



# LABORATÓRNA DIAGNOSTIKA

Slovenská spoločnosť klinickej biochémie  
Slovak Society of Clinical Biochemistry  
Recenzovaný časopis pre pracovníkov diagnostických laboratórií

**Číslo 1/2023**  
Ročník XXVIII.

Vydáva Slovenská spoločnosť klinickej biochémie pri SLS  
Cukrová 2373/3, 811 08 Bratislava  
Evidenčné číslo periodickej tlače EV 5929/20  
ISSN 2729-9201 (online)



# LABORATÓRNA DIAGNOSTIKA

Slovak Society of Clinical Biochemistry  
Recenzovaný časopis pre pracovníkov diagnostických laboratórií

**Číslo 1/2023**

Ročník XXVIII.

## PRESEDA REDAKČNEJ RADY

Hedviga Pivovarníková

## ODBORNÝ REDAKTOR

Oliver Rác

## REDAKČNÁ RADA

Ján Balla  
Pavel Blažíček  
Beáta Bolerázska  
Dušan Dobrota  
Eva Ďurovcová  
Michal Farkaš  
Vladimír Heriban  
Beáta Hubková  
Mária Kačániová  
Katarína Lepejová  
Daniel Magula  
Angela Molčányiová  
Jana Netriová  
Katarína Šebeková  
Ladislav Turecký

---

Laboratórna Diagnostika  
Vydáva Slovenská spoločnosť klinickej biochémie pri SLS  
Cukrová 2373/3, 811 08 Bratislava  
Evidenčné číslo periodickej tlače EV 5929/20  
ISSN 2729-9201 (online)  
Vychádza: 2-krát ročne

# OBSAH

## ÚVODNÍK

PRÍHOVOR PREZIDENTKY SSKB .....	5
---------------------------------	---

## IN MEMORIAM

<b>Gustáv Kováč, Daniel Magula:</b> In memoriam – MUDr. Viktor Rosival, PhD .....	7
<b>Ján Vindiš:</b> Spomienka na primára MUDr. Zdenka Cicvárika.....	9

## HISTÓRIA OKB, OLM

<b>Katarína Daňová:</b> História Oddelenia laboratórnej medicíny Národného ústavu srdcových a cievnych chorôb, a.s., Bratislava.....	12
<b>Ján Vindiš:</b> História Oddelenia klinickej biochémie, Fakultná nemocnica Trenčín .....	17
<b>Pavel Blažíček:</b> História vzniku Oddelenia klinických laboratórií v Nemocnici Ministerstva obrany SR.....	24
<b>Štefan Hajzer:</b> 30 rokov medicínskych laboratórií na Slovensku.....	33

## PREHLADOVÉ ČLÁNKY

<b>Andrea Leškaničová, Patrik Šimko, Nicol Urbanská, Terézia Kisková:</b> Metabolomika: potenciálny nástroj včasnej diagnostiky neurodegeneratívnych ochorení .....	40
---	----

## PÔVODNÉ PRÁCE

<b>Jana Ohlasová, Dana Ohlasová, Vladimíra Tomečková, Beáta Hubková, Anna Birková, Beáta Čižmarová, Silvia Timková:</b> Mikrobiologická analýza rozvinutého zubného kazu pred a po ošetrení laserom .....	49
<b>Andrea Leškaničová, Patrik Šimko, Nicol Urbanská, Peter Petík, Alžbeta Blichárová, Nela Žideková, Martin Kertys, Terézia Kisková:</b> Lipidomika: potenciálny nástroj včasnej diagnostiky nádorových ochorení mozgu .....	53
<b>Mária Janubová, Ingrid Žitňanová:</b> Vplyv extraktu Pycnogenol® na stresom indukovanú predčasnú bunkovú senescenciu.....	61
<b>Zuzana Porvazová, Andrea Leškaničová, Peter Petík, Nela Žideková, Alžbeta Blichárová, Ľudmila Verbóová, Martin Kertys, Terézia Kisková:</b> Energetický metabolizmus počas chemicky indukovanej rakoviny mozgu laboratórnych potkanov.....	67

# CONTENT

## EDITORIAL

SSKB PRESIDENT MESSAGE .....	5
------------------------------	---

## IN MEMORIAM

<b>Gustáv Kováč, Daniel Magula:</b> In memoriam – MUDr. Viktor Rosival, MD., PHD.....	7
<b>Ján Vindiš:</b> Memory of the primary MUDr. Zdenko Cicvárek .....	9

## HISTORY OF THE DEPARTMENTS OF CLINICAL BIOCHEMISTRY AND LABORATORY MEDICINE

<b>Katarína Daňová:</b> History of the Department of Laboratory Medicine of The National Institute for Cardiovascular Diseases Bratislava.....	12
<b>Ján Vindiš:</b> The history of Department of Clinical Biochemistry Faculty Hospital Trenčín.....	17
<b>Pavel Blažíček:</b> The history of the establishment of the Department of clinical laboratories in the military hospital of the Ministry of defense.....	24
<b>Štefan Hajzer:</b> 30 years of medical laboratories in Slovakia.....	33

## REVIEWS

<b>Andrea Leškaničová, Patrik Šimko, Nicol Urbanská, Terézia Kisková:</b> Metabolomics: The potential tool in early diagnosis of neurodegenerative diseases .....	40
--	----

## ORIGINAL RESEARCH MANUSCRIPTS

<b>Jana Ohlasová, Dana Ohlasová, Vladimíra Tomečková, Beáta Hubková, Anna Birková, Beáta Čižmarová, Silvia Timková:</b> Microbiological analysis of developed tooth decay before and after laser treatment.....	49
<b>Andrea Leškaničová, Patrik Šimko, Nicol Urbanská, Peter Petík, Alžbeta Blichárová, Nela Žideková, Martin Kertys, Terézia Kisková:</b> Lipidomics: the potential tool for early diagnosis of brain cancer .....	53
<b>Mária Janubová, Ingrid Žitňanová:</b> Effect of Pycnogenol® extract on stress-induced premature cell senescence .....	61
<b>Zuzana Porvazová, Andrea Leškaničová, Peter Petík, Nela Žideková, Alžbeta Blichárová, Eudmila Verbóová, Martin Kertys, Terézia Kisková:</b> Energy metabolism during chemically induced brain cancer of laboratory rats.....	67



## ÚVODNÍK

*Vážené a milé kolegynie a kolegovia,  
vážení členovia Slovenskej spoločnosti  
klinickej biochémie!*

*S príchodom nového ročného obdobia, povzbudivých jarných dní a pomalým nástupom na slniečko zatiaľ skúpych prvých aprílových dní môžeme už iba spomínať na minuloročné októbrové odborné stretnutie – XIV. Kongres SSKB s medzinárodnou účasťou pod záštitou EFLM, ktorý sa po vynútenej odmlke konal už prezenčne. Tento rok 2023 by mal pokračovať v tradičnom tempe a už aj s prípravou novej odbornej akcie LABKVALITA 2023 a voľbami do nového výboru a dozornej rady SSKB na obdobie 20. 5. 2023 do 19. 5. 2027. Volebné obdobie výboru SSKB končí 19. 5. 2023.*

*V súčasných dňoch na domácej pôde prebieha pripomienkové konanie ku Kategorizácii ÚZS nemocníc. Zároveň sa snažíme obnoviť a rozvíjať spoluprácu so zástupcami Jesseniovej Lekárskej fakulty v Martine na príprave návrhu študijného plánu a programu pre postgraduálne vzdelávanie lekárov a možnostiach využitia edukačného grantu. V odbornom časopise Laboratórna diagnostika sa postupne publikuje história nášho odboru za jednotlivé pracoviská v rámci SR. A v neposlednom rade sme už aj začali s prípravou hlavných tém a prednášok na blížiacu sa októbrovú konferenciu LABKVALITA 2023, aby nový výbor SSKB mohol plynule na jej realizácii pokračovať.*

*Úspešne rozvíjame spoluprácu aj na medzinárodnej úrovni. IFCC pripravila spoločné stretnutie odborných zástupcov jednotlivých krajín, ktoré sa konalo v dňoch 28. 10 – 31. 10. 2022 v Bruseli z príležitosti osláv 70. výročia IFCC, ktorého som sa ako zástupca slovenskej odbornej spoločnosti zúčastnila na základe pozvania EFLM a odsúhlasenia výborom SSKB. V jednotlivých vydaniach EFLM Newsletter sa môžete dočítať o všetkých aktivitách*

*EFLM a národných spoločností. V čísle [Newsletter EFLM 2/2023](#) je zverejnené zastúpenie národných spoločností v pracovnej skupine „Zelené a udržateľné laboratóriá“. Cieľom pracovnej skupiny EFLM Task-Force „Green Labs“, je vypracovať usmernenia, kritériá a kľúčové odporúčania pre udržateľné postupy v klinických laboratóriách (Green Lab Guide) a implementovať systém, ktorý bude viesť európske laboratóriá smerom na prechod k „zeleným laboratóriám“ a na monitorovanie ich stavu v priebehu rokov vydávaním ročného EFLM Certifikátu Green Labs. Novou výzvou EFLM v týchto dňoch je navrhnuť zástupcu národnej spoločnosti do pracovnej skupiny EFLM Task Force “Direct-to-Consumer Testing”, ktorého výbor SSKB v týchto dňoch odsúhlasil.*

*EFLM opakovane vyzýva jednotlivé národné spoločnosti na spoluprácu a zastúpenie v pracovných skupinách, preto je vhodné a potrebné sledovať webovú stránku SSKB, kde sa všetky tieto aktuálne informácie a nové výzvy pravidelne zverejňujú.*

*Významnou udalosťou SSKB v druhom polroku 2022 bol XIV. Kongres SSKB s medzinárodnou účasťou pod záštitou EFLM, ktorý sa konal v dňoch 9. 10.–11. 10. 2022 v malebnej Demänovskej doline po vynútenej dvojročnej pandemickej prestávke. O to spontánnejšie a radostnejšie boli naše osobné stretnutia na tomto kongrese a veľmi si vážime, že pozvanie prijala aj Prof. Tomris Ozben, výkonná prezidentka EFLM a zároveň zvolená prezidentka IFCC na roky 2024–2026 ako aj ďalší významní zahraniční hostia. Prvýkrát v histórii SSKB bola prítomná na kongrese aj prezidentka EFLM a zároveň aj prezidentka IFCC.*

*XIV. Kongres SSKB v roku 2022 bol aj príležitosťou a miestom pre všetkých ocenených jubilentov, ktorí si prišli pocty a ocenenia prevziať na kongres osobne, čo si veľmi vážime.*

*Laudácia na osobnosti sú obsahom kongresového čísla časopisu Laboratórna diagnostika č. 2/2022.*

[https://www.sskb.sk/2022/wp-content/uploads/2022/11/dg\\_2022\\_2.pdf](https://www.sskb.sk/2022/wp-content/uploads/2022/11/dg_2022_2.pdf)

Z významných medzinárodných odborných akcií sa pripravuje XXV. Kongres IFCC WorldLab EuroMedLab, ktorý sa bude konať ako spoločný 25. medzinárodný kongres klinickej chémie a laboratórnej medicíny (WorldLab) a 25. európsky kongres klinickej chémie a laboratórnej medicíny (EuroMedLab) a hosťiteľom bude Talianska spoločnosť klinickej biochémie a klinickej molekulárnej biológie pri príležitosti ich 55. výročného kongresu. Bude sa konať 21.–25. mája 2023 v Ríme.

XXVI. IFCC WORDLLAB sa bude konať 26.–30. mája 2024 v Dubaji, Spojených arabských emirátoch.

XXVI. IFCC-EFLM EUROMEDLAB 2025 sa bude konať 18.–22. mája 2025 v Bruseli.

Z domácich odborných akcií sa pripravuje už spomínané tradičné odborné podujatie LABKVALITA 2023 venované kvalite procesov v klinických laboratóriách 8.–10. októbra 2023 v hoteli Horizont Resort\*\*\*\* v Starej Lesnej vo Vysokých Tatrách.

Bližšie informácie priebežne zverejňujeme na webovej stránke SSKB.

Opätovne by som chcela osloviť a poprosiť všetkých členov SSKB na publikovanie v našom odbornom časopise „Laboratórna diagnostika“. Redakcia časopisu víta celý rad rôznych foriem publikácií a zaujímavostí.

Záverom mi dovoľte poďakovať sa za neúnavnú spoluprácu, aktívny prístup ku riešeniu, podporu, ale aj napĺňaniu nových výziev EFLM, ktorých nie je vôbec málo, všetkým členom výboru SSKB (M. Kačániovej, E. Ďurovcovej, K. Lepejovej, J. Netriovej, O. Ráčzovi, V. Heribanovi, D. Magulovi), členom dozornej rady (P. Sečníkovi jr., F. Štefancovi, B. Hvozdovičovej) a dlhoročnému národnému reprezentantovi SSKB (J. Ballovi).

*Bolo mi ctou pracovať uplynulé volebné obdobie s týmito odborníkmi, ktorých si vážim aj ako ľudí neváhajúcich kedykoľvek pomôcť a podporiť sa navzájom, čo je v dnešnej dobe skôr výnimočné, a práve preto...*

*Hovorí sa, že knižku Malý princ by sme si mali počas života prečítať viackrát. Minimálne raz v detstve a druhýkrát, keď dospejeme. Niektoré hlboké myšlienky Antoina de Saint-Exupéryho nám totiž začnú dávať význam vtedy, keď získame určité životné skúsenosti. Môžete si na ne spomenúť ako v ťažkých časoch, tak pri každodennej motivácii.*

*„Správne vidíme iba srdcom. To dôležité, je očami neviditeľné“.*

*„Kto ide stále rovno, ďaleko nedôjde“.*

*„Nikdy nie sme spokojní tam, kde sme“.*



*Želám výboru SSKB v novom zložení veľa entuziazmu, energie, trpezlivosti, vzájomnej úcty a pochopenia, prajnosti, pokory, aby „súzvučili“ všetci jej členovia v zmysluplnej odbornej, ale aj osobnej spolupráci ďalšie štyri roky.*

*Všetky aktuálne informácie vždy včas zverejňujeme na webovej stránke [www.sskb.sk](http://www.sskb.sk), ktorá nadobudla mierne zmenenú štruktúru, a tým uľahčila vyhľadávanie a prehľadnala dôležitosť informácií.*

*Podakovanie patrí všetkým...*

17. 4. 2023

Hedviga Pivovarníková  
prezidentka SSKB



Laboratórna Diagnostika, XXVIII, 1, 2023: 7–8

**IN MEMORIAM – MUDR. VIKTOR ROSIVAL, PHD.  
IN MEMORIAM – VIKTOR ROSIVAL, MD., PHD.**



Dňa 24. 1. 2023 nás vo veku 93 rokov navždy opustil lekár, internista, klinický biochemik, kolega a priateľ MUDr. Viktor Rosival, PhD. (nar. 31. 3. 1930 v Bratislave).

Radi by sme pri tejto smutnej príležitosti, ktorá čaká každého z nás, len nevieme kedy a kde, spomenuli skutočnosti, ktoré ostanú v našej pamäti ako trvalá spomienka na Viktora Rosivala – jeho príbeh, prínos a odkaz.

Dožiť sa 93 rokov hovorí samo za seba – určite to mal to v génoch, ale aj v životospráve a prístupe k existencii ako takej. Život sa s ním (na rozdiel od nás) nemaznal: mal v porovnaní s nami oveľa ťažšiu východiskovú situáciu a podstatne ťažšie podmienky. Vďaka jeho charakteru a prístupu, vytrvalosti a dôslednosti, čestnosti a priateľstvu ho zvládol spôsobom, ktorý nám všetkým slúži ako vzor – od klinického laboratória – cez interné oddelenie – až po ordinariát pre vnútorné prostredie: pre Trnavskú nemocnicu, a tým aj pre celé Československo.

Viktor Rosival zostane navždy spojený so zavedením diagnostiky porúch acidobázickej rovnováhy do liečebnopreventívnej praxe a činnosti. Osobne sme mali možnosť byť roky svedkami, ako spolu so svojou spolupracovníčkou Miou Knížovou dennodenne navšte-

vovali pacientov na oddeleniach Trnavskej nemocnice, zhodnotili ich klinický obraz, odobrali krv a analyzovali ju na „Astrupovi“, vypracovali záver a odporúčania pre ošetrojúceho lekára. Bol pre nás učiteľom, kolegom, priateľom a vzorom - ako sa má v praxi robiť klinická biochémia, či laboratórna medicína.

Priniesť diagnostiku porúch acidobázickej rovnováhy zo Škandinávie do Československa – teda priamo zo zdroja kde vznikla a kde mal možnosť problematiku dlhodobo študovať, sa podarí málokomu. Jemu sa to podarilo okrem vyššie spomenutých vlastností aj vďaka jeho jazykovej zdatnosti – dokonalému ovládaniu nielen švédštiny, ale aj nemčiny, angličtiny a maďarčiny. Na to prirodzene nadväzuje jeho publikačná činnosť v renomovaných medzinárodných odborných časopisoch, v ktorých každý rok uverejnil niekoľko príspevkov reagujúcich či už na vývoj alebo hodnotiacich poznatky a výsledky na poli problematiky acidobázy a vnútorného prostredia.

Primár Nejedlý z Kladna – legenda československej klinickej biochémie – si na adresu klinických biochemikov svojho času povzdychol – že sa kliniku nikdy nedoučili a biochémiu nikdy nenaučili. Viktor Rosival svojim

každodenným prístupom dokazoval pravý opak. Desaťročia denne vyšetriť do 30 pacientov podozrivých z porúch acidobázy na interne, chirurgii, gynekológii, urológii, neurológii a iných oddeleniach v Trnavskej nemocnici, v klinickom laboratóriu stanoviť každému z nich pH, pCO<sub>2</sub>, bikarbonát, elektrolyty, minerály a ďalšie potrebné parametre, napísať nález, odporúčenia a ďalší deň skontrolovať stav a navyše sa každý deň staráť o jednu izbu pacientov na internom oddelení – nepoznáme okrem MUDr. Rosivala nikoho, ktorý by tak osobitne a brilantne dokázal pretaviť rozsiahle vedomosti a skúsenosti z kliniky a laboratória do každodennej praxe, ako on.

Príbeh, prínos a odkaz MUDr. Viktora Rosivala, PhD. nie je možné charakterizovať výstižnejšie ako slovami Josepha Hellera – autora románu „Hlava 22“: „Z blata zlato“ — z blata – napriek neuveriteľne zlým podmienkam, prekážkam a nežičlivosti osudu vytvorí zlato – lekára, ktorý ovláda kliniku a laboratórium tak dokonale ako nik iný a denne pomáha pacientom.

Pre nás zostávajú dve úlohy. Prvá: zaviesť do každodennej praxe Rosivalov štýl práce a vychovávať klinických biochemikov a špecialistov v laboratórnej medicíne, ktorí sa kliniku doučili a biochémiu naučili. Druhá: zahájiť každoročne v rámci výročnej schôdze Slovenskej spoločnosti pre laboratórnu medicínu, tak ako to už viac ako 20 rokov realizujeme s laureátskou prednáškou a ude-

ľovaním ceny a *medaily Pera Hyltofta Petersena* za zásluhy o rozvoj laboratórnej medicíny na Slovensku, aj memoriálovú prednášku Viktora Rosivala s udelením diplomu za presadzovanie laboratórnych poznatkov do klinickej praxe, čo by nám pripomínalo nielen Rosivalov príbeh, prínos a odkaz, ale aj povinnosť našej každodennej prítomnosti na klinickom pracovisku a zlepšovania pomoci chorým.

Za celoživotný prínos v oblasti klinickej biochémie, prednáškovú a publikačnú činnosť najmä v problematike acidobázických pomerov a metabolizmu udelila Slovenská lekárska spoločnosť na návrh Slovenskej spoločnosti klinickej biochémie v roku 2022 Viktorovi Rosivalovi „*Ďakovný list SLS*“.



Spolu s priateľmi a kolegami zostávame v trvalej spomienke

**Prof. MUDr. RNDr. Gustáv Kováč, CSc., MBA**  
*Ústav chémie, klinickej biochémie a laboratórnej medicíny LF SZU Bratislava*  
*e-mail: gustav.kovac@gmail.com*

**MUDr. Daniel Magula, CSc.**  
*Oddelenie klinickej biochémie, Špecializovaná nemocnica sv. Svorada, Zobor, n. o., Nitra*





Laboratórna Diagnostika, XXVIII, 1, 2023: 9–11

## SPOMIENKA NA PRIMÁRA MUDR. ZDENKA CICVÁRKA MEMORY OF THE PRIMARY MUDR. ZDENKO CICVÁREK



\* 29. 7. 1921 Svätý Jur okres Pezinok  
† 26. 11. 1976 Trenčín

Rodičia: *otec* Ladislav C i c v á r e k, stredoškolský profesor, narodil sa v Lidiciach na Kladensku; *matka* Matilda, rodená K o l á r o v á. Manželka Anna, pôsobila ako učiteľka v materskej škole. Dcéra Zdenka, vyštudovala výtvarné umenie v Bratislave.

V roku 1939 maturoval na gymnáziu v Bratislave, v rokoch 1939–1946 študoval na Lekárskej fakulte Slovenskej univerzity v Bratislave. Ako medik sa zúčastnil Slovenského národného povstania, keď asistoval v nemocniciach v Banskej Bystrici a vo Zvolene.

Po promócií pôsobil ako lekár vo Zvolene a Rimavskej Sobote, v roku 1950 sa stal primárom detského oddelenia v Hnúšti. Vyznačoval sa nielen pediatrickými vedomosťami, ale aj otorinolaryngologickými, röntgenologickými, parazitologickými a samozrejme aj biochemickými. V rokoch 1952–1956 pôsobil na Povereníctve zdravotníctva v Bratislave ako vedúci odboru starostlivosti o matku a dieťa. V tomto období sa zameriaval na prevenciu detských ochorení a významne sa zaslúžil o pokles dojčenskej

úmrtnosti na Slovensku. V roku 1956 odišiel do Trenčína, kde sa stal primárom ním založeného centrálného biochemického laboratória ako prvého na Slovensku, neskôr Oddelenia klinickej biochémie Nemocnice s poliklinikou v Trenčíne. Dlhodobo spolupracoval so Slovenským ústavom pre doškoľovanie lekárov (terajšia Slovenská zdravotnícka univerzita v Bratislave), kde významne pomáhal vychovávať novú generáciu slovenských biochemikov. Ústrednou oblasťou jeho vedeckých záujmov bola lekárska biochémia, v rámci ktorej ako jeden z prvých v Československej republike opísal otravu antihistaminikami, spracoval problematiku fetálneho hemoglobínu a bol aj iniciátorom kontroly správnosti a presnosti biochemických vyšetrení. Propagoval a analyticky použil voľnú elektroforézu, laboratórne spracoval Waldenströmovu makroglobulinémiu, do praxe zaviedol tymolovú zákalovú reakciu. Venoval sa biochémii a polarografii mozgomiechového moku, acidobázickej rovnováhe ako aj viacerým metodickým problémom klinickej biochémie. Medzi jeho priority patrilo používanie elektroforézy a imunoelektro-

forézy, práce o glutatióne, paraproteinémiách a poznatky o biochémi mozgomiechového moku. Zastával aj funkciu krajského odborníka v klinickej biochémi. V priebehu celého obdobia postupne budoval a inovoval prístrojový park a rozširoval repertoár vyšetrení. Intenzívne sa so svojimi spolupracovníkmi venoval odbornej príprave zdravotníckych laborantov na Strednej zdravotníckej škole v Trenčíne, kde založil odbor zdravotnícky laborant.

Bol účastníkom mnohých sympózií, prednášal v Prahe, Petrohrade, Drážďanoch, Erfurte, Budapešti, Varšave, Bialystoku, Štetíne a na univerzite v Halle. Tiež pravidelne prednášal na schôdzach Spolku lekárov v Trenčíne. Prispieval sám aj so spolupracovníkmi do odborných časopisov doma i v zahraničí (100 exaktných vedeckých prác). Bol tiež autorom početného radu recenzií kníh a prác pre rôzne odborné časopisy. V rokoch 1959–1961 pôsobil ako zodpovedný redaktor, v rokoch 1961–1967 odborný redaktor časopisu *Lekársky obzor*. Bol vedúcim redaktorom časopisu *Biochemia Clinica Bohemoslovaca*. Od roku 1959 bol členom výboru Československej spoločnosti klinickej biochémie a v roku 1969 sa stal predsedom federálneho výboru spoločnosti klinickej biochémie. V rokoch 1970–1972 pôsobil ako predseda výboru Slovenskej spoločnosti klinickej biochémie.

Bol to človek so vzácnymi vlastnosťami, prirodzene inteligentný, vysoko erudovaný, veľmi pracovitý, snaživý, v práci systematický, vytrvalý, talentovaný, jazykovo zdatný (anglicky, nemecky, poľsky a rusky).

Osud nedoprial MUDr. Zdenkovi C i c v á r k o v i, priekopníkovi v odbore klinická biochémia, dožiť sa veku, v ktorom mohol zhodnotiť svoje celoživotné skúsenosti, vedomosti a výsledky vedeckej činnosti. No aj tak zanechal po sebe obdivuhodnú, kvalitnú prácu v prospech pacienta a celého zdravotníctva.

#### Knižné publikácie:

1. 1955 Laboratórna príručka pre detské zdravotné strediská s J. Homolkom.
2. 1965 Vnútorne choroby s M. Ondrejičkom.
3. 1970 Bielkoviny a nukleové kyseliny s L. Cebacauerom
4. 1974 Klinická biochémia cerebrospinálneho likvoru ako vrchol jeho vedecko-publikačnej činnosti.
5. 1975 Cícvárek, Z., Janiš, J., Müller, R.: Medzinárodná sústava jednotiek SI v klinickej biochémi. Ministerstvo zdravotníctva SSR, 1. vyd.

#### Učebnice pre SZŠ:

1. 1960 Laboratórne vyšetrovacie metódy.
2. 1964 a 1971 Biochemické vyšetrovacie metódy - zostavovateľ a spoluautor.
3. 1969 Biochémia – spoluautor.

Za svoju bohatú vedeckú činnosť bol menovaný za čestného člena

- Nemeckej lekárskej spoločnosti (NDR)
- Poľskej lekárskej spoločnosti
- Českej lekárskej spoločnosti – in memoriam
- Slovenskej spoločnosti klinickej biochémie – in memoriam

*MUDr. Ján Vindiš,  
emeritný primár Oddelenia klinickej biochémie,  
hematológie a mikrobiológie Fakultnej nemocnice  
v Trenčíne*

*e-mail: drvindis@yahoo.com*



## O AUTOROVI

### MUDr. Ján Vindiš

Narodil sa 18.1.1950 v Piešťanoch. Študoval na Lekárskej fakulte Univerzity Komenského v Bratislave, smer všeobecné lekárstvo, ktorú ukončil v roku 1975. V roku 1976 začal pracovať ako sekundárny lekár na oddelení klinickej biochémie Nemocnice s poliklinikou OÚNZ v Trenčíne. V roku 1981 absolvoval pedagogické minimum so záverečnou skúškou pre externých učiteľov na odborných školách. V rokoch 1981, 1983 pracoval ako sekundárny lekár na internom oddelení NsP Trenčín v rámci povinnej predtestačnej praxe. V roku 1982 vykonal atestáciu 1. stupňa, v roku 1987 atestáciu 2. stupňa z klinickej biochémie. V rokoch 1977–1990 pracoval na oddelení klinickej biochémie NsP Trenčín ako sekundárny lekár. V rokoch 1990–2005 ako nástupca primára MUDr. Fridricha V a r g u, vykonával funkciu primára Oddelenia klinickej biochémie FN Trenčín, od roku 2005 primára Oddelenia klinickej biochémie a hematológie, od roku 2012 primára Oddelenia klinickej biochémie, hematológie a mikrobiológie, a od roku 2013 primára Oddelenia klinickej biochémie, hematológie, mikrobiológie, imunológie a alergiológie. V roku 1996 absolvoval rekvalifikačný kurz *Manažment vedúceho pracovní-*

ka v zdravotníctve. Od nástupu do vedúcej funkcie kládol MUDr. V i n d i š dôraz na to, aby sa oddelenie stalo moderným, špičkovým a kvalitným zdravotníckym pracoviskom. Od roku 1977 vyučuje predmet klinická biochémia na SZŠ v Trenčíne a od roku 2018 aj predmet patológia. V školskom roku 2005/2006 učil predmet klinická biochémia na Zdravotníckej fakulte Trenčianskej univerzity Alexandra Dubčeka v Trenčíne. V rokoch 1990–1995 pôsobil ako okresný odborník, v rokoch 1996–2008 ako krajský odborník pre odbor klinická biochémia. V roku 2020 bol menovaný krajským odborníkom pre odbor klinická biochémia za trenčiansky kraj.

Hlavnou činnosťou bolo zabezpečovať kvalitnú a odbornú úroveň diagnostiky s dôrazom neurodegeneratívne, demyelinizačné, nádorové a lymfoproliferatívne ochorenia.

Publikačná a prednášková činnosť sa týkala oblasti ochorení centrálného nervového systému, gastrointestinálneho systému, porúch metabolizmu a v poslednom čase problematike POCT.

Organizoval vedecké pracovné schôdze Spolku lekárov Trenčín, krajské semináre a semináre vlastného oddelenia.

Slovenská spoločnosť klinickej biochémie pri Slovenskej lekárskej spoločnosti v roku 2022 pri príležitosti životného jubilea udelila MUDr. Jánovi V i n d i š o v i *Ďakovný list za prínos v prospech rozvoja medicínskeho odboru klinická biochémia a aktivity v oblasti vzdelávania zdravotníckych pracovníkov.*

*Redakcia*



Laboratórna Diagnostika, XXVIII, 1, 2023: 12–16

## HISTÓRIA ODDELENIA LABORATÓRNEJ MEDICÍNY NÁRODNÉHO ÚSTAVU SRDCOVÝCH A CIEVNÝCH CHORÔB, a.s., BRATISLAVA HISTORY OF THE DEPARTMENT OF LABORATORY MEDICINE OF THE NATIONAL INSTITUTE FOR CARDIOVASCULAR DISEASES BRATISLAVA

**Katarína Daňová**

Oddelenie laboratórnej medicíny, Národný ústav srdcových a cievnych chorôb, Bratislava

e-mail: katarina.danova@nusch.sk

Oddelenie laboratórnej medicíny (OLM) Národného ústavu srdcových a cievnych chorôb (NÚSCH) vzniklo v roku 2005 zlúčením Oddelenia klinickej biochémie a Oddelenia hematológie a transfuziológie. História pôvodného Oddelenia klinickej biochémie (OKB) sa začala písať v roku 1950, kedy sa presťahovala II. interná klinika z priestorov nemocnice na Hlbokej ceste do bývalej Evanjelickej nemocnice na Partizánskej ulici (Obr. 1). Laborató-

rium bolo súčasťou II. internej kliniky, ktorú viedol prednosta prof. MUDr. Vladimír H a v i a r. II. interná klinika obsadila trakt nemocnice od Bradlianskej ulice a II. chirurgická klinika od Palisád.

Laboratórium bolo umiestnené na 2. poschodí. Najprv ho tvorili tri miestnosti: hematologické laboratórium (vyšetrenie krvných obrazov, rekalcifikačných časov plazmy, protrombínových testov – Quicka, krvných náterov), kde



*Obr. 1. Budova bývalej Evanjelickej nemocnice*

sa súčasne robili vyšetrenia hladiny glykémie; miestnosť s meracími prístrojmi a biochemické laboratórium, kde sa vykonávali manuálne analýzy. Moč sa vyšetroval v miestnosti vedľa internej ambulancie na prízemí. Neskôr sa vyšetrenie moču robilo v priestoroch laboratória na druhom poschodí. Krvná banka, zriadená v chirurgickom trakte, patrila Klinike hematológie a transfuziológie na Partizánskej ulici.

V biochemickom laboratóriu pracovalo 5 zdravotníckych laborantiek, funkciu vedúcej laborantky vykonávala sestra Kamila-Rozália Parajková. Až do roku 1957, keď nastúpila do laboratória Ing. Oľga Luknárová – vedúca úseku rutinnej analýzy a kontroly, mal odborné pod dohľadom laboratórium MUDr. Július Kasper, lekár II. internej kliniky FN a Lekárskej fakulty UK. Laboratórium slúžilo pre už spomenuté kliniky a aj pre Kliniku plastickej chirurgie. Laborantky vykonávali odbery z prsta na stanovenie hladiny glykémie a na vyšetrenie krvných plynov.

