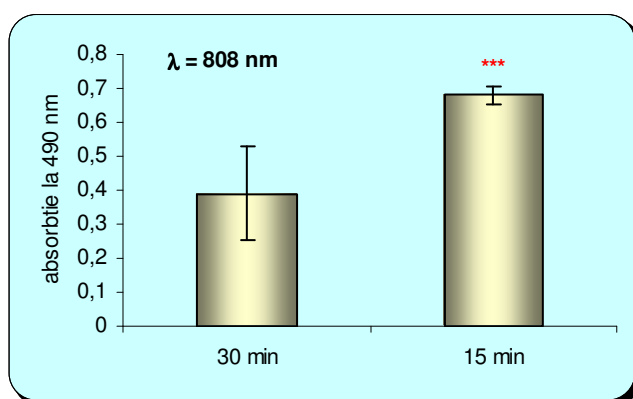


FIGURA 7

Comparatie între aspectele proliferative într-o cultură de celule HUVEC iradiată laser în domeniul infra-roșu, la diferite valori ale timpului de iradiere

*** $p < 0,001$

Studiul **EFFECTULUI MODULATORILOR ELIBERATI DE CELULELE ENDOTELIALE IRADIATE ASUPRA LEUCOCITELOR UMANE** ÎN CULTURĂ a fost inițiat pentru a căpăta o imagine asupra mecanismului de acțiune la distanță al radiațiilor laser la nivel celular. În acest scop s-a imaginat un sistem experimental în care leucocite din sângele periferic uman au fost cultivate în prezența supernatantului recoltat dintr-o cultură de celule endoteliale HUVEC iradiate laser.

Pentru experimentele noastre am utilizat celule din sângele periferic al unor subiecți umani normali. Astfel, sângele proaspăt a fost recoltat prin venopuncție în flacoane sterile heparinizate. Limfocitele și celulele polimorfonucleare (PMN) au fost separate prin centrifugare în gradient, utilizând SEPCEL (densitate specifică = 1,077).

Astfel, o cultură de celule endoteliale de 72 ore a fost iradiată laser în domeniul roșu ($\lambda = 650 \text{ nm}$) sau infraroșu ($\lambda = 808 \text{ nm}$), timp de 1800 sec; o cultură similară, dar neiradiată, a constituit martorul. Imediat după iradierea culturilor, s-au recoltat 50 μl supernatant din cultura iradiată și cultura martor, care au fost utilizați în stimularea *immediată* a leucocitelor (supernatant A). Celulele

endoteliale au fost cultivate în continuare încă 24 ore, după care s-au recoltat din nou 50 μ l supernatant din cultura iradiată și cultura martor (supernatant B), utilizat pentru studiul *efectului tardiv* al modulatorilor eliberați din celulele endoteliale în urma iradierii.

Leucocitele în cultură se comportă diferit în prezența acestor modulatori, în primul rând *în funcție de domeniul în care au fost iradiate celulele Huvec*. Astfel, la iradierea în domeniul roșu (fig. 8), supernatantul celulelor endoteliale, recoltat la momentul zero al iradierii (supernatant A) determină o eliberare mai mare de LDH din leucocite dacă se află în cantitate mai mare (efect de concentrație). Raportând la control (suspensie celulară fără supernatant din cultura de celule endoteliale) valorile obținute în culturile cu supernatant A (din cultura iradiată sau neiradiată), se observă diferențe înalt semnificative între aceste valori, atât la momentul zero, cât și după 24 ore de la iradiere. De asemenea, diferențe semnificative există și între culturile martor (cu supernatant A sau B dintr-o cultură de celule Huvec neiradiate) și culturile de leucocite aflate sub efectul supernatantului din cultură de celule Huvec iradiate ($p < 0,05$).

