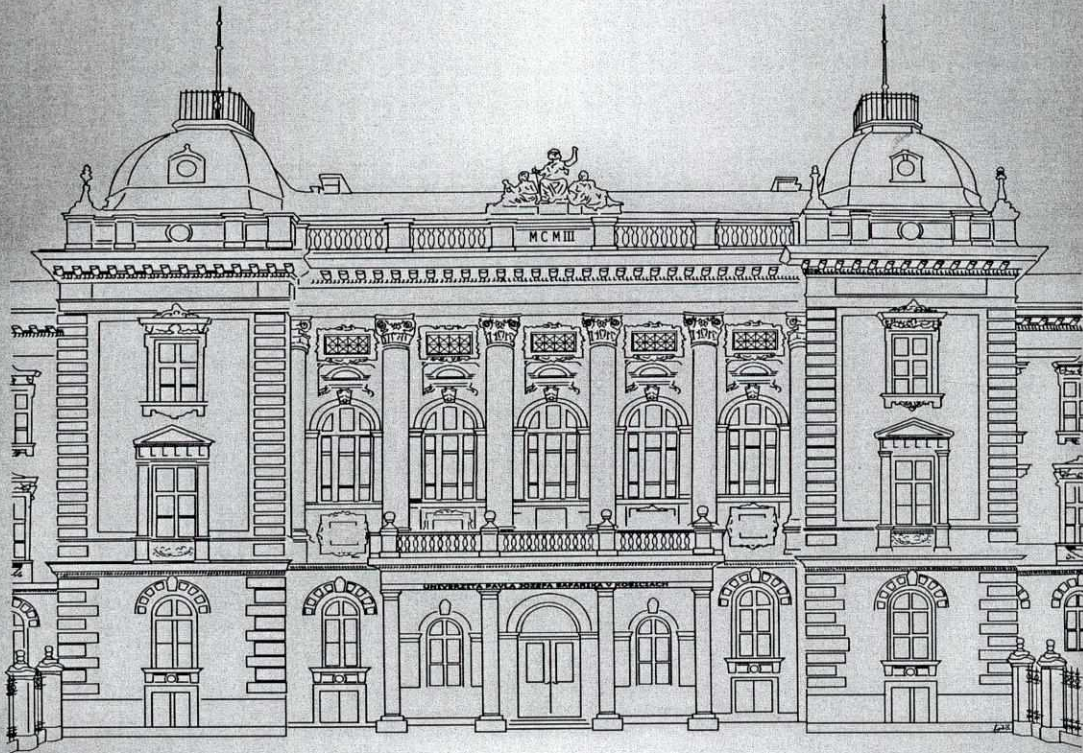




FOLIA MEDICA CASSOVIENSIA



UNIVERSITAS ŠAFARIKIANA

Tomus 67, No. 2, 2012

Analýza krvi a proteómu krvnej plazmy neožiarených a ožiarených potkanov použitím nízko-intenzívneho lasera

Veronika Kováčová¹, Peter Bober¹, Martina Chmelová¹, Ivan Talian¹, Elena Tóthová¹, Ján Hrubovčák³, Darina Petrášová², Imrich Géci¹, Ján Sabo¹

¹Ústav lekárskej a klinickej biofyziky, Lekárska fakulta UPJŠ, Košice, ²Centrálny zvieratník, Lekárska fakulta UPJŠ, Košice, ³Urologická klinika, UNLP, Košice