V hematologickom laboratóriu sa zo začiatku počítali krvné elementy mikroskopicky a hodnotila morfológia krvných elementov. Až v roku 1970 bol inštalovaný na oddelenie prvý hematologický analyzátor. Zodpovedná za úsek hematológie bola MUDr. Edita Lipsicová z Kliniky hematológie a transfuziológie na Partizánskej ulici. Vyšetrenia krvných skupín, krížové pokusy a sklad krvných liekov zabezpečovala pre nemocnicu Klinika hematológie a transfuziológie.

V sedemdesiatych rokoch dvadsiateho storočia vzniklo v rámci laboratórneho pracoviska laboratórium krvných plynov s analyzátorom krvných plynov firmy Radiometer. Najprv ho viedol RNDr. Červehň, po ňom RNDr. Felicitas Babušíková. Pracovali v ňom 3 laborantky.

V roku 1970 nastúpil do ústavu prof. MUDr. Ervín Barta, DrSc. Keď sa v roku 1971 vytvorilo v rámci Krajského ústavu národného zdravia na Mickiewiczovej ulici Oddelenie klinickej biochémie s primárom MUDr. Oskarom Kadlecom a vedúcou laborantkou D. Prieloznou, laboratórium na Partizánskej ulici sa odčlenilo od II. internej kliniky a stalo sa detašovaným pracoviskom – úsekom tohto oddelenia. Ing. O. Luknárová, CSc., bola vedúcou úseku a z vedúcej laborantky R. Parajkovej sa stala staničná laborantka.

Vo výskume sa Ing. O. Luknárová, CSc. venovala prevažne metabolizmu lipidov. Bola zaradená do tímu ochrany myokardu počas ischémie a perfúzie pri VÚS SAV, ktorý sídlil na 4. poschodí nemocnice.

Pulfrichov fotometer, používaný do sedemdesiatych rokov 20. storočia, nahradili fotometre Spekol (Analytik Jena) a Eppendorf s tlačiarňou na kinetickú analýzu enzýmov. Na meranie sodíka a draslíka slúžil plameňový fotometer značky Zeiss, chloridy sa vyšetrovali naďalej titračne. Súčasťou laboratórneho vybavenia boli osmometer a zariadenie na dvojrozmernú elektroforézu na papieri, na ktorej sa robila aj elektroforéza lipoproteínov.

1. 1. 1979 bol založený Ústav kardiovaskulárnych chorôb (ÚKVCH). Jeho jadrom sa stali II. interná klinika a II. chirurgická klinika. Vtedy vzniklo samostatné Oddelenie klinickej biochémie ÚKVCH. Ing. O. Luknárová viedla naďalej OKB, odborným garantom sa stal prof. MUDr. E. Barta, DrSc., ktorý bol súčasťou tímu mimotelového obehu (ECC). Vedúca laborantka R. Parajková odišla do starobného dôchodku, jej funkciu prebrala Eva PISOŇOVÁ. V roku 1981 nastúpila na oddelenie Ing. Helena MINÁROVÁ. E. PISOŇOVÁ vo funkcii vedúcej laborantky nahradila v roku 1983 Ľudmila GAŠPAROVICHOVÁ. V tom čase pracovali tri laborantky v laboratóriu krvných plynov, tri v hematologickom laboratóriu a osem v biochemickom laboratóriu. Operácie v mimotelovom obehu vyžadovali vyšetrenie krvných plynov a hemokoagulačné vyšetrenia, preto vzniklo v operačnom trakte príručné laboratórium s jednou laborantkou (Obr. 2, 3, 4).

V roku 1989 boli na OKB inštalované dva biochemické analyzátory Cobas Fara firmy Roche, ktoré umožnili automatizáciu vyšetrení a zmeny v prevádzke oddelenia. Zaviedli sa metódy s malým objemom vyšetrovanej vzorky (mikrometódy), kvantitatívne stanovenie imunoglobulín-



Obr. 2. Prof. MUDr. E. Barta, DrSc., v roku 1985



**Obr. 3 Pracovní kolektív OKB ÚKVCH v roku 1983 - zľava vedúca laborantka Ľ. Gašparovičová, zľava štvrtá Ing. O. Luknárová, vedľa zľava M. Paliesková, E. Buryňaková**



**Obr. 4. Pracovní kolektív OKB ÚKVCH v roku 1990**



**Obr. 5. Primár OKB ÚKVCH a SÚSCH prof. MUDr. I. Pecháň, DrSc., a vedúca laborantka OKB ÚKVCH a SÚSCH Ľ. Gašparovičová**



**Obr. 6. Budova Národného ústavu srdcových a cievnych chorôb**

nov na princípe turbidimetrie. Plameňový fotometer Zeiss nahradili dva ionselektívne analyzátory AVL 983. Prístrojový park sa rozšíril aj o dva analyzátory krvných plynov AVL 995.

Prof. MUDr. Ivan P e c h á ň, DrSc., prišiel pracovať na ÚKVCH v roku 1986 a stal sa prvým primárom OKB (Obr. 5). Pod jeho vedením sa rozšíril výskum ochrany myokardu počas ischémie a reperfúzie so špeciálnym zameraním na kardiochirurgických pacientov. Zaoberal sa biochemickým a imunologickým monitorovaním pacientov po transplantácii srdca. V roku 1994 odišľa do starobného dôchodku Ing. O. L u k n á r o v á.

Na jar roku 1997 sa laboratórium presťahovalo do novovybudovaných priestorov Slovenského ústavu srdcových a cievnych chorôb, ktorý sa po vzniku Stredoslovenského a Východoslovenského ústavu srdcových a cievnych chorôb premenoval na Národný ústav srdcových a cievnych chorôb (2006). Ústav sídli na Kramároch. Laborató-

rium sa nachádza na 2. poschodí v blízkosti operačných sál a Oddelenia akútnej a intenzívnej medicíny. V operačnom trakte je detašované pracovisko – laboratórium s analyzátorom krvných plynov, elektrolytov a glukózy. Pracuje v ňom jedna laborantka.

Po presťahovaní sa hematologická časť odčleňuje a vzniká Oddelenie hematológie a transfuziológie pod vedením primárky MUDr. Evy S i l v á n o v e j. Obe oddelenia sa v roku 2005 opäť zlučujú do Oddelenia laboratórnej medicíny. Nové, veľkorysé priestory OKB boli vybavené nasledovnou prístrojovou technikou – automatickými analyzátormi Hitachi 911, Cobas Mira Plus, OPUS Dade Behring, analyzátorom na stanovenie hladiny liečiv ViVA E (Siemens), immunochemickým analyzátorom Elecsys 2010, analyzátorom moču Miditron, analyzátormi krvných plynov OMNI 4 (AVL), neskôr Cobas b221 Roche, AVL Compact 3, ionselektívnymi analyzátormi elektrolytov AVL 983 (neskôr 988-3), glukometrom Beckmann (neskôr Biosen



**Obr. 7. Zdravotníčka laborantka L. Rajničová pracuje na analyzátoře Hitachi 911**



**Obr. 8. Zdravotníčka laborantka J. Kašaričková v urgentnom laboratóriu SÚSCH/NÚSCH**



**Obr. 9. Zdravotníčka laborantka J. Mihalíková v urgentnom laboratóriu SÚSCH/NÚSCH**



**Obr. 10. Imunochemický analyzátor Cobas e 411**

C-line). Prístroje boli zapojené do laboratórneho informačného systému (LIS), na jeseň 1998 sa LIS stal súčasťou nemocničného informačného systému (Obr. 6, 7, 8, 9, 10, 11).

1. 9. 1997 na OKB nastúpila MUDr. Katarína Daňová, primárkou sa stala v roku 1999 a úspešne vedie oddelenie dodnes. V roku 2000 nahradila Ing. Katarína Ondrejčovičová RNDr. F. Babušíkovú, ktorá odišla do dôchodku a po odchode Ing. H. Minárovej do dôchodku na jej pracovné miesto prišla Mgr. J. Balajová. Od mája roku 2022 na tejto pozícii pracuje Ing. Viera Horváthová (Obr. 11, 12, 13, 14).

Ľ. Gašparovičová vykonávala funkciu vedúcej laborantky OKB a OLM-PKB (Pracovisko klinickej biochémie) od roku 1983 do roku 2011. Na krátke obdobie (2011–2012) bola vedúcou laborantkou Mgr. Denisa Štěpánková, tú zastupovala počas materskej a rodičovskej dovolenky Magdaléna Záhořská. Od roku

2015 doposiaľ je vedúcou laborantkou Mgr. Lucia Rajničová. V súčasnosti pod jej vedením pracuje deväť zdravotníckych laborantiek.

Detské kardiocentrum (DKC) sa presídlilo do nových priestorov v areáli NÚSCH vo februári 2021, laboratóriu tak pribudla úloha poskytovať svoje služby aj detským pacientom so všetkými špecifikami detského veku v rámci predanalytickej, analytickej a postanalytickej fázy. S dostatočným časovým predstihom sa aj vďaka cenným radám kolegov z Oddelenia laboratórnej medicíny NÚDCH



**Obr. 11.** Zľava Ing. K. Ondrejkočičová a Ing. H. Minárová



**Obr. 12.** Pracovný kolektív OKB SÚSCH v roku 1999, dole v strede v civilnom oblečení RNDr. F. Babušiková, vedľa nej sprava primárka MUDr. K. Daňová, PhD.



**Obr. 13.** Zľava stojaca E. PISOŇOVÁ bývalá vedúca laborantka OKB ÚKVCH v spoločnosti kolegyň v roku 1999



**Obr. 14.** Zdravotníčka laborantka E. BURYŇIAKOVÁ na spoločnom prijíme biochemického a hematologického materiálu OKB SÚSCH v roku 2004

a znalosti požiadaviek odborníkov z DKC na túto špecifickú situáciu OLM pripravilo priestorovo, prístrojovým vybavením, vypracovaním potrebnej dokumentácie a zmenou režimu práce.

OLM NÚSCH, a. s., a jeho súčasť OLM-PKB úspešne zvládli proces akreditácie v zmysle normy EN ISO 15189: 2012. SNAS mu udelila osvedčenie o akreditácii podľa uvedenej normy v odboroch klinická biochémia, klinická hematológia a transfuziológia v biologických materiáloch humánneho pôvodu.

Históriu tvoria ľudia a aj históriu OKB/OLM tvorili a tvoria ľudia so svojimi schopnosťami, vedomosťami, charakterovými danosťami a víziami o smerovaní oddelenia. Každý z nich zanechal odtlačok na dnešnej podobe pracoviska. Napriek tomu, že mnohí z nich, ktorí budovali toto oddelenie, už nežijú, ostali žiť v životoch pacientov, ktorým svojou prácou pomohli a tiež v srdciach a pamäti spolupracovníkov, ktorých viedli, učili a pomáhali im po odbornej a aj ľudskej stránke.





Laboratórna Diagnostika, XXVIII, 1, 2023: 17–23

## HISTÓRIA ODDELENIA KLINICKEJ BIOCHÉMIE FAKULTNÁ NEMOCNICA TRENČÍN THE HISTORY OF DEPARTMENT OF CLINICAL BIOCHEMISTRY FACULTY HOSPITAL TRENČÍN

Ján Vindiš

Stredná zdravotnícka škola Celestíny Šimurkovej, Trenčín

e-mail: drvindis@yahoo.com

### SÚHRN

Pracovisko klinickej biochémie bolo založené v roku 1956 ako centrálné biochemické laboratórium, od roku 1968 pod názvom Oddelenie klinickej biochémie, ktoré bolo prvé svojho druhu na Slovensku.

Vzniklo zlúčením príručných laboratórií dislokovaných pri niektorých lôžkových oddeleniach.

V roku 1968 vzniklo v Trenčíne skrínigové laboratórium pre vyhľadávanie vrodených metabolických porúch.

Obdobie rokov 1973–1990 sa vyznačovalo nástupom používania mikroanalytických metód.

Po roku 1990 dochádza k mohutnému rozvoju automatizácie a informatizácie prevádzky oddelenia a rozsiahlemu využívaniu imunoanalytických metód.

Súčasnú dobu sa vyznačuje zriadením POCT úseku, integráciou analytických systémov do jedného celku, zavedením využívania čiarového kódu na identifikáciu vzoriek biologických materiálov a tiež elektronickej žiadanky z oddelení a ambulancií fakultnej nemocnice. Oddelenie počas celej svojej histórie participovalo na viacerých výskumných úlohách v rámci spolupráce s ostatnými oddeleniami.

**Kľúčové slová:** história; laboratórium; biochémia; automatizácia; informatizácia

### ABSTRACT

The Department of Clinical Biochemistry was founded in 1956 as a central biochemical laboratory, since 1968 named as the Department of Clinical Biochemistry, the first of its kind in Slovakia.

It was created by the merger of manual laboratories located at some hospital departments.

In 1968, a screening laboratory was established in Trenčín for the search for congenital metabolic disorders.

The period 1973–1990 was characterized by the beginning of the use of microanalytical methods.

After 1990, there was a massive development of automation and computerization of the department's operation and extensive use of immunoanalytical methods.

The current period is characterized by the establishment of the POCT section, the integration of analytical systems into a single unit, the introduction of the use of barcodes for the identification of samples of biological materials and also the electronic request form from the departments and clinics of the teaching hospital. Throughout its history, the department has participated in several research tasks in cooperation with other departments.

**Key words:** history; laboratory; biochemistry; automation; computerization

Prvá zmienka o mestskom špitáli v Trenčíne pochádza už z roku 1130. Špitál – chorobinec existoval v Trenčíne v roku 1505. Základný kameň terajšej nemocnice položili v roku 1848. Nemocnica mala jednu hlavnú poschodovú budovu a dve prízemné, mala 112 postelí. V rokoch 1910–1912 bola nemocnica za pomoci župy rozšírená ďalšou výstavbou. Postavil sa chirurgický pavilón a pribudli aj ďalšie pavilóny pre interné, infekčné, detské, neuropsychiatrické, gynekologicko-pôrodnické oddelenie a neskôr aj nový chirurgický pavilón.

Súčasná fakultná nemocnica zaviedla a aplikuje systém manažérstva kvality podľa normy ISO EN 9001:2015.

Pracovisko klinickej biochémie bolo založené 15. 11. 1956 ako centrálné biochemické laboratórium, na čele s odborným lekárom prvé svojho druhu na Slovensku. Vzniklo zlúčením príručných laboratórií dislokovaných pri niektorých lôžkových oddeleniach (interné, detské, neurologické oddelenie). Kádrové obsadenie v počiatku pozostávalo z jedného lekára, štyroch zdravotníckych laborantov a jedného vysokoškolsky vzdelaného pracovníka. Boli zriadené aj detašované pracoviská v nemocniciach v Novom Meste nad Váhom a Trenčianskych Tepliciach.

Od 1969 oddelenie nesie súčasný názov Oddelenie klinickej biochémie, ktoré do roku 1966 plnilo aj funkciu výučbovej bázy pre vzdelávanie lekárov v Slovenskom ústave pre doškoľovanie lekárov (SÚDL). Na čele oddelenia od jeho vzniku až do úmrtia (†26. 11. 1976) stál primár MUDr. Zdenko C i c v á r e k.

V roku 1969 bolo pri pracovisku v Trenčíne zriadené Krajské kontrolné a referenčné laboratórium poverené vykonávaním externej kontroly kvality s pôsobnosťou pre Západoslovenský kraj (Ing. Elena R e m e n c o v á) za účelom zlepšenia medzilaboratórnej porovnateľnosti výsledkov.

Pre obdobie 1968–1973 bolo charakteristické využívanie manuálnych metód s vysokou spotrebou biologického materiálu, reagensov, často agresívnych, zdĺhavosťou analytických postupov a nízkou špecifickosťou metód. Prechodne sa využívala polarografická metóda stanovenia mukoproteínov séra a vyšetrenia mozgovomiechového moku. V rokoch 1968–1996 sa významne podieľala na činnosti oddelenia Ing. Bohumila B a j č í k o v á (†2021).

V roku 1968 vzniklo v Trenčíne skrínigové laboratórium pre vyhľadávanie vrodených metabolických porúch u novorodencov pre celé územie Slovenskej republiky. V období 1971–1995 bolo pracovisko poverené vykonávaním skrínigovú fenylketonúrie.

Obdobie rokov 1973–1990 sa vyznačovalo nástupom používania mikroanalytických metód stanovovania látok, enzýmov a parametrov vnútorného prostredia (elektrolyty, acidobázická rovnováha), diagnostiky lipidového metabolizmu, rozvojom elektroforetických metód, mechanizáciou pracovných postupov, čiastočnou automatizáciou analytických činností a rozvojom urgentnej diagnostiky (elektrolyty, ABR, enzýmy), vyšetovania lipidového metabolizmu, imunochemických metód (protilátky, hormóny, liečivá), začiatkom využívania výpočtovej techniky. V týchto rokoch postupne pribúdali prístroje, spektrofotometre Spekol, plameňový fotometer Zeiss, Spektromom, Kipp and Zonen s linkou, spektrofotometre Chiratik a programovateľný Chiratik MK s linkou, Spekol 11, 1973 prvý acidobázický analyzátor BMS 3, 1977 plameňový fotometer FLM 3, 1979 osmometer Knauer, acidobázický analyzátor AVL. V roku 1984 oddelenie získalo prvé dva selektívne sériové biochemické analyzátory Gilford SBA 300.

V roku 1987 Ing. Ivan V i k á r naprogramoval prvý informačný systém oddelenia prevádzkovaný na dvoch počítačoch SM 50/50. RNDr. B i t t o s pracovníkom oddelenia Ing. Milanom Č e s a l o m sa pokúsili o viacrozmernú analýzu dát.

V rokoch 1976–1989 viedol pracovisko primár MUDr. Fridrich V a r g a. Od roku 1990 do roku 2017 stál na čele pracoviska primár MUDr. Ján V i n d i š.

Po roku 1990 dochádza k mohutnému rozvoju automatizácie a informatizácie prevádzky oddelenia v súvislosti s narastajúcim počtom vyšetrení a k rozsiahlemu využívaniu imunoanalytických metód. V roku 1990 bolo OKB vybavené glukózovým analyzátorom ECA 20, 1991 prvým automatickým random access analyzátorom Alliance 570, 1993 imunochemickými analyzátormi ES 33, ES300, 1994 analyzátormi TDX, IMX a neskôr AxSYM. Postupne pribúdali analyzátory Olympus AU 600 (1997), Olympus AU 400, Cobas Mira Plus, analyzátory Architect biochemické aj imunochemické, imunochemický analyzátor Elecsys 2010, glukózové analyzátory ECA 2000, Super G, moderné elektroforetické zariadenie Sebia, prietokový cytometer FACS Canto, kvapalinový chromatograf, registračný spektrofotometer, mikro ELISA analyzátor Dynex DSX, imunochemické analyzátory Advia Centaur, Cobas e411, Immulite 2000, Dynablot Euroimun, Orgentec alegria, nefelometer, OC-Senzor FOBT, Bio-Rad D-10 HbA1c, močový analyzátor iQ200 ELITE, modernejšie acidobázické analyzátory postupne AVL, CHIRON, Cobas Roche, Siemens RAPIDLab, ABL FLEX Radiometer.

V roku 1994 bolo pracovisko vybavené moderným informačným systémom Istrolab.

Postupne sa zavádzajú nové vyšetrenia ako napríklad stanovenie širokej palety hormónov, vitamínov, liečiv, ukazovateľov ochorení srdca, kostného obratu, nádorového rastu, diabetu, zápalových a reumatických procesov, porúch imunitného systému, alergií, vyšetrenia na zistenie otráv a početné vyšetrenia mozgovomiechového moku (aj cytologické) so zameraním na diagnostiku roztrúsenej mozgovomiechovej sklerózy. O rozvoj toxikológie a farmakobiochémie sa zaslúžila najmä PharmDr. Mária Schlesingerová (†2007). Pracovisko OKB sa začalo podieľať na vyšetrovaní stavu vývoja plodu pred narodením v spolupráci s oddelením lekárskej genetiky. V roku 2012 bol zriadený POCT úsek pod vedením Ing. Jany Strigáčovej, PhD, spočiatku rozmiestnením glukózových analyzátorov Accu-Chek Inform II, na jednotlivé oddelenia s prepojením na laboratórny informačný systém oddelenia. Rýchle odovzdávanie informácie lekárom sa dosahuje vzájomným prepojením laboratórneho informačného systému s nemocničným informačným systémom a tiež s ambulantnými informačnými systémami prostredníctvom internetu.

V marci 2005 sa po zriadení Národnej transfúznej služby k Oddeleniu klinickej biochémie pripojila časť Hematologicko-transfuziologického oddelenia s krvnou bankou, čím vzniklo spoločné Oddelenie klinickej biochémie a hematológie (OKBaH). V roku 2012 bolo k OKBaH pričlenené pracovisko klinickej mikrobiológie a v roku 2013 zriadené pracovisko laboratórnej imunológie a alergiológie (OKBHM).

Uvedené obdobie sa vyznačuje aj integráciou analytických systémov do jedného celku a zavedením využívania čiarového kódu na identifikáciu vzoriek biologických materiálov a tiež elektronickej žiadanky z oddelení a ambulancií fakultnej nemocnice. Oddelenie počas celej svojej histórie participovalo na viacerých výskumných úlohách v rámci spolupráce s ostatnými oddeleniami.

#### Primári oddelení

- MUDr. Zdenko C i c v á r e k, 1956–1976
- MUDr. Fridrich V a r g a, 1977–1989
- MUDr. Ján V i n d i š, 1990 – 2017
- MVDr. Jana R e p i š č á k o v á, 2017–2018
- Mgr. Zuzana G a l l o v á, 2019–doteraz

#### Vedúce laborantky

- Margita Š t u r d í k o v á
- Janka S t r á p k o v á
- Bernadetta Z o v č á k o v á
- Jana G a v e n d o v á
- Mariana B u r i a n o v á

#### Pracovníci pracoviska KB v súčasnosti:

- Lekári (t. č. pracovisko klinickej biochémie je bez lekára)
- Pracovníci s vysokoškolským vzdelaním – laboratórni diagnostici
- Laboranti s vysokoškolským vzdelaním
- Laboranti s vyšším odborným vzdelaním
- Laboranti
- Dokumentačný pracovník
- Sanitári

#### Súčasnosť pracoviska klinickej biochémie

- vykonáva biochemické vyšetrenia bežné, špeciálne, toxikologické a molekulárnobiologické
- pre nemocničné a ambulantné zložky
- pre región mesta Trenčín, okres, kraj a podľa požiadaviek aj pre iné kraje
- poskytuje konzultačné a ambulantné služby (vyšetrenie oGTT)
- je zaradené do systému externej kontroly kvality vo väčšine stanovovaných parametrov
- podieľa sa na pregraduálnej a postgraduálnej výchove SZP, VŠP a lekárov
- je bázou pre praktickú výučbu žiakov Strednej zdravotníckej školy a od roku 2005 aj študentov Trenčianskej univerzity Alexandra Dubčeka.

#### Podakovanie

*Ďakujem mojej manželke za láskavé spracovanie fotodokumentácie.*

#### LITERATÚRA

1. Jaroš, F. (2012): *Z dejín trenčianskeho zdravotníctva*, Martin, Osveta, 2012, 1. vyd., 157s., ISBN 978-80-8063-374-5. Kap. Oddelenie klinickej biochémie, s. 79.
2. Maniš, V. (1979): *História nemocnice v Trenčíne – 130 rokov nemocnice v Trenčíne*, OÚNZ Trenčín, 1979, 112s. Kap. Oddelenie klinickej biochémie, s. 84–85.



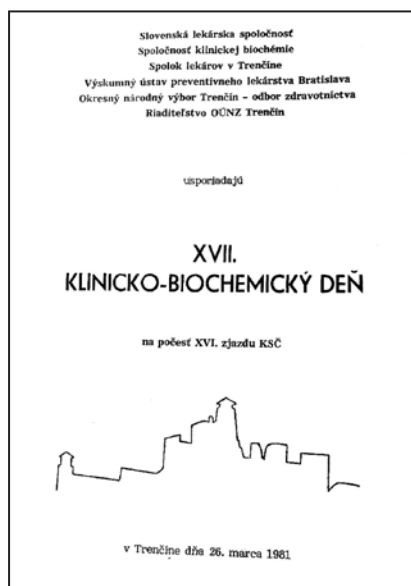
**Obr. 1. Vstup do Fakultnej nemocnice v Trenčíne**



**Obr. č. 2. primár MUDr. Zdenko Cícvárek  
1921–1976**



**Obr. č. 3. 1980, Krajský seminár Trenčín.  
Zľava Ing. Milan Česal, primár MUDr. Fridrich Varga,  
primár MUDr. Vojtech Okša, CSc., krajský odborník**



**Obr. č. 4. Pozvánka na XVII. Klinicko-biochemický deň**



**Obr. č. 5. 1981 Plénum XVII. Klinicko-biochemického dňa.  
Zľava:  
primár MUDr. Emil Bielik, CSc., primár MUDr. Anton Neuwirth, CSc.,  
primár MUDr. Vojtech Okša, CSc., primárka MUDr. Ruth Kratinová**



**Obr. č. 6. 1981 XVII. Klinicko-biochemický deň, predsedníctvo.  
Zľava: doc. MUDr. Ján Červenka CSc., primár MUDr. Romulus Müller,  
doc. Primár MUDr. Šimon Omaník, CSc., riaditeľ MUDr. Ján Kališ,  
primár MUDr. Fridrich Varga**



**Obr. 7. 1977, Laborantky Mária Chovancová a Daniela Arpášová pri titračnom stanovení vápnika**



**Obr. 8. 1977, Laborantka Anna Samáková pri fotometrii Spekol s logaritmickým prevodníkom**



**Obr. 9. 1977, Laborantky Beáta Mitánková a Oľga Špániková pri acidobázickom analyzátore BMS 3**



**Obr. 10. Zľava: primár MUDr. Fridrich Varga, Ing. Milan Česal a MUDr. Ján Vindiš**



**Obr. č. 11 1981, Ing. Bohumila Bajčíková v strede a laborantky zľava Oľga Juráková, Beáta Mitánková, Anna Kaščáková, Oľga Špániková a Libertína Noseková**



**Obr. 12 1982, Laborantka Anna Uhrinová pracuje na fotometrickej linke Chiratic 49**



*Obr. 13. 1982, Laborantka Anna Fabová pri práci s fotometrickou linkou Chiratic 49*



*Obr. 14. 1982, Laborantka Beáta Mitánková pri fotometri Clinicon 4010*



*Obr. 15. 1986, Ing. Elena Remencová programuje fotometrickú linku Chiratic 59 MK*



*Obr. 16. 1988, Laborantka Zuzana Šuranová pri zadávaní výsledkov do počítača SM 50/50*



*Obr. 17. 1989, Laborantka Anna Samáková stanovuje aktivity enzýmov na analyzátoře Gilford SBA 300*



*Obr. 18. Laborantka Veronika Halgošová pri práci na analyzátořoch Abbott c800 a i2000*



**Obr. 19. Laborantka Marta Kováčová  
pri analyzátoře Olympus AU 400**



**Obr. 20. Laborant Mgr. Radovan Palček pri spojených  
analyzátořoch Abbott c16000 a i2000**



**Obr. 21. Laborantky Alena Jamborová a Blažena Fabová  
pri zadávaní požiadaviek do informačného systému**



**Obr. 22. Analyzátoř Roche Cobas Mira Plus**



Laboratórna Diagnostika, XXVIII, 1, 2023: 24–32

## HISTÓRIA VZNIKU ODDELENIA KLINICKÝCH LABORATÓRIÍ V NEMOCNICI MINISTERSTVA OBRANY SR THE HISTORY OF THE ESTABLISHMENT OF THE DEPARTMENT OF CLINICAL LABORATORIES IN THE MILITARY HOSPITAL OF THE MINISTRY OF DEFENSE

**Pavel Blažíček**

Ústav chémie, klinickej biochémie a laboratórnej medicíny LF SZU, Bratislava

blazicekp@seznam.cz

### SÚHRN

Po vzniku Vojenskej nemocnice v Bratislave bolo v pivnici nemocnice vytvorené „Laboratórium“, ktoré oficiálne riadil primár interného oddelenia. V roku 1969 do Vojenskej nemocnice nastúpil na post náčelníka-primára interného oddelenia plk. MUDr. Ján Langoš CSc., ktorý si dal za úlohu zlepšiť diagnostiku a liečbu hypertenzie. K tomu potreboval zlepšiť funkciu laboratória a vytvoriť nové výskumné laboratórium na internom oddelení, kde by bolo možné vykonávať aj špeciálne vyšetrenia. V roku 1992 pre komplexné potreby Nemocnice Ministerstva obrany SR, a.s. vzniklo pracovisko Oddelenie klinických laboratórií. Oddelenie pozostávalo z klinickej biochémie, hematológie a mikrobiológie, na Slovensku bolo hodnotené spolu s Nemocnicou Ministerstva obrany ako jedno z najlepších a iniciovalo vznik klinických laboratórií aj v iných nemocniciach. Napriek výrazným úspechom Nemocnice Ministerstva obrany sa našlo niekoľko špekulantov a Nemocnicu Ministerstva obrany zlikvidovalo spojením s Nemocnicou s poliklinikou Ministerstva vnútra SR.

**Kľúčové slová:** klinická biochémia; oddelenie klinických laboratórií; výskumné laboratórium; spolupráca s klinickými pracoviskami

### ABSTRACT

After the establishment of the Military Hospital in Bratislava, a “Laboratory” was created in the basement of the hospital, which was officially managed by the head of the internal department. In 1969, colonel MUDr. Ján Langoš CSc., joined the Military Hospital as the head-primary of the internal department, who set himself the task of improving the diagnosis and treatment of hypertension. For this, he needed to improve the function of the laboratory and create a new research laboratory in the internal department, where special examinations could also be performed. In 1992, the Department of Clinical Laboratories was created for the complex needs of the Ministry of Defence Hospital. The department consisting of clinical biochemistry, hematology and microbiology was evaluated in Slovakia together with the Ministry of Defence Hospital as one of the best, and clinical laboratory departments began to be established in other hospitals as well. Despite the significant successes of the Ministry of Defence Hospital, several speculators were found and the the Ministry of Defence Hospital was liquidated by merging with the Hospital with Polyclinic of the Ministry of the Interior of the Slovak Republic.





**Obr. 1. Spolupráca Oddelenia klinickej biochémie Vojenskej nemocnice v Bratislave s internistami začala v roku 1969.**  
*Na fotke zľava: a) plk. MUDr. Ján Langoš, CSc., plk. Ing. Pavol Blažíček, CSc.; b) plk. MUDr. Pavol Vencel, plk. Ing. Pavol Blažíček*

**Key words: clinical biochemistry; department of clinical laboratories; research laboratory; cooperation with clinical workplace**

\*\*\*

### **História biochemického laboratória na internom oddelení vo Vojenskej nemocnici Bratislava a vznik Oddelenia klinických laboratórií Nemocnice Ministerstva obrany SR**

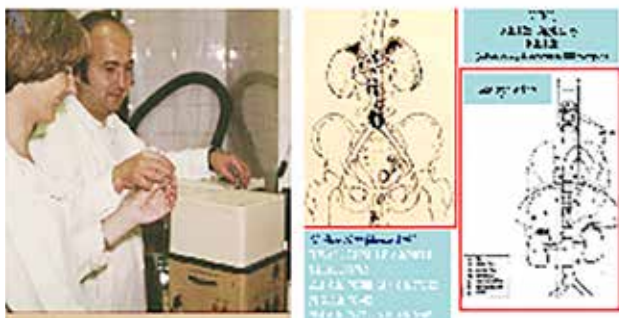
Náčelník-primár interného oddelenia plk. MUDr. Ján Langoš, CSc., si dal za úlohu zlepšiť diagnostiku a liečbu pacientov s hypertenziou. K tomu potreboval zlepšiť funkciu laboratória a vytvoriť nové výskumné laboratórium na internom oddelení, kde by bolo možné vykonávať aj niektoré ďalšie špeciálne vyšetrenia. Takými to boli najmä stanovenia renínu, aldosterónu, separovaného klírensu využitím inulínu a para-aminohippurovej kyseliny, kreatinínu, proteinúrie. Veľmi významnou sa stala najmä diagnostika funkčnosti a porúch sympatoadrenomedulárneho systému pomocou stanovenia katecholamínov a metabolitov v krvi. Tieto novozavedené analýzy sa neskôr využívali aj pri výskume stresu v rámci projektu Interkosmos. Úzka spolupráca s Ústavom experimentálnej endokrinológie Slovenskej akadémie vied (ÚEE SAV) a Farmakologickým ústavom Slovenskej akadémie vied (FÚ SAV) bola podmienkou úspešnej realizácie tohto projektu.

