

ŠTRUKTURÁLNA DYNAMIKA A MOLEKULOVÉ INTERAKCIE V ŽIVÝCH SYSTÉMOCH, VPLYV ENDOGÉNNYCH A EXOGÉNNYCH FAKTOROV

Obsah

1. SÚČASNÝ STAV PROBLEMATIKY	1
2. VLASTNÝ PRÍNOS K SÚČASNÉMU STAVU PROBLEMATIKY	4
3. VEDECKÉ CIELE - ZDÔVODNENIE A ANALÝZA	6
4. NÁVRH POSTUPOV NA DOSIAHNUTIE VEDECKÝCH CIEĽOV	7
5. INFRAŠTRUKTÚRA VÝSKUMU NA PRACOVISKU	8
6. POTENCIÁLNY SPOLOČENSKÝ PRÍNOS	9

V posledných piatich rokoch publikovali zamestnanci ústavu viac ako 60 prác v renomovaných karentovaných časopisoch, ktoré boli viac ako 100 krát citované (prehľad publikačnej činnosti pracovníkov na: <https://www.upjs.sk/public/media/9545/Publikacie-16.pdf>)

Projekty riešené na ústave sú realizované v rámci čiastkových orientácií, a preto je členenie na podkapitoly (kompletný prehľad na: <https://www.upjs.sk/public/media/9546/Granty-16.pdf>):

- A. Využitie molekulovo-biochemických metód pri diagnostike vybraných ochorení**
- B. Fluorescenčná spektrálna charakterizácia komplexných zmesí**
- C. Štúdium účinku vybraných prírodných/syntetických látok a ich vplyv na biochemické funkcie organizmu (aj na subcelulárnej úrovni)**

1. SÚČASNÝ STAV PROBLEMATIKY

A. Využitie molekulovo-biochemických metód pri diagnostike vybraných ochorení

V posledných rokoch došlo k výraznému pokroku v pochopení molekulových mechanizmov vzniku mnohých ochorení. Stanovenie jednotlivých molekulových markerov pri rôznych typoch ochorení, cielene zameriava pozornosť výskumu nielen na detekciu zmien expresie vybraných regulačných génov, ale aj na identifikáciu príslušných molekúl miRNA, ktoré sú pre dané ochorenie charakteristické. Následné detailnejšie skúmanie regulácie transkripčných mechanizmov umožňuje lepšie porozumenie vzniku, progresie daného ochorenia, prípadne monitorovanie úspešnosti liečby.

Jednou z oblastí využitia molekulovo-biochemických metód je detekcia skorých štádií rôznych typov gynekologických malignít (karcinóm prsníka, vaječníkov, tela a krčka maternice). Okrem základných markerov ako BRCA1/2 a CA125/Muc16 (relatívne nízka špecificita), existujú ďalšie biomarkery, väčšinou asociované s neoangiogenezou nádoru, ktorých hladina expresie sa výrazne odlišuje v priebehu fyziologickej angiogenézy oproti karcinogéze. Medzi spomínané markery patria aj AdliCAN, COL11A1, GMP6B a DR6, ktoré vykazujú 10 – 350 násobné zvýšenie expresie pri karcinóme žltého telieska, endometria a placenty. Okrem endoteliálnych buniek nádoru sú tieto markery produkované aj vaskulárnymi leukocyty a populáciou perivaskulárných buniek. Najnovšie štúdie detekcie endometriózy ako prekancerózy karcinómu endometria uteru, ale aj samostatného nádoru tela maternice sa zameriavajú na sledovanie transkripčnej aktivity génov zapojených do procesov adhézie buniek a regulácie apoptózy. Jedným z vhodných markerov je β -katenín, ktorý ovplyvňuje reguláciu transkripcie génov zapojených do Wnt signálnej dráhy a adhézie buniek. Pri aktivácii Wnt signalizácie dochádza k defosforylácii β -katenínu a jeho akumulácii v cytoplazme, čo má za následok jeho

translokáciu do jadra, kde pôsobí ako transkripčný faktor viacerých génov (napr. metaloproteináz 2 a 9, vaskulárneho endotelového rastového faktora – VEGF). Dostiaľ však žiaden marker (zo séra pacientiek) vzniku a progresie endometriózy nie je dostatočne senzitívny a špecifický, a preto sa využitie molekulových metód javí ako jedna z možných a perspektívnych ciest záchytu endometriózy ako prekancerózneho stavu, resp. pri diagnostike nádoru maternice.

