

Podiel pracoviska na výskumnom zámere fakulty

ŠTRUKTURÁLNA DYNAMIKA A MOLEKULOVÉ INTERAKCIE V ŽIVÝCH SYSTÉMOCH POD VPLYVOM ENDOGÉNNÝCH A EXOGÉNNÝCH FAKTOROV

Ťažiskový smer: Onkologický, Metabolomický

Spracovali: **M. Mareková, J. Guzy, P. Urban**

Obsah

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

Projekty riešené na ústave sú realizované v rámci troch čiastkových orientácií, a preto je členenie na podkapitoly:

A. Fluorescenčná spektrálna charakterizácia komplexných zmesí

B. Využitie molekulovo-biochemických metód pri diagnostike ochorení

C. Štúdium ovplyvnenia biochemických funkcií subcelulárnych častíc účinkom cudzorodých látok

1. SÚČASNÝ STAV PROBLEMATIKY

A. Fluorescenčná spektrálna charakterizácia komplexných zmesí

Fluorescencia patrí medzi najuniverzálnejšie a najspoľahlivejšie metódy štúdia živej hmoty a procesov v nej prebiehajúcich. Ide o neinvazívnu metódu interakcie svetla s hmotou. Väčšina molekúl prítomných v živých systémoch po interakcii so svetelnou energiou je schopná sekundárne sama produkovať vlastné svetlo (fluorescencia, fosforescencia). Jeho analýzou dostávame bohaté informácie o ich štruktúre a jej zmenách, dynamike a chemických interakciách kľúčových molekúl v bunkách živých systémov. Toto je podstatou mnohých novodobých diagnostických metód. Vývoj fluorescenčných značiek, sond a v poslednom období aj tzv. biosenzorov, vytvára predpoklady na ešte intenzívnejšie uplatnenie fluorescenčných techník v diagnostike.

Včasná detekcia tumorov a kancerogénnych procesov pomocou fluorescenčných spektier má dnes dominantné postavenie najmä pri karcinómoch močového mechúra využívajúc prítomnosť kyseliny aminolevulovej (ALA) ako markera v kombinácii so zvláštnym typom fluorescenčnej endoskopie. Výhodné skenovanie autofluorescencie povrchov kože pomocou 3-D matrice fluorescenčného spektra umožňuje objektívne identifikovať lézie a kožné tumory. Veľmi efektívne je aj diagnostické uplatnenie sofistikovaných fluorescenčných techník v gynekológii. Časté je štúdium autofluorescencie cervikálneho tkaniva najmä pri neopláziách a dyspláziách. Emisné fluorescenčné spektrum tu umožňuje vypracovať efektívne diagnostické algoritmy. Endogénna fluorescencia normálneho a malígneho tkaniva pažeráka meraná použitím sondy s optikou sklenených vlákien

ukázala zhodu s klasickým bioptickým vyšetrením. Tým sa stalo reálne stanovenie diagnózy bez biopsie. Významnou oblasťou uplatnenia luminiscenčných spektier je dôkaz vzniku aduktov DNA a genotoxických látok - biomarkerov a indikátorov rizika vzniku rakoviny. Ide najmä o tzv. PAH (polyaromatic hydrocarbons). Takýmto spôsobom boli monitorovaní napr. aj príslušníci armády USA v konflikte v Kuvajte v roku 1991. Autofluorescencia je všeobecne výhodná na rozlíšenie normálnych a kancerózných buniek.

Ďalšie aplikácie fluorescenčných a luminiscenčných techník vo všeobecnej biochémii sú také rozsiahle, že ich len stručne vymenujeme, napr. biologické membrány, apoptóza, oxidatívny stres, štúdium mitochondrií a voľných radikálov, enviromentálnych biomarkerov, neurodegeneratívnych ochorení, kvalitatívna a kvantitatívna identifikácia liekov a drog.

B. Využitie molekulovo-biochemických metód pri diagnostike nádorových ochorení

V posledných rokoch došlo k výraznému pokroku v pochopení molekulárnych mechanizmov, vedúcich k vzniku nádorov a ich metastázovania. Okrem aktivácie protoonkogénov, nekontrolovaná proliferácia buniek taktiež vyžaduje likvidáciu negatívnych regulačných dráh alebo génov, ktoré ich kódujú. V ostatných rokoch boli identifikované dva gény súvisiace s genetickou predispozíciou k rakovine prsníkov a ovárií, BRCA1 a BRCA2.

