



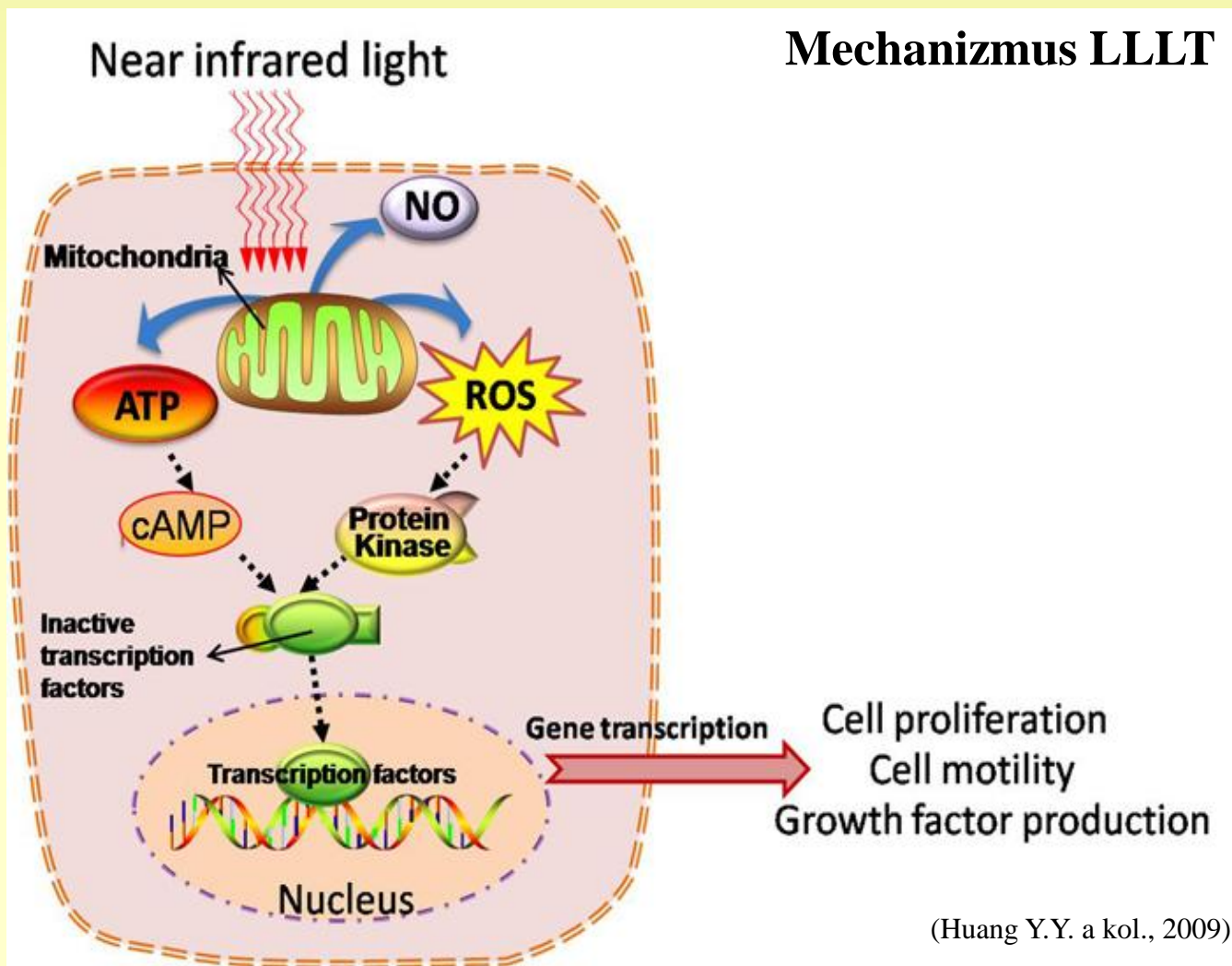
# Účinok nízko-úrovňovej laserovej terapie na zmeny akútnych fázových proteínov v krvnej plazme potkanov analyzovaných pomocou MALDI TOF/TOF

