

**UNIVERZITA PAVLA JOZEFA ŠAFÁRIKA V KOŠICIACH  
LEKÁRSKA FAKULTA**

**ZBORNÍK ODBORNÝCH A VEDECKÝCH PRÍSPEVKOV  
PROJEKTOV ZO ŠTRUKTURÁLNYCH FONDOV  
EURÓPSKEJ ÚNIE**



**Košice  
25. November 2013**

**Košice 2013**

**ZBORNÍK ODBORNÝCH A VEDECKÝCH PRÍSPEVKOV PROJEKTOV ZO  
ŠTRUKTURÁLNYCH FONDOV EURÓPSKEJ ÚNIE**

Editori:

Dr.h.c. prof. MUDr. Leonard Siegfried, CSc.

prof. Ing. Mária Mareková, CSc.

Ing. Jaroslav Majerník, PhD.

Všetky práva vyhradené. Toto dielo ani jeho žiadnu časť nemožno reprodukovať, ukladať do informačných systémov alebo inak rozširovať bez súhlasu majiteľov práv.

Za odbornú a jazykovú stránku tohto zborníka zodpovedajú autori jednotlivých príspevkov. Rukopis príspevkov neprešiel redakčnou ani jazykovou úpravou.

ISBN 978-80-8152-073-0

EAN 9788081520730

---

## OBSAH

<b>1 Výskumné centrum aplikovanej biomedicínskej diagnostiky .....</b>	<b>9</b>
<b>Charakteristika exozómov a ich význam pre medicínu</b>	
<i>Bencková M., Bober P., Talian I., Sabo J. ....</i>	11
<b>Proteomická analýza extracelulárnych vezikul izolovaných z moču pomocou diferenciálnej ultracentrifugácie</b>	
<i>Bober P., Talian I., Kováčová V., Chmelová M., Karabinoš A., Sabo J. ....</i>	17
<b>Diagnostika neurodegeneratívnych ochorení</b>	
<i>Dubayová K., Čakanová G., Vašková J., Lučková I., Bochová I., Sabo J., Karabinoš A. ....</i>	24
<b>Metabolomický fluorescenčný fingerprinting moču</b>	
<i>Dubayová K., Lučková I., Sabo J., Karabinoš A. ....</i>	28
<b>Mutačný stav génu TP53 u vybraných pacientov s chronickou lymfocytovou leukémiou (CLL)</b>	
<i>Karabinoš A., Dubayová K., Čakanová G., Vašková J., Lučková I., Bochová I., Tóthová E., Palášthy S., Štecová N., Sabo J. ....</i>	36
<b>Proteomická analýza vzoriek leukocytov iónovou pascou</b>	
<i>Kováčová V., Chmelová M., Bober P., Talian I., Tóthová E., Géci I., Karabinoš A., Sabo J. ....</i>	42
<b>Proteomický profil mononukleárnych buniek leukocytov potkanov pomocou dvojdimenzionálnej gélovej elektroforézy a hmotnostnej spektrometrie</b>	
<i>Kováčová V., Chmelová M., Bober P., Talian I., Petrášová D., Géci I., Karabinoš A., Sabo J. ....</i>	47
<b>Proteomická analýza celkových nestimulovaných ľudských slín</b>	
<i>Laputková G., Bober P., Trebuňová M., Sabo J. ....</i>	55
<b>Neurochémia suicidálneho správania</b>	
<i>Pálová E., Sabo J. ....</i>	65
<b>Prínos dátovo nezávislej MS/MS analýzy v oblasti proteomickej analýzy karcinómu prsníka</b>	
<i>Petrovič M., Talian I., Andrašina I., Sabo J. ....</i>	71
<b>2 Centrum excelentnosti pre elektromagnetické polia v medicíne.....</b>	<b>77</b>
<b>Videokonferencie a live streaming vo vedeckej spolupráci</b>	
<i>Majerník J. ....</i>	79
<b>Zdravotný profil marginalizovaných rómskych komunit na Slovensku</b>	
<i>Stupák M., Stupáková N., Veselá J., Guzy J., Mareková M. ....</i>	85
<b>3 Centrum excelentnosti pre výskum faktorov ovplyvňujúcich zdravie so zameraním na skupinu marginalizovaných a imunokompromitovaných osôb .....</b>	<b>91</b>
<b>Monitorovanie faktorov ovplyvňujúcich zdravie so zameraním na marginalizované etnické minority</b>	
<i>Bódy G., Hubková B., Mašlanková, Stupák M., Veselá J., Guzy J., Mareková M. ....</i>	93
<b>Výskyt urogenitálnych chlamýdiových infekcií v marginalizovanej skupine obyvateľstva na východnom Slovensku</b>	
<i>Čechová L., Halánová M., Čisláková L., Kalinová Z., Jarčuška Pa. ....</i>	104

<b>Možnosti odstraňovania následkov obezity u marginalizovaných skupín (kazuistika)</b> <i>Donič V., Tomori Z., Hnát B.</i> .....	111
<b>Epidemiologické aspekty výskytu vybraných oportúnnych nákaz u imunodeficientných pacientov</b> <i>Halánová M., Pohorencová A., Kalinová Z., Čechová L., Čisláková L., Jarčuška Pa.</i> .....	115
<b>Detekcia génov adherencie u Escherichia coli izolovaných z rôzneho klinického materiálu od imunokompromitovaných pacientov</b> <i>Kmeťová, M., Čurová, K., Lovayová, V., Sabol, M., Siegfried, L.</i> .....	124
<b>Výskyt parazitárnych a infekčných ochorení v rómskej populácii vo Východoslovenskom regióne</b> <i>Lovayová V., Rimárová K., Pastvová L., Nagyová M., Kmeťová M., Sabol M., Siegfried L.</i> .....	130
<b>Využitie informačných a komunikačných technológií na zvyšovanie vzdelanostnej úrovne a kvalifikácie pre uplatnenie na trhu práce u rómskej populácie</b> <i>Majerník J., Švida M.</i> .....	134
<b>Infertilita u mužov: príčiny a možné riešenia</b> <i>Mihálik J., Rybárová S., Kluchová D.</i> .....	141
<b>Hostility and health quality of life in Roma and non-Roma coronary heart disease patients</b> <i>Nagyova J., Silarova B.</i> .....	152
<b>Prehľad výsledkov štúdií zdravotného stavu minoritnej rómskej populácie v oblasti rastu detí, vplyvu na graviditu a frekvencie infekčných ochorení</b> <i>Rimárová K.</i> .....	159
<b>Hodnotenie držania tela v mladšej školskej populácii rómskych a nerómskych detí v závislosti od vplyvu antropometrických ukazovateľov</b> <i>Rimárová K.</i> .....	168
<b>Predictors of eight year's mortality of Roma and non-Roma patients after coronary angiography</b> <i>Sudzinova A., Rosenberger J., Nagyova I.</i> .....	176
<b>4 Centrum výskumu inovatívnych terapeutických postupov molekulárnej medicíny</b> .....	183
<b>Proteomická analýza kmeňových buniek choriónovej membrány s využitím MALDI TOF/TOF hmotnostnej spektrometrie</b> <i>Chmelová M., Kováčová V., Bober P., Géci I., Urdzik P., Rosocha J., Sabo J.</i> .....	185
<b>Problematika identifikácie biomarkerov pre klinickú prax</b> <i>Petrovič M., Talian I., Andrašina I., Sabo J.</i> .....	194
<b>Stanovenie profilu DNA buniek MCF-7 liečených cytostatikami v MDR1 géne vysokorozlišovacou analýzou kriviek topenia (HRM analýzou)</b> <i>Trebuňová M., Laputková G., Sabo J.</i> .....	199
<b>5 Špecializované laboratórium magnetickej rezonancie pre kardiovaskulárny výskum</b> .....	207
<b>Výskumné aplikácie kardiovaskulárnej magnetickej rezonancie v klinickej arytmiológii a elektrofyziológii a ich ďalšie perspektívy</b> <i>Mitro P.</i> .....	209
<b>Význam myokardiálnej fibrózy pri chronickom srdcovom zlyhávaní a jeho detekcia pomocou kardiovaskulárnej magnetickej rezonancie</b> <i>Mitro P.</i> .....	214