Utilizarea supernatantului culturilor de celule endoteliale iradiate în domeniul infraroșu induce un comportament oarecum diferit în cultura de leucocite (Fig.9). Astfel, supernatantul A nu modifică aproape deloc cantitatea de LDH eliberată de leucocitele în cultură, în timp ce în cazul utilizării supernatantului B apar diferențe pregnante între control, pe de o parte și celulele aflate în prezența supernatantului provenit de la o cultură de celule endoteliale iradiată sau nu. Cantitatea de enzimă

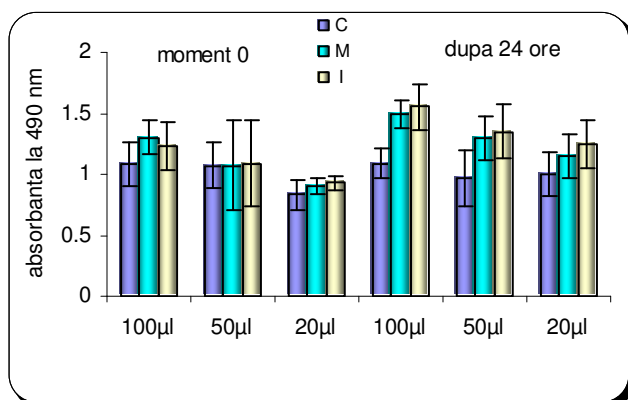


FIGURA 8

Eliberarea de LDH într-o cultură de leucocite sub efectul supernatantului unei culturi de celule HUVEC recoltat imediat după iradiere laser (650 nm) a celulelor Huvec (moment 0) sau la 24 h după iradiere

Semnificațiile statistice ale rapoartelor

100 μ l	C/M	$p < 0.005$	mom 0
50 μ l	C/I	$p < 0.05$	
20 μ l	M/I	$p < 0.05$	
100 μ l	C/M	$p < 0.005$	24h
50 μ l	C/I	$p < 0.005$	
20 μ l	M/I	$p < 0.05$	

- **C** – control (50 μ l suspensie celulară + 200 μ l mediu RPMI)
- **M** – martor (50 μ l suspensie celulară + 100 μ l supernatant din cultură de celule endoteliale neiradiate + 100 μ l mediu RPMI)
- **I** – iradiere (50 μ l suspensie celulară + 100 μ l supernatant din cultură de celule endoteliale iradiate + 100 μ l mediu RPMI)

eliberată este într-un raport direct proporțional cu cantitatea de supernatant adăugat în mediul de reacție.

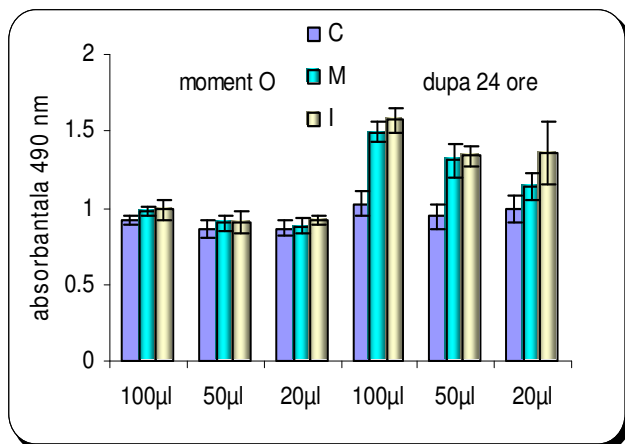


FIGURA 9

Eliberarea de LDH într-o cultura de leucocite sub efectul supernatantului unei culturi de celule HUVEC, recoltat imediat după iradiere laser (808 nm) a celulelor Huvec (moment 0) sau la 24 h după iradiere

Semnificatiile statistice ale rapoartelor

100 µl	C/I	p<0.05
	I/M	p<0.1

- **C** – control (50 µl suspensie celulară + 200 µl mediu RPMI); **M** – martor (50 µl suspensie celulară + 100 µl supernatant din cultură de celule endoteliale neiradiate + 100 µl mediu RPMI); **I** – iradiere (50 µl suspensie celulară + 100 µl supernatant din cultură de celule endoteliale iradiate + 100 µl mediu RPMI)

În plăcile-test rămase după recoltarea celor 50 µl mediu necesari determinării enzimei, s-a efectuat pe leucocitele în cultură, *studiul proliferării celulare*, cu ajutorul testului MTS. Studiul a fost realizat, ca și în cazul precedent, pentru cele două domenii de iradiere, roșu și infraroșu.