Zo spolupracovníkov z ÚEE SAV treba spomenúť najmä Dr. Macha, Dr. Kvetňanského, Dr. Németha, Ing. Kolenu, Dr. Vigaša, Dr. Palkoviča, Ing. Tordu, Dr. Murgaša, Dr. Čulmana, Ing. Knoppa, Dr. Košku, Ing. E. Šebokovú, Dr. Novotného a Dr. Ujházyho. Ďalšími spolupracujúcimi pracovníkmi boli Endokrinologický ústav v Ľubochni (Dr. Kreze),

interné kliniky (Dr. Hnilica, Dr. Podoba, Dr. Balážoviech, Dr. Kadlec), urologická klinika (Dr. Zvara, Dr. Breza), interná klinika v Košiciach (Dr. Mydlík), Slovenská zdravotnícka univerzita v Bratislave (Dr. Trnovec, Ing. Kudláčková, Dr. K. Šebeková). Spolupráca so SAV bola nutná, napr. renín po vyextrahovaní z krvi pacienta sa inkuboval s angiotenzinogénom v skúmavke a vzniknutý angiotenzín II sa meral na nefrektomovaných potkanoch na FÚ SAV (Dr. Novotný). V Československu vtedy renín, angiotenzín a aldosterón merali len v Prahe (Dr. Horák a Dr. Kuchel). Niektoré špeciálne vyšetrenia sa merali na ÚEE SAV (dopamín-beta-hydroxyláza, katecholamín-o-metyltransferáza a fenyletanol-N-metyltransferáza), ktoré sa však stanovovali len v rámci výskumu Interkosmos. V rámci klinického vyšetrenia bolo snahou efektívne využitie laboratórneho vyšetrenia a zabezpečenie adekvátneho využitia potrebných analýz. Bolo potrebné upozorňovať na zbytočné testy u niektorých pacientov uvedomujúc si, že konečné klinické rozhodnutie závisí vždy od klinika, ktorý však musí mať istotu, že spolupracujúci laboratórny diagnostik mu dáva spoľahlivé výsledky analýz. Niektoré analýzy, ktoré sa stali obsolentnými, sme nahradili modernejšími analýzami. Dynamické zmeny v laboratórnej diagnostike sú aj podkladom pre celoživotné vzdelávanie v odbore klinická biochémia a laboratórna medicína. Na vybudovaní výskumného laboratória mal veľkú zásluhu aj náčelník nemocnice plk. MUDr. Andrej Burdiga, ktorý dal súhlasné stanovisko k realizácii takéhoto projektu a zabezpečil naň aj finančné prostriedky. Úspešnú spoluprácu s ÚEE SAV zabezpečil plk. MUDr. Pavol Vencel.

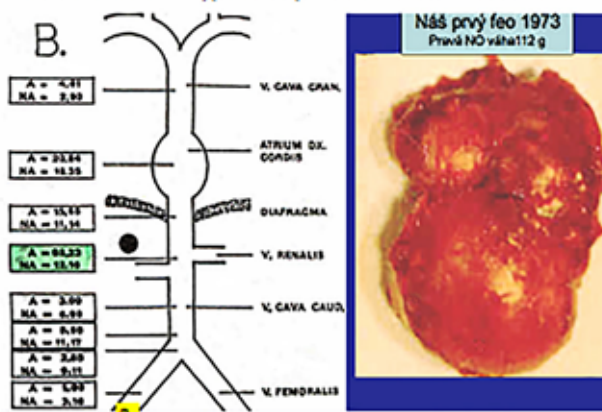
Pre prácu vo výskumnom laboratóriu však nepostačovali prístroje bežne používané v nemocničných laboratóriách (1970) a museli sme nakúpiť ďalšie prístroje: rotačná vákuová odparka, lyofilizátor, spektrofluorime-

## Meranie katecholamínov v krvi na Aminco-Bowman SPF a naše výsledky



Obr. 2. Analyza katecholamínov pomocou Aminco-Bowman spektrofluorimetra

**Lokalizácia feochromocytómu**  
Katóder sa zaviedol cez v.femoralis až do subklávie a postupne sa vyťahoval a každých 10 cm sa nabralo 2 ml krvi. Krv sa ihneď dala do termosky s ľadom. V krvi sa merali katecholamíny pomocou Spektrofluorimetra Aminco Bowman.



Obr. 3. Feochromocytóm lokalizovaný pomocou etážového odberu krvi

ter, HPLC systém s elektrochemickým detektorom, elektroforéza PAGE v trubičkách tzv. disková elektroforéza na vyšetrenie močových proteínov a neskôr prístroj prietoková cytometria moču Sysmex na vyšetrenie glomerulárnej a nonglomerulárnej hematúrie. Novo zavedené vyšetrenia sa na Slovensku v klinickej biochémií používali u nás ako v prvom laboratóriu. Zažili sme pri tom často aj úsmevné príhody, napríklad sme potrebovali kúpiť Spektrofluorimeter Aminco-Bowman na vyšetrenie katecholamínov a pán hlavný odborník Ministerstva obrany pre biochémiu doc. MUDr. Arient nám napísal, že „na tieto vyšetrenia Vám stačí Spekol, maximálne Vitatron“. Primár Dr. Lánogoš vtedy napísal na Ministerstvo obrany „Pán minister my by sme potrebovali topánky, ale poltopánky a nie ponúkané baganče“ náčelník zdravotníckeho odboru Ministerstva obrany generál Lux to pochopil a povolil kúpiť spektrofluorimeter Aminco-Bowman. Za rok sa pomocou tohto prístroja podarilo štandardizovať stanovenie katecholamínov v krvi. Diagnostikovali sa ďalší pacienti s feochromocytómom, u ktorých bol nádor aj úspešne operačne odstránený.

Nakoľko bola takáto laboratórna diagnostika zavedená ako v prvom laboratóriu v bývalom Československu, hlavný odborník Ministerstva obrany pre biochémiu doc. MUDr. Arient to ťažko znášal a výskumné laboratórium vždy kritizoval „Vždyť to nemá ani ÚVN Praha“. O sedem rokov neskôr výskumné laboratórium zlúčili s centrálnym laboratóriom Vojenskej nemocnice a vzniklo Oddelenie klinických laboratórií (OKL). V roku 1992 sa z Vojenskej nemocnice stala Nemocnica Ministerstva obrany SR a keďže primárom, teda náčelníkom oddelenia sa mohol stať atestovaný

klinický biochemik a zároveň vojak z povolania, náčelníkom-primárom bol určený, Ing. Blážíček, CSc., v hodnosti pplk.

Na oddelení ďalej pracovali atestovaná hematologička MUDr. Kadlecová, a atestovaný klinický biochemik MUDr. Sangret, atestovaná mikrobiologička Dr. Kopicová a atestované biochemičky Ing. Stachová, Ing. Koptová, Ing. Syrová a vynikajúce laborantky s pomaturitným špecializačným štúdiom Hajdúchová, Károlyová, Hlavenová, Kolpaská, Šemeláková, Wenclová, Šišoláková, Petrová, Tomanová, Kulcsarová, Drábová, Košická, odberové sestry Kružlíková a Mozolová.

Vznik OKL bol výhodný najmä pre pacientov: ráno sa na OKL odobrala pacientovi krv, internista pacienta vyšetril, urobil EKG a popoludní mal pacient kompletný predoperačný výsledok HBsAG, HCV, HIV, krvný obraz, krvnú skupinu, RPR a TPHA. Mal tak ukončené kompletné predoperačné vyšetrenie a na druhý deň ráno pred operáciou mal pacient vďaka veľmi dobrej spolupráci s Hematologickou klinikou zaistenú aj konzervu krvi. V tom čase laboratórium už úspešne a intenzívne spolupracovalo s nasledujúcimi inštitúciami: s ÚEE SAV, s Ústrednou vojenskou nemocnicou (ÚVN) v Prahe, s Inštitútom klinickej a experimentálnej medicíny (IKEM) v Prahe, s vojenskými nemocnicami (VN) v Plzni, VN v Českých Budejoviciach, VN v Olomouci, VN v Brne, VN v Ružomberku, VN v Košiciach, ďalej s FÚ SAV, Slovenskou zdravotníckou univerzitou v Bratislave, s National Institute of Health (NIH) v Bethesde v USA.



Obr. 4. plk. Ing. Pavel Blažíček, CSc., náčelník OKL od roku 1992



Obr. 6. Úspešná spolupráca s National Institute of Health, Bethesda, USA

S NIH bola nadviazaná spolupráca najmä s kolegami nositeľmi Nobelovej ceny Dr. J. Axelrod a, s Dr. Kopinom, Dr. Goldsteinom, Dr. Eisenhoferom a Dr. Pacakom. Aj vzhľadom na takúto úzku spoluprácu s viacerými inštitúciami boli možnosti úspešne vyliečiť pacientov. Okrem klinických vyšetrení pacientov sa OKL podieľalo aj pri výskume kozmu v rámci projektu Interkosmos.

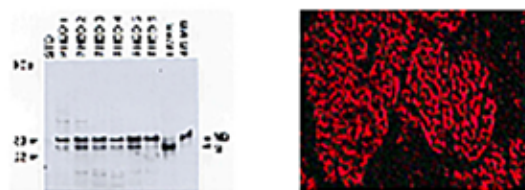
Vďaka dosiahnutým úspešným výsledkom sa laboratórium mohlo ďalej prístrojovo rozvíjať. Zakúpili sme chladenú ultracentrifúgu, nový lyofilizátor, zariadenie na papierovú dvojrozmernú chromatografiu, rotačnú vákuovú odparku, HPLC systém „Laboratórny prístroje“ (1973), ktorý sa dal napojiť cez kremennú prietokovú kvetu do spektrofotometra Aminco-Bowman. Spoločnosť Technopol pomohla zakúpiť HPLC Waters s elektrochemickým detektorom ECD 460, neskôr aj detektor Coulochem 3, čím nám umožnili stanovovať hladiny katecholamínov a ich metabolitov v nadobličkách potkanov z kozmickej lode v rámci



Obr. 5. Niektorí členovia OKL pri práci a pri gatúácii vrchnej laborantke k narodeninám

## Spolupráca s NIH Bethesda USA

Catechol-O-methyl transferase Immunohistochemistry (COMT)



Immunohistochemistry

Downregulation of metastasis suppressor genes in malignant pheochromocytoma. Ohta S, Lal BV, Pang AL, Brouwers FM, Chan WY, Eisenhofer G, de Rijger R, Ksinantova L, Breza J, Blazicek P, Kvetnansky R, Wesley RA, Pacak K. *Int J Cancer*. 2005 Mar 10;114(1):139-43.

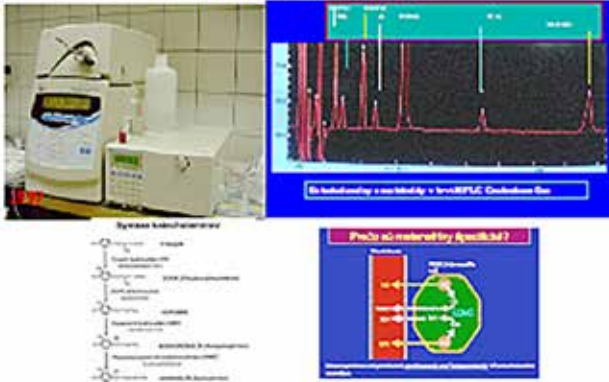
**Feochromocytóm prof. Breza vybral a bol uložený na suchý ľad a odoslaný lietadlom do Washingtonu kde bol analyzovaný**

Obr. 7. Časť feochromocytómu bola spracovaná na OKL a časť bola v suchom ľade odoslaná do NIH, Bethesda, USA, kde bola vykonaná imunohistochemia nádoru

projektu Interkosmos. Tieto metodiky sme plne využívali aj v diagnostike pacientov s hypertenziou, hlavne na stanovenie katecholamínov a nefrínov v krvi.

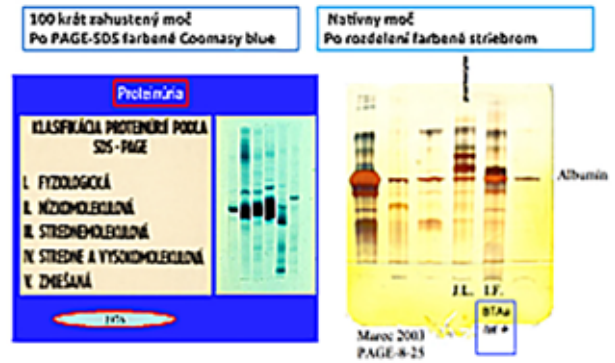
Na oddelení sme zaviedli už v roku 1976 vyšetrenie proteinúrie pomocou elektroforézy PAGE-SDS (diskovej) a neskôr v rámci výskumu sme merali proteinúriu aj pomocou dvojrozmernej PAGE-SDS elektroforézy. Dovtedy sa proteinúrie analyzovali po zahustení moču pomocou elektroforézy na agaróze a farbením s Coomassie brilliant blue podľa Englišovej metódy. Pomocou PAGE elektroforézy a farbením so striebrom nebolo treba moč zahusťovať. Meranie tak bolo mnohonásobne citlivejšie a pomo-

### Katecholamíny a ich metabolity v krvi pomocou analyzátoru Coulochem 3



Obr. 8. Analýza katecholamínov a metabolitov v krvi metódou HPLC s elektrochemickým detektorom Coulochem III

### Klasifikácia proteinúrií od r. 1976



Obr. 9. Metódy stanovenia proteínov v moči

Vľavo: proteinúria pomocou diskovej SDS PAGE elektroforézy, moč bol zahustený 100 ×, farbenie pomocou Coomassie Blue; vpravo: výsledok analýzy natívneho moču pomocou PAGE 8-25, farbenie striebrom

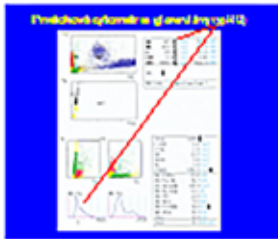
### Fázový kontrast sme nahradili prietokovou cytometriou



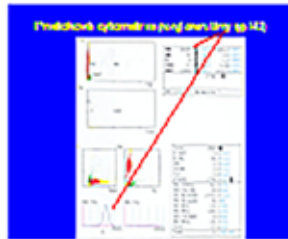
### Prietokový cytometer



### Výsledková cytometria s fázovým kontrastom



### Výsledková cytometria s fázovým kontrastom



Obr. 10. Práca s fázovým kontrastom (horný obrázok vľavo) a na prietokovom cytometri (horný obrázok vpravo).

V dolnej časti obrázku: rozlíšenie glomerulárnej a non-glomerulárnej hematúrie prietokovou cytometriou

cou denzitometra aj kvantifikovateľné, bolo možné presne zmerať zloženie bielkovín v moči a presne posúdiť aj typ proteinúrie.

V OKL sa ako v prvom laboratóriu na Slovensku zaviedlo vyšetrenie moču prietokovou cytometriou pomocou Sysmex UF 50 a neskôr UF 1000 a bolo možné zistiť o aké erythrocyty v moči sa jedná, či o glomerulárne, alebo nonglomerulárne. Nahradili sme tak dovtedy používané meranie pomocou fázového kontrastu.

Klinická biochémia musí zaistiť potrebné a rýchle informácie pre lekárov prvého kontaktu, aby bola dosiahnutá rýchla informácia k základnému diagnostickému rozhodovaniu. V roku 1970, keď sme začínali, interná kontrola kvality, externá kontrola kvality, presnosť, pravdivosť, ne-

istota merania boli len snom. Kontrolný materiál si bolo potrebné v laboratóriu vyrobiť vo vlastnej réžii. Na konci meraní sa nepotrebované sérum zamiešalo (zistila sa neprítomnosť HbsAg), prefiltrovalo cez 0,22 µm milipórový filter a potom precízne rozpipetovalo po 5 ml do injekčných ampuliek, vzniknuté alikvoty sa zlyofilizovali, zatavili a zamrazili. Zmerali sme presné hodnoty jednotlivých parametrov. Ampulky boli uložené v mrazničke pri  $-20^{\circ}\text{C}$ . Laborantka vybrala každý deň jednu ampulku, rozpustila v 5 ml redestilovanej vody a analyzovala ju ako bežnú vzorku pacienta, a výsledok vlastne slúžil ako interná kontrola kvality laboratória. Vtedy (1970) neboli kity, všetko sa muselo navažovať a roztoky zarábať. Vtedajšie metódy stanovenia glykémie (o-toluidín, kyselina octová), cholesterolu (kyselina sírová, anhydrid kyseliny octovej), meranie enzýmov endpoint metódou (60 minútová inkubačná doba), vápnika titráciou, minerálie pomocou plamenného fotometra Zeis III boli pracné a zdĺhavé.

Po elektroforéze bielkovín sme jednotlivé frakcie po následnom farbení z papiera vystrihovali. Intenzita farby úmerná koncentrácii bielkovín sa po extrakcii do metanolu stanovila spektrofotometricky. Vedeli sme stanovovať katecholamíny a ich metabolity, serotonin a jeho metabolity a to najprv pomocou dvojrozsmernej papierovej chromatografie, neskôr spektrofluorimetricky na prístroji SPF Aminco-Bowman a nakoniec pomocou HPLC s elektrochemickou detekciou a coulochemickou detekciou.

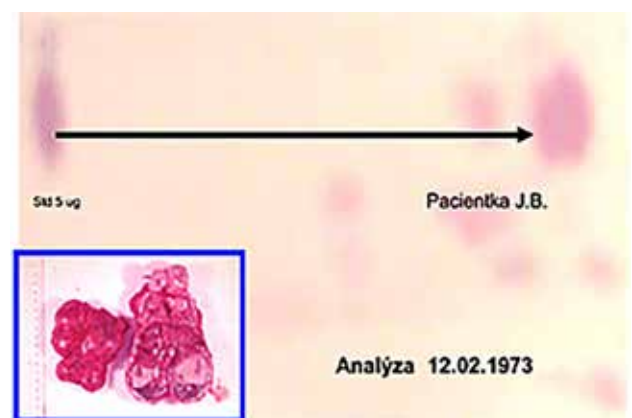
Keďže laboratórium vykonávalo v rámci Československa presnú HPLC diagnostiku feochromocytómu, alebo karcinoidu, bol to dôvod, že do laboratória boli posielaní pacienti z celého Československa. Možno spomenúť pa-



Obr. 11. Prístrojové vybavenie OKL v roku 1969

cientov, napr. od prof. Rybku zo Zlína, prof. Krezeho z Ľubochne, plk. Bestvinu z UVN v Ružomberku, prof. Ďuračkovej a prof. Čárskeho z Lekárskej fakulty UK v Bratislave, z ÚVN v Prahe, od Dr. Vosmíka z IKEM Praha. Vďaka takejto spolupráci sme dokázali za 35 rokov existencie OKL diagnostikovať 126 pacientov s feochromocytómom a MEN2A syndrómom a 7 pacientov s karcinoidom. Vynikajúcu spoluprácu možno demonštrovať aj na jednom z mnohých klinických prípadov. Dcére našej pacientky s MEN2A syndrómom, Rachel S., sme v laboratóriu namerali vysoký metanefrín, ale tumor nebolo možné na Slovensku lokalizovať, požiadali sme o pomoc profesora Pacáka v NIH Bethesda. V NIH diagnózu potvrdili a po lokalizovaní tumoru feochromocytóm aj odstránili, bez nároku na úhradu poskytnutej zdravotnej starostlivosti. Tento fakt tak môže dokumentovať vysokú úroveň spolupráce s NIH Bethesda a hlavne s prof. Pacákom, ktorý bol Slovenskou spoločnosťou klinickej biochémie prijatý za jej čestného člena SSKB.

Vedeli sme posúdiť, či v ischemickej obličke vzniká veľa renínu a vedeli sme posúdiť aj funkciu jednotlivých obličiek pomocou separovaného klirensu. Intravenózne sme podávali PAH (kyselinu paraaminohippurovú) a inulín. V jednotlivých vzorkách moču, ktorý sme získali z katétrov zavedených do jednotlivých uréterov, sme merali klirens kreatinínu, inulínu a PAH a vedeli sme presne posúdiť funkciu jednotlivých obličiek u pacientov, ktorí mali ťažkú



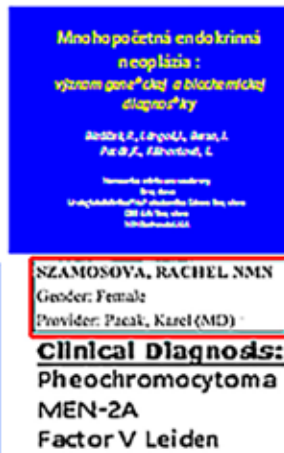
Obr. 12. Hlavný metabolit katecholamínov, kyselina vanylmandľová (VMK) pomocou dvojrozmernej papierovej chromatografie.

Vľavo: štandard 5 µg VMK vpravo koncentrácia u pacientky J. B.

hypertenziu a vysokú hladinu renínu pri ischemickej obličke. V laboratóriu bola zavedená aj metodika odberu krvi z jednotlivých obličkových žíl. Ak bol rozdiel v hladinách renínu veľmi veľký, odporučila sa nefrektómia. Pacientovi sa po odstránení ischemickej obličky „normalizoval“ tlak krvi.

Záujem o spoluprácu s OKL bol veľký, od roku 1997 malo laboratórium certifikát GLP (Good Laboratory Practice) a od roku 2000 aj certifikát podľa normy STN EN ISO 15189 pre Medicínske laboratóriá. Laboratórium bolo výborne vybavené a vyšetřovali sme aj mnohé špeciálne

## Neuroendokrinné nádory gastrointestinálneho traktu z pohľadu klinickej biochemiká



Obr. 13. Dokumentácia spolupráce s prof. Pacákom. Stanovenie zvýšených hladín nefrínov na OKL, operácia pacientky v NIH, Bethesda, USA. Výsledok: feochromocytóm, syndróm MEN-2A, mutácia Faktor V Leiden

parametre, napr. LP-PLA2, katecholamíny, metanefríny, homocysteín, adiponektín, MCP-1, HSP60, leptín, grelín, TAS, lipofuscín, serotonín, 5-HIOK, atď. (viď publikácie).

O úspešnej spolupráci s klinickými pracoviskami svedčí aj množstvo publikácií v domácich aj zahraničných časopisoch. Spolupráca je veľmi dôležitá, lebo interná medicína bez biochémie by bola oklieštená a to i dnes, keď si niektorí lekári ešte stále myslia, že pre diagnostiku postačujú iba zobrazovacie metódy, napr. echokardiografia, Holterovo monitorovanie tlaku či EKG, vyšetrenie CT a pod. Nie je to celkom tak, lebo diagnostika napr. MEN2 syndrómu bez biochemického a genetického vyšetrenia je neúplná a často nemožná. Svedčí o tom aj prípad pacientky Anny I., ktorej na prestížnej klinike na Floride diagnostikovali infarkt myokardu (IM), ale až o rok nato sme na OKL pri druhom IM dokázali, že bol spôsobený feochromocytómom, ktorý prof. B r e z a odstránil a pacientka žila ešte 23 rokov. Do ordinovania jednotlivých vyšetrení však treba zaviesť logiku a nespoliehať sa len na výsledky vyšetrení.

## ZÁVER

Dôležitá je potreba edukácie všetkých laboratórných zdravotníckych pracovníkov a potreba intenzívnej spolupráce s klinickými pracovníkmi. Spolupráca s klinikmi umožní zlepšiť využívanie služieb laboratória, eliminovať

zbytočné výdavky na laboratórnú diagnostiku. Tu je práve dôležitá spätná väzba od spolupracujúcich klinikov. Väčšina laboratórných skúšok sa vykonáva vo vysoko automatizovaných „core“ laboratóriách, kde sú k dispozícii moderné technické prostriedky, ktoré sú použité na určenie klinickej účinnosti, efektívnosti, alebo účinnosti uskutočňovaných preventívnych opatrení, ako aj na zabezpečenie ekonomického hodnotenia celého procesu. Laboratórni profesionáli musia mať zodpovedajúce vedomosti, aby mohli pomôcť zlepšiť kvalitu a účinnosť zdravotnej starostlivosti a organizovaním kontrolných procesov v zdravotníctve zlepšiť využívanie testov vo vzťahu ku klinickým procesom. Klinická biochémia musí zaistiť potrebné a rýchle informácie pre lekárov prvého kontaktu, aby bola dosiahnutá rýchla informácia k základnému diagnostickému rozhodovaniu a určeni, ako sa o pacienta postarať. Biochemické testy sú často potrebné na špecifikáciu tumoru podľa vylučovaného hormónu, alebo jeho metabolického produktu, alebo kontrolu jeho aktivity a liečebného efektu po operácii ako aj doživotný skrining. Biochemické skriningové testy pomáhajú v prevencii, diagnostike ako aj sledovaní liečebného procesu mnohých nádorových ochorení. OKL sa vždy podieľalo na riešení otázok diagnostiky a terapie v úzkej spolupráci s klinikmi.

## Poďakovanie

Dovoľujem si poďakovať všetkým mojim spolupracovníkom a hlavne perfektným laborantkám, bez ktorých by sa nepodarilo vyšetrenia úspešne realizovať.

Zároveň patrí poďakovanie všetkým kolegom a pracovníkmi, s ktorými malo OKL počas celej jeho činnosti úspešnú a zmysluplnú spoluprácu.

## LITERATÚRA

1. Lángos, J. et al. (1972): Stanovenie plazmatickej renínovej aktivity mikrometódou v periférnej krvi u človeka. Bratisl. Lek. Listy, 1972 Apr; 57(4): 436–41. Slovak. PMID: 4336237.
2. Lángos, J. et al. (1972): Význam akcesórnych renálnych artérií v patogenéze systémovej hypertenzie. Bratisl. Lek. Listy, 1972, 58(2):188–98. Slovak. PMID: 5085709.
3. Lángos, J. et al. (1974): Význam stanovenia plazmatickej renínovej aktivity v klinickej praxi. Vnitr. Lek., 1974 Nov; 20(11): 1085–96. Slovak. PMID: 4439662.

4. Langos, J. et al. (1975): Importance of excretory urography in the diagnosis of the hypertensive syndrome. *Voen. Med. Zh.*, 1975 Feb; (2):79–82. Russian. PMID: 1136233.
5. Lángos, J. et al. (1976): Vzťah medzi aktiváciou sympatického nervového systému a renínu u hypertonikov. *Bratisl. Lek. Listy*, 1976, 66(3): 306–12. Czech. PMID: 1009458.
6. Blažíček, P. et al. (1977): Rýchla a citlivá ionomeničová metóda na stanovenie vanilmandľovej kyseliny v moči u ľudí. *Biochem. Clin. Bohemoslov.*, 1977, 6(3): 137–145.
7. Blazicek, P. et al. (1980): Catecholamines and their synthesizing enzymes in rats exposed to prolonged hypokinesia. In *Catecholamines and Stress*. Eds. E. Usdin, R. Kvetnansky, Elsevier North Holland, New York, pp. 349–354. 1980.
8. Kvetnanský, R. et al. (1980): Sympathetic-adrenomedullary activity in rats after space flight on the biosatellites Cosmos. *Physiologist*, 1980 Dec; 23(Suppl 6): S121–2. PMID: 6113613.
9. Mydlík M. et al. (1980): Plasma renin activity and plasma aldosterone in acute renal failure. *Int. Urol. Nephrol.*, 1980 12(1): 83–90. doi: 10.1007/BF02085386.
10. Kvetnansky, R. et al. (1981): Activity of the sympathetic-adrenomedullary system in rats after space flight on the Cosmos biosatellites. *Adv. Space Res.*, 1981; 1(14): 187–92. doi: 10.1016/0273-1177(81)90261-1. PMID: 11541709.
11. Kvetnanský, R. et al. (1982): Medullary layer activity of the rat adrenals after a flight on the Kosmos-1129 biosatellite. *Kosm. Biol. Aviakosm. Med.*, 1982, Jul–Aug; 16(4): 44–7. Russian.
12. Kvetnansky, R. et al. (1982): Sympatheticadrenomedullary activity in rats affter space Flight on the biosatelit. Kosmos. *The Physiologist*. 23, Suppl., S 121–122, 1982.
13. Blažíček, P., et al. (1986): Katecholamíny v diagnostike tumorov neurálnej platničky. *Biochem. Clin. Bohemoslov.*, 1986, 15: 105–117.
14. Kvetnansky, R. et al. (1991): Activity of the sympathoadrenal system in cosmonauts during 25-day space flight on station Mir. *Acta Astronaut.*, 1991, 23: 109–16. doi: 10.1016/0094-5765(91)90106-f. PMID: 11537111.
15. Kvetnansky, R. et al. (1994): New approaches to evaluate sympathoadrenal system activity in experiments on earth and in space. *Acta Astronaut.*, 1994, Oct; 34: 243–54. doi: 10.1016/0094-5765(94)90261-5. PMID: 11540743.
16. Koska, J. et al. (1997): Activity of antioxidant enzymes during hyperglycemia and hypoglycemia in healthy subjects. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1997 Sep. 20; 827: 575–9.
17. Koska, J. et al. (1999): Malondialdehyde, lipofuscin and activity of antioxidant enzymes during physical exercise in patients with essential hypertension. *J. Hypertens.*, 1999 Apr; 17(4): 529–35. doi: 10.1097/00004872-199917040-00011. PMID: 10404955.
18. Vician, M. et al. (1999): Melatonin content in plasma and large intestine of patients with colorectal carcinoma before and after surgery. *J. Pineal. Res.*, 1999 Oct; 27(3):164–9.
19. Koska, J. et al. (2000): Insulin, catecholamines, glucose and antioxidant enzymes in oxidative damage during different loads in healthy humans. *Physiol. Res.*, 2000, 49 Suppl 1: S95–100. PMID: 10984077.
20. Krajcovicová-Kudláčková, M. et al. (2000): Homocysteine levels in vegetarians versus omnivores. *Ann. Nutr. Metab.*, 2000, 44(3): 135–8. doi: 10.1159/000012827. PMID: 11053 901.
21. Krajcovicová-Kudláčková, M. et al. (2000): Traditional and alternative nutrition-levels of homocysteine and lipid parameters in adults. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 2000 Dec, 60(8): 657–64. doi: 10.1080/00365510050216385. PMID: 11218148.
22. Raslová, K. et al. (2000): Effect of diet and 677 C→T 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase genotypes on plasma homocyst(e)ine concentrations in slovak adolescent population. *Physiol. Res.*, 2000; 49(6): 651–8. PMID: 11252530.
23. Sebekova, K. et al. (2000): A rapid rise in circulating advanced glycation end products (AGEs) in acute renal failure rats. *Journal of the American Society of Nephrology*, Vol. 11 9/2000
24. Sebeková, K. et al. (2001): Circulating advanced glycation end product levels in rats rapidly increase with acute renal failure. *Kidney Int. Suppl.*, 2001 Feb; 78: S58–62.
25. Blazicek, P. et al. (2001): Acute myocardial infarction conditioned by pheochromocytoma. *Clinical Chemistry*, Vol. 47, No. 6, Supplement, 2001.
26. Krivosíková, Z. et al. (2001): DNA damage of lymphocytes in experimental chronic renal failure: beneficial effects of losartan. *Kidney Int. Suppl.*, 2001 Feb; 78: S212–5.
27. Muchová, J. et al. (2001): Influence of age on activities of antioxidant enzymes and lipid peroxidation products in erythrocytes and neutrophils of Down syndrome patients. *Free Radic. Biol. Med.*, 2001 Aug 15; 31(4): 499–508.
28. Sebeková, K. et al. (2001): Increased levels of circulating advanced glycation end products in a model of acute renal insufficiency in rats. *Cas. Lek. Cesk.*, 2001 Jun 21; 140(12): 375–80.
29. Sebeková, K. et al. (2001): Plasma levels of advanced glycation end products in children with renal disease. *Pediatr. Nephrol.*, 2001 Dec; 16(12): 1105–12.