Positívny účinok laserového žiarenia na živé tkanivá je dokázaný vo viacerých štúdiách. V našej práci sme sa zaoberali zmenami v zložení krvi a zmenami v proteóme krvnej plazmy potkanov po aplikácii laserového žiarenia. Na výskum sme použili potkany rodu Wistar z ktorých jedna skupina tvorila kontrolnú vzorku (neožarované potkany). Druhú skupinu potkanov sme počas 9 dní ožarovali laserom (vlnová dĺžka 830 nm, výkon 450 mW a dávkou 10 J.m²). Po ukončení experimentu sme im odobrali vzorky krvi zo srdca a následne sme uskutočnili hematologické testy. Tieto testy preukázali, že u ožarovaných potkanov boli zvýšené hodnoty leukocytov zo 7,06 × 10⁹/L na 9,21 × 10⁹/L v porovnaní s neožiarenými potkanmi. Lymfocyty, ktoré tvoria jednu z podskupín leukocytov vzrástli pri ožarovaných potkanoch o viac ako 54 %. Okrem hematologických testov sme vykonali aj proteomickú analýzu krvnej plazmy, kde sme zistili zvýšenú prítomnosť imunoglobulínov gamma (IgG) v ožarovaných vzorkách. Pravdepodobnou príčinou zvýšenia leukocytov a imunoglobulínov po aplikácii laserového žiarenia je zvýšenie obranyschopnosti organizmu. Leukocyty rovnako ako imunoglobulíny sú totiž dôležité zložky imunitného systému.

Kľúčové slová: proteomická analýza, krvná plazma, imunoglobulíny, MALDI-MS, dvoj-rozmerná gélová elektroforéza

Key words: proteomics analysis, blood plasma, immunoglobulins, MALDI-MS, two-dimensional gel electrophoresis

Úvod

Vzorky krvi predstavujú vynikajúci model pre štúdium jednotlivých ľudských orgánov a interakcií krvných komponentov po aplikácii žiarenia. Bunkové zložky krvi sa relatívne ľahko izolujú [15]. Okrem bunkových elementov krv obsahuje aj nebunkovú zložku tzv. plazmu. Plazma je bohatým zdrojom proteínov, ktoré sa podieľajú na dôležitých funkciách v tele. Proteínový profil plazmy kolíše s fyziologickými a patologickými podmienkami [1]. Kvôli širokému dynamickému rozsahu abundančných proteínov je proteínový profil krvnej plazmy náročný na analýzu [8]. Plazma obsahuje množstvo proteínov v širokom koncentračnom rozsahu. Najčastejšie používanou technikou pre separáciu takéhoto komplexu zmesi proteínov je dvojdimenzionálna gélová elektroforéza (2 DE) [2,5,14]. Elektroforéza spolu s hmotnostnou spektrometriou predstavujú základné metódy proteomického výskumu.

Laserové technológie boli skúmané celé desaťročia a pozitívny účinok lasera na organizmus je preukázaný mnohými klinickými a tiež experimentálnymi štúdiami [3,13,16]. Avšak tieto štúdie neposkytujú presné informácie o vplyve laserového žiarenia na molekulovej úrovni [4]. Mechanizmus účinku laserového žiarenia je spojený so schopnosťou bunky absorbovať fotón, a premeniť energiu na adenosíntrifosfát (ATP). Zložky buniek, ktoré majú schopnosť absorbovať fotóny sa nazývajú chromofóry alebo fotoakceptory. Nachádzajú sa v mitochondriách a bunkovej membráne [9]. Zrýchľovaním stimulácie produkcie ATP, dochádza k zvýšenej podpore delenia buniek a bunkovej mitóze.

Tieto procesy poukazujú na biostimulačný účinok lasera. Laserové žiarenie podporuje okrem iného aj hojivý proces [6] a zlepšuje prirodzené obranné mechanizmy, tak že dochádza k aktivácii imuno-komplexných systémov T a B lymfocytov [10]. V štúdiách Mokmeli a kol. [12], alebo Fenyó [7] sa uvádza, že B-lymfocyty, ktoré produkujú proteíny humorálnej imunity, sú spolu s T-lymfocytmi aktivované laserovým žiarením. Okrem produkcie interleukínov sa pozoroval aj nárast počtu pomocných T-lymfocytov v rámci ich subpopulácie. Sú to Th lymfocyty, ktoré aktivujú B-lymfocyty k produkcii protilátok. Týmto zisteniami je možné čiastočne vysvetliť moduláciu humorálnej odpovede. Laserové žiarenie týmto spôsobom ovplyvňuje sérové hladiny imunoglobulínov, pričom bol pozorovaný predovšetkým nárast koncentrácie proteínov IgM, IgA a IgG. Mester [11] uvádza, že hodnoty sledovaných proteínov (IgG, IgA, IgM) namerané pred a po ožarovaní vzrástli. Zatelli a kol. [18] zistil vo vzorkách séra po aplikácii laserom nárast imunoglobulínov IgG (35 %), IgA (29 %) a IgM (49 %).