Utilizând supernatantul unei culturi de celule endoteliale Huvec iradiate în domeniul roșu (fig.10), se poate observa că, dacă acest supernatant a fost recoltat imediat după iradierea celulelor, el induce în cultura de leucocite o pierdere celulară mai pronunțată decât dacă a fost recoltat după 24 de ore de cultivare a celulelor iradiate, fenomen evidențiat prin valoarea mai mare a absorbantei la 490 nm. Supernatantul culturii de celule Huvec iradiate și cultivate 24 ore permite o proliferare celulară pusă în vedere de scăderea valorilor de absorbție la 490 nm. În ambele situații (moment 0 sau după 24 ore) supernatantul celulelor Huvec neiradiate determină același efect asupra leucocitelor, ceea ce este demonstrat de valori egale ale absorbției, indiferent de cantitatea de supernatant adăugată culturii de leucocite.

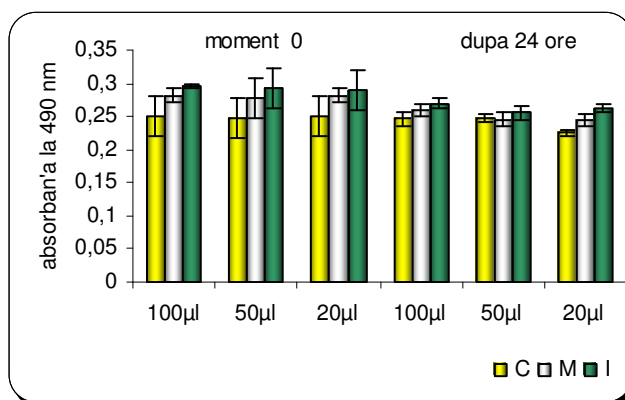


FIGURA 10

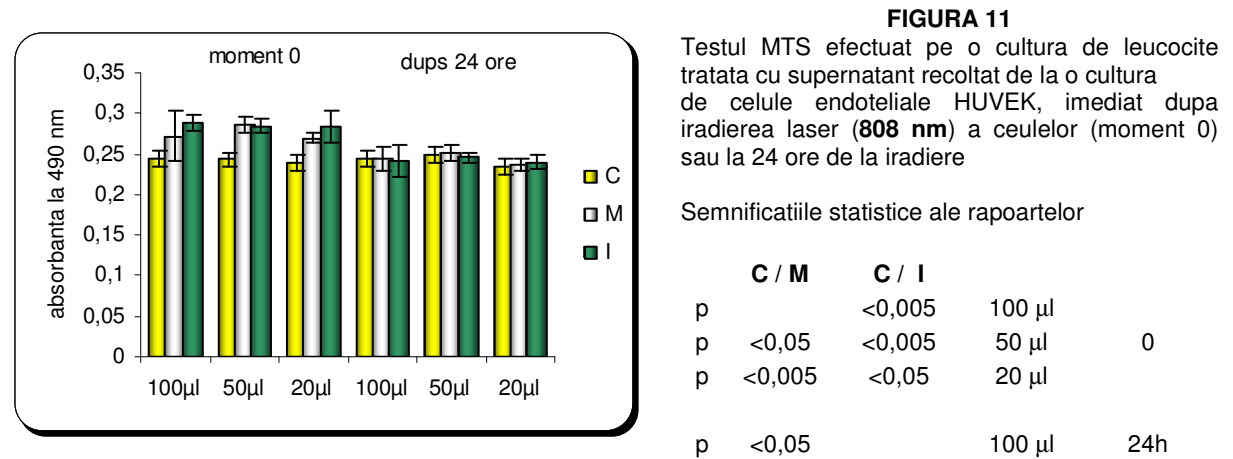
Testul MTS efectuat pe o cultură de leucocite tratată cu supernatant recoltat de la o cultură de celule endoteliale HUVEC, imediat după iradierea laser (650 nm) a celulelor (moment 0) sau la 24 ore de la iradiere