30. Blazicek, P. et al. (2002): Hyperhomocysteinemia-risk of alternative nutrition. *CLINICAL CHEMISTRY*, Vol. 48, No., 2002.
31. Blazicek, P. et al. (2002): The effect of physical inactivity and aerobic training on oxidative damage and antioxidant enzymes activities. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2002; 40. Special Supplement. S1–S352.
32. Krajcovicova-Kudlackova, M. et al. (2002): Insulin levels in Gypsy minority. *Bratisl. Lek. Listy*, 2002; 103(12): 459–61.
33. Kvetnansky, R. et al. (2002): Responses of sympathoadrenal and renin angiotensin systems to stress stimuli in humans during real and simulated microgravity. *Gravit. Physiol.*, 2002 Jul; 9(1): P79–80.
34. Simko, M. et al. (2002): Changes in serum levels of lipid peroxidation products during labor and in the puerperium. *Ceska Gynekol.*, 2002 Jan; 67(1): 15–9.
35. Langer, P. et al. (2003): Thyroid function and cholesterol level: paradoxical findings in large groups of population with high cholesterol food intake. *Endocr. Regul.*, 2003 Sep; 37(3): 175–80.
36. Sebeková, K. et al. (2003): Effects of ramipril in nondiabetic nephropathy: improved parameters of oxidative stress and potential modulation of advanced glycation end products. *J. Hum. Hypertens.*, 2003 Apr; 17(4): 265–70. 61/.
37. Sebeková, K. et al. (2003): Functional hyperhomocysteinemia in healthy vegetarians: no association with advanced glycation end products, markers of protein oxidation, or lipid peroxidation after correction with vitamin B(12). *Clin. Chem.*, 2003 Jun; 49(6 Pt 1): 983–6.
38. Krajcovicova-Kudlackova, M. et al. (2004): Cardiovascular risk factors in young Gypsy population. *Bratisl. Lek. Listy*, 2004; 105(7-8): 256–9.
39. Macho, L. et al. (2004): Effects of real and simulated microgravity on response of sympathoadrenal system to various stress stimuli. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2004 Jun; 1018: 550–61.
40. Valkovic, P. et al. (2005): Reduced plasma homocysteine levels in levodopa/entacapone treated Parkinson patients. *Parkinsonism Relat. Disord.*, 2005 Jun; 11(4): 253–6. Epub 2005 Apr 20.
41. Sebeková, K. et al. (2006): Association of metabolic syndrome risk factors with selected markers of oxidative status and microinflammation in healthy omnivores and vegetarians. *Mol. Nutr. Food Res.*, 2006 Sep; 50(9): 858–68.
42. Dvorakova, M. et al. (2007): Urinary catecholamines in children with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): modulation by a polyphenolic extract from pine bark (pycnogenol). *Nutr. Neurosci.*, 2007 Jun–Aug; 10(3–4):151–7.
43. Muchova, J. et al. (2007): The redox state of glutathione in erythrocytes of individuals with Down syndrome. *M Z. Bratisl. Lek. Listy*, 2007; 108(2): 70–4.
44. Penesova, A. et al. (2008): The role of norepinephrine and insulin resistance in an early stage of hypertension. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2008 Dec; 1148: 490–4. doi: 10.1196/annals.1410.036.
45. Vlcek, M. et al. (2008): Sympathetic nervous system response to orthostatic stress in female patients with rheumatoid arthritis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2008 Dec; 1148: 556–61. doi: 10.1196/annals.1410.026.
46. Kukumberg, P. et al. (2009): Sweat: a potential marker of clinical activity in panic disorder. *Neuro Endocrinol. Lett.*, 2009; 30(3): 400–2. PMID: 19855367.
47. Krivosíková, Z. et al. (2010): The association between high plasma homocysteine levels and lower bone mineral density in Slovak women: the impact of vegetarian diet. *Eur. J. Nutr.*, 2010 Apr; 49(3): 147–53. doi: 10.1007/s00394-009-0059-1. Epub 2009 Oct 7. PMID: 19809862.
48. Kuka, P. et al. (2010): HSP60, oxidative stress parameters and cardiometabolic risk markers in hypertensive and normotensive Slovak females. *Bratisl. Lek. Listy*, 2010; 111(10): 527–34. PMID: 21125796.
49. Penz, P. et al. (2010): MCP-1 -2518 A/G gene polymorphism is associated with blood pressure in ischemic heart disease asymptomatic subjects. *Bratisl. Lek. Listy*, 2010; 111(8): 420–5. PMID: 21033620.
50. Krajcovicova-Kudlackova, M. et al. (2011): Selected biomarkers of age-related diseases in older subjects with different nutrition. *Bratisl. Lek. Listy*, 2011; 112(11): 610–3. PMID: 22180985.
51. Penesova, A. et al. (2011): Insulin resistance in young, lean male subjects with essential hypertension. *J. Hum. Hypertens.*, 2011 Jun; 25(6): 391–400. doi: 10.1038/jhh.2010.72. Epub 2010 Jul 15. Erratum in: *J Hum Hypertens.* 2014 Mar; 28(3): 212. PMID: 20631738.
52. Krajcovicová-Kudlácková, M. et al. (2013): Seasonal folate serum concentrations at different nutrition. *Cent. Eur. J. Public Health*, 2013 Mar; 21(1): 36–8. doi: 10.21101/cejph.a3785. PMID: 23741898.





Laboratórna Diagnostika, XXVIII, 1, 2023: 33–39

## 30 ROKOV MEDICÍNSKÝCH LABORATÓRIÍ NA SLOVENSKU 30 YEARS OF MEDICAL LABORATORIES IN SLOVAKIA

Štefan Hajzer

hajzerst@pobox.sk

### SÚHRN

V článku sa popisuje vznik a vývoj medicínskych laboratórií ako pracovísk odboru laboratórnej diagnostiky po roku 1993. V krátkosti sa venuje obdobiu transformácie zdravotníctva charakterizovaného „odštátňovaním“ veľkej časti zdravotníckych služieb, vrátane odborov laboratórnej diagnostiky. Popisujú sa etapy privatizácie laboratórnych služieb a vznik kumulovaných pracovísk laboratórnej diagnostiky. V súvislosti s privatizáciou sa pokúšam o charakteristiku laboratórnych pracovísk ako obchodných spoločností, ako aj vývoja a stavu trhu v oblasti laboratórnej diagnostiky.

**Kľúčové slová:** laboratórna diagnostika; privatizácia; vývoj trhu

### ABSTRACT

This article describes formation and development of medical laboratories as a departments of laboratory diagnostic after 1993. Briefly covers the period of transformation of healthcare which was characterized by „denationalization“ of a large part of health services including laboratory diagnostics. Privatization stages of laboratory services and formation of consolidated departments of laboratory diagnostics are described. In connection with privatization, we characterize the laboratory departments as commercial companies as well as market development in the field of laboratory diagnostics.

**Key words:** laboratory diagnostics; privatization; market development

### ÚVOD

Medicínske laboratóriá – stručný prehľad vzniku a vývoja do roku 1993

Medicínske laboratóriá, ako samostatné pracoviská nemocníc a polikliník začali vznikať ako centralizované pracoviská na prelome 50 a 60-tych rokov minulého storočia vo vtedajšom Československu. Ich vznik a zriaďovanie si vyžiadala celkový svetový vedecký vývoj v oblasti lekárskejších a prírodných vied, predovšetkým chémie a biológie, ktoré prostredníctvom nových fyzikálno-chemických metód analýzy biologického materiálu dokázali poskytnúť širokú škálu informácií potrebných v diagnostike a v diferenciálnej diagnostike chorôb.

Na Slovensku (bývalom Československu) začali vznikať rôzne centralizované laboratóriá, ktoré sa neskôr pretransformovali na

- oddelenia klinickej biochémie
- oddelenia hematologicko- transfuziologické
- oddelenia klinickej mikrobiológie
- oddelenia klinickej imunológie a alergológie
- patologicko-anatomické oddelenia
- a neskôr oddelenia lekárskej genetiky

Na rozdiel od všetkých okolitých krajín (Poľsko, Rakúsko, Nemecko, NDR, Maďarsko atď.) a aj v ďalších krajín západnej Európy, kde už vo vtedajšej dobe boli laboratórne služby centralizované pod pojmom laboratórna diagnos-

tika, resp. laboratórna medicína a príslušné laboratórne pracoviská boli označované ako laboratória pre laboratórnu medicínu, resp. laboratórnu diagnostiku, v Československu sa presadil model, ktorý pretrval až do prevratu v roku 1989 a krátky čas aj po ňom. Laboratórne pracoviská boli samostatnými pracoviskami polikliník a nemocníc s celou štruktúrou riadiacich a odborných pracovníkov. Samozrejme, vyššie uvedených päť odborností sa do značnej miery vyvíjalo izolovane, čo mohlo negatívne ovplyvňovať nielen efektívnosť práce, odbornú profiláciu pracovníkov v jednotlivých samostatných odboroch, ale aj ich postgraduálne vzdelávanie.

Až zmena politického zriadenia a tlaky na ekonomizáciu zdravotníctva, jeho privatizáciu, nutnosť zvyšovania kvality a ďalšie ekonomicko-politické faktory prispeli k postupným zmenám, ktorých sme svedkami v tejto oblasti od roku 1993 dodnes.

### **Transformácia zdravotníctva na Slovensku a vznik medicínskych laboratórií**

Transformácia zdravotníctva začala privatizáciou, eufemisticky nazývanou „odštátnením“ celej ambulantnej sféry, zubných ambulancií, lekárenskej služby a veľkodistribúcie dodávok ŠZM, zdravotníckej prístrojovej techniky.

Laboratórne pracoviská stáli zo začiatku bokom privatizačných snáh, pretože rôzne typy medicínskych laboratórií boli integrálnou súčasťou zdravotníckych zariadení, predovšetkým nemocníc a polikliník všetkých typov a ich „vyňatie – delimitácia“ z organizačnej štruktúry týchto samostatných právnych subjektov bolo z legislatívneho hľadiska veľmi komplikované až nemožné. Nakoniec myšlienke privatizácie laboratórnej medicíny, ako ju poznáme dnes, neboli naklonení ani samotní predstavitelia vtedajších profesných organizácií a odborných spoločností, ktorí nevyvinuli, až na málo výnimiek, žiadny tlak ani aktivitu v tomto smere. „Osvietenejší“ riaditelia zdravotníckych zariadení videli v ziskových laboratóriách prínos pre ekonomiku zariadenia, tí iní sa snažili výnosy laboratórií využívať na vykrytie strát stratových oddelení.

Je príznačné, že prvé súkromné laboratória začali vznikať v poliklinickej sfére, kde už pôsobili rôzne typy súkromných zdravotníckych subjektov (ambulantní lekári, stomatólogovia, ambulantní špecialisti, lekárne, výdajne a pod.) a ich existencia nevyvolávala pocit „cudzieho“ tela v systéme.

### **Etapy privatizácie laboratórnych služieb a „vznik“ laboratórnej medicíny**

#### ***Privatizácia poliklinických laboratórnych pracovísk***

Privatizácia poliklinických laboratórnych pracovísk sa datuje do obdobia druhej polovice poslednej dekády minulého storočia, kedy vznikajú prvé súkromné laboratórne pracoviská poskytujúce svoje služby predovšetkým v ambulantnej sfére. Klientmi týchto laboratórií sa stali súkromní všeobecní lekári, ambulantní špecialisti a pod.

Jedným z prvých „odštátnených“ zdravotníckych zariadení sa stalo Diagnostické centrum Reimanus s. r. o. MUDr. Hollého v Prešove – Sekčove, ktoré vzniklo ako prvá privátna poliklinika spolu s laboratóriom pre klinickú biochémiu a hematológiu.

V Prešove vzniká v roku 1995 „na zelenej lúke“ jedno z prvých pracovísk laboratórnej medicíny ako Analyticko-diagnostické laboratórium s. r. o. (ADL) RNDr. Kužmovej realizujúce biochemické, hematologické a imunologické analýzy pre ambulantnú sféru.

V roku 1996 v Bratislave zakladá svoje mikrobiologické laboratória MUDr. Hanzen ako spoločnosť HPL spol. s r. o.

V Martine zakladá MUDr. Pírek spoločnosť Pharm-swiss a. s., ktorá začína prevádzkovať súkromné laboratórium v Ružomberku – Podhore a ktorá sa neskôr pretransformuje na Alpha medical s. r. o., v krátkej budúcnosti jedného z najväčších poskytovateľov laboratórnych služieb na Slovensku.

V roku 1997 začínajú v Košiciach samostatnú prevádzku spoločnosti MEDY s. r. o. MUDr. O l e k š á k a, RIA laboratórium s. r. o. PharmDr. Ž e m b e r o v e j, a BIO-HEM s. r. o. Ing. M a x i m o v e j.

Na západnom Slovensku a v Bratislave začína pôsobiť spoločnosť Medirex s. r. o., ktorú zakladá a vlastní MUDr. B a r d ú n v Pezinku a ktorá postupne rozširuje svoju pôsobnosť v oblasti poliklinických laboratórnych služieb na tzv. územné polikliniky v Bratislave a na blízke okolie Bratislavy, kde začína poskytovať laboratórne služby v klinickej biochémií a hematológii. Neskôr priebežne vznikali súkromné laboratória v Trnave, Piešťanoch, Nitre, Banskej Bystrici, Lučenci, Rimavskej Sobote, Trebišove, Michalovciach a inde.

#### ***Nemocničné laboratórne služby***

Relatívne dlho odolávali záujmom „neštátneho“ biznisu v tejto oblasti. Privatizácii nemocničných laboratórií zo začiatku bránila do určitej miery legislatíva, značná

averzia voči privatizácii na strane – primárov nemocničných laboratórnych oddelení a skutočnosť, že tieto pracoviská boli organickou súčasťou nemocníc, ktorých „delimitácia“ do súkromnej sféry narážala aj na odpor samotných nemocničných manažmentov.

Priaznivejší vývoj pre „odštátňovanie“ nemocničných laboratórnych služieb nastáva v priebehu prvej dekády tohto storočia. Paradoxne ho mohol spôsobiť určitý stupeň technologického úpadku týchto laboratórií ako aj ich úplné podfinancovanie zo strany vrcholového manažmentu nemocníc, ktoré mohlo vyplývať z celkového podfinancovania slovenského zdravotníctva ako celku. Mnohí riaditelia nemocníc pravdepodobne nepochopili, že laboratóriá, ktoré sú predovšetkým poskytovatelia medicínskych informácií pre diagnostiku, pracujú podobne ako „výrobné“ podniky a ich produktom sú výsledky. Ignorovali fakt, že tieto laboratóriá, napriek ich ekonomickej rentabilite, potrebujú pre svoju „produkciu“ financie na „surovinu“ (diagnostické sety, laboratórnu techniku). Nevhodnými zásahmi do ekonomiky týchto laboratórií prispeli k ich úpadku a tak urýchlili proces ich „odštátnenia“.

So skúsenosťami z prevádzkovania bratislavských poliklinických laboratórií spoločnosti Medirex, zakladá MUDr. B a r d ú n s partnermi a v spolupráci s manažmentom Fakultnej nemocnice L. Pasteura v Košiciach akciou spoločnosť LABMED a. s., ktorá vzniká v roku 2003 delimitáciou oddelenia klinickej biochémie a hematologického oddelenia a ich organizačným vyčlenením z pracovísk Fakultnej nemocnice L. Pasteura. Vzniká tak prvé veľké súkromné nemocničné pracovisko laboratórnej medicíny, ktorého denná kapacita v tej dobe obnáša odhadom do 1000 vzoriek. Rýchlo sa rozvíja a zvyšuje svoju kapacitu v dôsledku intenzívneho marketingu zameraného najmä na ambulantnú sféru, kde ponúka rýchle a kvalitné laboratórne služby. Rozširuje svoju ponuku aj najmä v oblasti cytologických a histologických vyšetrení.

V tomto období vzniká tiež vyčlenením oddelenia klinickej mikrobiológie vo Fakultnej nemocnici L. Pasteura v Košiciach, spoločnosť AVILAB s. r. o. MUDr. S z ö v é n y i o v e j.

V Košiciach „odskúšaný“ model vzniku súkromných nemocničných pracovísk laboratórnej medicíny realizuje MUDr. B a r d ú n a j v Bratislave, kde vzniká veľké zlúčené pracovisko klinickej biochémie vo FN na Mickiewiczovej ulici a v Nemocnici s poliklinikou v Ružinove. Medirex v roku 2014 začleňuje do skupiny a. s. LABMED

v Košiciach, postupne pohlcuje mikrobiologické laboratóriá HPL s. r. o., rôzne cytologické, genetické a rôzne iné špecializované pracoviská, aby v úzkej spoluvlastníckej spolupráci s nemeckou sieťou laboratórií Dr. Hansa Jakoba L i m b a c h a po niekoľkých rokoch vytvoril MEDIREX Group – jednu z najväčších súkromných laboratórnych sietí na Slovensku.

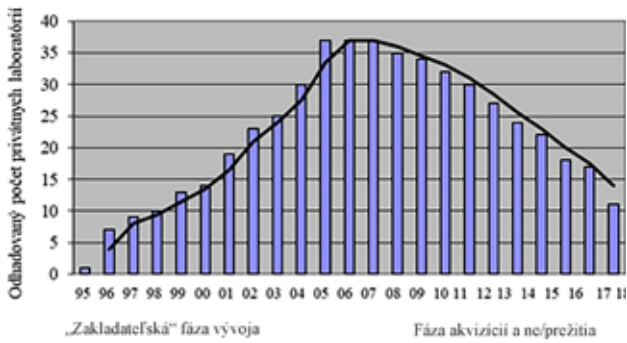
Do procesu „odštátnovania“ nemocničných laboratórnych služieb sa zapojila i spoločnosť INTES Poprad, v. o. s., ktorá sa zaoberala okrem iného aj dovozom zdravotníckej a laboratórnej techniky a diagnostík. Formou tzv. strategického partnerstva vytvárala s odbornými manažermi laboratórií okresných nemocníc spoločnosti s ručením obmedzeným. Tí sa totiž stávali spoločníkmi a/alebo odbornými garantmi a zaručovali ich odborné vedenie, ktoré vyžadovala príslušná legislatíva. Vzniklo tak odhadom 15 až 20 rôzne veľkých laboratórií (hlavne klinickej biochémie a hematológie) od východného až po západné Slovensko a Bratislavu, ktoré sa neskôr predali do rozpínejúcej sa spoločnosti Alpha medical s. r. o. Nech bol úmysel vlastníkov tejto spoločnosti akýkoľvek, výsledkom ich niekoľkoročných akvizičných snáh bola veľká slovenská laboratórna sieť, ktorú po desiatich rokoch úspešne predali medzinárodnému konzorciu UNILABS, za niekoľko sto miliónov eur, ktoré prevádzkuje túto sieť v súčasnosti.

V roku 2002 je založená spoločnosť KLINICKÁ BIOCHÉMIA s. r. o. so sídlom v Žiline, ktorá začala prevádzkovať medicínske laboratórium žilinskej nemocnice a postupne rozšírila svoje pôsobenie na oblasť severného a severozápadného Slovenska od Popradu, cez Liptovský Mikuláš až na Kysuce a Trenčín.

V roku 2005, ako posledná, vstupuje na trh aj spoločnosť SYNLAB Holding Austria GmbH so sídlom vo Viedni, ktorá prostredníctvom SYNLAB Slovakia s. r. o. v spolupráci s manažmentom pracoviska a nemocnice preberá pod svoju činnosť delimitované pracovisko klinickej biochémie a hematológie vo FNsP ak. Déreera na bratislavských Kramároch. V rokoch 2008 až 2012 preberá, resp. kupuje medicínske laboratóriá vo FN Prešov, mikrobiologické laboratóriá spoločnosti Avilab a niektoré poliklinické laboratóriá v Košiciach. V súčasnosti prevádzkuje sedem laboratórnych pracovísk nielen vo veľkých univerzitných nemocniciach v Bratislave a v Prešove, ale aj niekoľko poliklinických pracovísk v Košiciach a na západnom Slovensku.

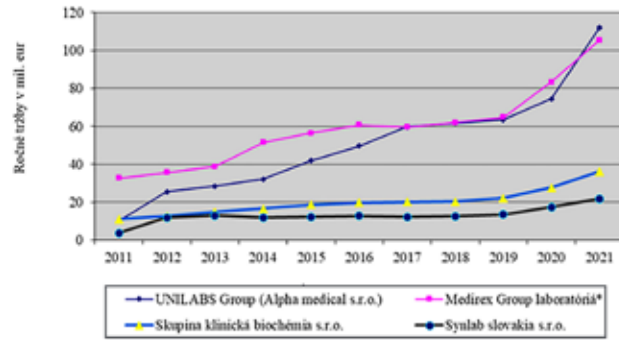
Z hľadiska popísaného vývoja privatizácie je zaujímavé sledovať na Obr. 1 vznik a zánik samostatných súkromných

**Odhad počtu samostatných medicínskych laboratórií - súkromných obchodných spoločností v rokoch 1995 až 2018**



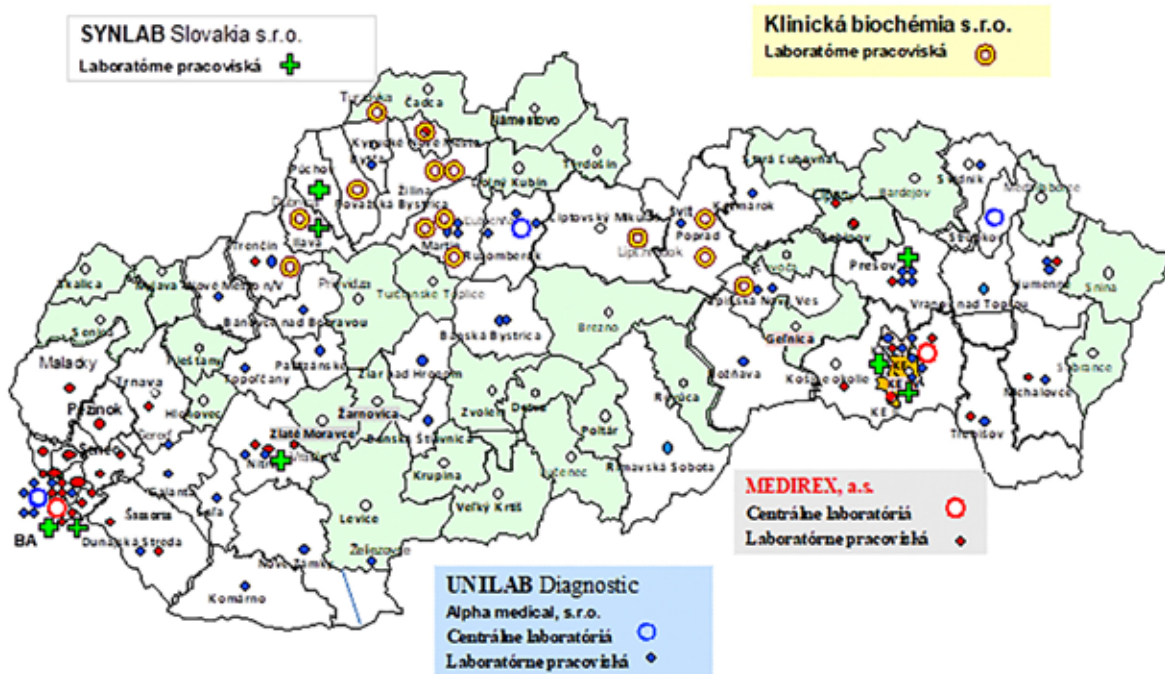
**Obr. 1. Odhad počtu samostatných poskytovateľov – samostatných právnych subjektov. Zdroj: FinStat, n. d.**

**Vývoj tržieb laboratórnych sietí na slovenskom trhu**



**Obr. 2. Vývoj finančných tržieb štyroch laboratórnych sietí od roku 2011. Zdroj: FinStat, n. d.**

## Laboratórne siete - územné rozloženie pracovísk



**Obr. 3. Schematické znázornenie územného rozloženia pracovísk štyroch laboratórnych sietí. Stav v roku 2018. Zdroj: Klinická Biochémia, n.d., Medirex, n.d., Synlab Slovakia, n.d., Unilabs Slovensko, n.d.**

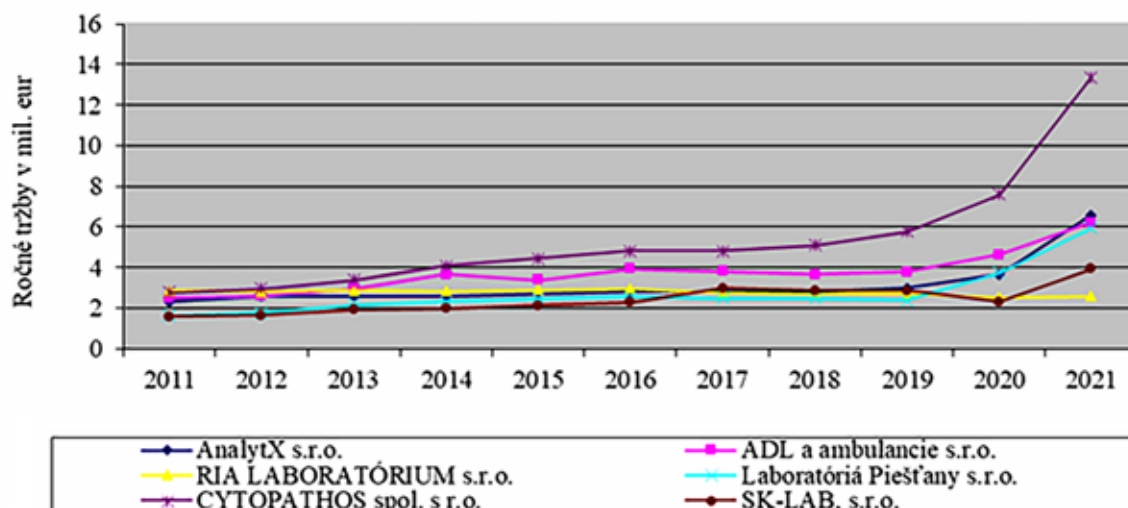
laboratórií v priebehu uplynulých viac ako dvoch dekád. V tzv. „zakladateľskej“ fáze (1995–2004) narastá počet súkromných laboratórií, kulminuje v intervale 2005 až 2008 a v ďalšom období klesá v dôsledku akvizičnej činnosti veľkých hráčov.

V súčasnosti, zdá sa, je „odštatňovanie“ laboratórnych medicínskych služieb v útlme. Manažmenty štátnych a MZ SR spravovaných nemocníc a ústavov pravdepodobne pochopili, že ekonomicky odborne riadené laboratória

môžu prinášať pozitívne hospodárske výsledky podobne ako v privátnom sektore. Mnohé nemocničné zariadenia na Slovensku si buď nechávajú vo svojej organizačnej štruktúre laboratórnu diagnostiku, alebo si laboratórne služby objednávajú v súkromnej sfére mimo vlastného zdravotníckeho zariadenia.

Na Obr. 2 je znázornený vývoj tržieb štyroch najväčších laboratórnych sietí od roku 2011. Ich hospodárske výsledky sú pravidelne uverejňované od roku 2009.

## Tržby samostatných súkromných laboratórií



Obr. 4. Vývoj finančných tržieb štyroch laboratórnych sietí od roku 2011. Zdroj: FinStat, n. d.

Z pohľadu na Obr. 2 sa zračí istá rivalita oboch veľkých sietí – Medirex Group a UNILABS Group. Vzostup ich tržieb bol podmienený hlavne masívnou akvizičnou a investičnou činnosťou krytou bankovými úvermi. Roky 2017 až 2018 sa javia ako plató, ktoré je pravdepodobne zapríčinené „vyprázdnením rybníka“. Pre vlastníkov a manažment spoločnosti Alpha medical s. r. o. bol pravdepodobne tento bod najvýhodnejší na predaj spoločnosti zahraničnému konzorciu UNILABS.

Medirex Group naďalej pôsobí ako najväčšia laboratórna sieť a bude iste zaujímavé sledovať jej budúcnosť na slovenskom laboratórnom trhu.

Vývoj dvoch menších sietí ovplyvnil pravdepodobne neskorší a menej razantný vstup na trh, veľmi obmedzené akvizičné možnosti a možno aj nechúť manažmentov masívnejšie investovať. Výsledkom je len mierny nárast tržieb u skupiny Klinická biochémia s. r. o. na úrovni okolo 20 mil. eur/ročne a úplne horizontálny priebeh tržieb u spoločnosti Synlab Slovakia s. r. o. približne do 15 mil. eur ročne (Obr. 3).

Roky 2020 a 2021 nie je možné z tohoto hľadiska seriózne hodnotiť, keďže tieto roky spadajú do obdobia pandémie Covid-19 a podobné tržby sa v budúcnosti pravdepodobne očakávať nedajú.

### Medicínske laboratóriá – ako obchodné spoločnosti

Súkromné medicínske laboratóriá pôsobia v slovenskom verejnom zdravotníctve ako obchodné spoločnosti. Väčšinou ako spoločnosti s ručením obmedzeným, alebo

ako akciové spoločnosti – samostatné právne subjekty. Najväčšie z týchto spoločností sú vyššie zmienené laboratórne siete. Okrem nich ale na Slovensku stále pôsobia a poskytujú svoje služby pracoviská, ktoré sú na trhu vyše 20 rokov a ktoré dokážu odolávať rôznym ekonomickým a konkurenčným tlakom v nepriaznivom podnikateľskom prostredí.

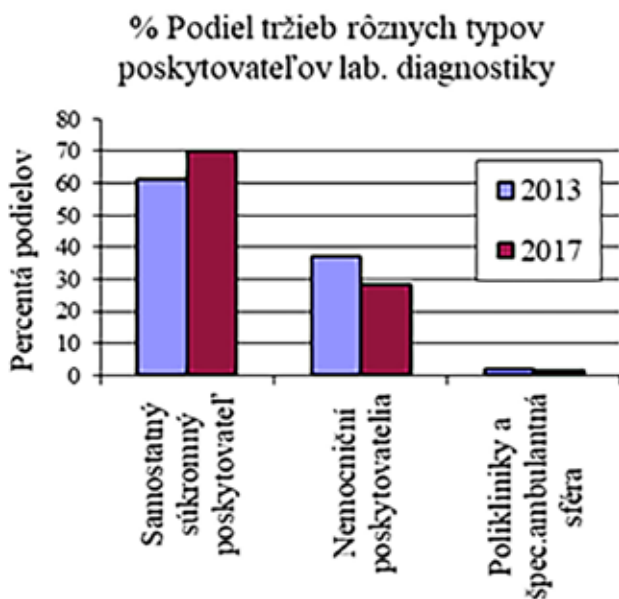
Celý ročný objem tržieb týchto laboratórií pochádza, až na malé výnimky, z platieb za výkony v odboroch laboratórnej diagnostiky.

Obr. 4 poskytuje pohľad na vývoj ročných tržieb týchto pracovísk za posledných 10 rokov.

Ako je z Obr. 4 zrejme skupine týchto laboratórií v priebehu poslednej dekády ročné tržby „opatrne“ rastú, resp. stagnujú. Z vlastnej podstaty však zostávajú oscilovať v rozmedzí 2 až 6 mil. eur ročne čo ich vlastne zaraďuje do skupiny „malých“ laboratórií. Opäť neberieme do úvahy trend rokov 2020 a 2021, ktorý bol veľmi špecifický z dôvodu pandémie Covid-19.

Väčšina týchto súkromných laboratórií dlhodobo a pravidelne vykazuje pozitívne hospodárske výsledky.

Ďalšia skupina poskytovateľov sa nachádza v rôznych typoch zdravotníckych zariadení vrátane štátnych nemocníc a ústavov, súkromných nemocníc, neziskových organizácií a polikliník, ktorých organickou súčasťou sú aj pracoviská laboratórnej diagnostiky. Ich separátne tržby však nie sú zrejme z účtovných uzávierok ani z koncepcie výročných správ, takže ich nemožno hodnotiť v rámci jednej homogénnej skupiny pracovísk.



Obr. 5. Odhad percentuálneho podielu jednotlivých poskytovateľov laboratórnej diagnostiky v roku 2013 a 2017

**Odhad % podielu na celkovom objeme trhu**

	2013 [%]	2017 [%]
Samostatné súkromné siete a ostatní súkromní poskytovatelia	61	70,1
Nemocniční poskytovatelia <sup>1)</sup>	37	28,5
Polikliniky a špec. ambulantná sféra	2	1,5

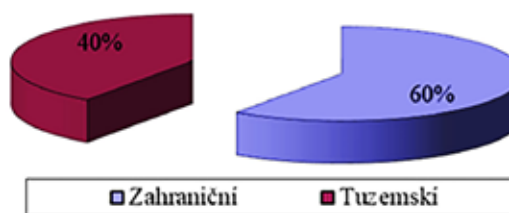
Szalaiová a Mužík (2014) zaviedli rozdelenie laboratórných pracovísk na tri skupiny:

- Samostatné súkromné siete a ostatní súkromní poskytovatelia
- Nemocniční poskytovatelia\*
- Polikliniky a špeciálna ambulantná sféra

Vo svojej štúdii sledovali relatívny podiel tržieb rôznych typov poskytovateľov laboratórnej diagnostiky v roku 2013. Časť ich zistení je znázornená v nasledujúcom grafe a tabuľke. Hunková (2018) vo svojej ostatnej analýze uvádza, že aj pri klesajúcom trende nákladov troch slovenských zdravotných poisťovní, ich náklady na laboratórnu diagnostiku predstavovali v roku 2017 spolu 249,6 mil. eur (FinStat, n. d.). Ak vychádzame z predpokladu, že nákla-

\* Všetci nemocniční poskytovatelia vrátane štátnych nemocníc a ústavov, súkromných nemocníc a polikliník, ktorých organickou súčasťou sú pracoviská laboratórnej diagnostiky.