Druhou oblasťou využitia molekulovo-biochemických metód je sledovanie vzniku a progresie malígneho melanómu (MM). MM je jedným z najagresívnejších druhov rakoviny. Primárne vzniká z pigment produkujúcich buniek melanocytov, ktoré sa vyznačujú špecifickými mechanizmami prežívania. Pôsobia hlavne proti viacerým karcinogénnym faktorom, vrátane UV žiarenia a vysoko reaktívnych medziproduktov melanogenézy. Kľúčové postavenie v metabolizme melanómu má transkripčný faktor asociovaný s mikroftalmiou (MITF, Microphthalmia Associated Transcription Factor), ktorý stojí v centre transkripčnej regulácie od embryonálneho vývoja normálnych melanocytov, cez ich diferenciaciu, udržanie identity až po prežívanie nielen normálnych, ale aj nádorových melanocytov. Expresia tohto transkripčného faktora v melanocytoch je aktivovaná niekoľkými signálnymi cestami, pričom blokovanie jeho expresie, alebo funkcie môže znamenať poruchu v regulácii antiapoptotických mechanizmov. MITF taktiež ovplyvňuje aktivitu matrixovej metaloproteinázy 14, ktorá je zodpovedná za zmenu tvaru melanocytov a za zvýšenie ich pohyblivosti a invazivity. Medzi ďalšie faktory ovplyvňujúce vznik a progresiu MM patrí aj detekcia polymorfizmov receptora vitamínu D₃ (VDR). Gén pre VDR sa nachádza na chromozóme 12q12-14 a obsahuje 2 promótorové oblasti, 8 kódujúcich exónov a 6 nekódujúcich exónov. Promótorové oblasti umožňujú syntézu viacerých špecifických izoformi finálneho transkriptu, z ktorých niektoré vplývajú na vznik MM. K najviac popísaným polymorfizmom s rôznou dĺžkou patria rs10735810, rs1544410 a rs731236. Analýza expresie VDR a jeho polymorfizmov môže poskytnúť informácie využiteľné pri liečbe melanómu pomocou vitamínu D a jeho analógov,

V neposlednom rade sa molekulovo-biochemické metódy používajú aj pri neinvazívnej diagnostike uroteliálneho karcinómu (UC). Pri vzniku agresívnej formy UC bola dokázaná prítomnosť špecifických miRNA (miRNA-96, 135b a 940) v moči ako aj v plnej krvi pacientov. Detekciou a analýzou týchto miRNA je možné určiť jednotlivé štádiá nádoru močového mechúra, čo môže prispieť ku skvalitneniu diagnostiky skorých štádií ochorenia pred objavením sa samotných príznakov. Stanovenie špecifických miRNA sa začína využívať aj pri detekcii a monitorovaní progresie aneurizmy hrudnej aorty (TAA). Dôležitú úlohu v patofyziológii TAA môžu zohrávať miRNA-19b, miRNA-302D a miRNA-340, ktorých hladiny expresie boli signifikantne zvýšené u pacientov s aneurizmou hrudnej aorty. Predchádzajúce štúdie ukázali, že miRNA-19a a 19b sú členmi klastra miRNA17-92, ktorý reguluje expresiu proteínov extracelulárnej hmoty, ako napr. rastového faktora spojivového tkaniva a trombospondínu 1. Pri vzniku a progresii TAA dochádza k patologickej remodelácii extracelulárneho matrixu (ECM), apoptóze buniek hladkého svalstva a zníženiu elasticity ciev. Jednou z hlavných dráh zapojených do vzniku TAA je signalizácia sprostredkovaná angiotenzinom 2 indukovaným TGF- β . Znížená hladina tohto rastového faktora naopak redukuje expresiu MMP a zabraňuje tým dilatácii aorty a progresii aneurizmy. U pacientov, ktorí podstúpili chirurgickú reparáciu aneurizmy, bola v aortickom tkanive zistená zvýšená expresia IL-6 a interferónu c (INF-c). Zvýšená expresia IL-6 vedie k akumulácii a indukcii monocytov/makrofágov, čo vedie k aktivácii chemotaktického mechanizmu cez monocytový chemotaktický proteín 1 (MCP-1: Monocyte Chemotactic Protein-1). Takto aktivované makrofágy produkujú proinflamačné cytokíny, chemokíny a ROS v stene ciev, čím dochádza k vzniku lokálneho zápalu a zmenám ECM. Infiltrujúce leukocyty urýchľujú patogenézu produkciou MMP, ktoré sú schopné degradovať dôležité komponenty steny aorty, vrátane elastínu a kolagénu.

Keďže je hladina expresie špecifických miRNA v zdravom tkanive pomerne stála, jej zmeny v priebehu patogenézy sú využiteľné aj pri detekcii a monitorovaní progresie neurodegeneratívnych ochorení ako napr. roztrúsená skleróza (SM: skleróza multiplex). SM je chronické zápalové ochorenie centrálného nervového systému, ktorého mechanizmus vzniku a priebehu na molekulovej úrovni nie je úplne objasnený. Bola objasnená úloha T lymfocytov exprimujúcich molekuly CD40 (bunky Th40). Tieto lymfocyty zohrávajú hlavnú úlohu pri rôznych autoimúnných ochoreniach. Sú hlavným miestom syntézy IL-17 a INF γ . Taktiež dochádza k dysregulácii syntézy miRNA (napr. miR-223, miR-15b) vo vzorkách krvi aj mozgovomiechového moku (CSF). Tento komplexný experimentálny prístup prispieva k rozšíreniu a skvalitneniu poznatkov o progresii, prípadne recidíve ochorenia. Mohol by tak

upresniť prognostickú informáciu pre lekára aj pacienta a následne prispieť k zjednodušeniu diagnostiky, či sledovaniu priebehu liečby SM.