Tento objav viedol k zvýšeniu záujmu lekárskej verejnosti o molekulové metódy detekcie predispozícií, čo viedlo k nárastu genetických vyšetrení. K ďalším génom, u ktorých bola dokázaná súvislosť s rakovinou ovárií patrí CA125/Muc16. Senzitivita tohto markera bola znížená o 50 % u pacientok v raných štádiách ovariálneho karcinómu. Zvýšená hladina CA125 bola taktiež detekovaná pri endometrióze, adenomyóze, ochoreniach pečene, pankreatitíde, peritonitíde a pri mnohých ďalších procesoch. Okrem CA125, ktorého hladina je monitorovaná v prípadoch rodinnej anamnézy a rizikových skupín žien, prípadne pre sledovanie úspešnosti liečby či relapsu prakticky neexistuje marker, ktorý by bol špecifickejší a citlivejší pri skríningu karcinómu ovárií. Dosiahlo sa niekoľko sľubných výsledkov napríklad pri štúdiu kalikreínov, avšak ani v kombinácii s CA125 tieto markery nespĺňajú požadované parametre pre globálny skríning.

Z faktu, že rakovina vaječníkov, tak ako mnohé ďalšie typy karcinómov, je závislá od angiogenézy, môžeme predpokladať existenciu ďalších vhodných biomarkerov zúčastňujúcich sa procesu angiogenézy nádorového tkaniva. Hladiny ideálnych nádorových vaskulárnych markerov pre skríning rakoviny vaječníkov musia vykazovať výrazne odlišnú hladinu expresie v priebehu prirodzenej fyziologickej angiogenézy ženských reprodukčných orgánov oproti karcinogéneze. Tieto podmienky spĺňajú: adlcan, COL11A1, GMP6B a DR6, ktoré vykazujú 10 – 350 násobné zvýšenie expresie pri karcinóme *corpus luteum*, endometria a placenty. Ako producenti týchto markerov sa ukázali nielen endotelálne bunky nádoru, ale aj vaskulárne leukocyty a populácie perivaskulárnych buniek.

C. Štúdium ovplyvnenia biochemických funkcií subcelulárnych častíc účinkom prírodných a cudzorodých látok

Biologicky aktívne molekuly (antioxidanty, antibiotika, prírodné látky flavonoidného charakteru) zasahujú do biochemických procesov často neznámym mechanizmom. Cieľom je nájsť vhodný model živého systému na báze subcelulárnych častíc (najmä mitochondrií) s možnosťou čo najjednoduchšieho vyhodnotenia biologických a biochemických efektov neznámych látok.

Zamerali sme sa na štúdium biologického účinku stobadinu [(-)cis-2,8-dimetyl-2,3,4a,5,9b-hexahydro-14-pyrido(4,3b)-indol, ktorý bol pre svoje protektívne účinky experimentálne testovaný voči oxidačnému stresu. Kardioprotektívne účinky stobadinu sú výsledkom jeho antioxidačných vlastností, založených na pyridoindolovej štruktúre molekuly. V neskorších prácach bola pozornosť sústredená na monitorovanie protektívneho efektu stobadinu počas oxidačných procesov v nervovom, resp. v mozgovom tkanive. Vplyv stobadinu za podmienok hemoreologie po celkovej ischémii mozgu psov popísal Pomfy a kol.. Zníženú peroxidáciu lipidov v homogenátoch mozgového tkaniva zajacov pozorovala Lukáčová a kol.. Stefek a kol. za podmienok alloxanom indukovanej peroxidácie lipidov pozoroval protektívny efekt stobadinu. Známe sú tiež údaje o rádioprotektívnom efekte stobadinu.