**Bober P., Kováčová V., Talian I., Chmelová M., Petrášová D.,  
Hrubovčák J., Géci I., Sabo J.**

# Nízko-úrovňová laserová terapia (LLLT)

- Nízko-úrovňová laserová terapia (LLLT) je aplikácia lasera s nízkym výkonom v rozsahu 1 - 500 mW (Huang a kol., 2009)
- Základné terapeutické účinky biostimulačného lasera sú:
  - a) biostimulačný účinok tkanivového metabolizmu (produkcia ATP, syntéza bielkovín)
  - b) protizápalový a protiedematózny účinok
  - c) analgetický účinok (Javůrek a kol., 1995)
- Terapeutický účinok LLLT závisí od základných parametrov lasera ako je **vlnová dĺžka, výkon a dávka**

- Absorpcia laserového svetla vyvoláva produkciu reaktívnych druhov kyslíka (ROS), NO a syntézu ATP, čo vedie k vzniku oxidačného stresu a kvantitatívnym zmenám akútnych fázových proteínov (APP)



# Ciele práce

- Proteomická analýza krvnej plazmy potkanov Wistar použitím 2 DE elektroforézy a MALDI TOF/TOF hmotnostnej spektrometrie
- Kvantitatívna analýza proteínov krvnej plazmy potkanov Wistar po aplikácii LLLT

# MATERIÁL A METÓDY

## Vzorka

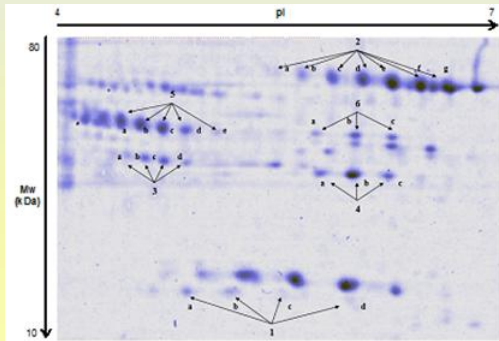
- 5-mesačné samce potkanov Wistar
  - neožiarená kontrolná skupina (**C**), (n = 2)
  - ožiarená skupina (**I**), (n = 2)

## LLLT

- GaAlAs diódový laser (Maestro /CCM, Medicom Praha,  $\lambda = 830 \text{ nm}$ , hustota výkonu **450 mW/cm<sup>2</sup>**, denná dávka **60 J/cm<sup>2</sup>**, čas ožarovania 33 min. a 33 sek.)

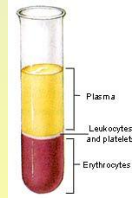


## 2-DE PAGE



Izolácia krvnej plazmy

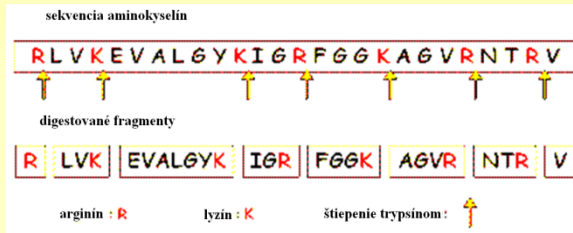
Odber krvi



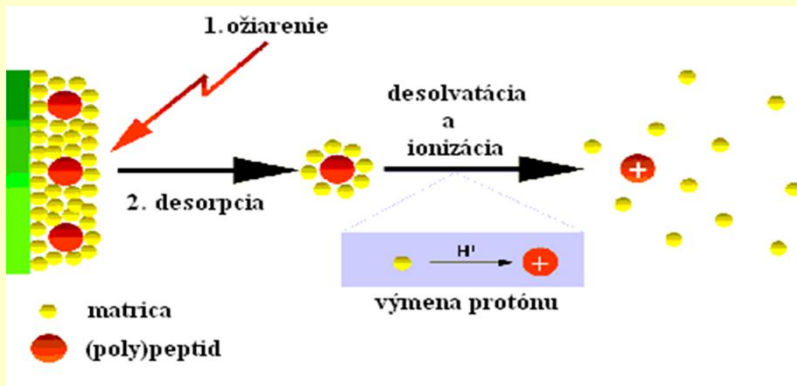
Rattus norvegicus (Wistar)