B. Fluorescenčná spektrálna charakterizácia komplexných zmesí

Fluorimetria patrí medzi najuniverzálnejšie a najspoľahlivejšie metódy štúdia živej hmoty a procesov v nej prebiehajúcich. Ide o neinvazívnu metódu interakcie svetla s hmotou. Väčšina živých systémov obsahuje molekuly, ktoré sú po interakcii so svetelnou energiou schopné sekundárne emitovať žiarenie (fluorescencia, fosforescencia). Jeho analýzou dostávame bohaté informácie o štruktúre, zmenách, dynamike a chemických interakciách kľúčových molekúl v bunkách živých systémov, čo je podstatou mnohých moderných diagnostických metód. Vývoj fluorescenčných značiek, sond a v poslednom období aj tzv. biosenzorov vytvára predpoklady na ešte intenzívnejšie uplatnenie fluorescenčných techník v diagnostike. Príkladom uplatnenia chemoluminiscenčných metód je dôkaz vzniku aduktov DNA, ktoré môžu zohrávať úlohu biomarkerov alebo indikátorov expozície genotoxickým látkam, ktoré významne zvyšujú riziko karcinogenézy.

Významným sa javí využitie fluorescence v diagnostike prekancerózných lézií a tumorov, napríklad v urológii, gynekológii, či gastroenterológii, ale aj v iných medicínskych odboroch. Fluorescencia protoporfyrínu IX po indukcii kyselinou aminolevulovou sa v kombinácii s endoskopickým vyšetrením úspešne využíva pri lokalizácii a vizualizácii karcinómov močového mechúra. Prirodzená fluorescencia kolagénu a koncových produktov glykácie pri skenovaní 3D fluorescenčných matric povrchov kože umožňuje bližšie identifikovať kožné lézie a tumory. Veľmi efektívne je aj diagnostické uplatnenie sofistikovaných fluorescenčných techník v gynekológii. Prirodzená fluorescencia cervikálneho tkaniva sa študuje predovšetkým v súvislosti s prítomnosťou intraepiteliálnych neoplázií a dysplázií. Podobne aj endogénna fluorescencia normálneho a malígneho tkaniva pažeráka snímaná v priebehu endoskopického vyšetrenia ukázala zhodu s klasickým bioptickým vyšetrením. Lepšia vizualizácia môže výrazne skvalitniť informáciu o veľkosti a rozsahu lézie nevyhnutnú pre následnú liečbu.

Ďalšie aplikácie fluorescenčných a luminiscenčných techník vo všeobecnej biochémii sú také rozsiahle, že ich len stručne vymenujeme, napr. štúdium biologických membrán, apoptózy, oxidatívneho stresu, mitochondrií a voľných radikálov, environmentálnych biomarkerov, neurodegeneratívnych ochorení, kvalitatívna a kvantitatívna identifikácia liekov a drog.

C. Štúdium účinku vybraných prírodných/syntetických látok a ich vplyv na biochemické funkcie organizmu (aj na subcelulárnej úrovni)

Poznanie mechanizmu tvorby reaktívnych foriem predovšetkým kyslíka (ROS) a dusíka (RNS) zohráva dôležitú úlohu tak pri posudzovaní fyziologických, ako aj patologických dejov prebiehajúcich v organizme. Redoxnou rovnováhou regulované fyziologické procesy sú citlivé na nadmernú produkciu ROS z endogénneho alebo exogénneho zdroja. Ich dôležitosť je zdôraznená narušením rovnováhy pri rôznych ochoreniach súvisiacich s oxidačným stresom. Zmeny v redoxnej regulácii sú podkladom patofyziologických dejov spojených s procesom starnutia (napr. skracovanie telomér) a mnohých ochorení (napr. rakovina, *diabetes mellitus* typu 1, ateroskleróza, neurodegeneratívne ochorenia, reumatoidná artritída, HIV infekcia, ischemicko-reperfúzne poškodenie, obštrukčné spánkové apnoe).

Zatiaľ čo nízke hladiny ROS sú bunkami veľmi dobre tolerované, vysoké hladiny indukujú oxidačný stres. Pri fyziologických hladinách pôsobia reaktívne formy dusíka a kyslíka (RNOS) ako redoxní poslovia vo vnútrobunkových signálnych dráhach a regulácii. Aktivácia vnútorných signálnych dráh vedie k aktivácii transkripčných faktorov, ktoré regulujú expresiu špecifických génov nevyhnutných pre zabezpečenie rôznych funkcií. Nadprodukcia môže ovplyvniť funkcie bunky poškodením nukleových kyselín, oxidáciou proteínov, peroxidáciou lipidov a viesť až k bunkovej smrti podporou vnútorných apoptotických dráh. Skutočnosť, či v dôsledku RNOS dôjde k poškodeniu štruktúr, či sa budú aktivizovať obranné mechanizmy alebo budú RNOS pôsobiť ako signálne molekuly závisí od rovnováhy medzi ich produkciou a vychytávaním na správnom mieste a v správnom čase.

Účinnú inaktiváciu zabezpečuje antioxidantný obranný systém, ktorý zahŕňa enzymatické antioxidanty ako superoxid-dismutáza, kataláza, glutatiónperoxidáza, glutatiónreduktáza, glutatión-S-transferáza ale aj neenzýmové nízko molekulárne metabolity ako napríklad glutatión, tokoferol,

karotenoidy a flavonoidy. Antioxidačný systém je ovplyvnený celým radom ďalších faktorov a okolností (napr. príjem exogénnych anti - alebo pro-oxidačných látok, príjem, transport a viazanie kovov do organických zlúčenín v organizme).

Sledovanie produkcie RNOS vplyvom vybraných látok a adaptívnej odpovede buniek endogénnymi antioxidantami patrí v súčasnosti medzi nástroje vedúce k poznaniu mechanizmov účinku vybraných látok, ktoré tak môžu byť cielene využité v prevencii alebo liečbe.