Vychádzajúc z údajov o kardioprotektívnych vlastnostiach tejto látky, pokúsili sme sa na experimentálnom modeli definovaného živého systému - mitochondriách myokardu zajacov a v krvi - študovať mechanizmus tohto účinku po *in vivo* aplikácii stobadínu v dávke 2 mg/kg váhy. Naše výsledky ukázali, že stobadín-hydrochlorid podávaný v dávke 2 mg/kg živej váhy znižuje kardiotoxický efekt izoproterenolu (1 mg/kg) na čo poukazujú znížené hodnoty enzýmových aktivít AST, CPK, LDH a ALT. Ďalej sme študovali vplyv stobadínu *in vivo* na respiráciu, hladiny ATP, malondialdehydu (MDA) a superoxididizmutázy (SOD) v mitochondriách myokardu. Aktivity AST, CPK a LDH v krvi po aplikácii stobadínu boli signifikantne znížené. Dýchanie a aktivita SOD boli inhibované v srdcových mitochondriách, zatiaľ čo hladina MDA bola zvýšená a nedošlo k zmene aktivity ATP. Na základe uvedených výsledkov nebol potvrdený kardioprotektívny efekt stobadínu pri ochrane mitochondrií myokardu. Ochranná úloha stobadínu pri kardiovaskulárnych ochoreniach je pravdepodobne oveľa komplexnejšia a prebieha na úrovni celého organizmu.

V budúcnosti sa chceme zamerať na štúdium vplyvu najmä prírodných antioxidantov zo skupiny flavonoidov (kvercetín a ďalšie) a syntetických chalkónov na oxidačné procesy v mitochondriách. Flavonoidy tvoria skupinu viac ako 4 000 prírodne sa vyskytujúcich látok, ktoré sú prítomné prevažne v potravinách rastlinného pôvodu. Mnohé z nich majú širokú škálu biologických účinkov, antioxidantné vlastnosti nevynímajúc. Antioxidantný efekt flavonoidov je založený na ich schopnosti vychytávať voľné radikály, donory vodíka, zhasače singletového kyslíka, alebo chelatovateľné metaloióny. Jedným z najviac rozšírených prírodných flavonoidov je kvercetín, ktorý sa nachádza vo veľkom množstve v ovocí a v zelenine. Preto chceme zamerať svoju pozornosť na štúdium vplyvu quercetínu na oxidačný stres. Chalkóny sú syntetické látky so štruktúrou podobnou flavonoidom. Ich účinok môže byť jednak protektívny ale aj prokancerózný. Štúdium týchto látok je zaujímavé najmä s ohľadom na možnosti ich využitia v protirakovinovej terapii.

2. VLASTNÝ PRÍNOS K SÚČASNÉMU STAVU PROBLEMATIKY

A. Fluorescenčná spektrálna charakterizácia komplexných zmesí

Dlhoročné skúsenosti s luminiscenčnými technikami na pracovisku viedli k rozpracovaniu i vlastnému vývoju špičkových techník pre potreby biochemického, biologického, biofyzikálneho a farmakologického výskumu s reálnymi diagnostickými výstupmi. Bol vyvinutý unikátny postup využitia synchronných fluorescenčných spektier pre moč, ale aj iné biologické tekutiny, ktorý zaručuje okamžitú identifikáciu exogénnych aj endogénnych patologických zložiek. Systém umožňuje vytvárať trojrozmerné fluorescenčné matrice a spracovať grafickú definíciu zloženia moču za normálnych a patologických podmienok.

Významnou oblasťou s pokročilými poznatkami je aplikácia počítačového vyhodnocovania proteinúrie po elektroforetickej separácii proteínov (SDS-PAGE). Kombinácia tejto techniky a 3-D synchronných fluorescenčných spektier je novým prvkom v diagnostike nefropatií. Pokroky v tejto oblasti boli dosiahnuté vďaka aktívnej spolupráci s Klinikou pre deti a dorast. V pokročilom štádiu je fluorescenčné monitorovanie dynamiky biologických membrán mitochondrií 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. V spolupráci s II. Gynekologicko-pôrodnickou klinikou je rozpracované diagnostické využitie fluorescenčného fingerpritu pri diagnostike rôznych gynekologických malignít.

B. Využitie molekulovo-biochemických metód pri diagnostike nádorových ochorení

Stanovenie expresie vaskulárnych markerov (VM) v periférnej krvi pacienta patrí k menej zaťažujúcim vyšetreniam, ktoré môže dopomôcť podrobne diagnostikovať jednotlivé typy karcinómov prsníka, ovárií a močového mechúra. Doterajšie štúdie detegovali prítomnosť VM priamo v postihnutom tkanive, periférnej a prípadne umbilikálnej krvi na malom počte pacientov. Zistili výrazne zvýšenú hladinu expresie génov pre dané markery na rozdiel od zdravých jedincov.