Digescia proteínov



Desorpcia a ionizácia zmesi proteín/matrica použitím laserového pulzu (MALDI TOF/TOF)



Stanovené plazmatické proteíny

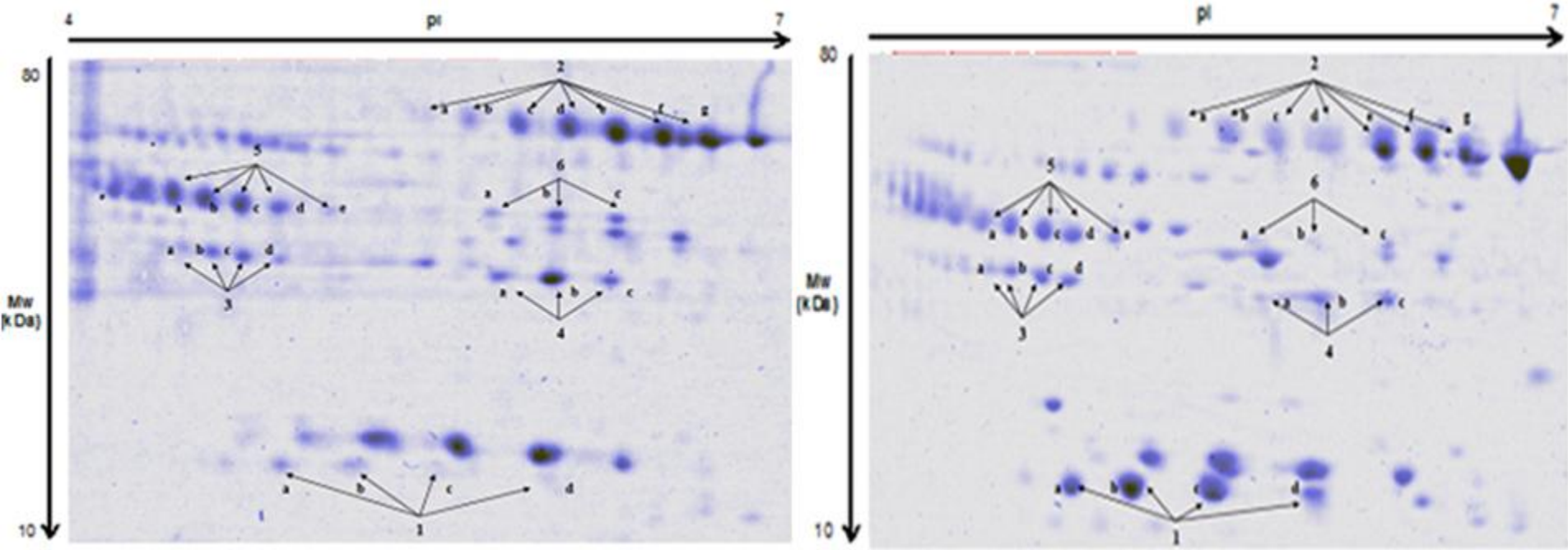
Spot č.	Proteín	Mw (Da)	pI
1	haptoglobín	39052	6.1
2	hemopexín	52060	7.6
3	alpha-1-antitrypsín	46278	5.7
4	fibrinogén gamma	51228	5.6
5	fetuin A	38757	6.0
6	fetuin B	42361	6.7