2. VLASTNÝ PRÍNOS K SÚČASNÉMU STAVU PROBLEMATIKY

A. Využitie molekulovo-biochemických metód pri diagnostike vybraných ochorení

Stanovenie expresie nádorovo cievnych markerov (TVM: Tumot Vascular Marker) v periférnej krvi pacienta patrí k menej zaťažujúcim vyšetreniam, ktoré môže dopomôcť diferencielne diagnostikovať jednotlivé typy karcinómov (napr. ženského reprodukčného systému). Doterajšie štúdie detegovali zvýšenú hladinu expresie génov pre dané markery priamo v postihnutom tkanive, periférnej a prípadne umbilikálnej krvi na malom počte pacientov. V prípade nádorového bujnenia môže byť angiogenéza spustená poruchou rovnováhy medzi angiogénnymi aktívatormi a inhibítormi. Preto je dôležité potvrdiť alebo vyvrátiť koreláciu zmeny hladín mRNA vybraných génov zúčastňujúcich sa neoangiogenézy na molekulovej úrovni s množstvom odpovedajúcich proteínov v periférnej krvi pacientov. Existuje úzky vzťah medzi hladinou angiogenézy a tvorbou metastáz. Detekcia TVM je možná vysoko citlivými metódami molekulovej diagnostiky. V súčasnosti sledujeme expresiu génov (DR6, GPM6B) v periférnej krvi gynekologických pacientiek a naše výsledky naznačujú zvýšenú hladinu ich expresie. Pri štúdiu vzniku a progresie malígneho melanómu je náš výskum zameraný na sledovanie transkripčného mechanizmu MITF, detekciou zmien expresie jednak samotného MITF, ako aj efektorových proteínov tejto signálnej dráhy ako napr. MMP14 a GLI2 z krvi pacientov. Súčasne sledujeme výskyt jednotlivých polymorfizmov receptora vitamínu D, asociovaných so zhoršenou prognózou ochorenia. Štúdium a detailné pochopenie regulácie signálnej dráhy MITF môže prispieť k vývoju nových diagnostických postupov, využiteľných následne aj pri monitorovaní pacientov s malígnym melanómom.

Pri sledovaní vzniku a progresiu uroteliálnych nádorov sa zameriavame aj na detekciu a analýzu prítomnosti špecifických miRNA (miRNA-96, 135b a 940). Na základe analýzy interakcie DNA/proteín chromatinových komplexov pomocou špecifickej metódy chip-qRT-PCR (chromatín imunoprecipitation capture quantitative real-time PCR) overujeme prepojenie transkripčnej aktivity príslušných génov s tvorbou/prítomnosťou transkripčne aktívneho euchromatínu, alebo transkripčne neaktívneho heterochromatínu pri karcinóme močového mechúra. Výsledky dosiahnuté pri riešení projektu rozšíria poznatky o progresii, prípadne recidíve ochorenia, čo by mohlo prispieť ku skvalitneniu prognostickej informácie pre lekára aj pacienta a následne môžu byť využité pri včasnej, neinvazívnej diagnostike karcinómu močového mechúra.

Štúdium vzniku a progresie aneurizmy hrudnej aorty (TAA) je zamerané na detekciu expresie špecifických miRNA ako napr. miRNA-19b, miRNA-302D a miRNA-340. Predchádzajúce štúdie ukázali, že miRNA-302D reguluje transkripciu transformujúceho rastového faktora β (TGF- β). Súčasne sledujeme zmeny expresie vybraných génov ako napr. TGF- β , zápalových interleukínov IL-6 a 10, ako aj matrixových metaloproteináz 2 a 9. Doteraz bola funkčne popísaná len veľmi malá časť molekúl miRNA, ktoré sú exprimované v kardiovaskulárnom systéme. Identifikácia ďalších miRNA a následná analýza ich cieľových funkcií by mohla poskytnúť inovatívny pohľad nielen na mechanizmus kardiovaskulárneho vývoja, ale aj na jeho funkcie/dysfunkcie.

Pri sledovaní progresie sklerózy multiplex (SM) porovnávame expresiu vybraných špecifických miRNA (miR-223, miR-15b) vo vzorkách krvi (resp. cerebrospinálnej tekutine) pacientov, a následne korelujeme hladinu expresie plazmatických miRNA so stupňom ochorenia pacienta. Vo vzorkách pacientov so SM taktiež sledujeme zmeny expresie zápalových markerov (IL-1beta, IL-6, IL-17, TNF-alpha, IFNgamma), jednak na úrovni mRNA, metódou qRT-PCR ako aj na úrovni proteínov metódou

biochip immunoassay. Následným využitím výsledkov výskumu bude možné potvrdiť a určiť incidenciu a jednotlivé štádiá SM.