Cieľom tejto štúdie bolo popísať účinok nízko-intenzívneho lasera (830 nm, 450 mW, 10 J.m²) na základe hematologických testov krvi a proteomickej analýzy krvnej plazmy ožiarených a neožiarených potkanov rodu Wistar.

Metódy

Na experiment sa použili dospelé samce potkanov rodu Wistar z jedného vrhu. Jedinca boli chované za štandardných podmienok pri izbovej teplote 20-22 °C. Bol im umožnený voľný príjem tekutín a potravy.

Podmienky a výkon experimentu zodpovedali požiadavkám na ochranu zvierat používaných na pokusné a iné účely v súlade s paragrafom 8 NV SR č. 23/2009 Z.z. Experiment bol schválený Etickou komisiou na LF UPJŠ.

Experimentálny protokol. Potkany v experimente boli rozdelené do dvoch skupín. Prvú skupinu tvorili neožarované potkany a predstavovali kontrolnú vzorku (počet zvierat = 2). Potkany z druhej skupiny boli ožarované rovnomerne z dorzálnej strany 3x30 minút denne v rovnomerných intervaloch po dobu 9 dní laserom s vlnovou dĺžkou 830 nm a výkonom 450 mW (počet zvierat = 2). Na záver experimentu boli uspaté hlbokou anestéziou ketamínu v kombinácii so xylozínom a vzorka krvi sa odobrala zo srdca. Krv sa vložila do skúmavky s antikoagulantom (1 % Na₂EDTA vo fyziologickom roztoku) a následne sa centrifugovala 10 min pri 2000 g a 4 °C. Po centrifugácii sa rozdelila na jednotlivé frakcie. Cieľom našich experimentov bola horná frakcia krvi plazma.

Izolácia proteínov z krvi. K vzorke plazmy (200 µl) sa pridal roztok 10 % kyseliny trichlóroctovej v acetóne (10 % TCA-acetón) (800 µl) za účelom vyzrážania proteínov. Vzorka sa inkubovala pri -20 °C 1 h. Po inkubácii sa centrifugovala 5 min pri 4 °C a 14 000 g. Supernatant sa odsal a k peletu proteínov sa pridal 1 ml acetónu na ich prečistenie. Vzorka proteínov sa inkubovala 1 h pri 4 °C. Následne sa centrifugovala 5 min pri 4 °C a 14 000 g. Supernatant sa odsal a pelet sa nechal vysušiť vo vákuovom koncentrátore pri 37 °C 2 min. Proteíny sa rozpustili v rehydratačnom roztoku obsahujúcom 7 M močovinu, 2 M tiomočovinu, 35 mM TRIS, 65 mM ditiotreititol (DTT), 2 % CHAPS.