Existuje úzky vzťah medzi hladinou angiogenézy a tvorbou metastáz. V prípade nádorového bujnenia môže byť angiogenéza spustená poruchou rovnováhy medzi angiogénnymi aktivátormi 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.

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. Plánujeme sledovať aj expresiu iných TVM (napr. FOXM 1, anexín 2) v spolupráci s Urologickou klinikou. Pre sledovanie hladín mRNA príslušných génov využijeme RT-PCR. Vo vzorkách so zvýšenou expresiou mRNA následne stanovujeme hladiny príslušných proteínov metódou Western Blot.

C. Štúdium ovplyvnenia biochemických funkcií subcelulárnych častíc účinkom cudzorodých látok

V oblasti štúdia oxidatívneho stresu sme zistili protektívny účinok stobadínu a kvercetínu na izoproterenolom, resp. daunorubicínom poškodený myokard. Zaznamenali sme významný protektívny účinok stobadínu tak na poškodený myokard ako i na hladiny enzýmov AST, CK a LDH. Uvedený efekt sme študovali aj na subcelulárnej úrovni, teda na mitochondriách. Sledovali sme respiráciu mitochondrií a enzýmové aktivity SOD a ATP-ázy. Na úrovni mitochondrií sa protektívny účinok stobadínu nepotvrdil.

Ďalej sme študovali vplyv kvercetínu na daunorubicínom poškodený myokard. Efekt na úrovni mitochondrií bol potvrdený ako protektívny tým, že sledovaná respirácia a enzýmové aktivity (ATP-áza, glutation peroxidáza a glutation reduktáza) sa po aplikácii kvercetínu vracali k norme. V ďalšom sme sa zamerali na štúdium efektu kvercetínu na paracetamolom poškodenú pečeň. Efekt sme sledovali na pečeňových mitochondriách.

3. ZDÔVODNENIE A ANALÝZA REÁLNOTI VEDECKÝCH CIEĽOV

Fluorescenčné fingerpriny moču majú reálny diagnostický výstup v nefrológi, gynekológii a urológii. Bude pokračovať aj v monitorovaní menej bežných telových tekutín (napr. slzy, pot, exsudáty) 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 apendicídy).

Pribudne aplikácia fluorescencie *in vivo* s pokusmi na klinickom materiáli, napr. pri monitorovaní kvality transparentnosti šošoviek; identifikácia prekanceróz pokožky (fluorescenčná identifikácia nádorových buniek). Pokračovať sa bude v aplikácii fluorimetrických techník *in vitro* na grafickú definíciu telových tekutín (moč, krv, slzy, cervikálny hlien a iné) a ich diagnostické využitie.

Prínos moderných biochemicko-molekulových metód spočíva v možnosti potvrdenia detekcie a presnejšej charakterizácie štádia rakoviny neinvazívnymi fluorescenčnými vyšetrovacími metódami telových tekutín s možnosťou praktického výstupu pri rutinnom vyšetrení v priebehu preventívnych prehliadok.

Štúdium oxidačného stresu bude zamerané na výskum vplyvu vybraných xenobiotík (napr. chalkóny) na izolované srdcové a pečeňové mitochondrie. Následne sa chceme zamerať na štúdium antioxidantných vlastností niektorých prírodných látok (flavonoidov) a syntetických látok pozorovaných na úrovni mitochondrií. Štúdium chceme realizovať sledovaním dynamiky a funkčnej schopnosti mitochondrií. Meraním respirácie, hladín niektorých enzýmov (ATP-áza, SOD, GR, GPX) a sledovaním poškodenia DNA. Sledovanie funkčnosti mitochondrií chceme potvrdiť použitím tak fluorescenčných analýz ako aj histologicky.