B. Fluorescenčná spektrálna charakterizácia komplexných zmesí

Dlhoročné skúsenosti s luminiscenčnými technikami na pracovisku viedli k prepracovaniu a vlastnému vývoju metodík pre potreby klinického, biochemického, biologického, biofyzikálneho, farmakologického, ale aj potravinárskeho výskumu. Biologické tekutiny sú komplexné zmesi obsahujúce obrovské množstvo látok. Spektrálna analýza endogénnej fluorescence zohľadňuje nielen prítomnosť a kvantitu fluoreskujúcich látok, ale aj mnohé iné vplyvy akými sú napr. polarita, pH, či prítomnosť zhášačov. Zmeny v metabolizme nádorových buniek predbiehajú histologicko-morfologické nádorové prejavy. Detekcia zmien biochemizmu ešte pred nástupom prejavov ochorenia tak môže významne ovplyvniť liečbu a prognózu ochorenia. Vysoko citlivé snímanie fluorescence dokáže v mnohých prípadoch odlišiť prítomnosť, alebo neprítomnosť zmien a na základe nich odlišiť biologický materiál zdravého a chorého. Biologickou tekutinou prvej voľby na fluorescenčnú spektrálnu analýzu na pracovisku je moč (neinvasívny, takmer neobmedzene opakovateľný odber, reflektuje metabolické pochody a reguláciu homeostázy). Na analýzu moču bol vyvinutý vlastný unikátny postup, ktorý významne prispieva k detekcii a identifikácii zmien spôsobených exogénnymi aj endogénnymi zložkami. Systém špecifických synchrónnych fluorescenčných meraní umožňuje vytvárať trojrozmerné fluorescenčné matrice, ktoré graficky definujú zloženie moču za normálnych aj patologických podmienok. Okrem moču sú na pracovisku skúsenosti aj so snímaním endogénnej fluorescence ďalších biologických tekutín, akými sú plazma, likvor, sliny, plodová voda či synoviálna tekutina, pričom každá má svoje špecifiká.

Vďaka dlhodobej aktívnej spolupráci s viacerými klinickými pracoviskami (napr. Klinika pre deti a dorast, Gynekologicko-pôrodná klinika, Východoslovenský onkologický ústav, Klinika plastickej a rekonštrukčnej chirurgie, Interná klinika) je k dispozícii pomerne rozsiahla databáza nameraných spektier. Spracovávanie a vyhodnocovanie nameraných dát sa realizuje prostredníctvom vlastných softvérových aplikácií vytvorených v spolupráci s Fakultou elektrotechniky a informatiky Technickej Univerzity v Košiciach. Medzi aplikáciami celkovej fluorescenčnej spektrálnej analýzy na našom pracovisku sú predovšetkým včasná diagnostika nádorových ochorení rôznych orgánov (napr. karcinóm prsníka, karcinóm krčka a tela maternice, karcinóm vaječníkov, malígný melanóm), ale aj obličkové ochorenia, či degeneratívne ochorenia kĺbového aparátu. Bohaté skúsenosti na pracovisku sú aj v oblasti monitorovania zmien natívnej fluorescence a polarizácie v mitochondriálnych membránach pri rôznych endogénnych a exogénnych vplyvoch (napr. toxické látky, liečivá). Mechanizmus reakcie biologických membrán na takéto vplyvy je selektívne špecifický pre jednotlivé látky či fyzikálne efekty.

C. Štúdium účinku vybraných prírodných/syntetických látok a ich vplyv na biochemické funkcie organizmu (aj na subcelulárnej úrovni)

V rámci doterajších *in vitro*, *in vivo* aj humánnych štúdií bolo prevedných niekoľko experimentov s cieľom zistenia orgánovo špecifickej odpovede, súvisu medzi miestom tvorby a pôsobenia izoenzymov. *In vitro* štúdie boli zamerané na schopnosť indukcie alebo vychytávania RNOS vybranými rastlinnými extraktami, či humínovými kyselinami. Zároveň sme sledovali schopnosť indukcie oxidačného stresu selektívne pripravenými štruktúrami cyklických derivátov chalkónov. Cieľom bolo objasnenie mechanizmov účinku v organizme, ako aj vyhľadanie selektívne pripravenej štruktúry s výrazne cytotoxickým prípadne cytoprotektívnym účinkom, ktorý by bol vhodný pre ďalší vývoj farmakologicky účinných prípravkov. V *in vivo* štúdiách naše výsledky prispeli k objasneniu účinku kyseliny retinovej v prenatalnom období nielen na vývin miechy ale aj redoxný stav pečene, mechanizmu účinku melatonínu pri nitrozoureou indukovanej mamárnej karcinogéneze, či udržaniu oxidačnej stability polynenasýtených mastných kyselín v organizme pri ich dlhodobom príjme vplyvom rastlinných extraktov. V humánnej štúdií Se-AOX (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02026856) bol sledovaný efekt podávania pentahydrátu seleničitanu sodného pacientom so systémovou zápalovou reakciou, sepsou, ťažkou sepsou a septickým šokom, s cieľom úpravy podmienok silného oxidačného stresu a zlepšenia ich prežívania.

3. VEDECKÉ CIELE - ZDÔVODNENIE A ANALÝZA

A. Využitie molekulovo-biochemických metód pri diagnostike vybraných ochorení

Prínos moderných biochemicko-molekulových metód spočíva v možnosti detekcie a presnejšej klasifikácie štádia rakoviny neinvazívnymi vyšetrovacími metódami telových tekutín s možnosťou praktického výstupu pri rutinnom vyšetrení v priebehu preventívnych prehliadok. K verifikácii výsledkov dosiahnutých napr. fluorescenčnými analýzami prispeje korelácia s klinicko-biochemickými stanoveniami (napr. cytokínov, CA), analýzou nukleových kyselín (napr. miRNA) identifikáciou interakcie DNA/proteínov a sledovaním koncentrácie špecifických proteínov.