**Podiel tržieb súkromných laboratórií podľa vlastníctva (2021)**



Obr. 6. Rozdelenie tržieb medzi súkromných tuzemských a zahraničných vlastníkov v roku 2021

dy poisťovní tvoria úhrady výkonov, potom tieto náklady predstavujú financie poskytnuté zdravotnými poisťovňami všetkým slovenským pracoviskám z oblasti laboratórnej diagnostiky a teda finančný objem slovenského trhu laboratórnej diagnostiky.

Naše odhady z roku 2017 vychádzajú z publikácie Hunkovej (2018) a z medializovaných dát (FinStat, n. d.).

V súlade s vývojom tržieb súkromných laboratórií (viď. Obr. 2 a 4) vzrástol v priebehu štyroch rokov ich podiel na trhu o temer 10% na úkor nemocničných poskytovateľov a polikliník (Obr. 5).

Údaje v Obr. 5 pochádzajú za rok 2013 od Szalaiovej a Mužíka (2014) a za rok 2017 z publikácie Hunkovej (2018). V období rokov 2018 a 2019 nevykazujú tržby súkromných poskytovateľov nijaké významné nárasty a preto sa dá predpokladať, že stav z roku 2017 pretrvával v podstate aj v ďalšom období. Roky 2020 a 2021 nie je možné z tohoto hľadiska seriózne hodnotiť, keďže tieto roky spadajú do obdobia pandémie Covid-19 a podobné tržby sa v budúcnosti pravdepodobne očakávať nedajú.

Pri sledovaní vývoja laboratórnej diagnostiky v súvislosti s jej privatizáciou, stojí za zmienku pohľad na vlastnícke vzťahy týchto pracovísk.

Samostatné súkromné laboratórne siete a samostatné súkromné laboratóriá vlastní tuzemskí i zahraniční vlastníci (Obr. 6., druh vlastníctva – Zdroj: Finstat, n. d.) Z verejne dostupných zdrojov vyplýva, že z celkového objemu tržieb 311,5 miliónov eur súkromných laboratórií v roku 2021, 60 % tržieb inkasujú laboratórne siete zahraničných vlastníkov. Skupine tuzemských vlastníkov súkromných laboratórných sietí a súkromných laboratórií zostáva 40 % tržieb. Údaje sú spracované na základe hospodárskych výsledkov z roku 2021.

## ZÁVER

Vývoj laboratórnej diagnostiky na Slovensku zaznamenal za posledných tridsať rokov značný pokrok. Prvé súkromné laboratóriá začali veľmi opatrne vznikať v podstate z iniciatívy ich vtedajších šéfov, ktorí nemali nijakú odbornú predprípravu na ekonomické riadenie. Niektorí to považovali skôr za osobnú výzvu a postupne sa začali zaplietať do neprehľadnej pavučiny vznikajúcich a neustále sa meniacich predpisov, osobných vzťahov a závislostí. Mnohí po čase zistili náročnosť riadenia malého rodinného podniku, ktorý asi, najmä spočiatku, ani nemusel byť tak ekonomicky lukratívny.

Súbežne s procesom privatizácie medicínskych laboratórií (klinická biochémia, hematológia, mikrobiológia atď.) však vzniká a silnie iný proces - realizovaný skupinou podnikateľov, ktorí až na výnimky, nemajú nijaké odborné vzdelanie laboratórneho smeru. Majú však financie, vplyv a kontakty. Sú to obchodníci, ktorí si spočítali ekonomický potenciál laboratórnej diagnostiky a využívajúc situáciu a kontakty v manažmentoch nemocníc, postupne „vyviedli“ laboratórne služby z pôsobnosti nemocníc na všetkých odborných úrovniach, od univerzitných až po malé okresné nemocnice. Ani jedna súkromná laboratórna sieť na Slovensku nevznikla „na zelenej lúke“, ale ich jednotlivé pracoviská boli postupne a cieľavedome skupované od majiteľov už sprivatizovaných malých laboratórií, alebo boli „delimitované“ z nemocničných laboratórnych pracovísk. V dôsledku toho, že sa laboratórne siete stali veľkými podnikmi, ktorých tržby sa pohybujú v desiatkach miliónov eur ročne, sú predmetom medzinárodných akvi-

zícii, a väčšina profitu súkromných slovenských laboratórií smeruje dnes k zahraničným vlastníkom a k ich zahraničným beneficentom.

Možno povedať, že privatizácia laboratórií a spájanie jednotlivých odborov laboratórnej diagnostiky do jedného organizačného celku by malo znásobovať potenciálne možnosti ekonomického rozvoja laboratórií aj odborného rastu pracovníkov v tomto odbore. Či tomu tak bude a či je tento vývoj, ktorý prináša aj mnohé riziká, výhodný pre slovenskú laboratórnu diagnostiku to ukáže budúcnosť.

## LITERATÚRA

1. **FinStat (n. d.):** Finančné a právne dáta o firmách na jednom mieste | FinStat.sk. Dostupné na: <https://www.finstat.sk/> (cit: 20.7.2022).
2. **Hunková M. (2018):** Laboratóriám klesajú platby aj výkony. *TREND*, 4. októbra 2018, str. 24–26.
3. **Klinická Biochémia (n. d.):** Dostupné na: [www.klinickabiochemia.sk](http://www.klinickabiochemia.sk) (cit: máj 2018).
4. **Medirex (n. d.):** Dostupné na: [www.medirex.sk](http://www.medirex.sk) (cit: máj 2018).
5. **Synlab Slovakia (n. d.):** Dostupné na: [www.synlab.sk](http://www.synlab.sk) (cit: máj 2018).
6. **Szalayová, A., Mužík, R. (2014):** *Vývoj laboratórnej diagnostiky za posledných 10 rokov*. Health policy institute (ISBN 978-802-971727-2-5).
7. **Unilabs Slovensko (n. d.):** Dostupné na: <https://www.unilabs.sk/> (cit: máj 2018).



Laboratórna Diagnostika, XXVIII, 1, 2023: 40–48

## METABOLOMIKA: POTENCIÁLNY NÁSTROJ VČASNEJ DIAGNOSTIKY NEURODEGENERATÍVNYCH OCHORENÍ METABOLOMICS: THE POTENTIAL TOOL IN EARLY DIAGNOSIS OF NEURODEGENERATIVE DISEASES

Andrea Leškaničová, Patrik Šimko, Nicol Urbanská, Terézia Kisková

Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Prírodovedecká fakulta

Ústav biologických a ekologických vied, Košice

andrea.stafurikova@gmail.com

### SÚHRN

Neurodegeneratívne ochorenia zahŕňajú širokú škálu stavov, ktoré sú výsledkom progresívneho poškodenia buniek a dráh a štruktúr nervového systému, ktoré sú nevyhnutné pre mobilitu, koordináciu, vnímanie či kogníciu. Neurodegeneratívne ochorenia postihujú milióny ľudí na celom svete. Napriek závažnej progresii a dlhodobom trvaní doposiaľ neexistuje žiadny spoľahlivý diagnostický nástroj, ktorý by dokázal stanoviť diagnózu v rannom štádiu ochorenia, kedy je ešte možnosť zvrátiť alebo aspoň spomaliť priebeh ochorenia. Rovnako doposiaľ neexistuje účinný liek na väčšinu týchto zložitých neurologických ochorení. Metabolomika patrí v súčasnosti k intenzívne vyhľadávaným diagnostickým nástrojom, pretože metabolity a ich koncentrácie priamo odrážajú základnú biochemickú aktivitu, stav buniek a tkanív a teda celkový momentálny fenotyp organizmu. Vzhľadom na to, že koncentrácie voľných metabolitov ovplyvňujú a sú ovplyvňované rýchlosťou metabolickej reakcie, je metabolický profil „odtlačkom“, ktorý poskytuje pohľad na *in vivo* enzymatickú aktivitu organizmu. V biológii sa zameriava na objasnenie dynamiky metabolických dráh a odhaľovanie komplexných molekulárnych mechanizmov prebiehajúcich v zdravom aj patologickom tkanive/organizme. V tejto práci poskytujeme základný prehľad o metabolických zmenách, ktoré nastávajú pri vybraných neurodegeneratívnych ochoreniach.

**Kľúčové slová:** neurodegenerácia; neurodegeneratívne ochorenie; metabolizmus; biomarker

### ABSTRACT

Neurodegenerative diseases include a wide range of conditions that result from progressive damage of the cells, pathways, and structures of the nervous system that are essential for mobility, coordination, perception, or cognition. Neurodegenerative diseases affect millions of people over the world. Despite a rapid progression and a long-term duration, there is still no reliable diagnostic tool that could establish a diagnosis in the early stages of the disease, when there is still a chance to reverse or at least slow down the course of the disease. Likewise, there is still no effective cure for most of neurological diseases. Metabolomics currently belongs to the most intensively studied diagnostic tools because metabolites and their concentrations directly reflect the biochemical activity and the state of cells and tissues, and thus the overall current phenotype of the organism. Since the concentrations of free metabolites affect and are affected by the rate of the metabolic reaction, the metabolic profile is a „fingerprint“ that provides insight into the *in vivo* enzymatic activity of the organism. It focuses on clarifying the dynamics of metabolic pathways and revealing complex molecular mechanisms running in both healthy and pathological tissue/organisms. In this work,



**we provide a basic overview of the metabolic changes, that occur in selected neurodegenerative diseases.**

**Key words: neurodegeneration; neurodegenerative disease; metabolism; biomarker**

### **Neurodegeneratívne ochorenia**

Pri neurodegeneratívnych ochoreniach charakteristicky dochádza k progresívnej strate populácií neurónov, čo je v kontraste so statickými stratami neurónov v dôsledku metabolických alebo toxických porúch. Takéto choroby sa môžu klasifikovať podľa primárnych klinických znakov, anatomického rozloženia neurodegenerácie alebo podľa hlavných molekulárnych abnormalít (Dugger, Dickson, 2017). Je ich možné klasifikovať podľa klinických prejavov, pričom najbežnejšie sú poruchy extrapyramidálneho a pyramidálneho pohybu, kognitívne poruchy a poruchy správania. Zvyčajne sú definované špecifickou akumuláciou proteínov a anatomickou zmenou. Počas nich dochádza k mnohým procesom spojeným s progresívnou neuronálnou dysfunkciou až smrťou neurónov, ako je proteotoxický stres a jeho sprievodné abnormality v ubikvitín – proteazomálnych a autofagozomálnych systémoch, oxidačný stres, programovaná smrť buniek či zápal neurónov (Evidente et al., 2011, Armstrong et al., 2013, Dugger et al., 2014). V súčasnosti však nie sú známe diagnostické biomarkery, s výnimkou zriedkavých prípadov, pomocou ktorých je možné preukázať, že príčinou je genetická mutácia (Ghaseemi, Brown, 2018, Hinz, Geschwind, 2017). Špecifické biomarkery *in vivo*, vrátane markerov biofluidného a molekulárneho zobrazovania, sú preto hlavnou prioritou súčasného výskumu (Johnson et al., 2016, Seeley, 2017). Pre ich komplexné porozumenie je potrebné aktivitu centrálnej nervovej sústavy (CNS) vnímať ako koordinovanú interakciu molekulárnych sietí rôznych oblastí mozgu. Funkčná úloha a vlastnosti mozgových oblastí sú synergické a komplementárne, ale nie sú lineárne závislé, čo si vyžaduje ich objasnenie a interpretáciu prístupmi systémovej biológie. Vysoko kvantitatívna povaha „omických“ štúdií posúva výskum mozgu vpred (Association et al., 2013).

### **Parkinsonova choroba**

Parkinsonova choroba (Parkinson's disease, PD) je progresívna neurologická porucha postihujúca približne 1 % ľudí vo veku nad 60 rokov (de Lau, Breteler, 2006,

Havelund et al., 2017b), charakterizovaná stratou veľkého počtu motorických a nemotorických funkcií, ktoré môžu ovplyvniť fungovanie človeka v rôznom rozsahu (Janovic, 2008). Existujú 4 hlavné znaky PD: tremor v pokojovom stave, rigidita, akinézia alebo bradykinézia a posturálna nestabilita (Janovic, 2003). Diagnóza PD sa momentálne opiera najmä o klinické príznaky, anamnézu a reakciu na dopaminergnú liečbu, čo vedie vo vysokej miere k chybnéj diagnóze v klinickej praxi (Nagesh Babu et al., 2018, Rizzo et al., 2016). Okrem toho klinické prejavy pacientov s PD značne zaostávajú za patologickým stavom zmeny mozgu (Trezzi et al., 2017). Preto je veľká výzva nájsť vhodné markery, ktoré by pomohli spoľahlivo určiť diagnózu v ranom štádiu ochorenia. Keďže PD je multifaktoriálna choroba, je pravdepodobné, že k jej patogenéze môže prispievať viacero mechanizmov. Aj napriek desaťročiam výskumu stále nie je základná etiopatogenéza PD úplne objasnená. Vzhľadom na nedostatok znalostí o mechanizmoch, ktoré regulujú nástup a progresiu patológie choroby, sa vyvíjajú nové prístupy zamerané na objavenie konkrétnych biomarkerov, ktoré ponúkajú presnejšiu diagnostiku a lepšie monitorovanie progresie PD. Okrem toho, identifikácia spoľahlivých markerov by mohla viesť k vývoju nových liekov, čo by mohlo zvrátiť neurodegeneráciu a progresiu PD (Shao, Le, 2019).

### **Metabolomické štúdie pacientov s Parkinsonovou chorobou**

Väčšina metabolomických štúdií sa vykonáva použitím vzoriek krvnej plazmy alebo séra. Je to pravdepodobne v dôsledku svojej minimálnej invazívnej povahy a relatívne ľahkej dostupnosti vzoriek krvi (Shao, Le, 2019). Rozdiel v metabolitoch medzi pacientmi s PD a kontrolami možno zhrnúť do skupín aminokyselín (AMK), mastných kyselín, acylkarnitínov, lipidov, purínov, organických kyselín a cukrov, ktoré sú súčasťou metabolizmu aminokyselín s rozvetveným reťazcom (BCAA), metabolizmu tryptofánu, lipidov, energetického metabolizmu, metabolizmu purínov a oxidačného stresu/cesty redoxnej homeostázy. V poslednej dobe štúdie preukázali tiež dysreguláciu v metabolickej dráhe kynurenínu u pacientov s PD (Chang et al., 2018, Han et al., 2017). Veľa biologických a klinických štúdií tiež uvádza urát ako sľubný biomarker pre vyhodnotenie rizika, diagnostiky a prognózy PD. V cerebrospinálnom moku (CSF) aj krvi u pacientov s PD bola objavená výrazne zvýšená hladina močoviny v porov-

naní s kontrolami (A s c h e r i o et al., 2009, C i p r i a n i et al., 2010). Avšak vysoká hladina močoviny môže tiež naznačovať pomalší priebeh choroby (C i p r i a n i et al., 2010, S c h w a r z s c h i l d et al., 2008). Ako dôležitý endogénny antioxidant, môže jej vysoká hladina prispieť k boju proti oxidačnému stresu u PD (v a n d e r B r u g et al., 2015). Zároveň hladina N8-acetyl spermidínu môže byť prediktívnym markerom pre fenotyp rýchlej motorickej progresie, ktorý môže poskytnúť novú stratégiu na oddialenie alebo spomalenie progresie PD (R o e d e et al., 2013). Z metabolomických zistení tiež vyplýva, že plazmatické metabolické profily serínu, purínu, mastných kyselín, polyamínov a metabolitov, asociovaných s metabolizmom tryptofánu, vykazujú vysokú koreláciu s progresiou PD (C h a n g et al., 2018, H a v e l u n d et al., 2017a). Vzhľadom na ľahkú dostupnosť a neinvazívny postup sú vzorky moču taktiež ideálnym zdrojom pre analýzy. Štúdie PD v moči boli zamerané predovšetkým na hodnotenie markerov oxidačného stresu (S a t o et al., 2005, B o l n e r et al., 2011, H i r a y a m a et al., 2011). Vystavenie reaktívnym a oxidačným druhom môžu byť bázy DNA hydroxylované a oxidované. 8-hydroxy-2-deoxyguanozín (8-hydroxy-2-deoxyguanosine, 8-OHdG) a 8-hydroxyguanozín (8-hydroxyguanosine, 8-OHG) sú dva z najvýznamnejších produktov poškodenia DNA (G m i t t e r o v á et al., 2009). Výsledný 8-OHdG sa môže vylúčiť močom bez ďalšieho metabolizmu, čo sa považuje za ukazovateľa oxidačného poškodenia DNA (B o l n e r et al., 2011). Štúdie preukázali zvýšené hladiny 8-OHdG v substantia nigra mozgu (A l a m et al., 1997) ako aj v sére a CSF u pacientov s PD (K i k u c h i et al., 2002). Okrem toho vykazuje úroveň 8-OHdG v moči postupné zvyšovanie s postupujúcou PD, čo naznačuje, že môže byť užitočným markerom pre sledovanie progresie ochorenia (S a t o et al., 2005).

### Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba (Alzheimer's disease, AD) je najčastejšou formou duševnej poruchy ľudí v neskoršom veku (S e l k o e, 2001). Predpokladá sa, že v najbližších 50 rokoch sa jej prevalencia strojnásobí [194]. Ide o chronické neurodegeneratívne ochorenie, ktoré sa často začína pomaly a nenápadne a postupom času sa prudko zhoršuje (B u r n s, I l l i f f e, 2009, M e n d e z, 2012). Najbežnejším skorým príznakom sú problémy so zapamätávaním nedávnych udalostí. Ako choroba postupuje, medzi príznaky sa postupne pridávajú problémy s rečou, dezorientácia,

zmeny nálady, strata motivácie, nevládanie starostlivosti o seba a problémy so správaním (B u r n s, I l l i f f e, 2009). Postupne sa strácajú telesné funkcie, čo nakoniec vedie k smrti (A m a n z a d e h et al., 2019). Aj keď sa rýchlosť progresie môže značne meniť, typická dĺžka života po stanovení diagnózy je 3–9 rokov (T o d d et al., 2013). AD ovplyvňuje CNS, čo vedie k deštrukcii a atrofií mozgovej kôry, a to najmä v tých oblastiach, ktoré súvisia s mentálnymi funkciami (F r a n c i s et al., 1999). Klinicky je AD charakterizovaná prítomnosťou intracelulárnych neurofibrilárnych spleť zložených z hyperfosforylovaných tau proteínov (G r u n d k e - I q b a l et al., 1986) a peptidových agregátov vo forme extracelulárnych amyloidových plakov (J a r r e t t et al., 1993) a amyloidových infiltrátov v mozgovej vaskulatúre (S u z u k i et al., 1994). Tieto formácie sa považujú za kľúčové faktory pri neuronálnej dysfunkcii a smrti buniek (C a l i s s a n o et al., 2009). Ďalšími neuropatologickými znakmi AD sú strata a/alebo dysfunkcia synapsií, znížený metabolizmus neurónov a strata viacerých neurotransmitterových systémov (S e l k o e, 2001). Ako choroba postupuje do kortikálnych oblastí mozgu, zhoršuje sa dlhodobá pamäť a bežné schopnosti vrátane sémantickej pamäte a pozornosti, čo vedie k syndrómu demencie (N e s t o r et al., 2004). Na liečbu AD však neexistuje žiadny liek. Súčasne dostupné lieky ponúkajú iba relatívne malú symptomatickú výhodu, ale svojou povahou stále ostávajú paliatívne (B i r k s, H a r v e y, 2018).

### Metabolické štúdie pacientov s Alzheimerovou chorobou

Za účelom detekcie potenciálnych metabolitových biomarkerov AD v plazme porovnali L i a kol. 20 kontrolných a 20 pacientov s AD. Štatistická analýza ukázala výrazné zmeny v tryptofáne, rôznych lyzofosfatidylcholínach (lysofosfatidylcholines, lysoPC) a sfingozínoch (L i et al., 2010). T a n g a kol. (T a n g et al., 2016) pozorovali metabolizmus AD na myšacom modeli. Zistili, že v porovnaní s kontrolnými skupinami boli najviac narušené metabolické dráhy aromatických AMK. Pozorovali zvýšené hladiny N-acetylvánilalanínu, 3-metoxytyrozínu a 3-metyldioxyindolu a zároveň znížené hladiny antranilátu a xanturenátu v moči AD myši. Tryptofán je metabolicky degradovaný odlišnými cestami, ktoré vytvárajú serotonin a kynurenín. Kynurenínová dráha je hlavnou katabolickou dráhou tryptofánu pri tvorbe nikotínamid adenín dinukleotidu (nucotinamide adenine dinucleotide, NAD+), ktorá je

nevyhnutná pre normálnu funkciu mitochondrií a rovnako slúži ako faktor pre mnohé biochemické reakcie (Di Stefano et al., 2013). Serotonínová dráha plní veľmi dôležitú funkciu, pretože produkuje intermediárne metabolity ako N-acetylserotonín alebo melatonín, so širokým účinkom ako neurotransmitery, neuromodulátory a antioxidanty (Rodríguez et al., 2012). Preto môže nerovnováha medzi aktivitou kynurenínu a serotonínu v katabolizme tryptofánu hrať kľúčovú úlohu pri patogenéze AD (Ruddick et al., 2006). Štúdia Tang a kol. (Tang et al., 2016) preukázala, že podiel tryptofánu metabolizovaného serotonínovou dráhou sa významne zvýšil, čo dokazuje produkcia väčšieho množstva metabolitu tejto dráhy N-acetylserotonínu, pravdepodobne na získanie neuroprotektie (Bachurin et al., 1999). Naopak podiel metabolizmu tryptofánu na tvorbu NAD<sup>+</sup> prostredníctvom kynurenínovej dráhy sa významne znížil, o čom svedčí nižšia koncentrácia antranilátu a xanturenátu (Tang et al., 2016). V súlade s tým sa zistilo, že potravinový doplnok, ktorý slúži ako NAD<sup>+</sup> prekurzor, kyselina nikotínová, má priaznivý vplyv na vývoj AD a spôsobuje oneskorenie nástupu prejavov choroby (Morris et al., 2004). Voľné AMK sa považujú za dôležité molekuly vo funkcii receptora pre neurotransmisiiu a sú zapojené do neurotoxicity (Advokat, Pellegrin, 1992). Samakashvili a kol. určili zmeny AMK v progresii AD. S progresiou AD boli spojené znížené hladiny arginínu, kyseliny glutámovej, kyseliny asparágovej a lyzínu a zvýšené hladiny kyseliny gama-aminomaslovej (Samakashvili et al., 2011). Tieto AMK boli zároveň navrhnuté ako potenciálne skoré biomarkery AD (Jack et al., 2010). Czech a kol. porovnávali vzorky pacientov s AD s kontrolnými skupinami pričom zistili, že cysteín, uridín, kortizol, 3-metoxy-4-hydroxyfenylglykol, dopamín, noradrenalín a normetanefrín boli významne odlišné. Neskôr pomocou diskriminačnej analýzy stanovili cysteín a uridín ako najspoľahlivejšie metabolity, predikujúce AD (Czech et al., 2012). Posúdenie metabolických zmien súvisiacich so začiatkom a vývojom AD by mohlo zlepšiť diagnostiku a monitorovanie AD, a dokonca pomôcť vyhodnotiť riziko vzniku ochorenia u zdravých ľudí, prípadne detegovať pacientov v prodromálnom stave ochorenia. Skúmanie skorých biomarkerov AD by mohlo zlepšiť naše chápanie patofyziológie a vývoj nových terapeutických postupov na odvrátenie patológie a progresie AD (Gibregiorgis, Powers, 2012).

## Huntingtonova choroba

Huntingtonova choroba (Huntington's disease, HD) je zriedkavá neurodegeneratívna porucha CNS, charakterizovaná nedobrovoľnými pohybmi, poruchami správania, psychiatrickými poruchami a demenciou. Prevalencia v Európe sa odhaduje na 1/10 000–120 000. Priemerný vek nástupu príznakov HD je 30–50 rokov. V niektorých prípadoch sa začína prejavovať už pred 20. rokom života ako porucha správania či učenia. Priemerný vek nástupu HD je 30 až 50 rokov. Primeraná dĺžka trvania choroby je 17–20 rokov. Progresia ochorenia vedie nakoniec až k smrti (McClagan, Tabrizi, 2018). Klasickým znakom HD je chorea – nedobrovoľný svalový pohyb, ktorý sa najskôr vyskytuje v distálnych častiach končatín ako sú prsty na nohách, ale aj malé svaly tváre. Vyskytuje sa tiež nestabilná chôdza. Nežiaduce pohyby sa postupne rozširujú na všetky ostatné svaly. Postupne sa stáva ťažkým aj hovorenie či prehĺtanie. U všetkých pacientov sa rozvíja hypokinéza, akinéza a rigidita (Wexler, 2006). Všetky psychomotorické procesy sa spomaľujú, u pacientov dochádza k psychiatrickým poruchám a kognitívnemu poklesu. Najčastejšie vyskytujúcim sa príznakom je depresia sprevádzaná apatiou či agresívne správanie pacienta (Wheeler et al., 2003). Najmä v neskorších štádiách sa môže tiež objaviť psychóza a vo väčšine prípadov je sprevádzaná až vznikom demencie (van Duijn et al., 2007). Najčastejšou príčinou úmrtia býva zápal pľúc, po ňom nasleduje samovražda (Wexler, 2006). HD je autozómovo dominantné ochorenie spôsobené predĺženým opakovaním CAG sekvencií (36 a viac opakovaní) na krátkom ramene chromozómu 4p16.3 v géne pre HD. Čím dlhšie sa táto sekvencia nukleotidov opakuje, tým skôr sa choroba u pacienta prejaví. Napriek tomu, že je známa patogenéza HD, účinná liečba zatiaľ neexistuje. Súčasná liečba sa sústreďuje výlučne na tlmenie príznakov s cieľom zlepšiť kvalitu života pacienta (McClagan, Tabrizi, 2018).

## Metabolické štúdie pacientov trpiacich Huntingtonovou chorobou

Predchádzajúce štúdie pozorovali znížené AMK s rozvetveným reťazcom (valín, leucín a izoleucín) (Mochel et al., 2007) a karnitíny (Mochel et al., 2007, Unger et al., 2006, Cuturic et al., 2013), a naopak zvýšené odbúravanie mastných kyselín (glycerol a etylén-glykol) a produkty rozkladu nukleových kyselín (2-amino-n-butyrát) v krvnej plazme alebo sére pacientov s HD

(U n d e r w o o d et al., 2006). Okrem AMK s rozvetveným reťazcom boli tiež pozorované výrazne nižšie plazmatické hladiny taurínu, serotonínu a troch druhov PC (PCaeC36:0, lysoPC C20:30 a PCaeC34:0) (C h e n g et al., 2016). Tieto markery naznačujú niekoľko potenciálnych dráh zapojených do patogenézy HD. Poškodenie mozgu vyvoláva uvoľňovanie glycínu (Y a o et al., 2012). Glycín bol navrhnutý ako N-metyl-D-aspartát (NMDA) receptorový koagonista s aktivitou podobnou glutamátu (R e i l m a n n et al., 1997). Ukázalo sa, že mutant HTT (tract in the huntingtin, HTT) môže zvyšovať citlivosť striatálnych neurónov na NMDA receptormi sprostredkovanú cytotoxicitu (F e r n a n d e s, R a y m o n d, 2009). Pacienti s HD vykazujú zvýšené hladiny glycínu v krvnej plazme (R e i l m a n n et al., 1997) či CSF (N i c o l i et al., 1993). U myši s HD tie isté hladiny boli zvýšené v moči aj vo svaloch (T s a n g et al., 2006). Zvýšenie hladín glycínu je primárne dôsledkom mutantnej HTT alebo sekundárne neuronálneho poškodenia HD. To naznačuje možnú úlohu glycínu v patogenéze HD a tiež to, že glycínové väzbové miesto NMDA receptora by mohlo byť atraktívnym cieľom na vývoj liekov HD (C h e n g et al., 2016). V myšiacích HD modeloch boli pozorované mitochondriálne deficity, ktoré viedli k neefektívnemu prenosu elektrónov na produkciu ATP, a teda k zvýšenému energetickému výdaju celého tela katabolizáciou AMK a mastných kyselín ako alternatívnych zdrojov energie (v a n d e r B u r g et al., 2008). Preto pokles plazmatického taurínu a AMK u pacientov s HD môže byť výsledkom aktivácie kompenzačných mechanizmov, aby sa zabezpečil dostatočný prísun energetických substrátov do cyklu kyseliny citrónovej (M o c h e l et al., 2007, U n d e r w o o d et al., 2006). Taurín je najhojnejšou intracelulárnou AMK s obsahom síry (B o u c k e n o o g h e et al., 2006). Je zapojená v mnohých biologických dejoch ako napríklad antioxidantný účinok (B o u c k e n o o g h e et al., 2006), protizápalové procesy (S u n et al., 2012) či neuroprotektia (S u n et al., 2011). Nedostatok taurínu je spojený s úzkosťou, epilepsiou a depresiou. Suplementácia taurínu môže tieto príznaky zmierniť (K o n g et al., 2006). Existujú dôkazy, že oxidačné poškodenie a zápal neurónov hrajú dôležitú úlohu pri patogenéze HD (H s i a o et al., 2013), preto nízka hladina taurínu v plazme môže znamenať progresiu HD. Tiež sa ukázalo, že taurín je v HD potenciálne neuroprotektívny (T a d r o s et al., 2005). Štúdia H e r m a n n a kol. (H e r m a n n et al., 2019) popisuje viacero biologických ciest, zapojených do patológie

HD, vrátane metabolizmu tyrozínu, fenylalanínu a metabolizmu purínov. Metabolizmus tyrozínu, vrátane tyroxínu, L-DOPA a dopamínu, vykazuje najväčší vplyv na základe analýzy dráhy, a preto by mohli zohrávať hlavnú úlohu v progresii choroby. Preukázali sa znížené hladiny tyroxínu pacientov manifestujúcich HD v porovnaní s premanifestujúcimi jedincami. Nižšie hladiny tyroxínu u pacientov premanifestujúcich HD boli spojené s vyššou mierou závažnosti ochorenia prejavujúcou sa v najbližších 5 rokoch (K a l l i o l i a et al., 2015, A z i z et al., 2010). Metabolizmus tyrozínu je spoločným menovateľom rovnako pre AD a PD (K o r i et al., 2016). Hormóny štítnej žľazy, vrátane tyroxínu, sú syntetizované a uvoľňované štítnou žľazou a následne transportované do CNS (D r a t m a n et al., 1983). Podieľajú sa na regulácii homeostázy energie a sú dôležité pre normálne fungovanie mozgu. HTT divokého typu sa viaže na receptor tyroidového hormónu, nukleárny receptor pre jodovaný produkt tyroxínu a trijódtyronínu, čo môže byť dôvodom zmeny metabolizmu tyrozínu. Dopamín a L-DOPA sú súčasťou dopaminergnej dráhy metabolizmu tyrozínu, kde je dopamín produkovaný jeho prekursorom L-DOPA, ktorý sa ďalej syntetizuje z tyrozínu a fenylalanínu, z ktorých sa všetky produkty objavili u pacientov s HD v znížených hladinách, pričom miera ich zníženia súvisela so závažnosťou ochorenia (H e r m a n n et al., 2019). Tyrozín je esenciálna AMK, ktorá ľahko prechádza hematoencefalickou bariérou, a je prekursorom biosyntézy neurotransmiterov sympatikového nervového systému dopamínu, norepinefrínu a epinefrínu. L-fenylalanín je zase prekursor tyrozínu, čím sa stáva aj prekursorom týchto katecholamínových neurotransmiterov. Hyperaktivita sympatikového nervového systému je u pacientov s HD preukázaná (G r a h a m et al., 2016), preto zvýšená syntéza neurotransmiterov vedie k deplícii prekursorov tyrozínu a L-fenylalanínu vo frontálnej aj striatálnej oblasti (G r a h a m et al., 2016). Výrazné zmeny metabolizmu tyrozínu boli rovnako dokázané aj v post mortem tkanivách pacientov s HD (T a b r i z i et al., 2012, G r a h a m et al., 2016).

## ZÁVER

Vďaka časovo nenáročnej a podrobnej analýze veľkého množstva dát sa metabolomika stáva sľubným nástrojom pre včasnú diagnostiku vyvíjajúcich sa neurodegeneratív-

nych ochorení. Navyše predstavuje vysoko individualizovaný prístup pre každého pacienta. Vyhodnocuje celé metabolické dráhy, vďaka čomu sa okrem stanovenia presnej diagnózy dokáže zvoliť cieľná liečba.