# Kvalitatívna analýza akútnych fázových proteínov krvnej plazmy pomocou MALDI TOF/TOF

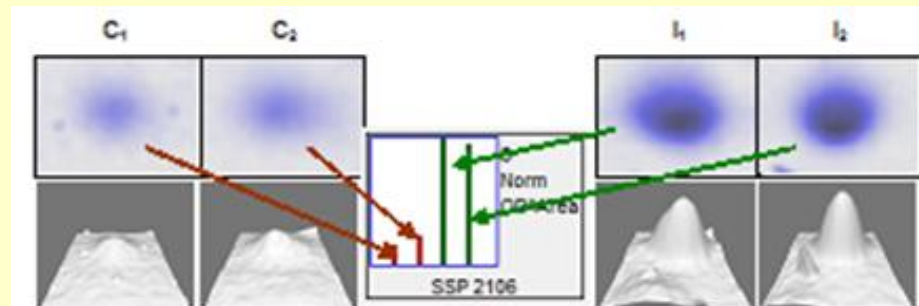
spot č.	názov proteínu	ID č.	Mw (Da)	pI	mascot score, (pokrytie %)	funkcia proteínu
1a	haptoglobin	P06866	39052	6.1	168, (40)	metabolizmus hému a antioxidačná ochrana, pozitívny akútny fázový proteín
2e	hemopexin	P20059	52060	7.6	241, (53)	
3d	alpha-1-antitrypsin	P17475	46278	5.7	127, (40)	antioxidačná ochrana, pozitívny akútny fázový proteín
4b	fibrinogen gamma	P02680	51228	5.6	122, (34)	protizápalový, negatívny akútny fázový proteín
5e	fetuin A	P24090	38757	6.0	68, (34)	antioxidačná ochrana, negatívny akútny fázový proteín
6a	fetuin B	Q9QX79	42361	6.7	63, (21)	

krvná plazma neožiareného potkana ( $C_1$ )

krvná plazma ožiareného potkana ( $I_1$ )



2D-SDS-PAGE porovnanie proteínov krvnej plazmy neožiareného  $C_1$  a ožiareného  $I_1$  potkana 1- haptoglobín, 2- hemopexín, 3- alfa 1-antitrypsín, 4- fibrinogén gama, 5- fetuin A, 6- fetuin B



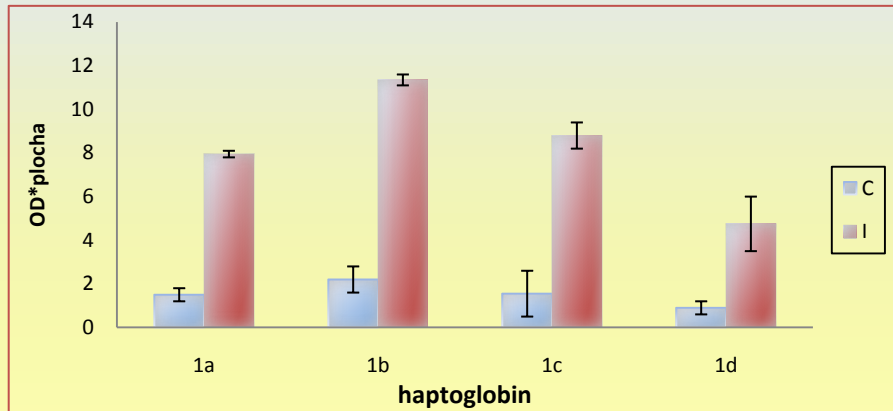
Kvantitatívne porovnanie spotu 1a (haptoglobín) neožiarených vzoriek ( $C_1$ ,  $C_2$ ) a ožiarených vzoriek ( $I_1$ ,  $I_2$ ) s 3D zobrazením