Semnificatiile statistice ale rapoartelor:

	C/M	C/I	M/I		
p		<0.1		100 µl	0
p	<0.1	<0.0001	<0.1	20 µl	24h

- **C** – control (50 µl suspensie celulară + 200 µl mediu RPMI); **M** – martor (50 µl suspensie celulară + 100 µl supernatant din cultură de celule endoteliale neiradiate + 100 µl mediu RPMI); **I** – iradiere (50 µl suspensie celulară + 100 µl supernatant din cultură de celule endoteliale iradiate + 100 µl mediu RPMI)

Fenomenul este similar si in cazul iradierii culturii de celule epiteliale Huvec in domeniul infrarosu (fig.11)



- **C** – control (50 µl suspensie celulară + 200 µl mediu RPMI); **M** – martor (50 µl suspensie celulară + 100 µl supernatant din cultură de celule endoteliale neiradiat + 100 µl mediu RPMI); **I** – iradiere (50 µl suspensie celulară + 100 µl supernatant din cultură de celule endoteliale iradiat + 100 µl mediu RPMI)

Aceste experimente au facut evident faptul ca in cultura de celule endoteliale Huvec se elibereaza, in urma cresterii celulare, factori cu capacitate modulatorie asupra altor tipuri celulare. Radiatiile laser fac ca proprietatile modulatorie ale acestor factori sa se modifice, cu repercursiuni asupra celulelor pe care au capacitatea de a le controla.

STUDIUL EFECTELOR IRADIERII LASER PE MODEL ANIMAL

În vederea transpunerii rezultatelor obținute la nivel celular, pe model experimental animal, au fost inițiate, împreună cu partenerii de la INCD Optoelectronica, studii pe culturi de celule endoteliale Huvec, de 72 ore, iradiate după schema de mai jos; rezultatele obținute în urma acestor studii au fost aplicate în evaluarea efectului terapeutic al radiațiilor laser la animale purtătoare de leziuni musculare.

Tabel 1	λ (nm)	Mod emisie	Putere	Timp iradiere/ sesiune	Timp total iradiere / zi	Schema de iradiere	Nr. placă
Varianta 1	670	continuu	15 mW	600 sec	600 sec	Mod: iradiere directă; Frecvența sesiunilor de iradiere: o singură sesiune / zi Nr.total de sesiuni: 3	1-3
Varianta 2	670	continuu	15 mW	300 sec	600 sec	Mod: iradiere directă; Frecvența sesiunilor de iradiere: 2 sesiuni/zi cu pauză de o oră între ele Nr.total de sesiuni: 6	4-6
Varianta 3	670	continuu	15 mW	200 sec	600 sec	Mod: iradiere directă Frecvența sesiunilor de iradiere: 3 sesiuni/zi cu pauză de 30 min între ele Nr.total de sesiuni: 9	7-9
Varianta 4	-	-	-	-	-	Neiradiate (martor)	10 - 12

Iradierea celulelor s-a făcut timp de 3 zile consecutiv în plăci de cultură cu diametrul de 35mm, ce conțineau 12.500 celule la momentul de debut al cultivării. După finalizarea determinărilor fizice, culturile au fost fotografiate, tripsinizate și s-a determinat viabilitatea celulară și numărul total de celule în cultură.