<b>6 Probiotické mikroorganizmy a bioaktívne látky naturálneho pôvodu pre zdravšiu populáciu Slovenska.....</b>	<b>221</b>
<b>Vplyv <i>Lactobacillus plantarum</i> na výskyt infekčných komplikácií u kriticky chorých</b> <i>Hudák V., Grochová M., Capková J., Firmont J.</i> .....	223
<b>Možnosti využitia probiotík v liečbe a prevencii infekčných chorôb u marginalizovaných skupín</b> <i>Jarčuška Pa., Paraličová Z.</i> .....	234
<b>Optimalizácia prípravy vzorky pre proteomickú analýzu bunkových proteínov probiotického kmeňa <i>Lactobacillus Plantarum</i> LS/07</b> <i>Tkáčiková S., Bober P., Sabo J., Strojný L.</i> .....	240
<b>7 Kompetenčné centrum pre biomodulátory a výživové doplnky.....</b>	<b>247</b>
<b>Selekcia bakteriocíny produkujúcich kmeňov a výber vhodných indikátorových mikroorganizmov</b> <i>Mareková M., Lauková A.</i> .....	249
<b>8 Budovanie infraštruktúry v centre excelentnosti SEPO-II.....</b>	<b>255</b>
<b>Prognostické a prediktívne biomarkery karcinómov prsníka</b> <i>Fröhlichová L., Habalová V., Švajdler M.</i> .....	257
<b>Vplyv genetického pozadia na terapiu u pacientov s hepatitídou C</b> <i>Hermanová H., Hudáková T.</i> .....	266
<b>Biomarkery vo vzťahu k terapii a prognóze u pacientov s folikulovým lymfómom</b> <i>Klimčáková L., Tóthová E., Slabá E., Šalagovič J.</i> .....	274
<b>9 Výskumné centrum moderných technológií a diagnostiky ochorení ohrozujúcich verejné zdravie .....</b>	<b>281</b>
<b>Toxíny <i>E. coli</i> a ich uplatnenie v patogenéze infekcií</b> <i>Čurová K., Kmeťová M., Siegfried L.</i> .....	283
<b>Expresia génu pre katelicidín u pediatrických pacientov s infekciou močového aparátu</b> <i>Hrabovský V., Kolvek G., Lovayová V., Hrabovská Z., Siegfried L.</i> .....	290
<b>Molekulová charakterizácia <i>Escherichia coli</i> izolovaných z krvi kriticky chorých pacientov</b> <i>Kmeťová M., Čurová K., Vargová R., Lovayová V., Sabol M., Siegfried L.</i> .....	295



**Výskumné centrum aplikovanej biomedicínskej  
diagnostiky**

## **Mutačný stav génu TP53 u vybraných pacientov s chronickou lymfocytovou leukémiou (CLL)**

*Karabinoš A.<sup>1</sup>, Dubayová K.<sup>1</sup>, Čakanová G.<sup>1</sup>, Vašková J.<sup>1</sup>, Lučková I.<sup>1</sup>, Bochová I.<sup>1</sup>, Tóthová E.<sup>2</sup>, Palášthy S.<sup>3</sup>, Štecová N.<sup>4</sup>, Sabo J.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>SEMBID, s.r.o., Výskumné centrum aplikovanej biomedicínskej diagnostiky  
080 01 Prešov

<sup>2</sup>Ústav lekárskej a klinickej biofyziky, Lekárska fakulta UPJŠ v Košiciach  
040 11 Košice

<sup>3</sup>Oddelenie klinickej hematológie, Univerzitná nemocnica J.L. Reimana, 080 01 Prešov

<sup>4</sup>Oddelenie hematológie a onkohematológie, Univerzitná nemocnica L. Pasteura  
040 11 Košice

\*Korešpondujúci autor: A. Karabinoš, SEMBID,s.r.o., Výskumné centrum aplikovanej biomedicínskej diagnostiky, Masarykova 16, 08001 Prešov  
Tel: +421 905 402 683, e-mail: sembid.pp@gmail.com

### **Abstrakt**

Chronická lymfocytová leukémia (CLL) je v západných krajinách najčastejšie sa diagnostikujúce leukemické ochorenie. Diagnóza ochorenia CLL a určenie jeho štádia podľa Raia (Rai et al., 1975) a/alebo podľa Bineta (Binet et al., 1981) predstavovali tradične základňu pre definíciu terapeutického postupu. V súčasnosti sa do tejto platformy stabilne zakomponovala cytogenetická a genetická charakteristika malígnych buniek ako rozhodujúci faktor pre stanovenie individuálnej prognózy ochorenia a tým aj špecifikáciu optimálneho terapeutického zásahu. Najčastejšími cytogenetickými abnormalitami CLL buniek sú del(13q), +12, del(11q22-23) a del(17p). V poslednej dobe sa v rámci genetického vyšetrenia ochorenia CLL poukazuje na mimoriadny význam analýzy mutačného stavu onkogénu/tumor-supresorového génu TP53. Jedná sa o genetický parameter ktorého prognostický význam je negatívny a súčasne sa javí byť nezávislý od všetkých horeuvedených genetických a cytogenetických faktorov. Predložená štúdia analyzovala mutačný stavu TP53 génu u 11 pacientov s ochorením CLL. Výsledkom bol nález mutácie A86T, ktorá vo svete doteraz ešte nebola popísaná.

### **Úvod**

Chronická lymfocytová leukémia (CLL) je v západných krajinách najčastejšie sa diagnostikujúce leukemické ochorenie. Typická CLL sa primárne manifestuje v kostnej dreni odkiaľ sa klon postupne rozširuje do periférnej krvi a usádza v lymfatických uzlinách pečeni a slezine. Jedná sa teda o lymfatické systémové ochorenie ktoré sa vzácné môže manifestovať aj extranodálne, najčastejšie v koži, CNS a meningoach.

CLL nemá žiadne typické príznaky ktoré by nám umožnili jej okamžité rozpoznanie. Často je zachytená v rámci rutinného vyšetrenia v bez-symptomatickom

štádiu pričom podiel takto zachytených pacientov predstavuje takmer 2/3 všetkých novodiagnostikovaných ochorení CLL. Približne 20% novodiagnostikovaných CLL pacientov subjektívne udáva nočné potenie, stratu hmotnosti a návaly teplôt čo sa zvykne sumárne nazývať ako B-symptomatológia. Z ďalších symptómov býva prítomná celková únava a záťažová dýchavičnosť, ktorá pravdepodobne odráža prítomnú anémiu. Okrem týchto subjektívnych symptómov býva často prítomná lymfadenopatia rôzneho stupňa, môže byť prítomná aj hepato-splenomegália a asi u tretiny pacientov aj rôzne prejavy autoimunitného procesu postihujúceho najčastejšie erytrocyty (autoimunohemolýza) alebo trombocyty (autoimunotrombocytopenia).

Morfologicky je typická forma CLL charakterizovaná prítomnosťou „typických CLL buniek“. Jedná sa o malé lymfatické bunky s kompaktným jadrom u ktorého je iba zriedka pozorovaný nukleolus alebo naštiepenia. Jadro je obklopené tenkou cytoplazmou v ktorej sa pri mikroskopickom pozorovaní nevyskytujú žiadne vakuoly. V prípade výskytu širšej cytoplazmy a asymetrickej polohe jadra v bunke sa hovorí o tzv. lymfoplazmocytoidnej diferenciácii a v takomto prípade je potrebná imunofenotypová analýza buniek z dôvodu diferenciálnej diagnostiky iných nízko malígnych NH-lymfómov. Imunofenotypicky sa zachytí u viac ako 95% prípadoch CLL klonálna expanzia B-buniek a iba v 5% T-buniek, no napriek tomu vykazujú aj malígne B-bunky koexpresiu T-bunkového znaku CD5 pri absencii iných pan-T-markerov. Okrem toho sú malígne B-bunky typicky označené CD19, CD23 a slabo alebo vôbec nie CD79b, CD22 a FMC7 (Dunphy, 2004; Quijano et al., 2008).