Pri riešení tejto problematiky je možné:

- izolovať špeciálne miRNA z biologického materiálu a analyzovať ich s možnosťou využitia pri klinicko-biochemickej diagnostike vybraných ochorení (napr. karcinóm močového mechúra, roztrúsená skleróza);
- overiť význam stanovenia nových vybraných tumor vaskulárnych markerov (TVM) špecifických pre rôzne onkologické ochorenia (napr. gynekologické, urologické);
- sledovať expresiu špecifických génov (napr. asociovaných so zápalom, zapojených do angiogenézy) pre presnejšie určenie štádia a progresie ochorenia, či úspešnosti liečby vybraných ochorení;
- stanoviť aktivitu vybraných metaloproteináz, ktoré korelujú so zvýšenou invazivitou nádorových buniek malígneho melanómu, alebo sú zapojené do remodelácie steny aorty pri progresii aneuryzmy hrudnej aorty;
- sledovať transkripčné mechanizmy jednak analýzou prítomnosti transkripčne aktívneho euchromatínu, ako aj identifikáciou interakcie DNA/proteínov.

B. Fluorescenčná spektrálna charakterizácia komplexných zmesí

Pracovisko pokračuje v štandardných metódach analýzy fluorescenčných fingerprintov moču, zdokonaľovaní postupov vedúcich k identifikácii patologických znakov vo fingerprintoch a v rozširovaní aplikácií fluorimetrických techník *in vitro* na diagnostické využitie.

Bude sa pokračovať aj v monitorovaní menej bežných telových tekutín (napr. slzy, pot, exsudáty, cervikálny hlien) vo vzťahu ku konkrétnym diagnózam na zistenie ich molekulového mechanizmu s diagnostickým prínosom pre očné, kožné lekárstvo, onkológiu, ale aj internú medicínu či chirurgiu (napr. identifikácia kyseliny 5-hydroxyindolooctovej, ktorá je markerom akútnej apendicitídy). Plánujeme aplikovať fluorescenciu *in vivo* na klinickom materiáli, napr. pri monitorovaní kvality transparentnosti šošoviek, identifikácii prekanceróz pokožky. Pri riešení tejto problematiky je možné:

- vypracovanie grafickej definície (fluorescenčné matrice, fingerprinty) rôznych biologických materiálov na základe špeciálnych fluorescenčných meraní v úzkej kooperácii s klinickými pracoviskami;
- vypracovať exaktné algoritmy vyhodnocovania fluorescenčných matric biologických materiálov pri konkrétnych fyziologických a patologických stavoch;
- aplikovať fluorescenčné techniky v klinicko-biochemickej diagnostike vybraných ochorení (napr. rakoviny s akcentom na skoré štádiá ochorenia a prekancerózne stavy) gynekologických, urologických, neurologických a iných;
- spresňovať fluorescenčný monitoring subcelulárnych procesov so zameraním na biologickú membránu a ich dynamiku pri normálnych a patologických stavoch s využitím selekčných sond.

C. Štúdium účinku vybraných prírodných/syntetických látok a ich vplyv na biochemické funkcie organizmu (aj na subcelulárnej úrovni)

Štúdium oxidačného stresu plánujeme zamerať na výskum vplyvu vybraných látok na funkčnosť mitochondrií (napr. srdca, pečene). Štúdium bude realizované dynamickým meraním respirácie, aktivity vybraných enzýmov (napr. ATP-áza, SOD, GR, GPX), sledovaním pomeru fluoreskujúcich kofaktorov

(napr. NADP/NADPH, NAD/NADH) a stanovením miery poškodenia DNA (napr. Comet Assay). Ciele štúdia prirodzených látok obsiahnutých vo výžive a ich vplyve na organizmus nadväzujú na výsledky predošlého výskumu a vychádzajú z potreby medicínskej praxe.

Posúdenie schopnosti eliminácie reaktívnych foriem kyslíka látkami s antioxidantnými vlastnosťami predstavuje využiteľný potenciál nielen v profylaxii alebo priamo v liečbe stavov spojených s oxidačným stresom, ale aj pri znižovaní závažnosti nežiadúcich účinkov liečby. Pri riešení tejto problematiky je možné:

- študovať antioxidantný efekt vybraných prírodných a syntetických látok (komplexne na celý organizmus a s použitím rôznych metodických postupov);
- zamerať sa na ciele výber takých látok, ktoré budú vykazovať najväčšie antioxidantné účinky;
- látky s najvýraznejšími antioxidantnými vlastnosťami môžu byť podrobnejšie analyzované s cieľom charakterizovať účinok komplexne;
- štúdium LDL a HDL frakcií vo vzťahu k vybraným ochoreniam (napr. kardiovaskulárne ochorenia, obezita, metabolický syndróm);
- skúmanie vplyvu rôznych prírodných látok (rastlinného pôvodu, syntetických) na antioxidantnú a respiračnú aktivitu mitochondrií rôznych tkanív.