Dvojrozmerná gélová elektroforéza (2 DE). 125 µl vzorky obsahujúceho 70 µg proteínov sa naniesli na lineárne Imobilizované pH gradientové (IPG) prúžky 7 cm (pH 4-7), ktoré boli pasívne rehydratované cez noc pri laboratórnej teplote. Na druhý deň boli prenesené na platničku izoelektrického fokusátora (IEF) a zaliate minerálnym olejom. Podmienky fokusácie boli 250 V 1 h, 4000 V 20h pri lineárnom gradiente. Po 21 h sa IPG prúžky premývali 10 min v prvom ekvilibračnom roztoku obsahujúcom (6 M močovinu, 2 % SDS, 0,375 M Tris - HCl pH= 8,8, 20 % glycerol, 130 mM DTT). Po 10 minútach sa premývali v druhom ekvilibračnom roztoku, ktorého zloženie bolo totožné s prvým ekvilibračným roztokom len DTT sa nahradil jodoacetamidom. IPG prúžky sa vložili do agarózy, ktorá sa naniesla na 4 % štartovací gél pozostávajúci z (10 % peroxosíran amóniový (APS), 0,5 M Tris - HCl pH = 6,8, TEMED a bis - akrylamid). Proteíny sa separovali na 12,5 % polyakrylamidovom gély, ktorého zloženie bolo totožné so 4 % gélom len sa použil 1,5 M Tris - HCl pH = 8,8. Separácia proteínov sa uskutočnila pri 400 mA a 200 V približne za 45 min na prístroji mini- PROTEAN 3 cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Po ukončení elektroforézy bol 4 % gél odstránený a 12,5 % gél bol farbený 1 h v Coomassie brilliant blue G-250. Aby bolo možné proteíny vizualizovať muselo sa Coomassie vymyť z gélu pomocou deionizovanej vody 3

krát počas 20 min. Potom sa gély oskenovali pomocou denzitometra GS-800 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). 2 DE proteínové mapy gélov sa analyzovali použitím komerčného softvéru (PDQuest 2-D Analyzačný Softwér, Bio-Rad laboratories, UK).

Digescia proteínov. Škvrnky sa vyrezali z gélu a preniesli sa do 500 µl skúmaviek. Škvrnky vyrezané z gélu sa premyli 3 krát s 200 µl roztoku obsahujúcom 50 % ACN/25mM hydrogenuhličitan amónny do odfarbenia gélových škvŕn. Supernatant sa odstránil a kúsok gélov sa pokryli 100 % ACN. Po niekoľkých minútach zbeleli a ACN sa odstránil. Gélové škvrnky sa vysušili na vzduchu. Následne sa k nim pridalo 25 µl roztoku obsahujúceho 12,5 µg trypsinu rozpusteného v 25 mM hydrogenuhličitan amónnom. Po 60 min na ľade sa trypsinový roztok, ktorý sa neadsorboval do gélov odstránil. Ku gélom sa pridal 25 mM hydrogenuhličitan amónny (20 µl) a vzorky sa inkubovali 16 h pri 37 °C. Vzorky sa centrifugovali pri 14 000 g počas 5 min a supernatant sa preniesol do 500 µl skúmavky. Peptidy sa extrahovali dvakrát pomocou 50 % ACN a 0,1 % TFA (20 µl). Následne sa miešali 30 min a centrifugovali pri 14 000 g počas 5 min. Vzorky sa zahustili na objem 10 µl.

Identifikácia proteínov pomocou MALDI-MS. Roztok z extrahovaných peptidov bol zmiešaný s roztokom matrice (6 mg/ml kyseliny α-kyano-4-hydroxyškoricovovej v acetonitril/metanol/0.1 % TFA vo vode, 84/14/2 v/v/v), v pomere 2:1. Zmes 1 µl peptidov/matrice bola aplikovaná na oceľovú platňu a vyschnutá. Vzorky boli analyzované hmotnostným spektrometrom MALDI TOF/TOF UltrafleXtreme (Bruker Daltonik, Nemecko). Spektrá boli získané v reflektor móde v rozsahu 700 - 3500 Da. Hmotnostná kalibrácia bola vykonaná pomocou PepCal (Bruker Daltonik, Nemecko) štandardu. Údaje boli vyhodnotené pomocou Mascot algoritmu (Matrix Science Ltd, UK). Hmotnostné spektrá peptidov boli porovnané s NCBIr databázou. Pri hľadaní boli použité tieto parametre: taxonómia *Rattus norvegicus* (potkan), globálne modifikácie Carbamidomethyl (C), variabilné modifikácie oxidácia (M), enzým trypsin, počet maximálne vynechaných štepov 1, tolerancia chyby hmotnosti 100 ppm v MS a 0,3 Da v MS/MS móde.