Diagnóza ochorenia CLL a určenie jeho štádia podľa Raia (Rai et al., 1975) a/alebo podľa Bineta (Binet et al., 1981) predstavovali tradične základňu pre definíciu terapeutického postupu. V súčasnosti sa do tejto platformy stabilne zakomponovala cytogenetická a genetická charakteristika malígnych buniek ako rozhodujúci faktor pre stanovenie individuálnej prognózy ochorenia a tým aj špecifikáciu optimálneho terapeutického zásahu. Najčastejšími cytogenetickými abnormalitami CLL buniek, vyšetrovanými hlavne metodikou fluorescenčnej in-situ hybridizácie (FISH), sú delécia a/alebo translokácia génu pre IgH (t/del 14q32), delécia dlhého ramienka chromozómu 13 (del(13q)), trizómia chromozómu 12 (+12), delécia úseku chromozómu 11 (del(11q22-23)) a delécia krátkeho ramienka chromozómu 17 (del(17p)). Kým prognostický význam aberácie +12 je nejasný, prítomnosť najčastejšie sa vyskytujúcej cytogenetickej aberácie del(13q) je spojený s dobrým priebehom ochorenia a prežívaním pacientov 10 rokov a viac. Agresívnejší priebeh ochorenia označuje prítomnosť del(11q22-23) a del(17p), ktorá je navyše spájaná s výskytom rezistencie na chemoterapiu (pozri napr. Byrd et al., 2004; Zenz et al., 2008; Salin et al., 2008). Analýza posledných dvoch genetických aberácií umožňuje pohľad do patogenézy ochorenia pretože v deletovaných oblastiach chromozómu 11 respektíve 17 sa nachádzajú dôležité tumor-supresorové gény ATM respektíve TP53. Tak napríklad proteín TP53 reguluje bunkovú odpoveď na stres, onkogénnu aktiváciu ako aj poškodenie DNA v zmysle využitia mechanizmu kontroly bunkového cyklu a apoptózy.



Z toho dôvodu je práve jeho strata považovaná za zodpovednú, minimálne z časti, za zlý priebeh a prognózu ochorenia CLL u pacientov s del(17p) (pozri napr. Olivier et al., 2009 a referencie v nej).

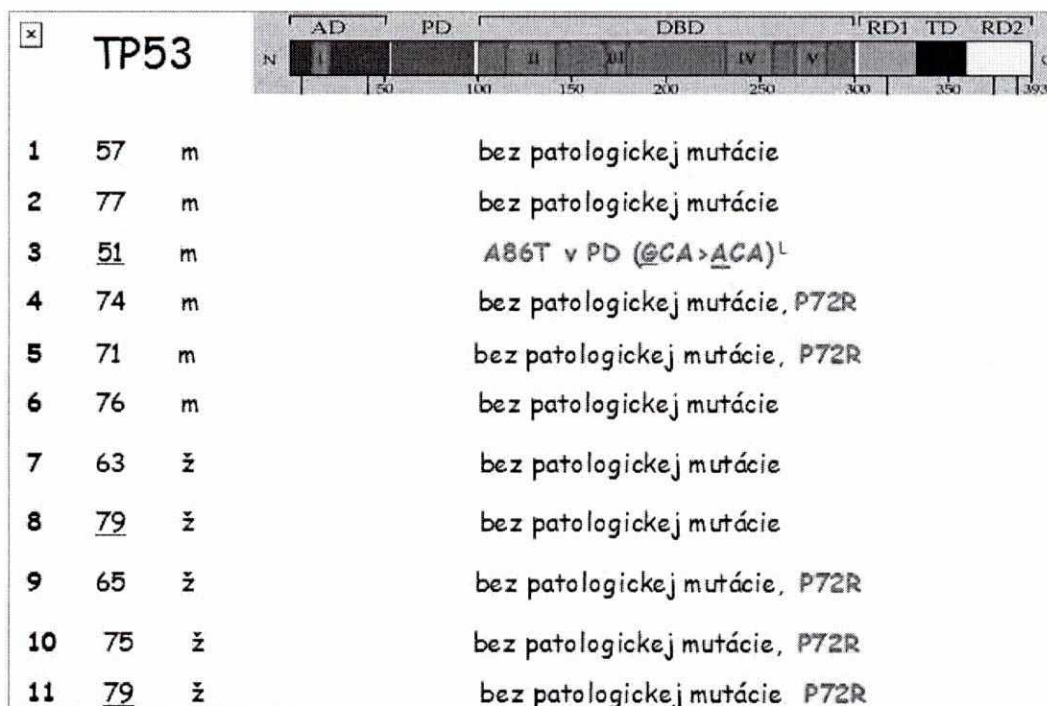
Z genetických faktorov vyšetovaných u ochorenia CLL predstavuje najvýznamnejšiu úlohu vyšetrenie mutačného stavu variabilnej domény ťažkých reťazcov imunoglobulínového VH génu. U pacientov s nemutovaným VH génom je priebeh ochorenia CLL nepriaznivý a rapídne progreduje zatiaľčo pacienti s mutovaným VH génom majú pomalú progresiu ochorenia a dlhé prežívanie (pori napr. Byrd et al., 2004 a referencie v nej). V poslednej dobe sa v rámci genetického vyšetrenia ochorenia CLL poukazuje na mimoriadny význam analýzy mutačného stavu génu TP53. Jedná sa o genetický parameter ktorého prognostický význam sa javí byť nezávislým od všetkých horeuvedených genetických a cytogenetických faktorov.

Tak napríklad v aktuálnej mohutnej štúdií autorov Dicker a kol. (2009) bolo analyzovaných 193 pacientov s CLL na prítomnosť mutácií v géne TP53 ako aj iných (cyto)genetických lézií. Zistilo sa že 13,5% pacientov vykazovalo mutácie v TP53 géne a že u týchto pacientov bola významne znížená doba medzi stanovením diagnózy ochorenia a začiatkom terapie v porovnaní s pacientmi s nemutovaným TP53. Sumárne sa v tejto štúdií zistilo, že TP53 mutčný status, rovnako ako aj VH-status, je nezávislým prediktorom rapídnej progresie ochorenia. K podobným záverom sa dopracovala paralelná objemná štúdiá talianskych autorov (Rossi et al., 2009), analyzujúca 308 pacientov s CLL na prítomnosť TP53 mutácií a aberácie del(17p). Z tejto štúdie jednoznačne vyplynulo že pacienti s CLL bez ohľadu na typ TP53 aberácie, teda či iba s TP53 mutáciami alebo iba s del(17p13) alebo s obomi léziami, uniformne vykazujú krátke prežívanie a rezistenciu na terapiu. Navyše, sekvenčným analyzovaním DNA vzoriek pacienta sa zistil nárast nových mutácií v TP53 géne korelujúci s nástupom rezistencie ochorenia na terapiu.

Predložená štúdiá analyzovala mutačný stavu TP53 génu u 11 pacientov s ochorením CLL. Výsledkom bol nález mutácie A86T, ktorá vo svete doteraz ešte nebola popísaná.

## **Výsledky**

Vyšetřili sme mutačný stav 11 pacientov s ochorením CLL. Výsledky tejto analýzy sumarizuje Obrázok 1. U jedného pacienta sme našli mutáciu A86T v oblasti proteínu bohatej na prolín (PD). U piatich pacientov sme našli prítomnosť polymorfizmu P72R zatialčo zvyšné vyšetřované vzorky nevykazovali žiadnu odchýlku od referenčnej sekvencie génu TP53.



Obrázok 1. Výsledok mutačnej analýzy TP53 u 11 vzoriek pacientov s ochorením CLL. V hornej časti obrázku sa nachádza schématický pohľad na proteín ZP53 so všetkými jeho doménami. Prvý číselný stĺpec v ľavej časti obrázku označuje poradové číslo vzorky od 1 do 11. Druhý stĺpec z ľava označuje vek pacienta a tretí stĺpec z ľava označuje pohlavie pacienta ako m-mužské a ž-ženské. Ku každému pacientovi je priradený v pravej časti panelu výsledok vyšetrenia TP53. U jedného pacienta sme našli mutáciu A86T v oblasti proteínu bohatej na prolín (PD). U piatich pacientov sme našli prítomnosť polymorfizmu P72R zatiaľčo zvyšné vyšetrované vzorky nevykazovali žiadnu odchýlku od referenčnej sekvencie génu TP53.