## LITERATÚRA

1. **ADVOKAT, C., PELLEGRIN, A. I. (1992):** Excitatory amino acids and memory: evidence from research on Alzheimer's disease and behavioral pharmacology. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 16, 13–24.
2. **ALAM, Z. I., JENNER, A., DANIEL, S. E., LEES, A. J., CAIRNS, N., MARSDEN, C. D., JENNER, P., HALLIWELL, B. (1997):** Oxidative DNA damage in the parkinsonian brain: an apparent selective increase in 8-hydroxyguanine levels in substantia nigra. *J. Neurochem.*, 69, 1196–203.
3. **AMANZADEH, M., MOGHADDASI, H., RABIEI, R., AMINI HARANDI, A., HAGHIGHI, H. (2019):** Difficulties of Diagnosing Alzheimer's Disease: The Application of Clinical Decision Support Systems. *Archives of Advances in Biosciences*, 9, 47–54.
4. **ARMSTRONG, M. J., LITVAN, I., LANG, A. E., BAK, T. H., BHATIA, K. P., BORRONI, B., BOXER, A. L., DICKSON, D. W., GROSSMAN, M., HALLETT, M., JOSEPHS, K. A., KERTESZ, A., LEE, S. E., MILLER, B. L., REICH, S. G., RILEY, D. E., TOLOSA, E., TRÖSTER, A. I., VIDAILHET, M., WEINER, W. J. (2013):** Criteria for the diagnosis of corticobasal degeneration. *Neurology*, 80, 496–503.
5. **ASCHERIO, A., LEWITT, P. A., XU, K., EBERLY, S., WATTS, A., MATSON, W. R., MARRAS, C., KIEBURTZ, K., RUDOLPH, A., BOGDANOV, M. B., SCHWID, S. R., TENNIS, M., TANNER, C. M., BEAL, M. F., LANG, A. E., OAKES, D., FAHN, S., SHOULSON, I., SCHWARZSCHILD, M. A. (2009):** Urate as a predictor of the rate of clinical decline in Parkinson disease. *Arch. Neurol.*, 66, 1460–8.
6. **ASSOCIATION, I., REDDY, P., MURRAY, S., LIU, W. (2013):** Knowledge-Driven, Data-Assisted Integrative Pathway Analytics.
7. **AZIZ, N. A., PIJL, H., FRÖLICH, M., ROELFSEMA, F., ROOS, R. A. (2010):** Altered thyrotropic and lactotropic axes regulation in Huntington's disease. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, 73, 540-5.
8. **BACHURIN, S., OXENKRUG, G., LERMONTOVA, N., AFANASIEV, A., BEZNOSKO, B., VANKIN, G., SHEVTZOVA, E., MUKHINA, T., SERKOVA, T. (1999):** N-acetylserotonin, melatonin and their derivatives improve cognition and protect against beta-amyloid-induced neurotoxicity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 890, 155–66.
9. **BIRKS, J. S., HARVEY, R. J. (2018):** Donepezil for dementia due to Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst. Rev.*, 6, Cd001190.
10. **BOLNER, A., PILLERI, M., DE RIVA, V., NORDERA, G. P. (2011):** Plasma and urinary HPLC-ED determination of the ratio of 8-OHdG/2-dG in Parkinson's disease. *Clin. Lab.*, 57, 859-66.
11. **BOUCKENOOGHE, T., REMACLE, C., REUSENS, B. (2006):** Is taurine a functional nutrient? *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, 9, 728–33.
12. **BURNS, A., ILIFFE, S. (2009):** Alzheimer's disease. *Bmj.*, 338, b158.
13. **CALISSANO, P., MATRONE, C., AMADORO, G. (2009):** Apoptosis and *in vitro* Alzheimer disease neuronal models. *Commun. Integr. Biol.*, 2, 163–9.
14. **CIPRIANI, S., CHEN, X., SCHWARZSCHILD, M. A. (2010):** Urate: a novel biomarker of Parkinson's disease risk, diagnosis and prognosis. *Biomark. Med.*, 4, 701–12.
15. **CUTURIC, M., ABRAMSON, R. K., MORAN, R. R., HARDIN, J. W., FRANK, E. M., SELLERS, A. A. (2013):** Serum carnitine levels and levocarnitine supplementation in institutionalized Huntington's disease patients. *Neurol. Sci.*, 34, 93–8.
16. **CZECH, C., BERNDT, P., BUSCH, K., SCHMITZ, O., WIEMER, J., MOST, V., HAMPEL, H., KASTLER, J., SENN, H. (2012):** Metabolite profiling of Alzheimer's disease cerebrospinal fluid. *PLoS One*, 7, e31501.
17. **DE LAU, L. M., BRETELER, M. M. (2006):** Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.*, 5, 525–35.
18. **DI STEFANO, G., MANERBA, M., VETTRAIANO, M. (2013):** NAD metabolism and functions: a common therapeutic target for neoplastic, metabolic and neurodegenerative diseases. *Curr. Top Med. Chem.*, 13, 2918–29.
19. **DRATMAN, M. B., CRUTCHFIELD, F. L., GORDON, J. T., JENNINGS, A. S. (1983):** Iodothyronine homeostasis in rat brain during hypo- and hyperthyroidism. *Am. J. Physiol.*, 245, E185-93.
20. **DUGGER, B. N., DICKSON, D. W. (2017):** Pathology of Neurodegenerative Diseases. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 9.
21. **DUGGER, B. N., HENTZ, J. G., ADLER, C. H., SABBAGH, M. N., SHILL, H. A., JACOBSON, S., CAVINESS, J. N., BELDEN, C., DRIVER-DUNCKLEY, E., DAVIS, K. J., SUE, L. I., BEACH, T. G. (2014):** Clinicopathological outcomes of prospectively followed normal elderly brain bank volunteers. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 73, 244–52.

22. EVIDENTE, V. G., ADLER, C. H., SABBAGH, M. N., CONNOR, D. J., HENTZ, J. G., CAVINESS, J. N., SUE, L. I., BEACH, T. G. (2011): Neuropathological findings of PSP in the elderly without clinical PSP: possible incidental PSP? *Parkinsonism Relat. Disord.*, 17, 365–71.
23. FERNANDES, H. B., RAYMOND, L. A. (2009): Frontiers in Neuroscience NMDA Receptors and Huntington's Disease. In VAN DONGEN, A. M. (ed.): *Biology of the NMDA Receptor*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis Copyright© 2009, Taylor & Francis Group, LLC.
24. FRANCIS, P. T., PALMER, A. M., SNAPE, M., WILCOCK, G. K. (1999): The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 66, 137–47.
25. GEBREGIWORGIS, T., POWERS, R. (2012): Application of NMR metabolomics to search for human disease biomarkers. *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, 15, 595–610.
26. GHASEMI, M., BROWN, R. H., JR. (2018): Genetics of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 8.
27. GMITTEROVÁ, K., HEINEMANN, U., GAWINECKA, J., VARGES, D., CIESIELCZYK, B., VALKOVIC, P., BENETIN, J., ZERR, I. (2009): 8-OHdG in cerebrospinal fluid as a marker of oxidative stress in various neurodegenerative diseases. *Neurodegener Dis.*, 6, 263–9.
28. GRAHAM, S. F., KUMAR, P. K., BJORNDahl, T., HAN, B., YILMAZ, A., SHERMAN, E., BAHADO-SINGH, R. O., WISHART, D., MANN, D., GREEN, B. D. (2016): Metabolic signatures of Huntington's disease (HD): (1)H NMR analysis of the polar metabolome in post-mortem human brain. *Biochim. Biophys. Acta*, 1862, 1675–84.
29. GRUNDKE-IQBAL, I., IQBAL, K., TUNG, Y. C., QUINLAN, M., WISNIEWSKI, H. M., BINDER, L. I. (1986): Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 83, 4913–7.
30. HAN, W., SAPKOTA, S., CAMICOLI, R., DIXON, R. A., LI, L. (2017): Profiling novel metabolic biomarkers for Parkinson's disease using in-depth metabolomic analysis. *Mov. Disord.*, 32, 1720–1728.
31. HAVELUND, J. F., ANDERSEN, A. D., BINZER, M., BLAABJERG, M., HEEGAARD, N. H. H., STENAGER, E., FAERGEMAN, N. J., GRAMSBERGEN, J. B. (2017a): Changes in kynurenine pathway metabolism in Parkinson patients with L-DOPA-induced dyskinesia. *J. Neurochem.*, 142, 756–766.
32. HAVELUND, J. F., HEEGAARD, N. H. H., FAERGEMAN, N. J. K., GRAMSBERGEN, J. B. (2017b): Biomarker Research in Parkinson's Disease Using Metabolite Profiling. *Metabolites*, 7.
33. HERMAN, S., NIEMELÄ, V., EMAMI KHOONSARI, P., SUNDBLOM, J., BURMAN, J., LANDTBLUM, A.-M., SPJUTH, O., NYHOLM, D., KULTIMA, K. (2019): Alterations in the tyrosine and phenylalanine pathways revealed by biochemical profiling in cerebrospinal fluid of Huntington's disease subjects. *Scientific Reports*, 9, 4129.
34. HINZ, F. I., GESCHWIND, D. H. (2017): Molecular Genetics of Neurodegenerative Dementias. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 9.
35. HIRAYAMA, M., NAKAMURA, T., WATANABE, H., UCHIDA, K., HAMA, T., HARA, T., NIIMI, Y., ITO, M., OHNO, K., SOBUE, G. (2011): Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine correlate with hallucinations rather than motor symptoms in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.*, 17, 46–9.
36. HSIAO, H. Y., CHEN, Y. C., CHEN, H. M., TU, P. H., CHERN, Y. (2013): A critical role of astrocyte-mediated nuclear factor- $\kappa$ B-dependent inflammation in Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.*, 22, 1826–42.
37. CHANG, K. H., CHENG, M. L., TANG, H. Y., HUANG, C. Y., WU, Y. R., CHEN, C. M. (2018): Alternations of Metabolic Profile and Kynurenine Metabolism in the Plasma of Parkinson's Disease. *Mol. Neurobiol.*, 55, 6319–6328.
38. CHENG, M. L., CHANG, K. H., WU, Y. R., CHEN, C. M. (2016): Metabolic disturbances in plasma as biomarkers for Huntington's disease. *J. Nutr. Biochem.*, 31, 38–44.
39. JACK, C. R., JR., KNOPMAN, D. S., JAGUST, W. J., SHAW, L. M., AISEN, P. S., WEINER, M. W., PETERSEN, R. C., TROJANOWSKI, J. Q. (2010): Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. *Lancet Neurol.*, 9, 119–28.
40. JANKOVIC, J. (2003): Pathophysiology And Clinical Assessment Of Parkinsonian Symptoms And Signs. *Handbook of Parkinson's disease*.
41. JANKOVIC, J. (2008): Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 79, 368–76.
42. JARRETT, J. T., BERGER, E. P., LANSBURY, P. T., JR. (1993): The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry*, 32, 4693–7.
43. JOHNSON, K. A., SCHULTZ, A., BETENSKY, R. A., BECKER, J. A., SEPULCRE, J., RENTZ, D., MORMINO, E., CHHATWAL, J., AMARIGLIO, R., PAPP, K., MARSHALL, G., ALBERS, M., MAURO, S., PEPIN, L., ALVERIO, J., JUDGE, K., PHILIOSSAINT, M.,

- SHOUP, T., YOKELL, D., DICKERSON, B., GOMEZ-ISLA, T., HYMAN, B., VASDEV, N., SPERLING, R. (2016): Tau positron emission tomographic imaging in aging and early Alzheimer disease. *Ann. Neurol.*, 79, 110–9.
44. KALLIOLIA, E., SILAJDŽIĆ, E., NAMBRON, R., COSTELLOE, S. J., MARTIN, N. G., HILL, N. R., FROST, C., WATT, H. C., HINDMARSH, P., BJÖRKQVIST, M., WARNER, T. T. (2015): A 24-Hour Study of the Hypothalamo-Pituitary Axes in Huntington's Disease. *PLoS One*, 10, e0138848.
45. KIKUCHI, A., TAKEDA, A., ONODERA, H., KIMPARA, T., HISANAGA, K., SATO, N., NUNOMURA, A., CASTELLANI, R. J., PERRY, G., SMITH, M. A., ITOYAMA, Y. (2002): Systemic increase of oxidative nucleic acid damage in Parkinson's disease and multiple system atrophy. *Neurobiol. Dis.*, 9, 244–8.
46. KONG, W. X., CHEN, S. W., LI, Y. L., ZHANG, Y. J., WANG, R., MIN, L., MI, X. (2006): Effects of taurine on rat behaviors in three anxiety models. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 83, 271–6.
47. KORI, M., AYDIN, B., UNAL, S., ARGAS, K. Y., KAZAN, D. (2016): Metabolic Biomarkers and Neurodegeneration: A Pathway Enrichment Analysis of Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease, and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *OmicS*, 20, 645–661.
48. LI, N. J., LIU, W. T., LI, W., LI, S. Q., CHEN, X. H., BI, K. S., HE, P. (2010): Plasma metabolic profiling of Alzheimer's disease by liquid chromatography/mass spectrometry. *Clin. Biochem.*, 43, 992–7.
49. MCCOLGAN, P., TABRIZI, S. J. (2018): Huntington's disease: a clinical review. *Eur. J. Neurol.*, 25, 24–34.
50. MENDEZ, M. F. (2012): Early-onset Alzheimer's disease: nonamnestic subtypes and type 2 AD. *Arch. Med. Res.*, 43, 677–85.
51. MOCHEL, F., CHARLES, P., SEGUIN, F., BARRITAU, J., COUSIEU, C., PERIN, L., LE BOUC, Y., GERVAIS, C., CARCELAIN, G., VASSAULT, A., FEINGOLD, J., RABIER, D., DURR, A. (2007): Early energy deficit in Huntington disease: identification of a plasma biomarker traceable during disease progression. *PLoS One*, 2, e647.
52. MORRIS, M. C., EVANS, D. A., BIENIAS, J. L., SCHERR, P. A., TANGNEY, C. C., HEBERT, L. E., BENNETT, D. A., WILSON, R. S., AGGARWAL, N. (2004): Dietary niacin and the risk of incident Alzheimer's disease and of cognitive decline. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 75, 1093–9.
53. NAGESH BABU, G., GUPTA, M., PALIWAL, V. K., SINGH, S., CHATTERJI, T., ROY, R. (2018): Serum metabolomics study in a group of Parkinson's disease patients from northern India. *Clin. Chim. Acta*, 480, 214–219.
54. NESTOR, P. J., SCHELTENS, P., HODGES, J. R. (2004): Advances in the early detection of Alzheimer's disease. *Nat. Med.*, 10 Suppl, S34–41.
55. NICOLI, F., VION-DURY, J., MALOTEAUX, J. M., DELWAIDE, C., CONFORT-GOUNY, S., SCIAKY, M., COZZONE, P. J. (1993): CSF and serum metabolic profile of patients with Huntington's chorea: a study by high resolution proton NMR spectroscopy and HPLC. *Neurosci. Lett.*, 154, 47–51.
56. REILMANN, R., ROLF, L. H., LANGE, H. W. (1997): Huntington's disease: N-methyl-D-aspartate receptor coagonist glycine is increased in platelets. *Exp. Neurol.*, 144, 416–9.
57. RIZZO, G., COPETTI, M., ARCUTI, S., MARTINO, D., FONTANA, A., LOGROSCINO, G. (2016): Accuracy of clinical diagnosis of Parkinson disease: A systematic review and meta-analysis. *Neurology*, 86, 566–76.
58. RODRÍGUEZ, J. J., NORISTANI, H. N., VERKHRATSKY, A. (2012): The serotonergic system in ageing and Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol.*, 99, 15–41.
59. ROEDE, J. R., UPPAL, K., PARK, Y., LEE, K., TRAN, V., WALKER, D., STROBEL, F. H., RHODES, S. L., RITZ, B., JONES, D. P. (2013): Serum metabolomics of slow vs. rapid motor progression Parkinson's disease: a pilot study. *PLoS One*, 8, e77629.
60. RUDDICK, J. P., EVANS, A. K., NUTT, D. J., LIGHTMAN, S. L., ROOK, G. A., LOWRY, C. A. (2006): Tryptophan metabolism in the central nervous system: medical implications. *Expert Rev. Mol. Med.*, 8, 1–27.
61. SAMAKASHVILI, S., IBÁÑEZ, C., SIMÓ, C., GIL-BEA, F. J., WINBLAD, B., CEDAZO-MÍNGUEZ, A., CIFUENTES, A. (2011): Analysis of chiral amino acids in cerebrospinal fluid samples linked to different stages of Alzheimer disease. *Electrophoresis*, 32, 2757–64.
62. SATO, S., MIZUNO, Y., HATTORI, N. (2005): Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine levels as a biomarker for progression of Parkinson disease. *Neurology*, 64, 1081–3.
63. SEELEY, W. W. (2017): Mapping Neurodegenerative Disease Onset and Progression. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 9.
64. SELKOE, D. J. (2001): Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol. Rev.*, 81, 741–66.
65. SHAO, Y., LE, W. (2019): Recent advances and perspectives of metabolomics-based investigations in Parkinson's disease. *Molecular Neurodegeneration*, 14, 3.
66. SCHWARZSCHILD, M. A., SCHWID, S. R., MAREK, K., WATTS, A., LANG, A. E., OAKES, D., SHOULSON, I., ASCHERIO, A., HYSON, C., GORBOLD, E., RUDOLPH, A., KIEBURTZ, K., FAHN, S., GAUGER, L., GOETZ, C., SEIBYL, J., FORREST, M.,

- ONDRASIK, J. (2008):** Serum urate as a predictor of clinical and radiographic progression in Parkinson disease. *Arch. Neurol.*, 65, 716–23.
- 67. SUN, M., GU, Y., ZHAO, Y., XU, C. (2011):** Protective functions of taurine against experimental stroke through depressing mitochondria-mediated cell death in rats. *Amino Acids*, 40, 1419–29.
- 68. SUN, M., ZHAO, Y., GU, Y., XU, C. (2012):** Anti-inflammatory mechanism of taurine against ischemic stroke is related to down-regulation of PARP and NF- $\kappa$ B. *Amino Acids*, 42, 1735–47.
- 69. SUZUKI, T., OISHI, M., MARSHAK, D. R., CZERNIK, A. J., NAIRN, A. C., GREENGARD, P. (1994):** Cell cycle-dependent regulation of the phosphorylation and metabolism of the Alzheimer amyloid precursor protein. *EMBO J.*, 13, 1114–22.
- 70. TABRIZI, S. J., REILMANN, R., ROOS, R. A., DURR, A., LEAVITT, B., OWEN, G., JONES, R., JOHNSON, H., CRAUFURD, D., HICKS, S. L., KENNARD, C., LANDWEHRMEYER, B., STOUT, J. C., BOROWSKY, B., SCAHILL, R. I., FROST, C., LANGBEHN, D. R. (2012):** Potential endpoints for clinical trials in premanifest and early Huntington's disease in the TRACK-HD study: analysis of 24 month observational data. *Lancet Neurol.*, 11, 42–53.
- 71. TADROS, M. G., KHALIFA, A. E., ABDEL-NAIM, A. B., ARAFA, H. M. (2005):** Neuroprotective effect of taurine in 3-nitropropionic acid-induced experimental animal model of Huntington's disease phenotype. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 82, 574–82.
- 72. TANG, Z., LIU, L., LI, Y., DONG, J., LI, M., HUANG, J., LIN, S., CAI, Z. (2016):** Urinary Metabolomics Reveals Alterations of Aromatic Amino Acid Metabolism of Alzheimer's Disease in the Transgenic CRND8 Mice. *Curr. Alzheimer Res.*, 13, 764–76.
- 73. TODD, S., BARR, S., ROBERTS, M., PASSMORE, A. P. (2013):** Survival in dementia and predictors of mortality: a review. *Int. J. Geriatr. Psychiatry*, 28, 1109–24.
- 74. TREZZI, J. P., GALOZZI, S., JAEGER, C., BARKOVITS, K., BROCKMANN, K., MAETZLER, W., BERG, D., MARCUS, K., BETSOU, F., HILLER, K., MOLLENHAUER, B. (2017):** Distinct metabolomic signature in cerebrospinal fluid in early parkinson's disease. *Mov. Disord.*, 32, 1401–1408.
- 75. TSANG, T. M., WOODMAN, B., MCLOUGHLIN, G. A., GRIFFIN, J. L., TABRIZI, S. J., BATES, G. P., HOLMES, E. (2006):** Metabolic characterization of the R6/2 transgenic mouse model of Huntington's disease by high-resolution MAS 1H NMR spectroscopy. *J. Proteome Res.*, 5, 483–92.
- 76. UNDERWOOD, B. R., BROADHURST, D., DUNN, W. B., ELLIS, D. I., MICHELL, A. W., VACHER, C., MOSEDALE, D. E., KELL, D. B., BARKER, R. A., GRAINGER, D. J., RUBINSZTEIN, D. C. (2006):** Huntington disease patients and transgenic mice have similar pro-catabolic serum metabolite profiles. *Brain*, 129, 877–86.
- 77. VAN DER BRUG, M. P., SINGLETON, A., GASSER, T., LEWIS, P. A. (2015):** Parkinson's disease: From human genetics to clinical trials. *Sci. Transl. Med.*, 7, 205ps20.
- 78. VAN DER BURG, J. M., BACOS, K., WOOD, N. I., LINDQVIST, A., WIERUP, N., WOODMAN, B., WAMSTEEKER, J. I., SMITH, R., DEIERBORG, T., KUCHAR, M. J., BATES, G. P., MULDER, H., ERLANSON-ALBERTSSON, C., MORTON, A. J., BRUNDIN, P., PETERSÉN, A., BJÖRKQVIST, M. (2008):** Increased metabolism in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *Neurobiol. Dis.*, 29, 41–51.
- 79. VAN DUJIN, E., KINGMA, E. M., VAN DER MAST, R. C. (2007):** Psychopathology in verified Huntington's disease gene carriers. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.*, 19, 441–8.
- 80. WEXLER, A. 2006.** Huntington disease. *J R Soc Med*, 99, 53.
- 81. WHEELOCK, V. L., TEMPKIN, T., MARDER, K., NANCE, M., MYERS, R., ZHAO, H., KAYSON, E., ORME, C., SHOULSON, I. (2003):** Predictors of nursing home placement in Huntington Disease. *Neurology*, 60, 998–1001.
- 82. YAO, W., JI, F., CHEN, Z., ZHANG, N., REN, S. Q., ZHANG, X. Y., LIU, S. Y., LU, W. (2012):** Glycine exerts dual roles in ischemic injury through distinct mechanisms. *Stroke*, 43, 2212–20.





Laboratórna Diagnostika, XXVIII, 1, 2023: 49–52

## MIKROBIOLOGICKÁ ANALÝZA ROZVINUTÉHO ZUBNÉHO KAZU PRED A PO OŠETRENÍ LASEROM MICROBIOLOGICAL ANALYSIS OF DEVELOPED TOOTH DECAY BEFORE AND AFTER LASER TREATMENT

Jana Ohlasová<sup>1</sup>, Dana Ohlasová<sup>2</sup>, Vladimíra Tomečková<sup>3</sup>, Beáta Hubková<sup>3</sup>  
Anna Birková<sup>3</sup>, Beáta Čižárová<sup>3</sup>, Silvia Timková<sup>1</sup>

<sup>1</sup>I. stomatologická klinika UPJŠ LF a UNLP, Košice

<sup>2</sup>Klinická mikrobiológia, Nemocnica Poprad a.s., Poprad

<sup>3</sup>Ústav lekárskej a klinickej biochémie UPJŠ LF, Košice

e-mail: vladimira.tomeckova@upjs.sk

### SÚHRN

Cieľom tejto experimentálnej štúdie bolo mikrobiologické vyhodnotenie rastu bakteriálnych kolónií v rozvinutom zubnom kaze pred a po ošetrení laserom. Odber kariézneho dentínu sa realizoval z okluzálnych a aproximálnych kavít v trvalej dentícii pomocou tampónov. V extrahovaných vzorkách kariézneho dentínu (n = 20) boli pomocou mikrobiologickej analýzy identifikované prevažne kariogénne baktérie. Baktérie boli eliminované po ošetrení laserom Er: YAG. Toto experimentálne preparačné ošetrenie zubného kazu je perspektívne aj v blízkej budúcnosti a môže nahradiť konvenčné metódy, keďže je vysoko efektívne nielen v odstraňovaní infikovaného dentínu, ale aj v eliminácii prítomných patogénnych baktérií, ktoré sa podieľajú na tvorbe zubného kazu.

**Kľúčové slová:** zubný kaz; baktérie ústnej dutiny; laser; mikrobiologická analýza

### ABSTRACT

The aim of this experimental study was to microbiologically evaluate the growth of bacterial colonies in developed tooth decay before and after laser treatment.

Carious dentin collection was performed from occlusal and proximal cavities in permanent dentition using swabs. Predominantly cariogenic bacteria were identified in the extracted carious dentin samples (n = 20) by microbiological analysis. Bacteria were eliminated after Er: YAG laser treatment. This experimental preparatory treatment of dental caries is promising in the near future and can replace conventional methods, as it is highly effective not only in removing infected dentin, but also in eliminating the pathogenic bacteria present, which are involved in the formation of dental caries.

**Key words:** tooth decay; oral bacteria; laser, microbiological analysis

### ÚVOD

V súčasnosti sa zubný kaz lieči odstránením poškodeného zubného tkaniva, náhradou vyvráteného tkaniva umelým výplňovým materiálom, ktorý má rôzne nedostatky, keďže má inú chemickú štruktúru ako zub. Ideálna je prirodzená regenerácia zuba, a preto sú nevyhnutné komplexné informácie o ekologickom mikrobióme ústnej dutiny, mikroštruktúre skloviny, dentínu, cementu a drene, ale aj mechanizmu regenerácie tvrdého zubného tkaniva.

Hydroxyapatit je základnou stavebnou jednotkou skloviny, dentínu, zubného cementu a kostí. Kryštalizuje z amorfného prekursora  $\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x} \cdot n\text{H}_2\text{O}$  na šesťuholníkový kryštál s chemickým vzorcom  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ , ktorý sa najčastejšie uvádza vo forme diméru  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , keďže každá kryštalická jednotka obsahuje dve entity. V každom zube sa hydroxyapatit nachádza v približnom počte 5–12 miliónov kryštálov, pričom jeden kryštál má v priereze priemer 60–70 nm, šírku 25–30 nm a dĺžku 50–1000 nm.

Skutočná veľkosť kryštálov hydroxyapatitu skloviny je ovplyvnená okrem iného prítomnosťou stopových prvkov. Hydroxyapatit je iónomenič, s vysokým špecifickým povrchom. Katióny vápnika  $\text{Ca}^{2+}$  môžu byť vymenené za horčík  $\text{Mg}^{2+}$ , železo  $\text{Fe}^{2+}$ , zinok  $\text{Zn}^{2+}$ , meď  $\text{Cu}^{2+}$  a sodík  $\text{Na}^+$ . Hydroxylové  $\text{OH}^-$  a fosforečnanové anióny  $\text{PO}_4^{3-}$  môžu byť vymenené za uhličitanové  $\text{CO}_3^{2-}$ , chloridové  $\text{Cl}^-$  a fluoridové  $\text{F}^-$  (S h a g i r i a kol., 2022). Na veľkosť kryštálov hydroxyapatitu vplyva aj obsah bielkovín. Počas tvorby zubnej skloviny (amelogenézy) vylučujú ameloblasty proteíny, ako je amelogenín, ameloblastín a amelotín. V tomto dynamickom procese slúžia ako matrica pre zabudovanie iónov vápnika i fosforu a usmerňujú rast kryštálov hydroxyapatitu v sklovine (S h a o a kol., 2022).

Hydroxyapatit je alkalický a je veľmi citlivý na kyseliny, ktoré ho môžu poškodiť až rozpustiť (S o u n a h, M a d f a, 2020). Zvýšený príjem sacharidov znižuje pH v ústnej dutine, čo umožní rast rôznych patogénnych baktérií, ktoré tvoria rôzne kyseliny, ktoré poškodzujú sklovinu zubov (B u d a kol., 2021).

Sliny prirodzene ochraňujú zuby svojím zložením a pH. Presýtenie slín iónmi  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{PO}_4^{3-}$  pri fyziologickom pH zaisťuje, že tieto ióny pomocou difúzie prechádzajú do lézií s nedostatkom minerálov, kde iniciujú remineralizáciu. Zloženie slín je tak ovplyvnené aj potravinami s obsahom hydroxyapatitu, ako sú listy a stonky rastlín, napríklad bazalka, mäta a zelený čaj, červené riasy, ale aj mušle, vývary z rybiech a zvieracích kostí (hlavne hovädzích). Aplikácia jemných práškov z vaječných škrupín, ulity slimákov, perál (zložky zubných pást) sa tiež podieľajú na udržiavaní alkalického pH slín a správnom minerálnom zložení slín a skloviny (S a k h a r e a kol., 2021).

Ak má strava dlhodobu nevhodnú zloženie, sliny nedokážu tlmiť vplyv kyselín. Tvorba zubného kazu je spojená s prítomným mikrobiómom (S t e r z e n b a c h a kol., 2020). Cieľom tejto experimentálnej štúdie je študovať

patogénne aj nepatogénne zastúpenie baktérií v zubnom kaze pred a po ošetrovaní laserom.

## MATERIÁL A METÓDY

Štúdie sa zúčastnilo dvadsať pacientov vo veku 19 až 43 rokov s rozvinutou kariéznou léziou. Pred ošetrovaním boli pacienti poučení a podpísali informovaný súhlas pacienta. Odber kariézneho dentínu sa realizoval z okluzálnych a aproximálnych kavít v trvalej dentícii pred a po ošetrovaní laserom (erbium-doped yttrium aluminium garnet laser, erbium YAG laser, Er: YAG Light walker AT-S, s vlnovou dĺžkou  $\lambda = 2940$  nm, FOTONA, Slovinsko) pomocou tampónov. Po laserovej ablácii, bola na overenie prítomnosti infikovaných tkanív použitá svetelná sonda pre fluorescenčnú detekciu kazu (Fluorescence Aided Caries Excavation, FACE). Žiadnemu pacientovi nebola podaná anestéza. V extrahovaných vzorkách kariézneho dentínu boli pomocou mikrobiologickej analýzy identifikované rôzne druhy baktérií. Kultivácia baktérií bola uskutočnená na kultivačných pôdach krvný agar (BD Columbia Agar with 5 % Sheep Blood, MkB Test a. s., Rosina, Slovakia) a chromogénny agar s chromogénnou zmes, ktorá umožňuje detekciu aktivít špecifických enzýmov a zaručuje tak diferenciáciu určitých druhov alebo skupín mikroorganizmov (UriSelectTM4, BioRad, USA).

## VÝSLEDKY

Vo vzorkách rozvinutého kariézneho dentínu boli u pacientov pred ošetrovaním zubného kazu laserom po 24 hodinách a 48 hodinách inkubácie identifikované pomocou mikrobiologickej analýzy rôzne bakteriálne druhy. Na krvnom agare (Tab. 1) a chromogénnom agare (Tab. 2) boli identifikované kariogénne, ale aj nekariogénne druhy. Z nekariogénnych baktérií boli detegované v rozvinutom zubnom kaze koaguláza-negatívny stafylokok *S. haemolyticus* a *Neisseria Lactamica*, avšak väčšinou prevažovali kariogénne baktérie *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiela pneumoniae*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus faecium* *Enterococcus faecalis*, *Acinetobacter*, *Neisseria sicca*.

**Tabuľka 1. Bakteriálne druhy detegované v rozvinutom kariéznom dentíne, krvný agar**

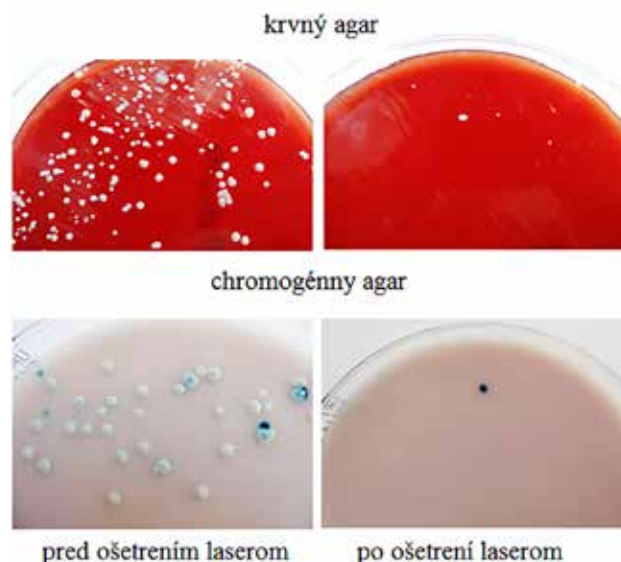
Gram <sup>+</sup>	Gram <sup>-</sup>
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	<i>Acinetobacter</i> spp.
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
koaguláza-negatívne stafylokoky, CoNS <i>S. epidermidis</i> , <i>S. haemolyticus</i>	<i>Neisseria lactamica</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Neisseria sicca</i>
<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Neisseria sufflava</i>

**Tabuľka 2. Chromogénna identifikácia baktérií, chromogénny agar**

<b>kolónie ružovej farby</b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>kolónie modrofialovej farby</b>	<i>Klebsiella</i> spp., <i>Enterobacter</i> spp.
<b>kolónie bez farebnej zmeny (biele)</b>	<i>Acinetobacter</i> spp., <i>Staphylococcus aureus</i>

Pred ošetrením zubného kazu laserom boli vo všetkých vzorkách kariézneho dentínu identifikované kariogénne druhy *Streptococcus mutans* a *Lactobacillus* spp. charakteristické pre pokročilé lézie zubného kazu. Oba kariogénne druhy rástli v živnom médiu po 48 hodinách inkubácie (Tab. 1).