Výsledky a diskusia

V tejto štúdii sme použili samce potkanov Wistar, z ktorých jedna skupina bola podrobená nízko-intenzívnemu infračervenému laserovému žiareniu (830 nm, 450 mW). Pozorovali sme stimulačný vplyv nízko-intenzívneho lasera na imunitný systém potkanov spôsobený nárastom imunoglobulínu gamma v krvnej plazme a nárastom leukocytov vo vzorke krvi. Vzorky krvnej plazmy boli separované pomocou 2DE a identifikované hmotnostným spektrometrom MALDI MS. Vzorky krvi boli taktiež podrobené hematologickému vyšetreniu krvného obrazu a diferenciálneho leukogramu. Výsledky naznačujú, že využitie proteomických a hematologických metód má

perspektívne a opodstatnené miesto vo výskume vplyvu nízko-intenzívneho lasera na organizmus.

Z hematologických testov krvi vyplýva, že hodnota leukocytov u neožarovaných potkanov teda našej kontrolnej vzorky bola $7,06 \times 10^9/L$. Po ožarovaní dosiahli leukocyty hodnotu $9,21 \times 10^9/L$. Ich počet sa zvýšil o viac ako 30 %. Zvýšili sa aj kvantitatívne hodnoty samotných lymfocytov zo $4,85 \times 10^9/L$ na $7,48 \times 10^9/L$, ktoré tvoria jednu z podskupín leukocytov. Tento nárast bol výrazný a predstavoval viac ako 54 %. Vzostup leukocytov u ožarovaných potkanov je možné vysvetliť tým, že laserové žiarenie podporuje prirodzené obranné mechanizmy organizmu. Výsledky hematologických testov vykazujú nepatrný pokles v počte erytrocytov z $9,01 \times 10^{12}/L$ na $8,81 \times 10^{12}/L$ a mierny vzostup hemoglobínu z 156 na 159 g/L. Z toho vyplýva, že použitím nízko-intenzívneho lasera (830 nm, 450 mW, $10 J.m^2$) nedošlo k výraznému zvýšeniu hemolýzy krvi. Zmeny vo výsledkoch nastali porovnaním kontrolných potkanov s ožarovanými potkanmi aj v prípade krvných doštičiek. U ožarovaných potkanov sme sledovali ich pokles z $985 \times 10^9/L$ na $836 \times 10^9/L$, ktorý predstavoval 15 %. Pokles trombocytov vplyvom ožiarovania zaznamenali vo svojej štúdii aj Timimi a kol. [17] (tab. 1).

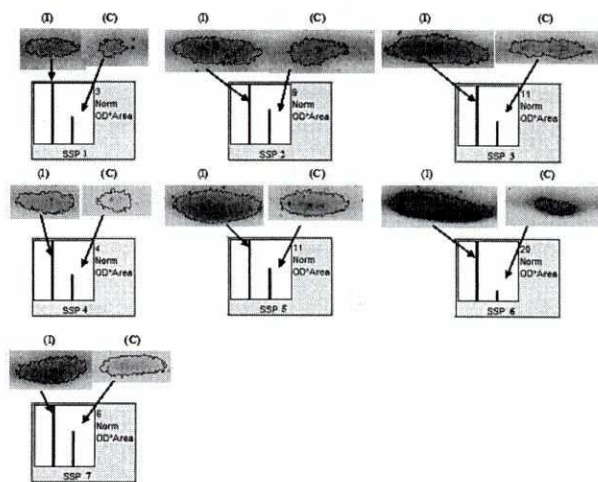
Tab. 1 Porovnanie výsledkov hematologických testov ožarovaných (I) a neožarovaných potkanov (C). Zvýraznené hodnoty predstavujú najvýznamnejšie zmeny, ktoré nastali v krvi ožarovaných potkanov v porovnaní s kontrolnými potkanmi.