### Diskusia

V predloženej štúdií mutačného stavu génu pre TP53 u 11 pacientov s ochorením CLL sme zachytili u jedného z nich mutáciu pozostávajúcu z výmeny aminokyseliny Arginín na pozícii 86 proteínu TP53 za Treonín (A86T, Obr. 1). Mutácia sa nachádza v doméne proteínu TP53, označovanej ako PD-“proline rich domain“. Porovnanie tejto mutácie s verziou-13 TP53 mutačnej databázy na „IARC“ bolo negatívne. Išlo pre nás o prekvapivé zistenie, pretože spomínaná databáza disponuje 24785 somatickými a 423 hereditárnymi mutáciami génu TP53, zozbieranými z celého sveta. Databáza ďalej uvádza že nami zistená mutácia by nemala mať negatívny efekt na „splicing“ a transkripčnú aktivitu TP53 proteínu. Čo je zaujímavé, spomenutá databáza udáva potenciálny negatívny dopad na štruktúru a funkciu proteínu. Znamená to, že by sa eventuálne mohlo jednať o mutáciu s negatívnym dopadom na funkciu TP53 a teda aj na priebeh ochorenia CLL u nositeľa tejto mutácie (pre popis vplyvu mutácií v TP53 na ochorenie CLL pozri referencie veľkých štúdií, uvedených v Úvode). Zaujímavosťou tiež je, že nositeľ tejto mutácie je najmladším pacientom z našej vyšetrovanej skupiny

(Obr. 1) a tiež pacientom ktorý okrem genetickej aberácie TP53 má aj pozitívny nález pre iný negatívny cytogenetický marker 11q22. Z pohľadu výskumného tímu aktuálne premýšľame o dizajne experimentálneho prístupe, ktorý by nám význam spomenutej novej mutácie v géne TP53 pomohol objasniť.

## **Materiál a metódy**

### ***Menežment vyšetovaných vzoriek***

Na predloženej štúdií sme použili vzorky 6 pacientov (vek: 51, 57, 71, 74, 76 a 77 rokov) a 5 pacientiek (vek: 63, 65, 75, 79 a 79 rokov) s ochorením CLL. Všetky vyšetované vzorky pacientov boli zasielané z krajskej Kliniky hematológie a onkohematológie v Košiciach do laboratória lekárskej genetiky SEMBID,s.r.o. na rutinné vyšetrenie CLL-asociovaných cytogenetických aberácií t/del 14q32 , del(13q), +12, del(11q22-23), del(17p) a molekulovo biologickej analýzy rearenžmentov IgH. V laboratóriu SEMBID,s.r.o. bola zriadená kompletná dokumentácia vzoriek a laboratórium zodpovedá za ich manažment v rámci predloženej štúdie.

### ***Analýza mutačného stavu TP53***

Pri analýze génu TP53 vyšetrujeme jeho celú kódujú oblasť (11 exónov) a príľahlé intronické úseky. Z izolovanej genomickej DNA amplifikujeme celý gén v 6 fragmentoch ktoré sa potom podrobujú sekvenáčnej analýze na DNA analyzátoe ABI310 podľa štandardných protokolov.

## **Pod'akovanie**

*Publikácia vznikla na základe finančnej podpory Agentúry Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu SR pre štrukturálne fondy EÚ pri riešení projektu s ITMS kódom: 26220220143 (100%).*

## **Referencie**

- Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Pigué H, Goasguen J, Vaugier G, Potron G, Colona P, Oberling F, Thomas M, Tchernia G, Jacquillat C, Boivin P, Lesty C, Duault MT, Monconduit M, Belabbes S, Gremy F,. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*, 1981, 48(1), 198-206.
- Byrd JC, Stilgenbauer S, Flinn IW,. Chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2004, 163-183
- Dicker F, Herholz H, Schnittger S, Nakao A, Patten N, Wu L, Kern W, Haferlach T, Haferlach C,. The detection of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia independently predicts rapid disease progression and is highly correlated with a complex aberrant karyotype. *Leukemia*, 2009, 23(1), 117-124.

- Dunphy CH,. Applications of flow cytometry and immunohistochemistry to diagnostic hematopathology. *Arch Pathol Lab Med*, 2004, 128, 1004-1022.
- Olivier M, Petitjean A, Marcel V, Pétré A, Mounawar M, Plymoth A, de Fromental CC, Hainaut P,. Recent advances in p53 research:interdisciplinary perspective. *Cancer Gene Ther*, 2009, 16(1), 1-12.
- Quijano S, López A, Rasillo A, Sayagués JM, Barrena S, Sánchez ML, Teodosio C, Giraldo P, Giralt M, Pérez MC, Romero M, Perdiguier L, Orfao A,. Impact of trisomy 12, del(13q), del(17p), and del(11q) on the immunophenotype, DNA ploidy status, and proliferative rate of leukemic B-cells in chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry B Clin Cytom*, 2008, 74(3), 139-149
- Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS,. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 1975, 46(2), 219-234
- Rossi D, Cerri M, Deambrogi C, Sozzi E, Cresta S, Rasi S, De Paoli L, Spina V, Gattei V, Capello D, Forconi F, Lauria F, Gaidano G,. The prognostic value of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia is independent of Del17p13: implications for overall survival and chemorefractoriness. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(3), 995-1004.
- Salin H, Ricoul M, Morat L, Sabatier L,. Increased genomic alteration complexity and telomere shortening in B-CLL cells resistant to radiation-induced apoptosis. *Cytogen Genome Res*, 2008, 122, 343-349
- Zenz T, Benner A, Döhner H, Stilgenbauer S,. Chronic lymphocytic leukemia and treatment resistance in cancer. *Cell Cycle*, 2008, 7(24), 3810-3814.

## **Diagnostika neurodegeneratívnych ochorení**

*Dubayová K.<sup>1</sup>, Čakanová G.<sup>1</sup>, Vašková J.<sup>1</sup>, Lučková I.<sup>1</sup>, Bochová I.<sup>1</sup>, Sabo J.<sup>2</sup>,  
Karabinoš A.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>SEMBID, s.r.o., Výskumné centrum aplikovanej biomedicínskej diagnostiky  
080 01 Prešov

<sup>2</sup>Ústav lekárskej a klinickej biofyziky, Lekárska fakulta UPJŠ v Košiciach  
Trieda SNP1, 040 11 Košice

\*Korešpondujúci autor: A. Karabinoš, SEMBID,s.r.o., Výskumné centrum aplikovanej biomedicínskej diagnostiky, Masarykova 16, 080 01 Prešov  
Tel: +421 905 402 683, e-mail: sembid.pp@gmail.com

### **Abstrakt**

Minimálne 18 geneticky podmienených neurologických a svalových chorôb ľudí má príčinu v expanzii krátkych opakujúcich sa sekvencií v genóme človeka nazývaných tiež Short Tandem Repeats (STR). Expanzia STR markerov sa diagnostikuje metódou fragmentačnej analýzy nazývanej tiež QF-PCR (kvantifikačná fluorescenčná PCR). V našom laboratóriu touto metodikou diagnostikujeme ochorenie Chorea Huntington (HD), Friedreichova ataxia (FA) a šesť typov spinocerebelárnych ataxií (SCA). V priebehu 2 rokov bolo u nás vyšetrených 16 pacientov s podozrením na ochorenia FA, pričom u jedného pacienta bola diagnostikovaná FA a u jedného pacienta nájdená jedna expandovaná alela. V rovnakom čase sme analyzovali 10 pacientov s HD, pričom u 4 bolo toto ochorenie potvrdené. S diagnózou spinocerebelárnych ataxií sme v priebehu dvoch rokov vyšetrili 15 pacientov, pričom u jedného bola potvrdená diagnóza SCA3.