4. VEDECKÉ CIELE

A. Fluorescenčná spektrálna charakterizácia komplexných zmesí

- vypracovanie grafickej definície (fluorescenčné matrice, fingerprinty) biologických materiálov a diagnostika prekancerózných stavov na základe špeciálnych fluorescenčných meraní *in vivo* v úzkej kooperácii s klinickými pracoviskami;
- vypracovať algoritmy vyhodnocovania fluorescenčných matric biologických materiálov pri konkrétnych fyziologických a patologických stavoch;
- aplikácia fluorescenčných techník v diagnostike *in vivo* (napr. gynekológia, urológia);
- spresňovať fluorescenčný monitoring subcelulárnych procesov s prihliadnutím na biologickú membránu a ich dynamiku pri normálnych a patologických stavoch s využitím selekčných sond.

B. Využitie molekulovo-biochemických metód pri diagnostike nádorových ochorení

- overiť a potvrdiť použitie nových vybraných tumor vaskulárnych markerov (TVM) špecifických pre rôzne onkologické ochorenia (napr. gynekologické, urologické);
- sledovanie expresie špecifických génov pre presnejšie určenie štádia, úspešnosti liečby prípadne regresiu tumorov;
- korelácia výsledkov meraní fluorescenčných matric a sledovanie výsledkov zmien expresie TVM umožní monitoring vplyvu terapie a odhalenie prípadnej recidívy, čo prispeje ku skvalitneniu života pacientov a presnejšej prognóze ochorení.

C. Štúdium ovplyvnenia biochemických funkcií subcelulárnych častíc účinkom prírodných a cudzorodých látok

- preštudovať antioxidačný efekt vybraných flavonoidov komplexne na celý organizmus a s použitím rôznych metodických postupov, najmä fluorescenčných spektier;
- zamerať sa na ciele výber takých flavonoidov a chalkónov, ktoré budú vykazovať najväčšie antioxidačné účinky;
- látky s najvýraznejšími antioxidačnými vlastnosťami podrobíme podrobnejšej analýze s cieľom charakterizovať účinok antioxidantu komplexnejšie.

5. KONKRÉTNY NÁVRH POSTUPU NA DOSIAHNUTIE VEDECKÝCH CIEĽOV

A. Fluorescenčná spektrálna charakterizácia komplexných zmesí

Pre rýchly postup 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 spektrá typu synchronnej fluorescencie, polarizácie fluorescencie, zhášania (time resolved) fluorescencie s vysokou presnosťou a citlivosťou, v širokom spektrálnom rozsahu 200 - 900 nm spracované výkonným počítačom do trojrozmernej podoby umožňujú intramolekulárny pohľad na dynamiku chemických a fyzikálnych procesov v biomakromolekulách, biologických membránach [2]

bunečných organelách, jednotlivých bunkách i celých tkanivách. Mikroperfúzne zariadenie umožňuje študovať a simulovať normálne i patologické procesy *in vitro*. Používané metódy:

- trojrozmerné *excitačné* a *emisné* spektrá s vysokým rozlíšením – zisťovanie prítomnosti prírodných fluorofórov v biologických materiáloch;
- trojrozmerné *synchronne fluorescenčné spektrá* vo forme *vrstevnicových máp*, tzv. synchronny fluorescenčný fingerprint (3-D SFF), (priorita pracoviska) - vhodné zvlášť na analýzu komplikovaných zmesí (telové tekutiny, farmakologické a kozmetické prípravky, určenie originality a kontrola kvality produktu, štúdium stability biologických materiálov);
- anizotropia - meranie *polarizácie fluorescence* - interakcie biomakromolekúl s inými molekulami (interakcie receptorov a signál. molekul, mechanizmus interakcie antigén - protilátka, "rozbaľovanie a zbaľovanie" molekul proteínov a nukleových kyselín, jemné mechanizmy enzymovej katalýzy, molekul. dynamika biol. membrán, transport cez membrány, interakcie na membránach);
- *fosforescencia* - zhašovanie fluorescence - *time resolved fluorescence* – Trojrozmerný počítačový záznam "odoznievania - zhašovania" fluorescenčného signálu (v mikro- až milisekundách). Aplikácia - jemná charakterizácia okolia fluorofórov v bunkách a bunečných organelách - určenie jeho polarizácie, pH, typu interakcie;
- *chemiluminiscenčné merania* - štúdium jemných mechanizmov a energetiky niektorých biochemických reakcií;
- *aplikácia fluorescenčných značiek* (fluorescence labeling) a ich interakcie napr. s bunkami, bunkovými organelami, vnútrobunečným štruktúrami;
- možnosť *fluorescenčného skenovania (synchronne spektrá) pevných povrchov* pokožky, vnútorných slizníc - unikátne metódy veľmi včasného diagnostikovania prekancerózných stavov známe doteraz len z vojenského výskumu USA;
- použitie štandardnej vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie (HPLC) na frakcionáciu malých množstiev biologického materiálu potrebného pre bližšiu identifikáciu molekul;
- praktická možnosť kombinovania menovaných spektrálnych fluorescenčných techník s *pozorovaním pod mikroskopom, HPLC technikou a detekciou TVM metódami na molekulovej úrovni*.