Chromogénne kultivačné médium um ožnilo selektívnu identifikáciu baktérií s enzymovou aktivitou  $\beta$ -galaktozidázy,  $\beta$ -glukozidázy a tryptofán-deamidázy (Tab. 2). *Escherichia coli* boli identifikované na základe aktivity  $\beta$ -galaktozidázy, ktorá štiepi prítomný chromogénny substrát zakotvený v chromogénnom kultivačnom médiu a spôsobuje ružové zafarbenie kolónií. *Klebsiella* a *Enterobacter* vykazujú aktivitu  $\beta$ -galaktozidázy aj  $\beta$ -glukozidázy a vytvárajú tak modro-fialové zafarbenie kolónií. Očakávaná farba kolónií *Acinetobacter* a *Staphylococcus aureus* bola biela. Po ošetrení laserom došlo k eliminácii väčšiny baktérií (Obr. 1).



**Obrázok 1. Semi-kvantitatívne vyhodnotenie rastu bakteriálnych kolónií v zubnom kaze pred a po ošetrení laserom Er:Yag**

## DISKUSIA

Mikrobióm ústnej dutiny človeka je ekologické spoločenstvo komenzálnych, symbiotických a patogénnych mikroorganizmov, ktoré pozostáva z viac ako 1000 rôznych bakteriálnych druhov s odhadovaným počtom okolo 20 miliárd baktérií. Rôzne štruktúry a tkanivá ústnej dutiny sú kolonizované odlišnými mikrobiálnymi kolóniami. Hypotéza ekologického plaku popisuje nerovnováhu v celkovej mikroflóre v dôsledku ekologického stresu, čo vedie k prevahe niektorých patogénnych baktérií napr. typom výživy, ktorý má najväčší vplyv na ekológiu ústnej dutiny (R a d a i c, K a p i l a, 2021).

Normálna bakteriálna flóra ústnej dutiny obsahuje bakteriálne druhy s arginolytickým charakterom, ako sú *Streptococcus australis* a ďalšie, ktoré silne antagonizujú patogénne baktérie. Zubný povlak metabolizuje sacharidy aj aminokyseliny. Arginín deamináza je enzým, ktorý premieňa arginín na ornitín, amoniak a oxid uhličitý. Ornitín a amoniak zvyšujú pH ústnej dutiny s regeneračným účinkom na tvrdé zubné tkanivá (N a s c i m e n t o a k o l., 2019).

Tvorbu biofilmu v ústnej dutine ovplyvňujú interakcie a adhézia. Proces mikrobiálnej adhézie možno rozdeliť do rôznych krokov: transport mikroorganizmov na povrch, reverzibilná adhézia k povrchu, prechod k ireverzibilnej adhézii a tvorba biofilmu. Ireverzibilná bakteriálna adhézia je výsledkom mnohých reverzibilných väzbových inte-

rakcií. Adherujúci bakteriálny biofilm sa podieľa na vzniku zubného kazu (S t e r z e n b a c h a kol., 2020).

Mikrobiálne kolónie v rozvinutom kaze sú rôznorodé, obsahujú najmä baktérie *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus*, *Acinetobacter* a ďalšie (W o f f a kol., 2019).

Nové terapeutické metódy na regeneráciu zubov vyžadujú včasnú detekciu zubného kazu, minimálne invazívnu, bezbolestnú, selektívnu preparáciu zubného kazu a elimináciu patologického mikrobiómu. Tieto podmienky preparácie tvrdého zubného tkaniva aktuálne spĺňajú lasery, keďže laser bezkontaktné interaguje s tvrdým zubným tkanivom, minimálne invazívne ošetrí zubný kaz, tak aby sa nepoškodilo zdravé zubné tkanivo. Tento selektívny netradičný prístup má terapeutický potenciál v klinickej praxi (K u h n a kol., 2021).

Na odstránenie infikovaného dentínu v tejto štúdii bol experimentálne použitý laser Er:YAG. Vo vzorkách po laserovej terapii boli prítomné baktérie len v minimálnom rozsahu. Pacienti pri laserovej bezkontaktné ablácii ocenili znížené vnímanie bolesti bez aplikácie lokálnej anestézie pri preparácii zubného kazu. Nevýhodou metódy je dvojnásobne dlhší čas preparácie zubného kazu v porovnaní s konvenčným prístupom preparácie. Tento nový prístup si vyžaduje interdisciplinárny systematický výskum a spoluprácu vo viacerých vedných oblastiach: chémia, biochémia, fyzika, mikrobiológia a stomatológia.

## ZÁVER

Navrhnuté experimentálne preparačné ošetrovanie zubného kazu je perspektívne v blízkej budúcnosti a môže nahradiť konvenčné metódy, keďže je vysoko efektívne nielen v odstraňovaní infikovaného dentínu, ale aj v eliminácii prítomných patogénnych baktérií, ktoré sa podieľajú na tvorbe zubného kazu.

## POĎAKOVANIE

*Práca bola podporená grantom VEGA 1/0333/20.*

## LITERATÚRA

- Bud, E. S. et al. (2021):** Observational Study Regarding the Relationship between Nutritional Status, Dental Caries, Mutans *Streptococci*, and *Lactobacillus* Bacterial Colonies. *International journal of environmental research and public health*, 18(7), pp. 3551. doi: 10.3390/ijerph18073551.
- Kuhn, K. et al. (2021):** Er:YAG laser-induced damage to a dental composite in simulated clinical scenarios for inadvertent irradiation: an *in vitro* study. *Lasers in medical science*, doi: 10.1007/s10103-021-03348-4.
- Nascimento, M. M. a kol. (2019):** Arginine metabolism in supragingival oral biofilms as a potential predictor of caries risk. *JDR Clinical and Translational Research*, 4(3): 260–270. doi: 10.1177/2380084419834234.
- Radaic, A., Kapila, Y. L. (2021):** The oralome and its dysbiosis: New insights into oral microbiome-host interactions. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 19:1335-1360. doi: 10.1016/j.csbj.2021.02.010.
- Saghiri, M. A. et al. (2022):** Functional role of inorganic trace elements in dentin apatite tissue-Part 1: Mg, Sr, Zn, and Fe. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 71:126932. doi:10.1016/j.jtemb.2022.126932
- Sakhare, S. et al. (2021):** A comparative evaluation of probiotic formulations in prevention of dental caries: A clinical study. *Journal of the Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry*, 39(4), pp. 416–422. doi: 10.4103/jisppd.jisppd\_236\_21.
- Shao C. et al. (2022):** Regulation of Hydroxyapatite Nucleation *In Vitro* through Ameloblastin-Amelogenin Interactions [published online ahead of print, 2022 Jan 24]. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2022;10.1021/acsbiomaterials.1c01113. doi:10.1021/acsbiomaterials.1c01113
- Sounah, S. A., Madfa, A. A. (2020):** Correlation between dental caries experience and the level of *Streptococcus mutans* and *lactobacilli* in saliva and carious teeth in a Yemeni adult population. *BMC research notes*, 13(1), pp. 112. doi: 10.1186/s13104-020-04960-3.
- Sterzenbach, T. et al. (2020):** Bioadhesion in the oral cavity and approaches for biofilm management by surface modifications. *Clinical oral investigations*, 24(12), pp. 4237–4260. doi: 10.1007/s00784-020-03646-1.
- Woff, D. et al. (2019):** Amplicon – based microbiome study highlights the loss of diversity and the establishment of a set of species in patients with dentin caries. *PLoS One*, 14(7): e0219714. doi: 10.1371/journal.pone.0219714.



Laboratórna Diagnostika, XXVIII, 1, 2023: 53–60

## LIPIDOMIKA: POTENCIÁLNY NÁSTROJ VČASNEJ DIAGNOSTIKY NÁDOROVÝCH OCHORENÍ MOZGU

### LIPIDOMICS: THE POTENTIAL TOOL FOR EARLY DIAGNOSIS OF BRAIN CANCER

Andrea Leškaničová<sup>1</sup>, Patrik Šimko<sup>1</sup>, Nicol Urbanská<sup>1</sup>, Peter Petík<sup>2</sup>  
Alžbeta Blichárová<sup>2</sup>, Nela Žideková<sup>3</sup>, Martin Kertys<sup>3</sup>, Terézia Kisková<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ústav biologických a ekologických vied PF UPJŠ, Košice

<sup>2</sup>Ústav patológie UPJŠ LF a UN LP, Košice

<sup>3</sup>Ústav farmakológie JLF UK v Martine

e-mail: terezia.kiskova@upjs.sk

#### SÚHRN

Malígne gliómy sú jedným z typov nádorov mozgu, ktoré najviac vzdorujú liečbe. Rozvoj rezistencie na rádioterapiu a chemoterapiu rovnako prispieva k agresívnym fenotypom týchto nádorov. Za posledných 50 rokov sa zistila zvýšená hladina lipidov a produktov ich metabolizmu v gliómoch. Molekulárne mechanizmy, vďaka ktorým neoplasticky transformované tkanivá získavajú a využívajú tieto lipidy, však doposiaľ nie sú dobre známe. V našej štúdií sme pozorovali 3 skupiny lipidov. V skupine fosfatidylcholínov sa počas skorého štádia rakoviny mozgu zistilo 48 % signifikantne zmenených metabolitov u samíc a 66,2 % metabolitov u samcov potkanov kmeňa Sprague Dawley. V skupine lyzofosfatidylcholínov bolo množstvo zmenených metabolitov 57,1 % u samíc a 64,3 % u samcov. Najzaujímavejšie výsledky sme pozorovali v skupine sfingomyelínov, kde vyše 85 % metabolitov bolo signifikantne zvýšených pri rakovine mozgu oproti kontrolnej skupine u oboch pohlaví.

**Kľúčové slová:** glioblastóm; nádory mozgu; metabolomika; lipidový metabolizmus

#### ABSTRACT

Malignant gliomas are one of the most treatment-resistant types of brain tumors. The development of resistance to radiotherapy and chemotherapy also contributes to the aggressive phenotypes of these tumors. Over the past 50 years, an increased level of lipids and products of their metabolism has been found in gliomas. However, the molecular mechanisms by which neoplastically transformed tissues acquire and use these lipids are still not well understood. In our study, we observed 3 groups of lipids. In the phosphatidylcholine group, 48 % of significantly altered metabolites in female and 66.2 % of metabolites in male Sprague Dawley rats were found during the early stage of brain cancer. In the group of lysophosphatidylcholines, the amount of changed metabolites was 57.1 % in females and 64.3% in males. We observed the most interesting results in the sphingomyelin group, where over 85 % of metabolites were significantly increased in brain cancer compared to the control group in both sexes.

**Key words:** glioblastoma; brain tumors; metabolomics; lipid metabolism

## ÚVOD

Nádory mozgu a centrálného nervového systému patria k najfatálnejším typom rakoviny. Vyznačujú sa vysokou mierou morbidita a mortality (Miller et al., 2021). Hoci sú primárne malígne mozgové nádory zriedkavé, vykazujú vysokú mieru úmrtnosti. Len tretina pacientov preživa viac ako 5 rokov po diagnostikovaní ochorenia (Siegel et al., 2021). Najzhubnejšou formou mozgového nádoru je multiformný glioblastóm (glioblastoma multiforme, GBM), zvyčajne sa nachádza v hemisférach mozgu a vzniká buď de novo, alebo menej často malignitou nižších stupňov astrocytómov (Liu et al., 2016, O'Leary, Aldape, 2014). Pacienti s touto diagnózou zvyčajne prežívajú 6 až 18 mesiacov po jej diagnostikovaní. Hoci má GBM veľmi zlú prognózu, možnosti liečby sú extrémne obmedzené. Liečba je štandardne paliatívna, čiže zameraná na starostlivosť o pacientov, zmiernenie bolesti, podporu ich rodiny, rádioterapeutická alebo chemoterapeutická, zriedkavo chirurgická (Silant'ev et al., 2019). Vzhľadom na absenciu účinnej liečby je pre výber personalizovanej liečby kľúčová včasná diagnostika spojená s presnou klasifikáciou nádoru (O'Leary, Aldape, 2014). Dôležitým aspektom, ktorý je potrebné brať do úvahy pri diagnostike mozgového nádoru, je jeho vysoká vnútorná heterogenita, ktorá je pre nové ale aj recidivujúce nádory charakteristická (Johnson et al., 2014). Morfologicky odlišné bunky mozgu totiž vykazujú rôznu *in vitro* inváziu a schopnosť migrácie v závislosti od okolitého mikroprostredia (Koh et al., 2018, Hawkins et al., 2020). Identifikácia zmien v koncentráciách malých molekúl alebo nízkomolekulových zlúčenín v rakovinových bunkách v porovnaní so zdravými bunkami môže byť použitá ako diagnostický, prognostický alebo klasifikačný marker typu nádoru (Longuespée et al., 2018, Mörén et al., 2018). Malé molekuly zahŕňajú bunkové lipidy, metabolity a organické zlúčeniny schopné rýchlo difundovať cez bunkové membrány, čím sa dostanú do intracelulárnych a extracelulárnych priestorov (Spalding et al., 2016).

Už v 20. rokoch 20. storočia Otto Warburg pozoroval jav, že nádorové bunky a tkanivá s dostatkom glukózy produkujú veľké množstvo laktátu bez ohľadu na to, či je alebo nie je prítomný v tkanive kyslík. Tento jav je v porovnaní s normálnymi tkanivami, v ktorých sa laktát výrazne produkuje len v neprítomnosti kyslíka odlišný. Označuje sa ako Warburgov efekt (Warburg, 1956).

Neskôr boli objavené ďalšie metabolické zmeny nádorových buniek a tkanív, ktoré charakterizujú rakovinu. Následná transformácia nádorových buniek získava niekoľko charakteristických znakov, ktoré uľahčujú proliferáciu a inváziu. V dôsledku toho sa významne mení metabolizmus glukózy, bielkovín a lipidov v nádorových bunkách (Lui, Chen, 2014). Metabolické profilovanie neoplastických pacientov môže poskytnúť neoceniteľné informácie o mechanizmoch, ktoré sú základom onkogenézy, progresie nádorov a tiež reakcií na liečbu. Navyše, metabolické profilovanie rastúcich nádorov môže viesť k identifikácii nových diagnostických alebo prognostických biomarkerov, čo má veľký praktický klinický význam (Lui, Chen, 2014).

## METÓDA

### Zvieratá a podmienky

V experimente sa použila rodičovská generácia potkanov kmeňa *Sprague Dawley* (Velaz, Praha, Česká republika) (10 samíc, 5 samcov). Zvieratá boli adaptované na štandardné podmienky zvieratníka s teplotou 21–24 °C, relatívnou vlhkosťou 50–65 % a na svetelný režim 12:12 hodín (svetlo/tma). Zvieratá boli křímené štandardnými potkanmi peletami Altromin 1328 (Velaz, Praha, Česká republika) podľa legislatívy EÚ pre krmivá a usmernenia a mali voľný prístup k vode z vodovodu. Rodičovské samice sa spáрили s rodičovskými samcami. Na ďalšie experimenty sa použilo potomstvo. So zvieratami sa zaobchádzalo podľa smerníc ustanovených zákonom č. 377 a 436/2012 Slovenskej republiky o starostlivosti a používaní laboratórnych zvierat a schválených Štátnou veterinárnou a potravinovou správou Slovenskej republiky (číslo schválenia: Ro-2219/19 -221/3).

### Experimentálny dizajn

Gravidné samice boli rozdelené do dvoch skupín. Jedna skupina slúžila ako kontrolná a jedna ako GBM skupina (zvieratá nesúce nádor). Karcinogénna látka Etyl-nitroso-urea (ENU) bola podávaná ako jedna intraperitoneálna dávka (100 mg/kg b. w.) GBM samiciam na 15. deň gravidity, ako je opísané v uvedených štúdiách (Bulnes-Sesma, Ullibarri-Ortiz de Zárate, Lafuente-Sánchez, 2006; Koestner, Swenber, Wechsler, 1971; Bulnes et al., 2012). Po na-

rodení bolo potomstvo ponechané s matkami po dobu 30 dní a následne bolo rozdelené podľa pohlavia. Vo veku 4 mesiacov boli potkany usmrtené, mozgy boli vybraté a tiež bola odobratá krv, aby sa zistili rozdiely v lipidomike.

### Odber krvi a metabolické meranie

Krv zo všetkých experimentálnych zvierat sa odobrala z *vena caudalis* v celkovom objeme 100 µl do mikroskúmaviiek. Miesto odberu bolo ošetrené dezinfekčným prostriedkom. Po izolácii sa krvné sérum skladovalo pri -80 °C. Zmrazené sérum sa rozmrazilo a použilo sa na ďalšiu analýzu. Vzorky boli merané súpravou Absolutel DQ p180 (BIOCRATES Life Sciences AG, Innsbruck (Rakúsko)). Nasledovala prietoková injekčná analýza (FIA) a cielené metabolické meranie vybranej skupiny lysoPC, PC na báze kvapalinovej chromatografie a tandémovej hmotnostnej spektrometrie (LCMS/MS). Plne automatizovaný test bol založený na derivatizácii PITC (fenyliizotiokyanát) v prítomnosti vnútorných štandardov a následne FIA-MS/MS a LC-MS/MS s použitím SCIEX 4000 QTRAP® (SCIEX, Darmstadt, Nemecko) alebo prístroja Waters XEVO™ TQMS (Waters, Viedeň, Rakúsko) s elektrosprejovou ionizáciou. Test bol založený na princípe opísanom v štúdiu Pena a kol. (Pena et al., 2016). Určené hodnoty boli log<sub>2</sub>-transformované, aby sa získali normálne údaje a stabilizoval rozptyl.

### Štatistické analýzy

Kvantifikácia koncentrácií metabolitov sa uskutočnilo pomocou softvérového balíka MetIQ (BIOCRATES Life Sciences AG, Innsbruck, Rakúsko). Vnútorné štandardy slúžili ako referencia pre výpočty koncentrácie metabolitov.

Jednorozmerná (t-test) a viacrozmerná štatistika (partial least square - discrimination analysis; čiastočná analýza najmenších štvorcov PLS-DA), ako aj faktor dôležitosti z analýzy PLS-DA (variable importance projection – VIP), boli vykonané pomocou MetaboAnalyst 3.0 (24). Taktiež sme použili analýzu Fold Change na charakterizovanie najvýznamnejších metabolitov.

### VÝSLEDKY

Nádory mozgu indukované použitím m ENU boli prevažne solídne, lokalizované v bielej a sivej hmote. Tvorili skoré štádiá nádorov.

Nameraných bolo celkovo 102 lipidových metabolitov zo skupín fosfatidylcholínov (PC), lyzofosfatidylcholínov (lysoPC) a sfingomyelínov (SM). Porovnávali sa zdravé aj GBM zvieratá, a to v závislosti aj nezávisle od pohlavia.

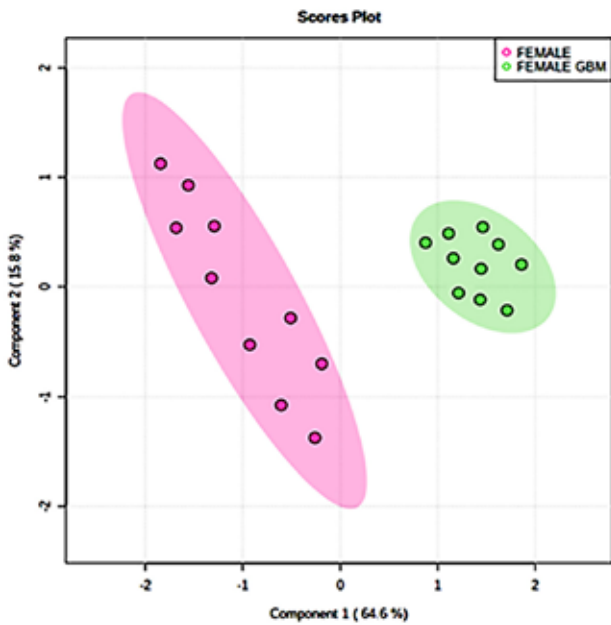
V skupine samíc bolo v ranom štádiu rakoviny mozgu signifikantne zmenených celkovo 36 zo 74 PC, čo predstavuje 48,6 %. Z nich 16 (44,4 %) malo vyššie hladiny u GBM samíc, zatiaľ čo zvyšných 20 (55,6 %) malo vyššie hladiny u intaktných samíc. V skupine lysoPC bolo 8 zo 14 (57,1 %) metabolitov významne zmenených, 2 (25 %) mali vyššie hladiny u GBM samíc a 6 (75 %) malo vyššie hladiny v skupine intaktných samíc. Najzaujímavejšie výsledky sme pozorovali v skupine sfingomyelínov, kde 12 zo 14 (85,8 %) metabolitov bolo signifikantne zvýšených počas rakoviny mozgu (skupina GBM).

V skupine samcov sa signifikantne zmenilo celkovo 49 zo 74 fosfatidylcholínov, čo predstavuje 66,2 %. Z nich

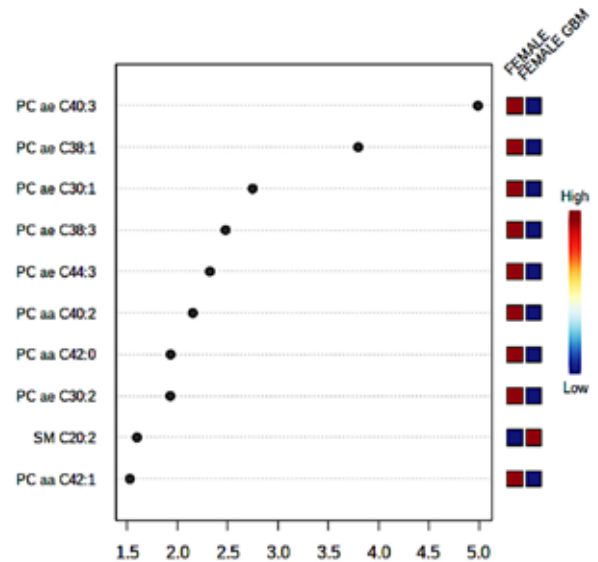


**Obr. 1. Solídne nádory indukované ENU. Farbenie pomocou HE**

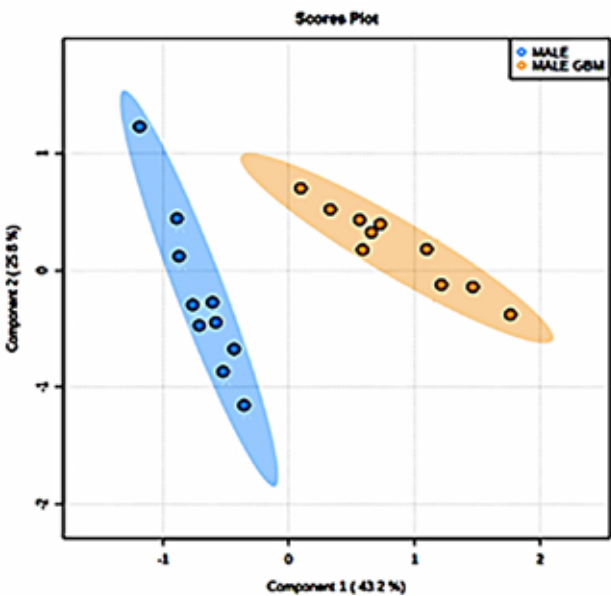
A – Mozgové tkanivo so solídnym nádorom v perihypokampálnej oblasti mozgu v hlbokoj bielej hmote mozgu; 40-násobné zväčšenie, solídny nádor označený červeným rámcikom. B – Mozgové tkanivo s dvoma solídnymi nádormi v oblasti corpus callosum v hlbokoj bielej hmote; 40-násobné zväčšenie, dva nádory označené červeným rámcikom



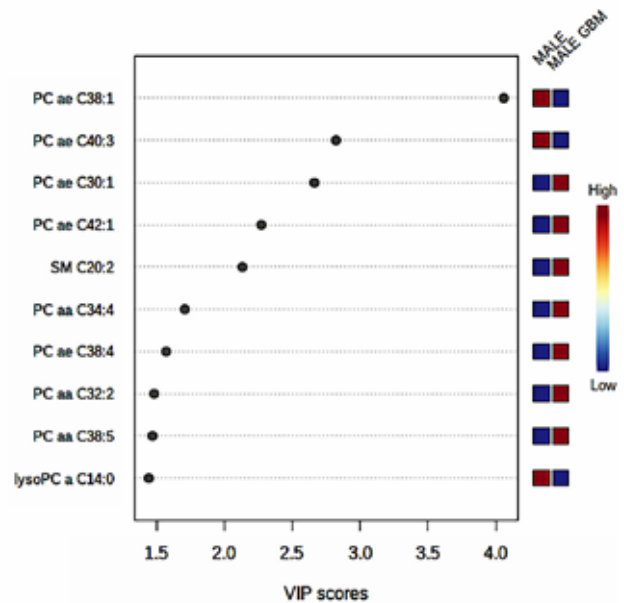
Obr. 2. Čiastočná diskriminačná analýza najmenších štvorcov (Partial least squares-discrimination analysis, PLS-DA) vybraných metabolitov u GBM a intaktných samičiach. V grafickom výstupe sú zahrnuté 95 % elipsy spoľahlivosti pre konkrétne skupiny



Obr. 3. Graf premennej dôležitosti v projekcii (VIP), vypočítaný metódou PLS-DA, zobrazuje 10 najdôležitejších vlastností metabolitov identifikovaných pomocou PLS-DA. Políčka vpravo označujú relatívnu koncentráciu zodpovedajúceho metabolitu v krvi v zostupnom poradí dôležitosti. VIP je vážený súčet druhých mocnín PLS-DA zaťaženi, berúc do úvahy množstvo vysvetlenej Y-premennej v každej dimenzii. Najdôležitejšie vlastnosti majú VIP hodnoty >1,5



Obr. 4. Čiastočná diskriminačná analýza najmenších štvorcov (Partial least squares-discrimination analysis, PLS-DA) vybraných metabolitov u GBM a intaktných samcov. V grafickom výstupe sú zahrnuté 95 % elipsy spoľahlivosti pre konkrétne skupiny



Obr. 5. Graf premennej dôležitosti v projekcii (VIP), vypočítaný metódou PLS-DA, zobrazuje 10 najdôležitejších vlastností metabolitov identifikovaných pomocou PLS-DA. Políčka vpravo označujú relatívnu koncentráciu zodpovedajúceho metabolitu v krvi v zostupnom poradí dôležitosti. VIP je vážený súčet druhých mocnín PLS-DA zaťaženi, berúc do úvahy množstvo vysvetlenej Y-premennej v každej dimenzii. Najdôležitejšie vlastnosti majú VIP hodnoty >1,5

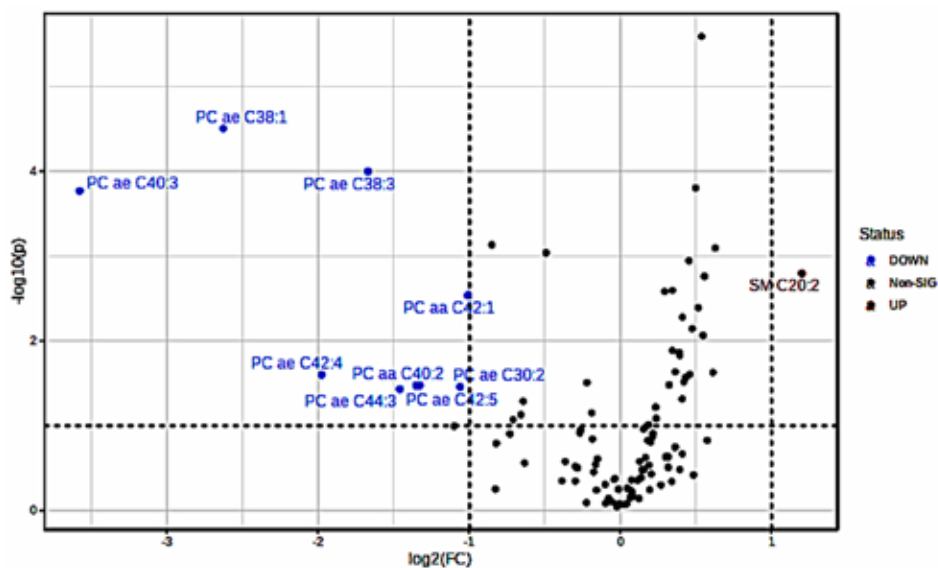


	Compounds	Fold Change	log <sub>2</sub> (FC)
1	PC ae C40:3	0.083717	-3.5783
2	PC ae C38:1	0.16185	-2.6272
3	PC ae C42:4	0.25423	-1.9758
4	PC ae C38:3	0.31453	-1.6687
5	PC ae C44:3	0.36375	-1.459
6	PC aa C40:2	0.39181	-1.3518
7	PC ae C42:5	0.39875	-1.3265
8	SM C20:2	2.3005	1.202
9	PC aa C42:0	0.46668	-1.0995
10	PC ae C30:2	0.47993	-1.0591
11	PC aa C42:1	0.49718	-1.0082

Obr. 6. Dôležité metabolity identifikované fold change analýzou  
Tabuľka bola vytvorená v softvéri Metaboanalyst

41 (83,6 %) malo vyššie hladiny u GBM samcov, zatiaľ čo 8 (16,4 %) malo vyššie hladiny u intaktných samcov. V skupine lysoPC bolo 9 zo 14 (64,3 %) metabolitov významne zmenených, 5 (55,6 %) malo vyššie hladiny u GBM samcov a 4 (44,4 %) mali vyššie hladiny v skupine intaktných samcov. Najzaujímavejšie výsledky sme opäť pozorovali v skupine sfingomyelínov, kde bolo signifikantne zmenených 11 zo 14 (78,6 %) metabolitov. Všetky vykazovali zvýšené hladiny u GBM samcov.

Pri porovnávaní údajov nezávisle od pohlavia s cieľom nájsť metabolit, ktorý charakterizuje ochorenie v počiatkových štádiách bez ohľadu na pohlavie, sme odhalili, že



Obr. 7. Dôležité vlastnosti vybrané pomocou volcano plot analýzy násobnej zmeny (x) 2 a prahom t-testov (y) 0,1. Červené kruhy predstavujú prvky nad prahom. Násobné zmeny aj hodnoty p sú logaritmicke transformované. Čím ďalej je jeho poloha od (0,0), tým významnejší je prvok

mnohé znaky sú rovnaké u samcov aj samíc. Najdôležitejším metabolitom sa ukázal byť SM C20:2.

Ostatné signifikantne znížené metabolity boli prevažne zo skupiny PC (PC ae C38:1; PC ae C38:3; PC ae C40:3; PC aa C42:1; PC aa C40:2; PC ae C42:4; PC ae C42:5; PC ae C30:2; PC ae C44:3).

Podľa VIP skóre, vypočítaného metódou PLS-DA, bolo určených 5 najdôležitejších metabolitov. Počas skorých štádií rakoviny mozgu sa zistilo, že PC ae C40:3, PC ae C38:1, PC ae C38:3 a PC ae C42:4 sú exkluzívne markery. Ďalším dôležitým metabolitom je SM C20:2, ktorý je počas rakoviny mozgu výrazne zvýšený.

## DISKUSIA

Od roku 2007 Svetová zdravotnícka organizácia (WHO) klasifikuje gliómy na základe ich bunkového typu a agresivity, pričom trieda I pozostáva z benígnych nádorov a trieda IV zahŕňa najagresívnejšie typy nádorov. GBM je mozgový nádor triedy IV (Chhabda et al., 2016). Včasná diagnostika rakoviny mozgu zostáva výzvou, pretože novo navrhované lieky musia spĺňať špecifické požiadavky, ako je schopnosť prekonať hematoencefalickú bariéru (BBB) a účinná infiltrácia nádoru (Cava z o s, B r e n n e r, 2016). V roku 2016 WHO zaviedla nové usmernenia pre diagnostiku mozgových gliómov na základe nových genómových markerov. Pridanie týchto nových markerov

k už existujúcim diagnostickým metódam poskytlo novú úroveň presnosti diagnostiky gliómu a predikcie účinnosti liečby. Napriek tomuto novému klasifikačnému nástroju má GBM naďalej jednu z najvyšších mier úmrtnosti medzi nádormi CNS. Metabolomika je obzvlášť sľubným nástrojom na analýzu mozgových nádorov a potenciálnych metód ich liečby, keďže je to jediný „omický“ prístup, ktorý môže poskytnúť metabolický „podpis“ fenotypu nádoru (J a r o c h, M o d r a k o w s k a, B o j k o, 2021).