	I	C
WBC ($\times 10^9/L$)	9,21	7,06
RBC ($\times 10^{12}/L$)	8,81	9,01
HGB (g/L)	159	156
HCT	0,468	0,459
MCV (fl)	53,1	50,9
MCH (pg)	18	17,3
MCHC (g/L)	340	340
PLT ($\times 10^9/L$)	836	985
RDW-SD (fl)	31	29,9
RDW-CV	0,184	0,189
PDW (fl)	8,5	8,6
MPV (fl)	7,7	7,8
P-LCR	0,066	0,073
PCT	0,0064	0,0076
Lymf ($\times 10^9/L$)	7,48	4,85
Neut ($\times 10^9/L$)	1,28	1,71
Baz ($\times 10^9/L$)	0,01	0,00
Mon ($\times 10^9/L$)	0,33	0,4
Eo ($\times 10^9/L$)	0,11	0,1

Zistili sme taktiež kvantitatívne zmeny IgG v krvnej plazme ožarovaných potkanov v porovnaní s neožarovanými potkanmi (obr. 1). Získané kvantitatívne hodnoty boli merané v jednotkách ($OD^*plocha$), kde OD (optická hustota) je signál intenzity jedného pixelu a plocha predstavuje ohraničenú plochu celkového počtu pixelov jednej

gélovej škvry. Pomocou kvantitatívneho pomeru proteínov ožiarených/neožiarených potkanov I/C sme určili o akú hodnotu sa zvýšilo alebo znížilo množstvo proteínov v ožiarenej/neožiarenej vzorke krvnej plazmy (tab. 2). Z výsledkov vyplýva, že množstvo IgG pôsobením lasera vzrástlo približne 2-násobne. Zvýšenie koncentrácie reťazcov imunoglobulínov je s najväčšou pravdepodobnosťou spojené s nárastom počtu samotných lymfocytov. Imunoglobulíny sú produkované B-lymfocytmi. Z uvedených výsledkov vyplýva, že výsledky proteomickej analýzy korelujú s hematologickými testami, kde sa pozorovali výrazné zmeny v počte niektorých bielych krviniek, čo potvrdzuje vplyv laserového žiarenia na imunitu.

Obr. 1 Kvantitatívne porovnanie izoform (1-7) imunoglobulínu gamma neožiarených potkanov (C) s ožiarenými (I) pomocou programu PDQuest (Bio-Rad, Laboratories USA)



Tab. 2 Kvantitatívne zmeny imunoglobulínu gamma. Kvantitatívne porovnanie Imunoglobulínu gamma u neožiarených/ožiarených (C/I) potkanov pomocou nameraných hodnôt optickej hustoty ($OD^*plocha$)

proteín	izoforma	neožiarená vzorka (C)	ožiarená vzorka (I)	pomer (I / C)
		($OD^*plocha$)	($OD^*plocha$)	
Imunoglobulín gamma	1	1,54	3,44	2,23
	2	5,15	8,97	1,74
	3	4,62	11,33	2,45
	4	1,77	4,04	2,28
	5	5,48	10,60	1,93
	6	3,24	19,73	6,09
	7	3,77	6,49	1,72

Štúdium proteómu umožňuje omnoho širšie vyšetrovanie fyziologických zmien než bežné biochemické metódy. Proteíny a ich štúdium nadobúdajú čoraz väčší význam nielen vo výskume v patologických a fyziologických procesoch, ale aj v rámci diagnostiky a terapie ochorení. Štúdium zmien, ku ktorým dochádza pri aplikácii laserového žiarenia počas nízko-intenzívnej laserovej terapie, pomocou proteomických

metód, pomôže pri hlbšom pochopení pôsobenia laserového žiarenia na organizmus.

Summary

The positive effect of laser radiation on living tissue is demonstrated in several studies. In our work we deal with changes in composition of blood and changes in the proteome of blood plasma of rats after application of laser radiation. On the research we used rats of Wistar family. One group of rats consisted of a control sample (non-irradiated rat). Second group of rats we irradiated by laser (wavelength 830 nm, power 450 mW and fluency 10 J.m²) during 9 days. After the experiment we isolated them blood samples from the heart. We performed hematological tests. These tests demonstrated that irradiated rats were elevated leukocyte count of $7,06 \times 10^9 / L$ to $9,21 \times 10^9/L$ in compared to unirradiated rats. Lymphocytes, which form one of the subsets of leukocytes increased in irradiated rats more than 54 %. In addition to hematological tests we performed a proteomic analysis of blood plasma, where we found an increased presence of gamma immunoglobulins (Ig G) in irradiated sample. The probable cause of the increase of leukocytes and immunoglobulins after application of laser radiation is to increase the immunity of the organism. Leukocytes as well as immunoglobulins are important components of the immune system.