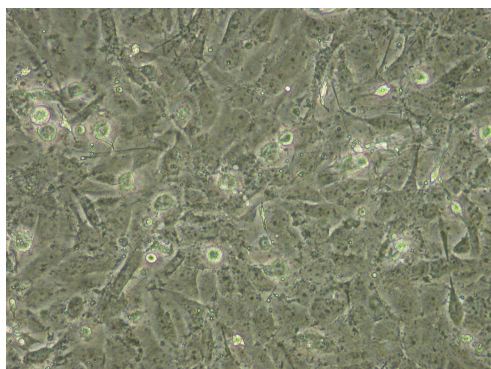


Figura 12

Cultura de 144 ore din celule Huvec neiradiate

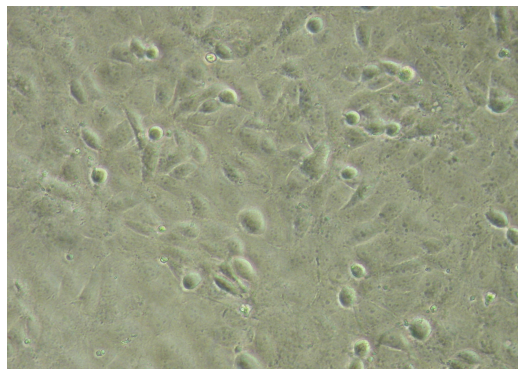


Figura 13

Cultura de 144 ore din celule HUVEC iradiate conform variantei 1

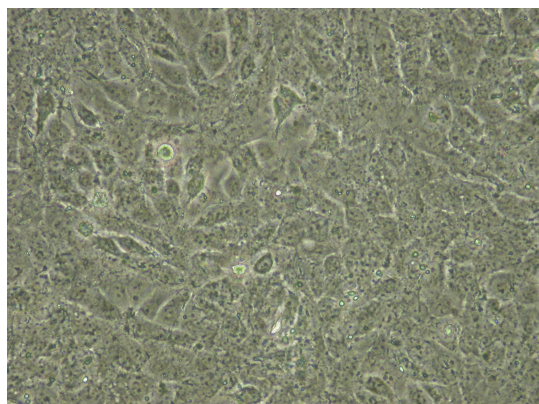


Figura 14

Cultura de 144 ore din celule HUVEC iradiate conform variantei 2

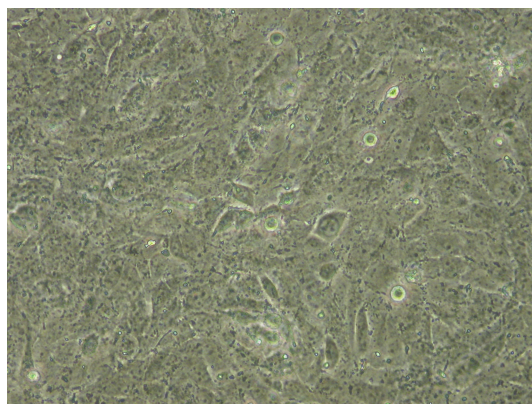


Figura 15

Cultura de 144 ore din celule HUVEC iradiate conform variantei 3

Determinarea viabilității celulare și a numărului total de celule/placa de cultură la finele experimentului a dus la următoarele rezultate (tabel 2):

Tabel 2	Varianta experimentală	Viabilitate celulară	Nr. total celule/placă
1	Celule neiradiate	94,2%	$2,8 \times 10^6$
2	Celule iradiate 600 sec într-o singură priză	97,6%	$3,3 \times 10^6$
3	Celule iradiate 600 sec în două prize	96,2%	$2,7 \times 10^6$
4	Celule iradiate 600 sec în trei prize	94,4%	$2,2 \times 10^6$

După cum se poate constata, în condițiile noastre experimentale varianta cea mai bună de iradiere este aceea în care celulele sunt iradiate într-o singură sesiune / zi, aceasta ducând la o viabilitate superioară celei din cultura martor și la o proliferare celulară crescută.

Studiul radiațiilor laser pe **model experimental** a fost realizat pe șobolani din linia outbred Wistar în vârstă de 10-12 săptămâni și greutate de 150 ± 10 g.