### **Úvod**

Minimálne 18 geneticky podmienených neurologických a svalových chorôb ľudí má príčinu v expanzii krátkych opakujúcich sa sekvencií v genóme človeka nazývaných aj Short Tandem Repeats (STR). Jednou z týchto ochorení je aj Friedreichova ataxia (FA) predstavujúca autozomálne recesívne ochorenie, u ktorého sa vyšetruje relevantná oblasť génu pre Frataxín. V tejto oblasti spomenutého génu sa nachádza GAA – triplet, pričom u zdravého jedinca je ich počet medzi 7 – 22, zatiaľčo postihnutí jedinci ich majú 200 až 900 (Delatycki et al., 2000). Ďalším známym ochorením z tejto skupiny je Chorea Huntington (HD), autozomálne dominantné ochorenie u ktorého sa vyšetruje CAG-triplet v relevantnej oblasti génu Huntingtin, lokalizovaného na chromozóme 4. Normou je počet tripletov nižší ako 35, patologických je viac ako 39 CAG-tripletov (Margolis a Ross, 2003). Ďalšou nie menej významnou skupinou neurodegeneratívnych ochorení s expanziou tripletov v konkrétnom géne sú autozomálne dominantné

ochorenia nazývané ako spinocerebelárne ataxie (SCA; Freund et al, 2009). V rámci nich sa definuje napríklad spinocerebelárna ataxia 1 (SCA1) SCA1 u ktorej majú zdraví jedinci pod 36 CAG-tripletov v géne pre Ataxin 1, lokalizovanom na chromozóme 6, zatiaľčo patológiu predstavuje prítomnosť viac ako 40 CAG-tripletov. U SCA2 majú zdraví jedinci pod 32 CAG-tripletov v géne pre Ataxin 2, lokalizovanom na chromozóme 12, zatiaľčo patológiu označuje prítomnosť 33 až 77 CAG-tripletov. U SCA3 majú zdraví jedinci medzi 12-40 CAG-tripletov v géne pre MJD, lokalizovanom na chromozóme 14, zatiaľčo patológiu označuje prítomnosť viac ako 55 CAG-tripletov. U SCA6 majú zdraví jedinci medzi 8 až 18 CAG-tripletov v géne pre kalciový kanál CACNL1A4, lokalizovanom na chromozóme 19, zatiaľčo patológiu označuje prítomnosť medzi 33 až 77 CAG-tripletov. U SCA7 majú zdraví jedinci medzi 7-17 CAG-tripletov v géne pre Ataxin 7, lokalizovanom na chromozóme 3, zatiaľčo patológiu označuje prítomnosť 38 až 130 CAG-tripletov. U SCA17 majú zdraví jedinci medzi 25-42 CAG-tripletov v géne pre TATA BP, lokalizovanom na chromozóme 6, zatiaľčo patológiu označuje prítomnosť vyše 44 CAG-tripletov.

V predloženej štúdií sme vyšetrovali vzorky 16 pacientov s podozrením na ochorenie FA, 10 pacientov s podozrením na ochorenie HD ako aj 15 pacientov s podozrením na ochorenie SCA.

## Výsledky

Vyšetrili sme mutačný stav relevantných génov u 16 pacientov s podozrením na ochorenie FA, 10 pacientov s podozrením na ochorenie HD ako aj 15 pacientov s podozrením na ochorenie SCA. Výsledky tejto analýzy sumarizuje Tabuľka 1. U jedného pacienta bola diagnostikovaná FA, u jedného pacienta nájdená jedna expandovaná alela „FA génu“, u 4 pacientov bolo diagnostikované ochorenie Huntingtonova Chorea a konečne u jedného pacienta sme potvrdili expanziu CAG-tripletu v géne MJD zodpovednú za ochorenie spinocerebelárne ochorenie typu 3.

<b>Fiedreichova ataxia:</b>		
	<b>Alela 1</b>	<b>Alela 2</b>
Zdraví jedinci	7±2 až	22±2 GAA-tripletov
1. pacient s jednou exp. al. (Ž, vek 33 rokov)	8±2 a	~500 GAA-tripletov
Diagnostikovaná FRDA		
2. pacient (Ž, vek 23 rokov)	~200 a	~330 GAA-tripletov
<b>Huntingtonova chorea:</b>		
	<b>Alela 1</b>	<b>Alela 2</b>
Zdraví jedinci	12±2 až	29±2 CAG-tripletov

Diagnostikovaná Chorea Huntington			
1. pacient (M, vek 67 rokov)		14±2	42±2 CAG-tripletov
2. pacient (M, vek 31 rokov)		27±2	50±2 CAG-tripletov
3. pacient (Ž, vek 29 rokov)		23±2	53±2 CAG-tripletov
4. pacient (M, vek 25 rokov)		22±2	57±2 CAG-tripletov
<b>Spinocerebelárna ataxia:</b>			
Zdraví jedinci	SCA1	27±1	až 32±1 CAG-tripletov
	SCA2	19±1	až 28±1 CAG-tripletov
	SCA3	14±1	až 29±1 CAG-tripletov
	SCA6	3±1	až 12±1 CAG-tripletov
	SCA7	5±2	až 11±2 CAG-tripletov
	SCA17	34±1	až 41±1 CAG-tripletov
Diagnostikovaná	SCA3	36±1	a 72±1 CAG-tripletov
1. pacient (Ž, vek 33 rokov)			

Tabuľka 1. Výsledok fragmentačnej DNA analýzy jednotlivých pacientov zameranej na diagnostiku ochorenia Friedreichova ataxia (FA), Huntingtonova chorea (HD) alebo spinocerebelárna ataxia typu SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7 a SCA17. Udaný je aj vek pacienta a jeho pohlavie ako M-mužské a Ž-ženské. Ku každému pacientovi je priradený v pravej časti panelu výsledok vyšetrenia v podobe zisteného počtu tripletov v prvej a druhej alele vyšetrovaného génu. U jedného pacienta bola diagnostikovaná FA, u jedného pacienta nájdená jedna expandovaná alela „FA génu“, u 4 pacientov bolo diagnostikované ochorenie HD a konečne u jedného pacienta sme potvrdili expanziu CAG-tripletu v géne MJD zodpovednú za ochorenie SCA3.

## Diskusia

V predloženej štúdií STR tripletov v génoch zodpovedných za jednotlivé typy neurodegeneratívnych ochorení u indikovaných pacientov sme u jedného pacienta diagnostikovali FA, u jedného pacienta bola nájdená jedna expandovaná alela „FA génu“, u 4 pacientov bolo diagnostikované ochorenie HD a konečne u jedného pacienta sme potvrdili expanziu CAG-tripletu v géne MJD zodpovednú za ochorenie SCA3. U väčšiny pacientov, ktorí boli u nás indikovaní na vyššie spomenuté fragmentačné DNA vyšetrenia, sa opakovala symptomatológia často zahrňujúca skorý nástup ochorenia s neistou chôdzou, poruchou rovnováhy, dysartriou, parézu dolných končatín rôzneho stupňa, areflexiu a/alebo poruchy hĺbkovej citlivosti. Často sa pripájali poruchy pyramidových dráh, skolióza alebo kardiomyopatia. Z ostatných pridružených symptómov sa niekedy pozorovala aj atrofia optického nervu, nystagmus, porucha sluchu alebo dokonca cukrovka. Za týchto podmienok dosť difúznej a málo nešpecifickej symptomatológie sa javilo fragmentačné DNA vyšetrenie jednotlivých úsekov génov pre Frataxín, Huntingtín alebo jednotlivé SCA-špecifické gény z nášho vyšetrovaného portfólia ako unikátna diagnostická pomôcka, ktorá bola schopná nielen potvrdiť diagnózu neurodegeneratívneho ochorenia ale aj presne zašpecifikovať jeho

typ. Tento nález znamenal pre lekárov presnú informáciu, ktorá mu pomohla nastaviť pacienta na ochorenie-špecifickú liečbu a z pohľadu klinického genetika iniciovala podrobnú rodinnú anamnézu pacienta s cieľom čo najpresnejšieho informovania pacienta o možnom priebehu ochorenia prípadne o riziku, ktoré toto ochorenie môže predstavovať pre jeho potomstvo. V zmysle týchto úspechov pracujeme na rozšírení portfólia vyšetrovaných génov zodpovedných za jednotlivé typy neurodegeneratívnych ochorení ako aj na výskumných úlohách spojených s problematikou neurodegenerácie. Výsledky týchto snažení budú predmetom nasledujúcich štúdií.

### **Materiál a metódy**

#### ***Menežment vyšetrovaných vzoriek***

Na predloženej štúdií sme použili vzorky 16 pacientov s podozrením na ochorenie FA, 10 pacientov s podozrením na ochorenie HD a 15 pacientov s podozrením na ochorenie SCA. Všetky vyšetované vzorky pacientov boli zasielané z príslušných ambulancií klinického genetika v Prešove alebo Košiciach do laboratória lekárskej genetiky SEMBID, s.r.o.. V laboratóriu bola zriadená kompletná dokumentácia vzoriek a laboratórium zodpovedá za ich manažment v rámci predloženej štúdie.