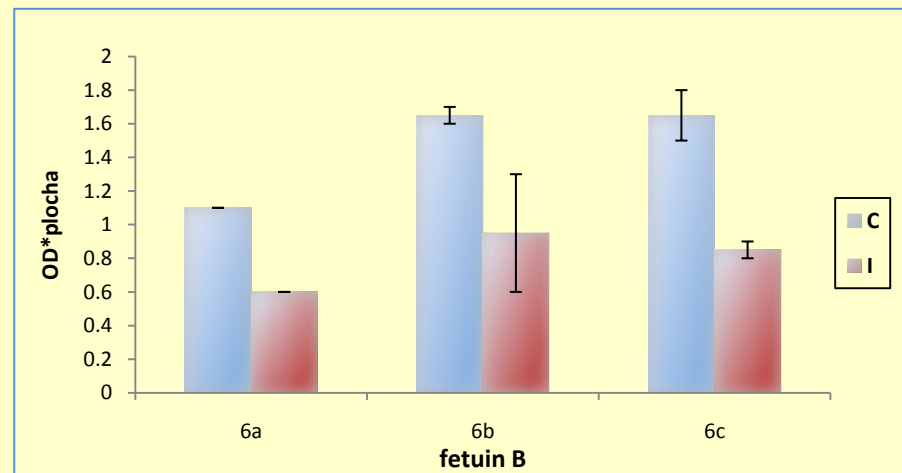
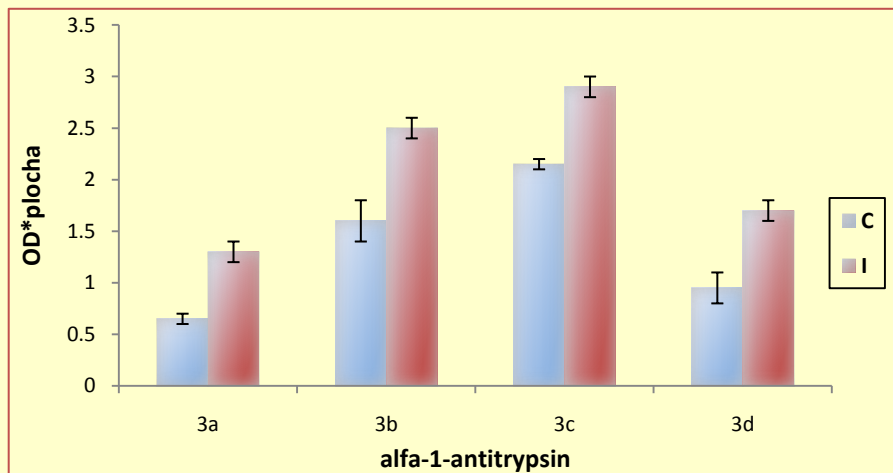
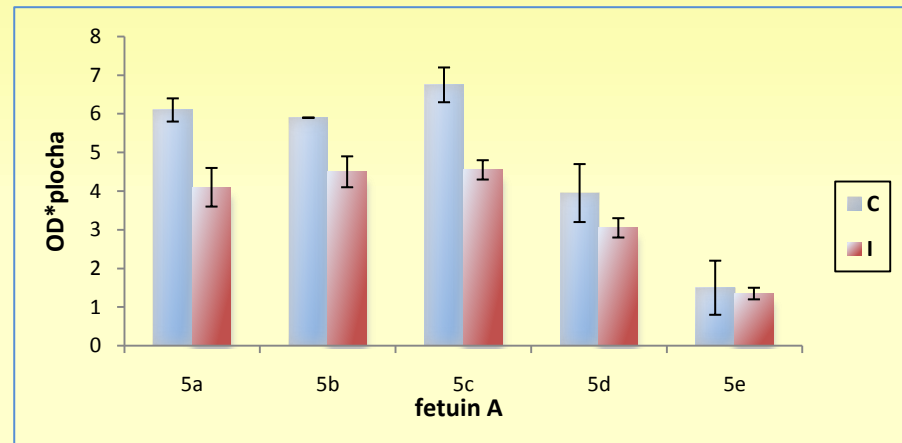
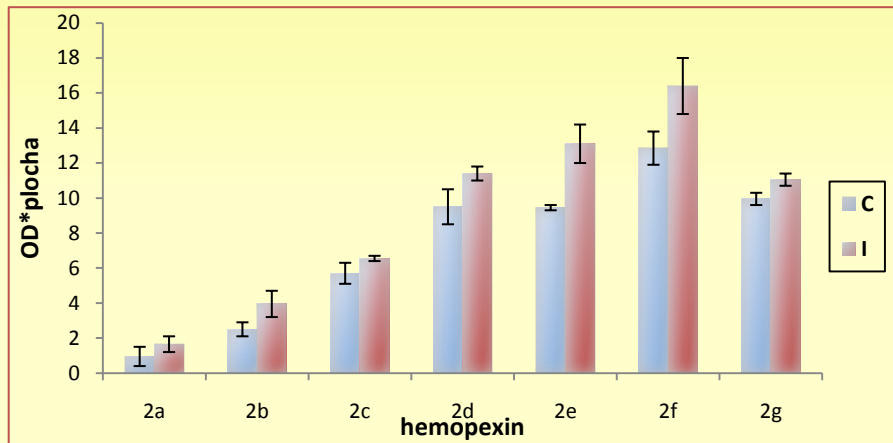
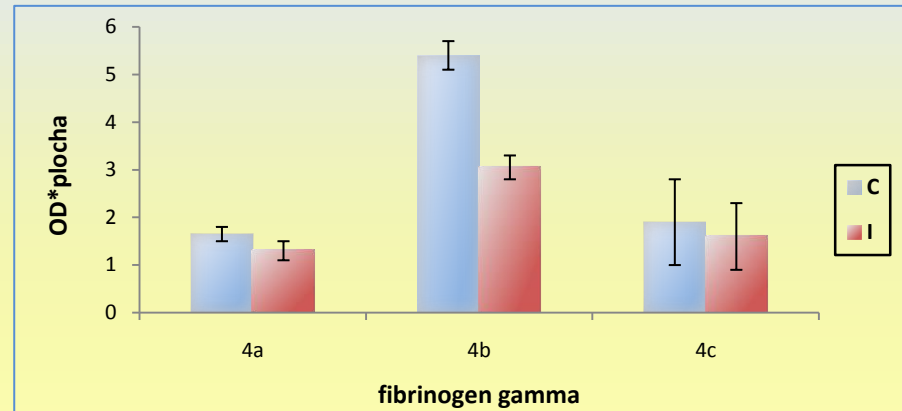
# Kvantitatívna analýza akútnych fázových proteínov krvnej plazmy