Sistemul experimental a fost realizat conform Procedurii Operaționale Specifice (POS 09) din sistemul procedural al Institutului Național Victor Babeș. Animalele de experiență au fost întreținute conform prevederilor legale care sunt cuprinse în Legea nr 305 /2006 privind ratificarea Convenției europene pentru protecția animalelor vertebrate utilizate în experimente și alte scopuri științifice, adoptată la Strasbourg la 18 martie 1986, și în protocolul de amendare a acesteia adoptat în iunie

1998. Experimentele au fost aprobate de Comisia de etică a INCD « V. Babeș » conform deciziei 1185/29.07.2004

Proceduri experimentale :

- cântărire, marcarea individuală, epilare la nivelul pulpei picior posterior drept;
- inducere leziune musculară (pensare treapta 1) la nivelul pulpei picior posterior drept;
- efectuarea măsurători și tratamente cu aparatură și personal de la INCD- Optoelectronica

Iradieră animalelor normale și traumatizate s-a realizat conform celor trei scheme de tratament folosite în cazul culturilor celulare și s-a urmărit timp de 2 săptămâni comportamentul animalelor de experiență. Au fost luați în considerare următorii parametri comportamentali:

- variația în greutatea corporală
- mobilitatea
- viteza de vindecare a răni

Tabel 1	λ (nm)	Mod emisie	Putere	Timp iradiere/sesiune	Timp total iradiere / zi	Schema de iradiere
Varianta 1	670	continuu	15 mW	600 sec	600 sec	Mod: iradiere directă; Frecvența sesiunilor de iradiere: o singură sesiune / zi Nr.total de sesiuni: 3
Varianta 2	670	continuu	15 mW	300 sec	600 sec	Mod: iradiere directă; Frecvența sesiunilor de iradiere: 2 sesiuni/zi cu pauza de o ora între ele Nr.total de sesiuni: 6
Varianta 3	670	continuu	15 mW	200 sec	600 sec	Mod: iradiere directă Frecvența sesiunilor de iradiere: 3 sesiuni/zi cu pauza de 30 min între ele Nr.total de sesiuni: 9
Varianta 4	-	-	-	-	-	Neiradiate (martor)

S-a putut observa că la animalele rănite, datorită dispariției apetitului, imediat după rănire greutate corporală a scăzut cu 15-20%. Pe măsură ce rana se vindeca, creșterea în greutate s-a realizat cu viteză mai mare, astfel că după două săptămâni animalele au ajuns la o greutate de $180 \pm 16g$. Mobilitatea șobolanilor a fost, de asemenea monitorizată. Deși comportamentul animalelor lezate a fost, în linii mari, același în cazul celor 3 scheme de iradiere folosite în tratament (tabel 1), o oarecare diferență a fost observată în cazul vitezei de vindecare a răni care, în situația în care s-a utilizat schema de iradiere în care celulele sunt iradiate trei zile consecutiv, în două prize zilnice, timp de 600 secunde (variante experimentală 2). Acest comportament este în concordanță cu rezultatele

determinărilor efectuate de partenerul de la INCD Optoelectronica, care arată o revenire spre normal a spectrelor de reflexie difuză mai vizibilă în cazul utilizării schemei a doua de iradiere.

În tabelul 1 sunt redate cele trei variante de iradiere utilizate, în care parametrul variabil a fost *modalitatea de aplicare a radiațiilor* la nivelul leziunii musculare. Animalele, împărțite pe loturi, au fost iradiate cu dioda laser ($\lambda = 670\text{nm}$, 15 mW) timp de 3 zile consecutiv, cu aceeași doză totală de radiații și același timp total de iradiere, diferențele dintre loturi fiind date de modul în care au fost aplicate radiațiile și de densitatea de energie pe priză de iradiere; animalele au fost sacrificate la 48 ore, 4 zile și 8 zile de la inducerea leziunii.

1. lotul 1 (T și B) – primește o singură priză de iradiere zilnic;
2. lotul 2 (T și B) – aceeași cantitate de radiații ca la lotul 1, dar repartizată în 2 prize zilnice;
3. lotul 3 (T și B) – aceeași cantitate de radiații repartizate însă în 3 prize / zi.
4. lotul 4 (T și B) – martor, animale neiradiate

Animalele au fost monitorizate pe parcursul unei săptămâni de la producerea leziunilor și s-a urmărit viteza de vindecare a rănii, ca și aspectele histologice apărute în cursul procesului de reparare musculară.