#### ***Fragmentačná DNA analýza špecifických úsekov jednotlivých génov***

Pri analýze génov pre Frataxin, Huntingtin, Ataxin1, Ataxin 2, MJD gén, CACNL1A4, Ataxin 7 a TATA BP vyšetrujeme konkrétny úsek génu na počet GAA (FA) alebo CAG tripletov. Z izolovanej genomickej DNA amplifikujeme konkrétny úsek génu pomocou metodiky PCR ktorý po následnej purifikácii podrobujeme fragmentačnej DNA analýze na DNA analyzátore ABI377 podľa štandardných protokolov.

### **Pod'akovanie**

*Publikácia vznikla na základe finančnej podpory Agentúry Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu SR pre štrukturálne fondy EÚ pri riešení projektu s ITMS kódom: 26220220143 (100%).*

### **Referencie**

- Delatycki MB, Williamson R, Forrest SM., Friedreich ataxia: an overview. *J Med Genet*, 2000, 37, 1-8.
- Freund AA, Scola RH, Teive HAG, Arndt RC, da Costa-Ribeiro MCV, Alle LF, Werneck LC., Spinocerebellar ataxias. *Arq Neuropsiquiatr*, 2009, 67(4), 1124-1132.
- Margolis RL, Ross CA., Diagnosis of Huntington disease. *Clin Chem*, 2003, 49(10), 1726-1732.



## Metabolomický fluorescenčný fingerprinting moču

*Dubayová K.\*, Lučková I.<sup>1</sup>, Sabo J.<sup>2</sup>, Karabinoš A.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Výskumné centrum aplikovanej biomedicínskej diagnostiky, SEMBID, s.r.o.  
Pražská 4, 040 11 Košice

<sup>2</sup>Ústav lekárskej a klinickej biofyziky, LF UPJŠ v Košiciach,  
Trieda SNP 1, 040 66 Košice

\*Korešpondujúci autor: K.Dubayová, SEMBID,s.r.o., Výskumné centrum aplikovanej biomedicínskej diagnostiky, Pražská 4, 040 11 Košice  
Tel: +421 556857340, e-mail: sembid.vyskum@gmail.com

### Abstrakt

Fluorescenčný metabolóm moču bol definovaný ako fluorescenčný koncentračný profil vytvorený snímaním synchronného excitačného spektra, ktorý bol graficky spracovaný do fluorescenčnej koncentračnej matrice. Koncentračná matica unikátne rieši problém koncentračnej rôznorodosti močov a zároveň poskytuje diagnosticky hodnotné informácie o jeho kvantitatívnom aj kvalitatívnom zložení. Porovnaním grafického záznamu skúmaného moču s definovaným štandardným metabolickým profilom je možné aj bez detailného poznania zloženia okamžite identifikovať odlišnosti. Vizualizácia zloženia moču prináša nové diagnosticky významné informácie, ktoré dopĺňajú výsledky klasickej analýzy.

**Kľúčové slová:** fluorescencia, moč, metabolóm, synchronné spektrum, koncentračná matica

### Úvod

Biologické tekutiny sú jedinečným zdrojom informácií o stave organizmu. Kompletný kvalitatívny a kvantitatívny súbor všetkých prítomných metabolitov sa nazýva metabolóm a jeho zloženie je výsledkom metabolických procesov, ktoré prebiehajú v organizme.

Na štúdium metabolómu sa využívajú rôzne analytické prístupy: cielená analýza metabolitov (Villas-Bôas et al., 2007), metabolomika (Van a Veenstra, 2009; Villas-Bôas et al., 2007, Ellis et al., 2007; Weckwerth a Morgenthal, 2005; Dunn a Ellis, 2005), metabonomika (Robertson, 2005; Ellis et al., 2007), metabolitové profilovanie (Sweetlove et al., 2003), či metabolitové odtlačkovanie – fingerprinting. Stratégie bez individuálneho určovania identity metabolitov sú označené ako metabolický „printing“. Metabolitové odtlačkovanie (fingerprinting) je nešpecifická analýza založená na snímaní spektier rôzneho typu, ktoré poskytujú „odtlačky prstov“ metabolitov a sú efektívnym nástrojom v porovnávaní a triedení vzoriek. Aplikácia tejto stratégie je založená na vizualizácii zloženia a vyžaduje porovnávací etalón na identifikáciu

odlišností. Fingerprinting neposkytuje klasické informácie o určitých metabolitoch. Výhodou metabolitového fingerprintingu je, že bez chromatografickej separácie a komplikovanej detekcie poskytuje hodnotné informácie o metabolóme analyzovanej vzorky. Je vhodné najmä na rýchlu klasifikáciu určitých typov vzoriek, na diagnostické účely alebo ako skriningová metóda (Fiehn, 2001; Ellis et al., 2007).

Fluorescenčná profilová analýza na základe trojrozmerného snímania fluorescenčných spektier definuje zloženie metabolómu vo forme „obrázku“ ako fingerprint. Porovnaním grafického záznamu analyzovanej vzorky s fingerprintom štandardu je možné okamžite odhaliť kvalitatívne aj kvantitatívne zmeny v zložení metabolómu. Odhalenie patologického procesu umožňuje priradenie fluorescenčných parametrov ku konkrétnym metabolitom.

Moč ako celok sa vyznačuje modro-zelenou fluorescenciou (Leiner et al., 1987). Viaceré zložky moču fluoreskujú, ale nie všetky boli identifikované z hľadiska chemickej štruktúry. Najznámejšie z nich sú metabolity tryptofánu, katecholamínov a porfyríny (Goiffon, et. al., 2009; Meijer et al., 2000).

Moč ako fluorescenčný metabolóm, je mimoriadne komplikovaný analytický systém, pretože koncentrácie jednotlivých fluorofórov v moči sa rádovo líšia a navyše u moču sa mení aj obsah vody, takže aj samotný moč ako celok koncentračne varíruje v závislosti od pitného režimu, prípadne koncentračnej schopnosti obličiek.

Na vizualizáciu zloženia moču bola aplikovaná špeciálna technika snímania fluorescencie, tzv. synchronne fluorescenčné spektrum ( $\Delta\lambda = 30$  nm) (Dubayová, et al., 2003), ktoré bolo snímané pri systematicky, geometrickým radom sa meniacich koncentráciách vzorky moču. Výsledkom počítačového spracovania je obrázok - fluorescenčná koncentračná matica, ktorá vyjadruje vzťah medzi intenzitou fluorescencie, excitačnými vlnovými dĺžkami a riedením moču (Kušnir et al., 2005).

### **Materiál a metódy**

Ranný moč gynekologických pacientiek vyšetrených v laboratóriu SEMBID a dobrovoľných zdravých jedincov. Doplnujúce údaje boli získané z chorobopisu a z dotazníka, ktorý pacientky aj dobrovoľníci vyplnili. V dotazníku boli údaje o užívaní liekov, vitamínov, prípadne iných skutočnostiach, ktoré by závažným spôsobom mohli ovplyvniť fluorescenčnú analýzu moču. Súhlas so spracovaním údajov bol potvrdený vlastnoručným podpisom.

Patologické zložky moču (proteíny, glukóza, ketolátky, žlčové farbivá, krv) a pH boli semikvantitatívne stanovené diagnostickými prúžkami Heptaphan.