4. NÁVRH POSTUPOV NA DOSIAHNUTIE VEDECKÝCH CIEĽOV

A. Využitie molekulovo-biochemických metód pri diagnostike ochorení

Biochemicko-molekulové metodiky sú v súčasnej dobe najpresnejšími a najcitlivejšími metódami sledovania skorých patologických zmien:

- na sledovanie zmien expresie génov pri rôznych typoch ochorení na úrovni mRNA používame qRT-PCR v kombinácii s gélovou elektroforézou;
- pri sledovaní hladín proteínov odpovedajúcich skúmaným génom používame vertikálnu elektroforézu s následným prenesením separovaných proteínov z polyakrylamidových gélov na nitrocelulózu membránu použitím Semi-dry Western blot techniky;
- na detekciu zmien expresie špecifických miRNA používame Real-time PCR cyklér s vysoko citlivým analyzátorom topenia oligonukleotidových fragmentov;
- na stanovenie prítomnosti transkripčne aktívneho euchromatínu a sledovanie interakcie DNA/proteínov používame metódu Chip qRT-PCR.
- pri sledovaní zmien expresie na úrovni proteínov využívame imunometódu Biochip ELISA Array.

B. Fluorescenčná spektrálna charakterizácia komplexných zmesí

Pre rýchlu diagnostiku je dôležité prístrojové a metodické zázemie pracoviska. Zariadenie LS 55 umožňuje robiť nadštandardné luminiscenčné, fluorescenčné, fosforescenčné, bioluminiscenčné a chemiluminiscenčné merania biologických tekutín, buniek, tkanív a telových povrchov (sliznice, koža a podobne).

Fluorescenčné merania sú vysoko reprodukovateľné a citlivé. Luminiscenčný spektrofotometer LS 55 dovoľuje stanovenia v širokom spektrálnom rozsahu (200 - 900 nm). Okrem bežných excitačných a emisných spektier umožňuje navyše snímanie spektier so synchronným posunom monochromátorov, ktoré ešte viac zvyšujú rozlišovaciu schopnosť a selektivitu nameraných údajov, ďalej meranie polarizácie a anizotropie biologických systémov. Komplexná fluorescenčná charakterizácia vzoriek tak poskytuje ucelenejší pohľad na dynamiku fyzikálno-chemických procesov počas rôznych stavov v biomakromolekulách, biologických membránach, bunkových organelách, jednotlivých bunkách i celých tkanivách. V kombinácii so simuláciou mikroperfúzie rozširuje možnosti *in vitro* štúdia fyziologických aj patologických procesov počas ischémie a hypoxie. Používané metódy:

- trojrozmerné *excitačné* a *emisné* spektrá s vysokým rozlíšením – zisťovanie prítomnosti natívnych fluorofórov v biologických materiáloch;

- trojrozmerné *synchrónne fluorescenčné spektrá* vo forme *vrstevnicových máp*, tzv. *synchrónny fluorescenčný fingerprint (3D SFF)*, (priorita pracoviska) – pre vysoký rozlišovací potenciál zvlášť vhodné na analýzu a rozlišovanie komplikovaných zmesí (telové tekutiny, farmakologické a kozmetické prípravky, určenie originality a kontrola kvality produktu, štúdium stability biologických materiálov);
- anizotropia - meranie *polarizácie fluorescencie* – štúdium interakcie biomakromolekúl s inými molekulami (interakcie receptorov a signálnych molekúl, mechanizmus interakcie antigén - protilátka, "rozbaľovanie a zbaľovanie" molekúl proteínov a nukleových kyselín, detailné mechanizmy enzymovej katalýzy, molekulová dynamika biologických membrán, transport cez membrány, interakcie na membránach; jemná charakterizácia okolia fluorofórov v bunkách a bunčných organelách - určenie jeho polariry, pH, typu interakcie;
- *chemiluminiscenčné merania* - štúdium detailných mechanizmov a energetiky niektorých biochemických reakcií;
- *aplikácia fluorescenčných značiek* (fluorescence labeling) a ich interakcie napr. s bunkami, bunkovými organelami, vnútrobunkovými štruktúrami;
- možnosť *fluorescenčného skenovania (synchrónne spektrá) pevných povrchov* pokožky a slizníc - unikátna metóda včasného diagnostikovania prekancerózných stavov;
- použitie štandardnej vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie (HPLC) s UV/VIS a fluorescenčnou detekciou na frakcionáciu biologického materiálu potrebného pre exaktnejšiu identifikáciu molekúl;
- praktická možnosť kombinovania menovaných spektrálnych fluorescenčných techník s ďalšími zobrazovacími (napr. *mikroskopia*), separačnými (napr. *HPLC*, *elektroforéza*), imunologickými (napr. *ELISA*), izolačnými a molekulárno-genetickými metódami (napr. *PCR*, *Western blot*, *elektroforéza*).

C. Štúdium účinku vybraných prírodných/syntetických látok a ich vplyv na biochemické funkcie organizmu (aj na subcelulárnej úrovni)

Vytýčené vedecké ciele chceme realizovať tak pomocou metód používaných na našom pracovisku ako aj zavádzaním nových metód a postupov. Ide o metódy:

- klinicko-biochemické analýzy metabolitov (napr. glukóza, močovina, kreatín), enzýmov (napr. SOD, ALP), proteínov (napr. Hsp, cytokíny);
- izolácie mitochondrií z rôznych orgánov s možnosťou rozšírenia na ďalšie subcelulárne častice, biologické membrány, celé bunky a pod.;
- využitie mitochondrií ako definovaného živého systému na testovanie interakcií látok sledovaním ich vplyvu na respiráciu pomocou Klárkovej kyslíkovej elektródy;
- sledovanie poškodenia DNA pomocou metódy Comet Assay.