Concluzionând datele experimentale obținute, se poate afirma că există o variabilitate a răspunsului organismului la acțiunea radiațiilor laser, dată atât de factori legați de statusul animalelor de experiență (în cazul nostru, vârsta animalelor), cât și de variația parametrilor de iradiere. Acești factori determină răspunsuri diferite; astfel, în condițiile noastre experimentale, animalele tinere sunt sensibile la o schema de iradiere care utilizează aplicare a două prize de iradiere / zi, cu un număr total de 6 prize și o densitate de energie de $4,5 \text{ J/cm}^2$, în timp ce animalele bătrâne răspund mai bine la o schemă ce cuprinde 3 prize de iradiere zilnic, cu un număr total de 9 prize și o densitate de energie de 3 J/cm^2 . De notat faptul că timpul total de iradiere este, în ambele situații, același – 600 sec.

Aceste comportamente diferite ale organismului duc la concluzia că în stabilirea schemelor de iradiere utilizate în terapia cu laseri de mică putere trebuie ținut seama nu numai de caracteristicile sondelor utilizate, ci și de starea generală a pacientului supus acestei terapii.

CONCLUZII

- iradierea laser a celulelor, atât în domeniul roșu, cât și în infraroșu, nu produce leziuni majore la nivelul membranei celulare, ci din potrivă, are un efect protector la acest nivel.
- Nu există diferențe între efectul iradierii în domeniul roșu și al iradierii în domeniul infraroșu, absorbția la 490 nm înscriindu-se în aceeași plajă de valori
- Un timp îndelungat de iradiere are efecte benefice foarte bine evidențiate, atât la momentul zero al culturii, cât și la o cultură de 24 ore. Diferențele sunt înalt semnificative statistic la o cultură de 24 ore.
- Proliferarea celulară în cazul iradierii laser este dependentă mai mult de timpul de expunere a culturilor celulare la iradiere decât de faptul că o cultură a fost iradiată sau nu.
- În cazul celulelor provenite din sângele periferic uman se evidențiază o proliferare slabă în cazul celulelor PMN și valori mari de incorporare a radionuclidului în limfocitele, demonstrând marea capacitate proliferativă a acestora din urmă.
- În cultura de celule endoteliale Huvec se eliberează, în urma creșterii celulare, factori cu capacitate modulatorie asupra altor tipuri celulare. Radiațiile laser fac ca proprietățile modulatorie ale acestor factori să se modifice, cu repercursiuni asupra celulelor pe care au capacitatea de a le controla.
- Aceasta din urmă concluzie demonstrează capacitatea de control la distanță care poate fi exercitată de iradierea cu radiații laser de mică putere.
- Rezultatele obținute în studiile efectuate pe model experimental indică o dependență a procesului de reparare a leziunilor atât de vârstă, cât și de modalitatea de iradiere a animalelor.
- În stabilirea schemelor de iradiere utilizate în terapia cu laseri de mică putere trebuie ținut seama nu numai de caracteristicile sondelor utilizate, ci și de starea generală a pacientului supus acestei terapii.

Rezultatele experimentale obținute prin iradierea culturilor celulare, coroborate cu cele ce reies din utilizarea terapiei laser în vindecarea rănilor la animale de experiență au arătat că efectele radiației laser de mică putere la nivel celular și tisular sunt similare și depind de lungimea de undă utilizată, de timpul de iradiere, ca și de schemele de iradiere. Extinderea aplicării valorilor diferiților parametri de iradiere care, în cazul culturilor celulare sau a modelului animal au dat rezultate satisfăcătoare, în terapia laser pe subiecți umani lasă loc la discuții și interpretări și, în orice caz, la necesitatea efectuării a mult mai multe experimente, cu mult mai multe variabile și cu interpretări statistice foarte riguroase.