Táto štúdia bola vypracovaná s finančnou podporou projektu Štrukturálneho fondu EU ITMS : 26220220143

Literatúra

1. Anderson, N. L., Anderson, N. G.: The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol. Cell. Proteomics*, 1 (11), 2002, s. 845-867
2. Anderson, L., Anderson, N. G.: High resolution two-dimensional electrophoresis of human plasma proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 74 (12), 1977, s. 5421- 5425
3. Brosseau, L. et al. : Low level laser therapy (Classes I, II and III) for treating rheumatoid arthritis. *The Cochrane Library*, 4 (1), 2009, s. 1-3
4. Chichuck, T. V., Strashkevich, I. A., Klebanov, G. I.: Free-radical mechanisms of the stimulant action of low intensity laser radiation. *Bulletin of the Russian academy of med. Sciences*, 2, 1999, s. 27-32

5. Cristea, I. M., Gaskell, S. J., Whetton, A. D.: Proteomics techniques and their application to hematology. *Blood*, 103 (10), 2004, s. 3824-3634
6. Danhof, G. (Ed): *Laseroterapie in der Allgemeinmedizin*. WBV Biologisch-Medizinische Verlagsgesellschaft, Schondorf, 1991, 252 s.
7. Fenyó, M.: Theoretical and experimental basis of biostimulation by laser irradiation. *Optics and laser technology*, 16 (4), 1984, s. 209-215
8. Jacobs, J. M. et al.: Utilizing human blood plasma for proteomic biomarker discovery. *J. Proteome. Res.*, 4 (4), 2005, s. 1073-1085
9. Karu, T. I. : Photobiological fundamentals of low-power laser therapy. *IEEE J. Quantum Electron*, 23 (10), 1987, s. 1703-1717
10. Klima, H. (Ed): *Biophysikalische Aspekte von Laserstrahlen*. Vortrag Lasersymposium, Salzburg, 1986
11. Mester, E.: Laser induced stimulation of the vascularization of the healing wound. *Separatum Experientia*, 30, 1974, s. 341
12. Mokmeli, S. et al.: Evaluating the Efficiency of Low Level Laser Therapy (LLL) in Combination With Intravenous Laser Therapy (IVL) on Diabetic Foot Ulcer, Added to Conventional Therapy. *Journal of Lasers in Medical Sciences*, 1 (1), 2010, s. 8-13
13. Navrátil, L., Hubáček, J. (Ed): *Biologické účinky světelné energie*. Moderní fototerapie a laseroterapie, Manus, Praha, 2000, s. 53-93
14. O'Farrell, P. H.: High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Bio. Chem.*, 250 (10), 1975, s. 4007-4021
15. Sandler, I. et al.: In Vitro Effects of Low-Level Laser Irradiation at 660 nm on Peripheral Blood Lymphocytes. *Lasers in Surgery and Medicine*, 27 (3), 2000, s. 255-261
16. Sutter, R., Grossenbacher, R.: Ressection of palatal tumours with the CO₂ laser. *J Laryngol Otolol*, 4, 1990, s. 20-23
17. Timimi et al.: The Influence of Low Power Laser Energy on Red blood Cell and Platelets (In Vitro). In: *International Conference on Bioscience, Biochemistry and Pharmaceutical Sciences (ICBBPS'2012)*, Pidsamai, P. (Ed), 11-12 February 2012, Penang -Malaysia, 2012, s. 12-14
18. Zatelli, R., Recsa, D., Bazzochi, L.: Modifications to immunological state in patients on pain treatment with laser radiation. *Medical Laser Report* Febraio, 37, 1986, s. 40