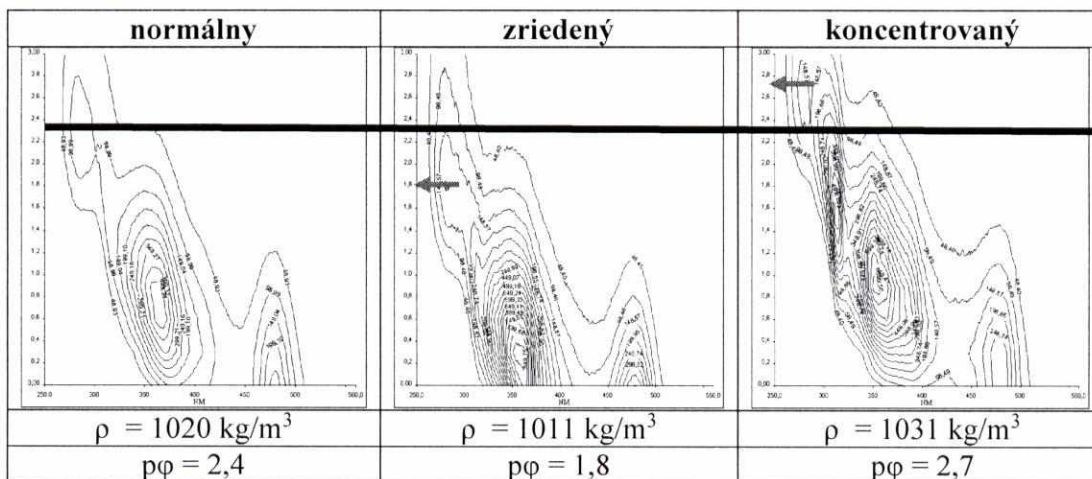
Fluorescenčná analýza moču (Fluorescenčný spektrofotometer Perkin Elmer Model LS55 softvar FLWinlab, excitačná/emisná štrbina 5/5 nm, kremenná kyveta šírky 1 cm, skenovacia rýchlosť monochromátorov 20 nm/s.). Vzorka moču bola centrifugovaná 10 min (10 000 otáčok za minútu) a následne riedená ultračistou vodou v pomere 1:1 geometrickým radom. Zo série riedení bola vytvorená fluorescenčná koncentračná

matrica snímaním synchrónnych spektier s konštantne nastaveným rozdielom vlnových dĺžok  $\Delta\lambda = 30$  nm. Fluorescencia bola vyjadrená ako funkcia excitačnej vlnovej dĺžky v rozsahu 250 – 550 nm. Koncentračné matrice predstavujú trojrozmerný priestorový útvar, ktorého kolmým priemetom do roviny ohraničenej osou excitačných vlnových dĺžok ( $\lambda_{ex}$ ) a osou riedení sa zobrazí jeho dvojrozmerná projekcia, tzv. koncentračná matrica. Os y predstavuje záporný dekadický logaritmus objemového zlomku moču  $p\phi = -\log \phi$  pri danom riedení (analógia pH). Hodnota jednej vrstevnice predstavuje 5% celkovej fluorescence. Súradnicový systém koncentračnej matrice: os x -  $\lambda_{EX}$ ; os y -  $p\phi$ . (Kušnír et al., 2005). Koncentračná matrica bola transformovaná do jednoduchého grafického profilu vlastným autorským programom.

### Výsledky a diskusia

Koncentračná fluorescenčná matrica moču (obr. 1) informuje o celkovej koncentrácii moču ako takého, resp. množstve vody v moči, o kvalitatívnom aj kvantitatívnom zložení fluorescenčného metabolómu. Pre maximálne vyťaženie informácií o vzorke moču je nevyhnutná správna interpretácia grafických charakteristík koncentračnej matrice. Súradnica x – excitačná vlnová dĺžka je kvalitatívnou charakteristikou fluorofórov (fluorescenčných metabolitov), súradnica y -  $p\phi$  informuje o množstve vody vo vzorke moču (tzv. hustota moču) a súradnica z – intenzita fluorescence je kvantitatívnou charakteristikou fluorofórov (čím väčší počet vrstevníc, tým vyššia koncentrácia fluorofóru).

**Koncentrácia moču.** Množstvo vody v moči je údaj, ktorý závisí od príjmu tekutín a celkového vylučovania vody obličkami. Hodnoty  $p\phi$  jednotlivých fluorescenčných centier závisia od základnej – vstupnej koncentrácie vzorky moču. Hustejší moč má vyššie hodnoty  $p\phi$ , redší nižšie. Pre posúdenie hustoty vzorky moču sme zvolili hodnotu  $p\phi$  prvého fluorescenčného centra. Táto súradnica predstavuje fiktívne ukotvenie matrice v súradnicovom systéme a informuje koľko vody je vo vzorke moču (Dubayová, 2010). Priemerná hodnota  $p\phi$  močov zdravých jedincov sa pohybuje v rozmedzí 2,1 – 2,4. Hodnoty vyššie ako 2,4 sú typické pre koncentrované moče, hodnoty nižšie ako 2,1 indikujú zriedené moče (obr.1).



Obrázok 1 Porovnanie koncentračných matric močov s rôznou hustotou. Číselné údaje charakterizujú celkovú koncentráciu vzorky moču. ( $\rho$  - merná hmotnosť;  $p\varphi$  - charakteristika objemového zlomku)

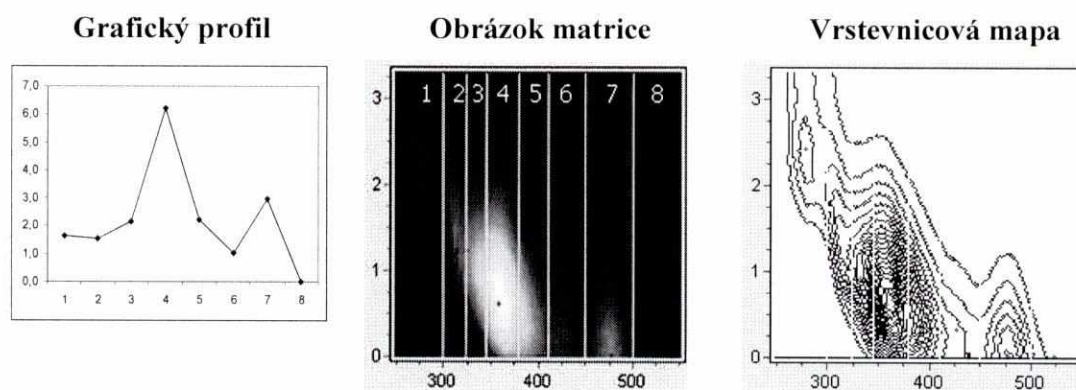
**Moč ako fluorescenčný metabolóm.** Koncentračnú maticu sme rozdelili do ôsmich fluorescenčných zón (obr. 2, tab.1), ktoré reprezentujú jednotlivé skupiny fluorofórov. Jednotlivé zóny nie sú rozdelené rovnomerne, niektoré fluorofóry zasahujú aj dve zóny. Farebné zobrazenie koncentračnej matrice uľahčuje identifikáciu jednotlivých fluorofórov.

Tabuľka 1 Fluorescenčné zóny koncentračnej matrice  $\Delta\lambda = 30 \text{ nm}$

Zóna	$\lambda_{EX}$ [nm]	Metabolit
1	250 - 300	metabolity katecholamínov, deriváty indolu, proteíny
2	300 - 325	indolové metabolity tryptofánu, 5-HIAA
3	325 - 345	kyselina nikotínová, kyselina izonikotínová, kyselina 3-hydroxy-
4	345 - 380	antranilová, kyselina močová, pyridoxín
5	380 - 410	kyselina xanturenová
6	410 - 450	pteríny, kynurenín, kyselina listová
7	450 - 500	flavíny
8	500 - 550	porfyríny

Ďalším predpokladom úspešného využitia koncentračných matric v klinickej praxi je definovanie štandardu, ktorý predstavuje normálne zloženie moču za fyziologických podmienok. Profilová fluorescenčná analýza moču sa opiera o topografický prístup založený na porovnávaní grafického záznamu vzorky s definovaným štandardom