B. Využitie molekulovo-biochemických metód pri diagnostike nádorových ochorení

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

- na sledovanie zmien rôznych typov karcinómov na úrovni mRNA používame klasickú metódu PCR (v blízkej dobe prejdeme na presnejšiu real time 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;
- po prenose detegujeme špecifické proteíny väzbou s primárnymi a sekundárnymi protilátkami, ktoré sú konjugované s peroxidázou. Kvantifikujeme snímaním a vyhodnotením intenzity chemiluminiscenčného signálu.

C. Štúdium ovplyvnenia biochemických funkcií subcelulárnych častíc účinkom cudzorodých látok

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

- 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 oxymetra;
- sledovanie poškodenia DNA pomocou metódy COMET ASSAY.

6. INFRAŠTRUKTÚRA VÝSKUMU NA PRACOVISKU

- *Luminiscenčný spektrophotometer Perkin Elmer LS 55* (s atestom pre GLP) vybavený fluorescenčnými polarizátormi, prídavným zariadením pre biokinetiku, optickým vláknom na meranie v exteréri prístroja. Jedná sa o unikátny prístroj jediný na Slovensku, aj v strednej Európe.
- *Perkin Elmer Fluorescence Spectrometer Model 3000* – starší prístroj po rozsiahlej modernizácii a dodatočnom napojení na počítač. Aplikáciou vlastného meracieho a vyhodnocovacieho softwaru „Spektrum“ pre unikátne fluorescenčné techniky sa stal špičkovým prístrojom. Bude slúžiť ako doplnkové zariadenie.
- *Oxymeter s mikroprocesorom*
- *Ultracentrifúga* slúži na prípravu a izoláciu subcelulárnych častíc, najmä mitochondrií
- *Automatizovaný (počítačom riadený) prístroj na stanovenie rozpustnosti pevných látok* - originálne zariadenie na stanov. disociač. konštánt, konštánt stability komplexoligandov s kovmi v živých systémoch (Potenciometrické zariadenie spojené s meraním rozpustnosti)
- *Automatický analyzátor aminokyselín* – staršie zariadenie v štádiu modernizácie
- *HPLC (Shimadzu)* – UV/VIS a fluorescenčný detektor
- *PCR cyklyer TECHNE TC/3000 (Barloworld Scientific)* - prístroj pre klasickú PCR
- *G-Box Chemi* (Syngene) - dokumentačný systém so zabudovaným transiluminátorom a možnosťou fotenia chemiluminiscencie chladenou kamerou
- *Trans-Blot SD RNA/DNA blotting (Biorad)* – prístroj na blotovanie z gélov na NC membránu
- *Elisa*
- *Ostatné doplnkové vybavenie* - presné analytické váhy, elektroforetické zariadenia, gélová chromatografia, spektrofotometre, pH-metre, termostaty, zariadenie na prípravu ultračistej vody

7. POTENCIÁLNY SPOLOČENSKÝ PRÍNOS

- A. 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 prispieť k včasnému záchytu rôznych patologických stavov.
- B. Prínos spočíva v možnosti detekcie rôznych fáz karcinómov z periférnej krvi pacientov použitím neinvazívnych vyšetrovacích metód, s možným praktickým výstupom pri rutinnom skríningu v priebehu štandardných odberov počas preventívnych prehliadok. Ďalej chceme prispieť k lepšiemu monitoringu vplyvu terapie a k skoršiemu odhaleniu prípadnej recidívy, čo môže prispieť k skvalitneniu života pacientov a presnejšej prognóze ochorenia.

- C.** Dosiiahnuté výsledky riešenia vedecko – výskumných úloh prispievajú k rozšíreniu poznatkov na úrovni štúdia mitochondrií.