5. INFRAŠTRUKTÚRA VÝSKUMU NA PRACOVISKU

- **Luminiscenčný spektrophotometer Perkin Elmer LS55** (s atestom pre GLP) – vybavený fluorescenčnými polarizátormi, prídavným zariadením pre biokinetiku, optickým vláknom na meranie v exteriéri prístroja.
- **Perkin Elmer Fluorescence Spectrometer Model 3000** – starší prístroj po rozsiahlej modernizácii a dodatočnom napojení na počítač. Aplikáciou vlastného meracieho a vyhodnocovacieho softwaru „Spektró“ pre unikátne fluorescenčné techniky sa stal špičkovým prístrojom. Slúži ako doplnkové zariadenie.
- **Randox Monza RX** – polo-automatizovaný biochemický analyzátor umožňuje stanovenie širokého spektra klinicko-biochemických parametrov z krvného séra, plazmy, moču a CSF pacientov
- **Quantimetrix LipoPrint** – elektroforetické delenie lipoproteínov, ktoré umožňuje identifikovať a určiť percentuálne zastúpenie aterogénnych subfrakcií v krvi pacientov

- **Becker Coulter Optima MAX-XP** – ultracentrifúga slúži na prípravu a izoláciu subcelulárnych častí, najmä mitochondrií
- **Automatizovaný (počítačom riadený) prístroj na stanovenie rozpustnosti pevných látok** - originálne zariadenie na stanov. disociač. konštant, konštant stability komplexoligandov s kovmi v živých systémoch (Potenciometrické zariadenie spojené s meraním rozpustnosti)
- **HPLC (Shimadzu)** – UV/VIS a fluorescenčný detektor
- **PCR cykler TECHNE TC/3000 (Barloworld Scientific)** - prístroj pre klasickú PCR
- **Real-time BIORAD CFX96** – prístroj na kvantifikáciu génovej expzie s prídavnou hlavicou na meranie teplotného gradientu primérov na klasickú PCR
- **Qiagene Rotor-Gene Q** – Real-time PCR cykler s vysoko citlivým analyzátorom topenia oligonukleotidových fragmentov – prístroj na kvantifikáciu génovej expzie
- **ROCHE LightCycler® 480 Instrument II** – kvalitatívna aj kvantitatívna detekcia nukleových kyselín, skenovanie mutácií a SNP analýza
- **Randox evidence investigator-Biochip Array** – immunoassay, SNP genotypizácia, sledovanie génovej expzie, detekcia patogénov a mutácií
- **Elisa imunoanalyzátor Dynex DS2** – automatický pipetovací a vyhodnocovací systém ELISA na kvantifikáciu špecificky značených proteínov
- **Syngene G:Box system** – detekčný a dokumentačný systém na vizualizáciu a vyhodnotenie chemiluminiscenčného a UV signálu, s možnosťou fotenia chladenou kamerou
- **Biorad Trans-Blot SD** – zariadenie na prenos DNA/RNA/proteínov zo separačného gélu na NC membránu
- **Spektrofotometer NanoDrop 2000c** – Spektrofotometer schopný merať v oblasti 190 – 840 nm v objeme vzorky 1 – 2 µl vhodný na meranie koncentrácie izolovaných nukleových kyselín, alebo proteínov
- **Fluorescenčný spektrofotometer NanoDrop 3300** – Inovatívny fluorescenčný spektrofotometer na kvantifikáciu mikroobjemových vzoriek, minimálne parametre: rozsah vlnových dĺžok 300 - 750 nm, meranie absorbancie v malých objemov (0,5 – 1 µl)
- **Hansatech Oxygraph Plus (Clarkova kyslíková elektróda)** – zariadenie na meranie respirácie
- **Ostatné doplnkové vybavenie** – napr. presné analytické váhy, elektroforetické zariadenia, gélová chromatografia, spektrofotometre, pH-metre, termostaty, zariadenie na prípravu ultračistej vody

6. POTENCIÁLNY SPOLOČENSKÝ PRÍNOS

- A. Prínos spočíva v možnosti detekcie rôznych fáz karcinómov využitím telových tekutín (napr. krv, moč) pacientov za použitia neinvazívnych vyšetrovacích metód (napr. klinicko-biochemická analýza krvi, izolácia a analýza NK, proteínov), s možným praktickým výstupom pri rutinnom skríningu v priebehu štandardných odberov počas preventívnych prehliadok. Ďalej môžu tieto štúdie prispieť k lepšiemu monitoringu vplyvu terapie a k skoršiemu odhaleniu prípadnej recidívy, čo môže skvalitniť život pacientov a upresniť prognózu ochorenia.
- B. Výsledkom štúdia by mali byť nové, presné, rýchle a spoľahlivé algoritmy diagnostikovania ochorení (napr. onkologických, metabolických) fluorescenčnou profilovou analýzou telových tekutín. Získanie ďalších poznatkov o detailných molekulových mechanizmoch interakcií látok v živých systémoch, najmä v biologických tekutinách, by mohlo následne prispieť k včasnému záchytu rôznych patologických stavov.
- C. Dosiahnuté výsledky poznatkov na úrovni štúdia reaktívnych foriem kyslíka a dusíka, ako aj antioxidantov a ich úloha v mnohých fyziologických procesoch (napr. udržiavanie redoxnej homeostázy, regulovaná produkcia mediátorov a senzorov, regulácia adhézie buniek, amplifikácia imunitnej odpovede, apoptóza) prispievajú k rozšíreniu poznatkov o RNOS a môžu byť cielene využité v prevencii či liečbe vybraných ochorení (napr. aterosklerózy).