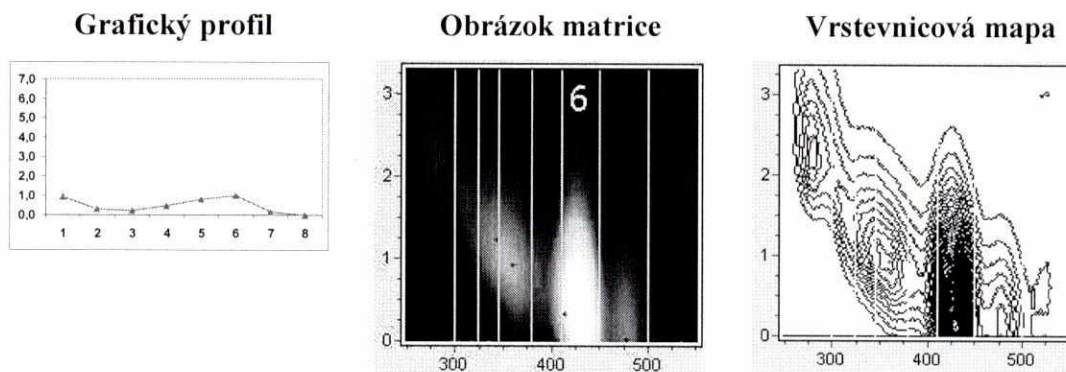
a identifikácii rozdielov, ktoré vedú k odhaleniu patologického procesu. Grafický štandard predstavuje koncentračná matica matematicky vytvorená ako aritmetický priemer koncentračných matic zdravých jedincov. Porovnaním obrázku analyzovaného moču s definovaným štandardom zdravého jedinca je možné okamžite identifikovať zmenu v zložení. Zmenená intenzita niektorej zóny je veľmi často postrehnuteľná voľným okom. Vyhodnocovanie koncentračných matic len pohľadom je však pre rutinnú prax neefektívne a nepraktické a pre automatické počítačové vyhodnocovanie nepoužiteľné. Preto je nevyhnutné „obrázok“ matrice pretransformovať do číselnej, resp. jednoduchšej grafickej podoby. Grafický profil bol vytvorený matematickým spracovaním intenzít fluorescence jednotlivých zón vzhľadom k zóne s najnižšou intenzitou fluorescence u zdravých jedincov (zóna 6). Grafický profil názorne reprezentuje koncentračnú maticu a okamžite identifikuje rozdiely spôsobené zmenou v zložení metabolómu (Dubayová, 2010).



Obrázok.2 Grafický štandard v podobe profilu a rôzneho zobrazenia koncentračných matic

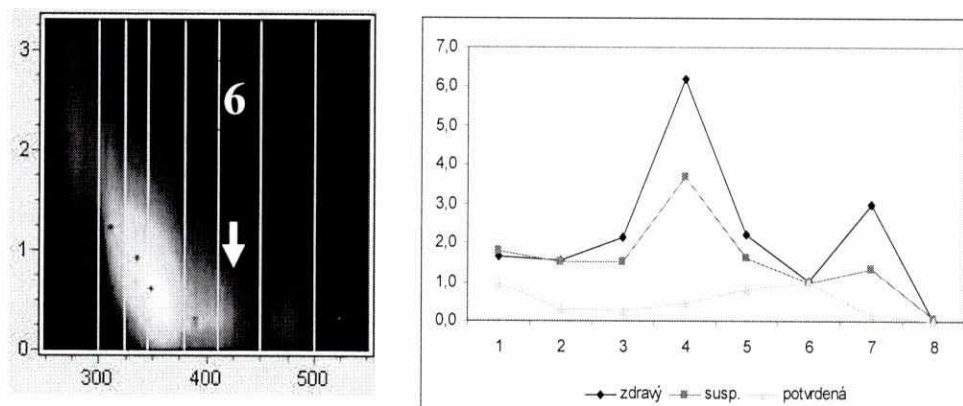
Zmenený grafický profil v určitej zóne súvisí so zvýšenou koncentráciou príslušných metabolitov a tak identifikuje patologický proces.

Zóna 6 s intervalom 410 – 450 nm sa javí diagnosticky veľmi zaujímavá. V uvedenom intervale synchronného spektra sa fluorescenčne prejavujú pteríny, kynurenín a kyselina listová. Intenzita fluorescence tejto zóny je za normálnych podmienok nízka a v grafickom profile hodnota tejto zóny je rovná 1. U väčšiny pacientiek s onkogynekologickými ochoreniami bol oproti štandardu výrazne zmenený grafický profil v dôsledku vysokej intenzity fluorescence v zóne 6 (obr. 3). Zvýšená intenzita fluorescence tejto zóny potom výrazne mení tvar grafického profilu (porovnaj obr. 2 a 3). Zvýšené vylučovanie pterínov močom bolo popísané u pacientov s nádorovým procesom (Tomandl, J., 1998; Melichar, et al., 2008).



Obrázok 3 Zvýšená zóna 6 u onkogynekologickej pacientky

Profil pacientky so suspektným karcinómom prsníka sleduje priebeh štandardu, ale z dôvodu zvýšenej zóny 6 je pod jeho úrovňou. Zvýšená intenzita zóny 6 je viditeľná aj na obrázku matrice (obr. 4)



Obrázok 4 Koncentračná matrica a grafický profil pacientky so susp. karcinómom prsníka. Grafický profil pacientky je porovnaný so štandardom a potvrdenou diagnózou.

### Záver

Snímanie synchronných fluorescenčných spektier programovo riedeného moču a ich trojrozmerné grafické spracovanie do matrice nebolo doteraz aplikované na grafickú definíciu zloženia žiadneho biologického materiálu. Koncentračná matrica je unikátnym a originálnym prístupom k analýze multifluorescenčného systému. Vyriešila problém koncentračnej rôznorodosti močov a poskytla jedinečné doplňujúce údaje ku klasickej analýze moču.

Význam fluorescenčnej profilovej analýzy spočíva v jej preskríningovej funkcii. Fluorescenčná koncentračná matrica informuje o kvalitatívnom aj kvantitatívnom zložení metabolómu, cielene a špecificky upozorňuje na význam ďalších konkrétnych podrobných analýz a odhaľuje aj nepredvídané metabolity. Vzťah medzi

koncentračnými maticami a niektorými ochoreniami demonštruje vysokú citlivosť a reprodukovateľnosť koncentračného fluorescenčného profilu moču.

#### **Pod'akovanie**

*Publikácia vznikla na základe finančnej podpory Agentúry Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu SR pre štrukturálne fondy EÚ pri riešení projektu s ITMS kódom: 26220220143 (100%).*

#### **Literatúra**

- Van, Q. N., Veenstra, T.D.: How close is the bench to the bedside? Metabolic profiling in cancer research. In *Genome Medicine*, 2009, 1:5, dostupné na internete: <http://genomemedicine.com/content/1/1/5>
- Villas-Bôas, S., G., Roessner, U., Hansen, M., A. E., Smedsgaard, J. - Nielsen, J. 2007. *Metabolome Analysis: An Introduction*. John Wiley & Sons, Inc. 2007
- Ellis, D.I., Dunn, W.B., Griffin, J.L., Alwood, J.L., Goodacre, R.: Metabolic fingerprinting as a diagnostic tool. In *Pharmacogenomics*, 2007, 8, 9, 1243 – 1266
- Weckwerth, W. Morgentahl, K.: Metabolomics: from pattern recognition to biological interpretation. In *Drug Discovery Today: Targets*, 2005, 10: 1551-1558.
- Dunn, W., B., Ellis, D. 2005. Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. In *Trends in Analytical Chemistry* 2005, 24, 285 – 294.
- Robertson, 2005;
- Fiehn, O., Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modeling to understand metabolic networks. In *Comparative and Functional Genomics*, 2001, 2, 155-168
- Leiner, M. J. P., Hubmann, M. R., Wolfbeis, O. S. 1987. The total fluorescence of human urine. In *Analytica Chimica Acta*, 1987, 198, 13-23
- Goiffon, R. J., Akers, W. J., Berezin, M. Y., Lee, H., Achilefu, S.: Dynamic Noninvasive monitoring of renal function in vivo by fluorescence lifetime imaging. In *J Biomed Opt.* 2009, 14, 2 :020501
- Meijer, W.G., Kema, I. P., Volmer, M., Pax H.B. Willemse, P. H .B., De Vries, E.G.E.: Discriminating Capacity of Indole Markers in the Diagnosis of Carcinoid Tumors. In *Clinical Chemistry*, 2000, 46,10: 1588–1596
- Dubayová, K., Kušnir, J., Podracká, E., Diagnostic monitoring of urine by means of synchronous spectrum. In *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 2003, 55, 111-119

- Kušnír J., Dubayová K., Lešková L., Lajtár M., Concentration Matrices-Solutions for Fluorescence Definition of Urine. In *Analytical Letters*, 2005, 38/10, 1559-1567
- Dubayová, K., Diagnostický potenciál fluorescenčnej profilovej analýzy v klinickej biochémií. 2010, Košice, Habilitačná práca.
- Tomandl, J.: Pteriny. In *Chem. Listy*, 1998, 92: 689 - 697
- Melichar, B., Hyspler, R., Kalabova, H., Urbanek, L., Kremova, L., Solichova, D.: Gastrointestinal Permeability - a Parameter of Possible Prognostic Importance in Metastatic Colorectal Carcinoma. In *Pteridines*, 2008, 19: 19 - 22