- Na kvantitatívne vyhodnotenie 2 DE gélov bol použitý PDQuest softvér
- Kvantita proteínov bola udávaná v jednotkách „**OD plocha**“, (OD - intenzita signálu jedného pixelu)
- Na základe kvantitatívneho pomeru  $(I_1 + I_2) / (C_1 + C_2)$  sme zistili nárast alebo pokles množstva proteínov po aplikácii LLLT:
  - haptoglobín (500 % nárast) ↑
  - hemopexín (10-60 % nárast) ↑
  - alfa-1 antitrypsín (40-100 % nárast) ↑
  - fibrinogén gama (20-40 % pokles) ↓
  - fetuín A (10 – 30 % pokles) ↓
  - fetuín B (50 % pokles) ↓
- Akútne fázové proteíny krvnej plazmy sú definované ako proteíny, ktorých koncentrácia sa zvyšuje alebo znižuje najmenej o **25 %** v priebehu oxidačného stresu, zápalových ochorení, infekcie (Gabay a kol., 1999)

## pozitívne APP



## negatívne APP



# Záver

- Presné mechanizmy na bunkovej úrovni, pri biostimulačnom účinku LLLT, nie sú doposiaľ stále objasnené
- Proteomická analýza ponúka objektívny spôsob ako študovať zmeny hladiny proteínov vyvolané rôznymi experimentálnymi podmienkami (aplikácia LLLT)
- Tento prístup sa ukázal úspešný pre identifikáciu nových mechanizmov bunkovej odpovede (oxidačný stres)

**Ďakujem za pozornosť**