Pri štúdiu rakoviny mozgu u ľudí existuje veľa nekontrolovateľných faktorov, ako je anamnéza liekov, vek pacienta alebo životné podmienky. V tomto ohľade predstavujú zvieracie modely základný krok na skúmanie nervových obvodov alebo molekulárnych a bunkových dráh v kontrolovanom prostredí (L e s k a n i c o v a et al., 2021). Cieľom našej štúdie bolo odhaliť zmeny v lipidomike počas skorých štádií chemicky indukovanej rakoviny mozgu laboratórnych potkanov, a to aj v závislosti od pohlavia.

Rýchly rast a delenie patria medzi hlavné charakteristiky malígnych nádorov. Vzhľadom na dôležitú úlohu lipidov pri tvorbe bunkovej membrány a prenose signálov je identifikácia rozdielov v zložení lipidov medzi nádorovými a normálnymi tkanivami, s cieľom nájsť možné diagnostické a prognostické biomarkery pre pacientov s rakovinou, dlhodobým úsilím vedcov (G u o, B e l l, C h a k r a v a r t i, 2013).

Zdravie a funkcia nervového systému je úzko spätá s homeostázou lipidov. Mozog je druhou najväčšou zásobárňou lipidov v tele, hneď za tukovým tkanivom (R a l h a n et al., 2021; P e t r e l l i, K n o b l o c h, A m a t i, 2022). Normálne bunky využívajú hlavne glukózu a mastné kyseliny na výrobu energie a splnenie požiadaviek na rast buniek. Rakovinové bunky však využívajú zmenený metabolizmus na udržanie rýchleho rastu. Tento zmenený metabolizmus, kde rakovinové bunky využívajú vyššie hladiny glukózy na výrobu energie anaeróbnou glykolýzou namiesto aeróbnou glykolýzou prostredníctvom cyklu trikarboxylových kyselín (TCA), sa nazýva Warburgov efekt (W a r b u r g, 1956). Znížené hladiny lipidov pozorované v tkanive mozgového nádoru môžu naznačovať, že okrem glukózy z anaeróbnou glykolýzou závisí od mastných kyselín ako zdroja paliva. Potenciálne zvýšená hladina lipolýzy v mozgových rakovinových bunkách generuje energiu na proliferáciu rakovinových buniek a vedie k celkovému zníženiu hladiny detekovaných lipidov (H e et al., 2007, C a m p a n e l l a, 1992). CNS má špecializované dráhy na syntézu a degradá-

ciu lipidov súvisiace s jeho špecializovanou fyziológiou a funkciou (H e et al., 2007). K zníženiu obsahu lipidov teda môžu viesť dva scenáre: mozgové tkanivo bohaté na lipidy nahradzujúce nádorové bunky bohaté na lipidy by celkovo znížilo množstvo lipidov, zatiaľ čo nádorové bunky by pravdepodobne využívali aj normálne fyziologické dráhy súvisiace s metabolizmom lipidov v centrálnom nervovom tkanive. V literatúre je množstvo správ, že syntetáza mastných kyselín je vysoko regulovaná pri rôznych druhoch rakoviny vrátane GBM a môže byť dobrým terapeutickým cieľom (F l a v i n et al., 2010).

Štúdie o úlohe metabolizmu sfingolipidov sa v posledných rokoch stali neoddeliteľnou súčasťou výskumu rakoviny. Sfingomyelíny (SM), prevládajúce sfingofosfolipidy v bunkovej membráne, a ich hydrolýza sfingomyelinázami sú nevyhnutné pre účinnosť chemo- a rádioterapie. Sfingomyelín je tiež kľúčovou zložkou bunkovej membrány, ktorá interaguje s cholesterolom a glycerofosfolipidmi, čím sa podieľa na tvorbe a udržiavaní lipidových mikrodomén. Lipidové rafty sú dôležité signálne platformy, ktorých štruktúra je citlivá na zloženie membránových lipidov (S i m o n s, T o m r e, 2000), rovnako ako proteíny, ktoré interagujú s týmito a inými membránovými mikrodoménami (d e A l m e i d a, F e d o r o v, P r i e t o, 2003; d e A l m e i d a et al., 2005). Preto modifikácie obsahu SM ovplyvňujú signálne dráhy spojené s lipidovým raftom (H u i t e m a et al., 2004).

V našej štúdii sme pozorovali najzaujímavejšie výsledky v skupine sfingolipidov, kde 12 zo 14 metabolitov, čo predstavuje 85,8 %, metabolitov bolo významne zmenených počas rakoviny mozgu u žien a 11 zo 14, čo predstavuje 78,6 % u mužov. Zhaw a kol. vo svojej štúdii tiež identifikovali sfingomyelíny ako biomarkery gliómových nádorov (Z h a i et al., 2019).

Sfingolipidová dráha hrá kľúčovú úlohu pri určovaní bunkového osudu, vďaka čomu je atraktívnym liekovým cieľom v procesoch, ako sú zápaly, kardiovaskulárne ochorenia, cukrovka a rakovina (M a c e y k a, Spiegel, 2014; H a d i et al., 2015). Predovšetkým súčasná terapia GBM indukuje viaceré účinky na sfingolipidovú dráhu. Ionizujúce žiarenie spôsobuje jedno a dvojlátkové zlomy v DNA, ale tiež aktivuje kyslú sfingomyelinázu, aby vyvolala konverziu sfingomyelínu nachádzajúceho sa v bunkových membránach na ceramid (M i r z a y a n s et al., 2013). Toto obohatenie ceramidu v plazmatickej membráne vedie k zhlukovaniu receptorov bunkovej smrti,

čo podporuje apoptózu (Grassmé, Riethmüller, Gulbins, 2007). TMZ tiež spôsobuje zlomy dvojvláknovej DNA a ukázalo sa, že podporuje akumuláciu ceramidu v bunkách GBM (Grassmé, Riethmüller, Gulbins, 2007). To je v súlade so známymi účinkami mnohých chemoterapií, ktoré často aktivujú tvorbu ceramidov prostredníctvom viacerých mechanizmov, vrátane aktivácie ceramidsyntáz, pričom táto akumulácia ceramidu hrá hlavnú úlohu v mechanizme účinku mnohých z týchto látok (Ekiz, Baran, 2011; Truman et al., 2014; Oskoui a Saaba, 2010). Súčasná terapia GBM teda čiastočne fungujú tak, že menia metabolizmus sfingolipidov na zvýšenie proapoptotických hladín ceramidu. Zvýšený metabolizmus ceramidov napríklad prostredníctvom zvýšených hladín sfingozínkináz, kyslej ceramidázy alebo glukozylceramidsyntázy, ktoré sa bežne pozorujú pri mnohých rakovinách, môže odstrániť tento zvýšený ceramid a prekonať rádio/chemoterapiu (Ekiz, Baran, 2011; Truman et al., 2014).

V našej štúdii bolo 48,6 % PC významne zmenených počas skorého štádia rakoviny mozgu u samíc a 66,2 % u samcov. Čo sa týka lysoPC, 57,1 % metabolitov sa významne zmenilo u samíc a 64,3 % u samcov. Podľa VIP projekcie boli najdôležitejšie metabolity: PC ae C:38:1, PC ae C40:3, PC ae C30:1, PC ae C42:1, SM C20:2, PC aa C34:4, PC ae C38:4, PC aa C32:2, PC aa C38:5, lysoPC a C14:0. Najdôležitejšie vlastnosti identifikované analýzou násobnej zmeny boli PC ae C40:3, PC ae C38:1, PC ae C42:4, PC ae C38:3, PC ae C44:3, PC aa C40:2, PC ae C42:5, SM C20:2, PC aa C42:0, PC ae C30:2, PC aa C42:1.

Naše výsledky sú v súlade s niektorými predchádzajúcimi štúdiami. Buentzel a kol. vo svojej štúdii zistili významné zmeny v hladinách metabolitov PC aa C38:5, PC ae C38:3, PC aa C40:2, kde metabolit PC aa C38:5 a lysoPC C26:0 boli spojené s výrazne kratším celkovým prežitím, čo zdôrazňuje prognostický význam tohto zistenia (Buentzel et al., 2021). V súlade s tým Guo a kol. už skôr opísali, že odchýlky lysoPC boli spojené s progresiou rakoviny (Guo et al., 2012). Schmid a kol. po kontrole pre viacnásobné testovanie uviedli, že lysoPC a C18:0, PC aa C36:2, PC aa C36:3, PC aa C38:3, PC aa C38:5, PC aa C40:2, PC aa C40:3, PC aa C40:4, PC aa C40:5, PC aa C42:4, PC aa C42:5 a PC ae C40:1 boli nepriamo spojené s rizikom rakoviny prostaty (Schmid et al., 2017). V našom modeli rakoviny mozgu nastali identické zmeny v PC aa C40:2, PC ae C30:2, PC aa C42:1 a PC aa C38:5.

## Podakovanie

Táto práca bola podporená grantovou agentúrou VEGA (VEGA-1/0658/20; VEGA-1/0081/20) a internými grantovými systémami UPJŠ (VVGS-PF-2022-2136; VVGS-2023-2561).

## LITERATÚRA

1. Buentzel, J. et al. (2021): Metabolomic Profiling of Blood-Derived Microvesicles in Breast Cancer Patients. *Int. J. Mol. Sci.*, 22.
2. Bulnes-Sesma, S., Ullibarri-Ortiz De Zárate, N., Lafuente-Sánchez, J. V. (2006): Tumour induction by ethylnitrosourea in the central nervous system. *Rev. Neurol.*, 43, 733–8.
3. Bulnes, S. et al. (2012): Angiogenic Signalling Pathways Altered in Gliomas: Selection Mechanisms for More Aggressive Neoplastic Subpopulations with Invasive Phenotype. *Journal of Signal Transduction*, 2012, 597915.
4. Campanella, R. (1992): Membrane lipids modifications in human gliomas of different degree of malignancy. *J. Neurosurg. Sci.*, 36, 11–25.
5. Cavazos, D. A. & Brenner, A. J. (2016): Hypoxia in astrocytic tumors and implications for therapy. *Neurobiol. Dis.*, 85, 227–233.
6. De Almeida, R. F. et al. (2005): Lipid rafts have different sizes depending on membrane composition: a time-resolved fluorescence resonance energy transfer study. *J. Mol. Biol.*, 346, 1109–20.
7. De Almeida, R. F. M., Fedorov, A., Prieto, M. (2003): Sphingomyelin/phosphatidylcholine/cholesterol phase diagram: boundaries and composition of lipid rafts. *Biophysical Journal*, 85, 2406–2416.
8. Ekiz, H. A., Baran, Y. (2011): Bioactive sphingolipids in response to chemotherapy: a scope on leukemias. *Anticancer Agents Med. Chem.*, 11, 385–97.
9. Flavin, R. et al. (2010): Fatty acid synthase as a potential therapeutic target in cancer. *Future Oncol.*, 6, 551–62.
10. Grassmé, H., Riethmüller, J., Gulbins, E. (2007): Biological aspects of ceramide-enriched membrane domains. *Prog. Lipid. Res.*, 46, 161–70.
11. Guo, D., Bell, E. H., Chakravarti, A. (2013): Lipid metabolism emerges as a promising target for malignant glioma therapy. *CNS Oncol.*, 2, 289–99.
12. Guo, Y. et al. (2012): Probing gender-specific lipid metabolites and diagnostic biomarkers for lung cancer using Fourier

- transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Clin. Chim. Acta*, 414, 135–41.
13. **Hadi, L. A. et al.:** The Role and Function of *Sphingolipids* in *Glioblastoma Multiforme*. 2015.
  14. **Hawkins, C. C. et al. (2020):** Sphingolipid Metabolism in Glioblastoma and Metastatic Brain Tumors: A Review of Sphingomyelinases and Sphingosine-1-Phosphate. *Biomolecules*, 10.
  15. **He, H. et al. (2007):** Method for lipidomic analysis: p53 expression modulation of sulfatide, ganglioside, and phospholipid composition of U87 MG glioblastoma cells. *Analytical chemistry*, 79, 8423–8430.
  16. **Huitema, K. et al. (2004):** Identification of a family of animal sphingomyelin synthases. *EMBO J.*, 23, 33–44.
  17. **Chhabda, S. et al. (2016):** The 2016 World Health Organization Classification of tumours of the Central Nervous System: what the paediatric neuroradiologist needs to know. *Quantitative imaging in medicine and surgery*, 6, 486–489.
  18. **Jaroch, K., Modrakowska, P., Bojko, B. (2021):** Glioblastoma Metabolomics-In Vitro Studies. *Metabolites*, 11.
  19. **Johnson, B. E. et al. (2014):** Mutational analysis reveals the origin and therapy-driven evolution of recurrent glioma. *Science*, 343, 189–193.
  20. **Koestner, A., Swenberg, J. A., Wechsler, W. (1971):** Transplacental production with ethylnitrosourea of neoplasms of the nervous system in Sprague-Dawley rats. *Am. J. Pathol.*, 63, 37–56.
  21. **Koh, I. et al. (2018):** The mode and dynamics of glioblastoma cell invasion into a decellularized tissue-derived extracellular matrix-based three-dimensional tumor model. *Sci. Rep.*, 8, 4608.
  22. **Leskancicova, A. et al. (2021):** Sex-dependent differences in stress-induced depression in Wistar rats are accompanied predominantly by changes in phosphatidylcholines and sphingomyelins. *J. Physiol. Pharmacol.*, 72.
  23. **Liu, B. et al. (2016):** RND3 promotes Snail 1 protein degradation and inhibits glioblastoma cell migration and invasion. *Oncotarget*, 7, 82411-82423.
  24. **Longuespée, R. et al. (2018):** Rapid detection of 2-hydroxyglutarate in frozen sections of IDH mutant tumors by MALDI-TOF mass spectrometry. *Acta neuropathologica communications*, 6, 21–21.
  25. **Lu, X., Ji, L. J., Chen, J. L. (2014):** Metabolomic profiling of neoplastic lesions in mice. *Methods Enzymol.*, 543, 261–73.
  26. **Maceyka, M., Spiegel, S. (2014):** Sphingolipid metabolites in inflammatory disease. *Nature*, 510, 58–67.
  27. **Miller, K. D. et al. (2021):** Brain and other central nervous system tumor statistics, 2021. *CA Cancer J. Clin.*, 71, 381–406.
  28. **Mirzayans, R. et al. (2013):** Ionizing radiation-induced responses in human cells with differing TP53 status. *Int. J. Mol. Sci.*, 14, 22409–35.
  29. **Mörén, L. et al. (2018):** Metabolomic profiling identifies distinct phenotypes for ASS1 positive and negative GBM. *BMC Cancer*, 18, 167.
  30. **Olar, A., Aldape, K. D. (2014):** Using the molecular classification of glioblastoma to inform personalized treatment. *J. Pathol.*, 232, 165–77.
  31. **Oskouian, B., Saba, J. D. (2010):** Cancer treatment strategies targeting sphingolipid metabolism. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 688, 185–205.
  32. **Pena, M. et al. (2016):** Serum metabolites predict response to angiotensin II receptor blockers in patients with diabetes mellitus. *Journal of translational medicine*, 14, 203.
  33. **Petrelli, F., Knobloch, M., Amati, F. (2022):** Brain lipid metabolism: the emerging role of lipid droplets in glial cells. *Curr. Opin. Lipidol.*, 33, 86–87.
  34. **Ralhan, I. et al. (2021):** Lipid droplets in the nervous system. *J. Cell. Biol.*, 220.
  35. **Schmidt, J. A. et al. (2017):** Pre-diagnostic metabolite concentrations and prostate cancer risk in 1077 cases and 1077 matched controls in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *BMC Med.*, 15, 122.
  36. **Siegel, R. L. et al. (2021):** Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J. Clin.*, 71, 7–33.
  37. **Silantyev, A. S. et al. (2019):** Current and Future Trends on Diagnosis and Prognosis of Glioblastoma: From Molecular Biology to Proteomics. *Cells*, 8.
  38. **Simons, K., Toomre, D. (2000):** Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 1, 31–9.
  39. **Spalding, K. et al. (2016):** A review of novel analytical diagnostics for liquid biopsies: spectroscopic and spectrometric serum profiling of primary and secondary brain tumors. *Brain and behavior*, 6, e00502-e00502.
  40. **Truman, J. P. et al. (2014):** Evolving concepts in cancer therapy through targeting sphingolipid metabolism. *Biochim. Biophys. Acta*, 1841, 1174–88.
  41. **Warburg, O. (1956):** On the origin of cancer cells. *Science*, 123, 309-14.
  42. **Zhai, X. H. et al. (2019):** Novel sphingomyelin biomarkers for brain glioma and associated regulation research on the PI3K/Akt signaling pathway. *Oncol. Lett.*, 18, 6207–6213.



Laboratórna Diagnostika, XXVIII, 1, 2023: 61–66

## VPLYV EXTRAKTU PYCNOGENOL® NA STRESOM INDUKOVANÚ PREDČASNÚ BUNKOVÚ SENESCENCIU EFFECT OF PYCNOGENOL® EXTRACT ON STRESS-INDUCED PREMATURE CELL SENESCENCE

Mária Janubová, Ingrid Žitňanová  
Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie  
Lekárska fakulta Univerzity Komenského v Bratislave

maria.janubova@fmed.uniba.sk

### SÚHRN

Bunková senescencia zohráva významnú úlohu v procese starnutia organizmu. Senescentné bunky hromadia sa so zvyšujúcim sa vekom v organizme prispievajú k zhoršeniu funkcií tkanív a orgánov a rozvoju ochorení spojených so starnutím. V našej práci sme sledovali vplyv extraktu Pycnogenol® na rozvoj stresom indukovanej predčasnej senescencie, nakoľko Pycnogenol® (extrakt z kôry francúzskej prímorskej borovice *Pinus pinaster*) má výrazné antioxidantné vlastnosti a ukazuje sa aj jeho pozitívne pôsobenie na starnúci organizmus.

**Kľúčové slová:** Pycnogenol®; bunková senescencia; MRC-5 ľudské pľúcne fibroblasty

### ABSTRACT

Cellular senescence plays an important role in the aging process. Senescent cells that accumulate in organisms with increasing age contribute to the deterioration of the tissue and organ functions and the development of age-associated diseases. In our work, we analysed the effect of Pycnogenol® extract on the development of stress-induced premature senescence, since Pycnoge-

nol® (extract from the bark of the French maritime pine *Pinus pinaster*) has significant antioxidant properties and its positive effect on the aging organism has been also shown.

**Keywords:** Pycnogenol®; cell senescence; MRC-5 human lung fibroblasts

### ÚVOD

Stresom indukovaná predčasná senescencia je odpoveďou bunky na rôzne druhy stresu vrátane oxidačného stresu, poškodenia DNA, dysfunkcie mitochondrií, nadexpresie protoonkogénov a porušenia epigenetickej regulácie (Di Leonardo a kol., 1994; Chen a kol., 1998; Munro a kol., 2004; Serrano a kol., 1997; Ziegler a kol., 2015).

Senescentné bunky majú zastavený bunkový cyklus a vyznačujú sa viacerými zmenami v bunkovej morfológii a fyziológii (Campisi, d'Adda di Fagnola, 2007). K typickým znakom senescentných buniek patrí ich znížený rast, zväčšený a menej pravidelný tvar, zväčšené jadro, produkcia zvýšeného množstva reaktívnych foriem kyslíka a zvýšená aktivita lyzozomálnej  $\beta$ -galaktozidázy pri pH 6, ktorá je známa ako  $\beta$ -galaktozidáza asociovaná so

senescenciou (SA- $\beta$ -galaktozidáza) (C a m p i s i, d'Á d d a di F a g a g n a, 2007; D i m r i a kol., 1995; P a s s o s a kol., 2010).

V senescentných bunkách je zmenená aj expresia génov. Vo zvýšenej miere sa exprimujú gény, kódujúce proteíny, ktoré sa podieľajú na inhibícii bunkového cyklu ako je p21 a p16 (C a m p i s i, d'Á d d a di F a g a g n a, 2007).

Bolo zistené, že so zvyšujúcim sa vekom sa senescentné bunky hromadia v organizme a prispievajú k zhoršeniu funkcií tkanív a orgánov a rozvoju ochorení spojených so starnutím (B h a t a kol., 2012; J e y a p a l a n, S e d i v y, 2008; M i n a m i n o a kol., 2002; P r i c e a kol., 2002).

Pycnogenol® je polyfenolový extrakt z kôry francúzskej prímorskej borovice *Pinus pinaster*, ktorý je známy svojimi antioxidantnými vlastnosťami. Pycnogenol® dokáže indukovať expresiu antioxidantných enzýmov, zvyšovať aktivitu antioxidantných enzýmov, regenerovať vitamín C a ochraňovať vitamín E a glutatión pred oxidačným stresom. Okrem pozitívneho pôsobenia na metabolizmus antioxidantov Pycnogenol® ovplyvňuje aj tvorbu a prežívanie voľných radikálov. Pycnogenol® má schopnosť inaktivovať superoxidový aniónový a hydroxylový radikál a inhibuje tvorbu singletového kyslíka (G u l a t i, 2005; I r a v a n i, Z o l f a g h a r i, 2011; R o h d e w a l d, 2002; W e i a kol., 1997). Ukazuje sa, že Pycnogenol® tiež ovplyvňuje aj proces starnutia. V myšacom modeli predčasného starnutia Pycnogenol® viedol k zlepšeniu funkcie T- a B-lymfocytov (L i u a kol., 1998). U ľudí bola zaznamenaná zvýšená expresia enzýmov potrebných pre tvorbu kyseliny hyaluronovej (HAS-1) a kolagénu (M a r i n i a kol., 2012). Vplyv extraktu Pycnogenol® na proces bunkovej senescencie zatiaľ nebol dostatočne preskúmaný.

V našej práci sme preto sledovali vplyv extraktu Pycnogenol® na rozvoj peroxidom vodíka indukovanej predčasnej senescencie alebo etopozidom indukovanej predčasnej senescencie.

## METÓDA

### Kultivácia bunkovej línie MRC-5

Bunkovú líniu MRC-5 (ľudské pľúcne fetálne fibroblasty) sme kultivovali v MEM s obsahom 1 % L-glutamínu, 1 % neesenciálnych aminokyselín, 1 % penicilín-streptomycínu a 10 % fetálneho telacieho séra. Bunky sme pasážovali pomocou 0,25 % trypsín-EDTA roztoku.

### Indukcia senescencie v bunkách

Bunky sme nasadili na kultivačné platne a po 24 hodinovej kultivácii pri 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub> sme k nim pridali 100  $\mu$ M peroxid vodíka na 0,5 hodinu alebo 80  $\mu$ M etopozid (VP16) na 1 hodinu. Po uplynutí uvedenej doby sme bunkám vymenili médium a kultivovali ich v termostate pri 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub> do 5. dňa od nasadenia buniek, kedy sme uskutočnili vybrané experimenty.

### Ovplyvnenie buniek extraktom Pycnogenol®

Extrakt Pycnogenol® bol rozpustený v DMSO a skladovaný pri +4 °C ako 50 mg·ml<sup>-1</sup> zásobný roztok.

#### Pre-treatment

Extrakt Pycnogenol® sme v koncentrácii 30–50  $\mu$ g·ml<sup>-1</sup> pridávali k bunkám na 24 hodín pred indukciou senescencie.

#### Post-treatment

Extrakt Pycnogenol® sme v koncentrácii 30–50  $\mu$ g·ml<sup>-1</sup> pridávali k bunkám na 24 hodín po indukciu senescencie.

### Sledovanie vplyvu extraktu Pycnogenol® na rast MRC-5 bunkovej línie

Vplyv extraktu Pycnogenol® na rast MRC-5 bunkovej línie sme sledovali pomocou metyltiazol tetrazoliového (MTT) testu. Bunky sme kultivovali v 96-jamkových platničkách, pričom sme vysievali 10 000 buniek na cm<sup>2</sup>. K bunkám sme hneď pridali extrakt Pycnogenol® v koncentrácii 5, 10, 20, 30, 40 alebo 50  $\mu$ g·ml<sup>-1</sup> a bunky sme kultivovali 24 hodín pri 37 °C a 6 % CO<sub>2</sub>. Po uplynutí 24 hodín sme bunkám vymenili médium a bunky kultivovali do 5. dňa od nasadenia, kedy sme k bunkám pridali 20  $\mu$ l MTT roztoku (5 mg·ml<sup>-1</sup> v 1  $\times$  PBS) do každej jamky a následne sme bunky inkubovali 4 hodiny pri 37 °C a 6 % CO<sub>2</sub>. Po skončení inkubácie sme odsali médium a do každej jamky sme pridali 200  $\mu$ l DMSO a platničku sme na 5 minút umiestnili na trepačku. Absorbanciu sme merali pomocou mikroplatničkového spektrofotometra pri 490 nm.

### Sledovanie vplyvu extraktu Pycnogenol® na rast buniek v podmienkach indukujúcich senescenciu

Vplyv extraktu Pycnogenol® na rast buniek v podmienkach indukujúcich senescenciu sme sledovali pomocou metyltiazol tetrazoliového (MTT) testu. Bunky sme vysiali na 96-jamkové platničky v množstve 10 000 buniek na cm<sup>2</sup>. V bunkách bola následne indukovaná senescencia ako sme popísali v časti Indukcia senescencie v bun-

kách. Bunky boli ovplyvnené extraktom Pycnogenol® buď pred indukciou senescencie (pretreatment) alebo po indukcii senescencie (posttreatment) ako sme uviedli v časti Ovplyvnenie buniek extraktom Pycnogenol®. Po troch dňoch od indukcie senescencie sme k bunkám pridali 20 µl MTT roztoku (5 mg·ml<sup>-1</sup> v 1 × PBS) do každej jamky a inkubovali 4 hodiny pri 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>. Po skončení inkubácie sme odsali médium a do každej jamky sme pridali 200 µl DMSO a platničku sme na 5 minút umiestnili na trepačku. Absorbanciu sme merali pomocou mikroplatničkového spektrofotometra pri 490 nm.

### Štatistické vyhodnotenie výsledkov

Štatistická analýza bola uskutočnená pomocou jednosmernej ANOVY s Bonferroniho korekciou. Hodnota  $p < 0,05$  bola považovaná za štatisticky významnú. Výsledky sú vyjadrené ako priemer ±SD.

## VÝSLEDKY

### Vplyv extraktu Pycnogenol® na rast MRC-5 bunkovej línie

Vplyv extraktu Pycnogenol® na rast MRC-5 bunkovej línie sme sledovali pomocou MTT testu. Bunky sme ovplyvňovali extraktom Pycnogenol® v koncentracii 5, 10, 20, 30, 40 alebo 50 µg·ml<sup>-1</sup>/24 hodín. Žiadna z použitých koncentracií extraktu Pycnogenol® signifikantne neovplyvnila rast MRC-5 buniek v porovnaní s DMSO kontrolou (Obr. 1).

### Vplyv extraktu Pycnogenol® na rast buniek v podmienkach indukujúcich senescenciu

Vplyv extraktu Pycnogenol® na rast buniek v podmienkach indukujúcich senescenciu sme sledovali pomocou MTT testu.

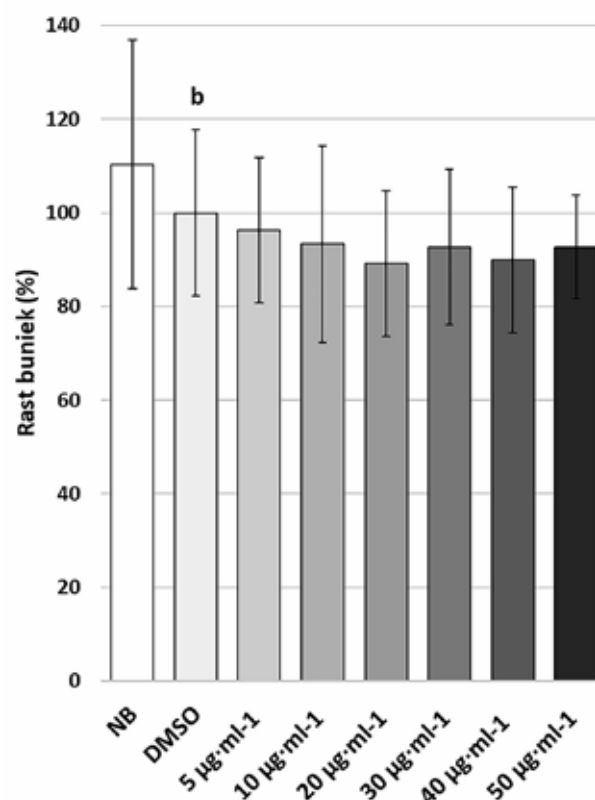
#### Pretreatment

V tomto experimente boli bunky inkubované s extraktom Pycnogenol® 24 hodín pred indukciou senescencie. Signifikantné účinky extraktu Pycnogenol® na rast buniek sme zaznamenali len pri etopozidom indukovanej senescencii. Pycnogenol® v koncentracii 30, 40 alebo 50 µg·ml<sup>-1</sup> výrazne zvýšil rast buniek (135,56 ± 9,52 %, 146,03 ± 9,52 % alebo 137,78 ± 15,87 %), v ktorých bola indukovaná senescencia etopozidom v porovnaní s ED kontrolou (Obrázok 2B). Jedným z markerov senescencie

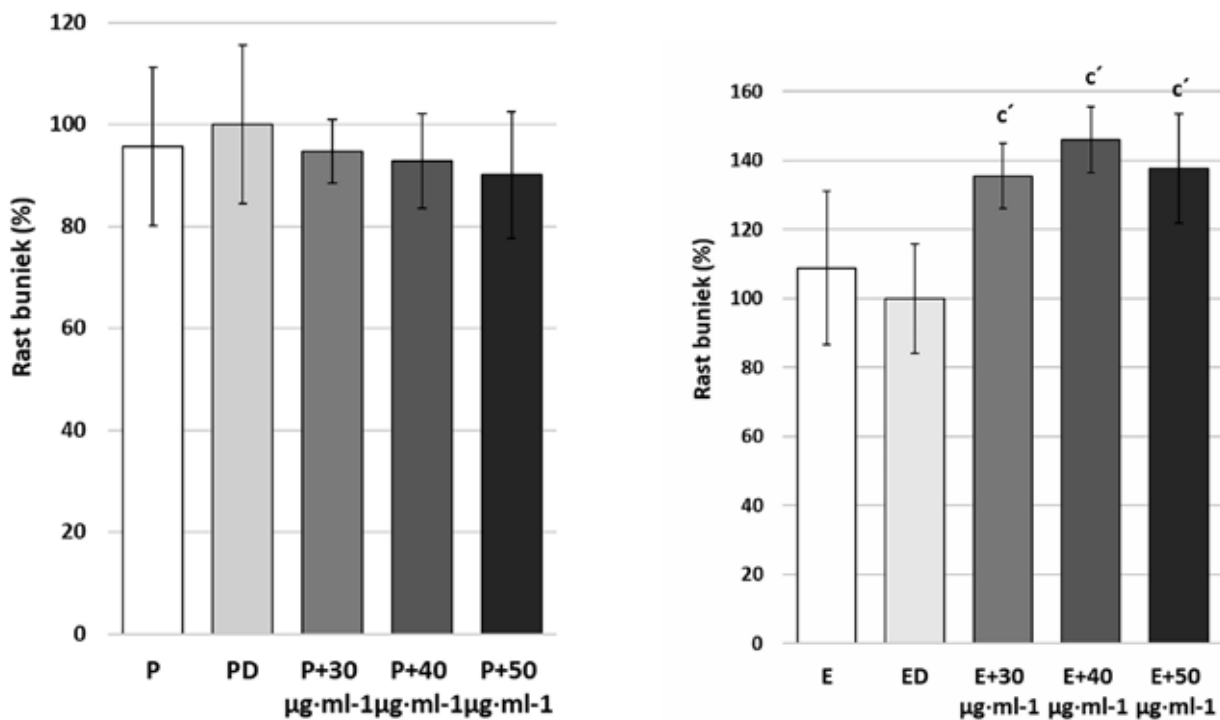
je znížený rast buniek v dôsledku zastavenia bunkového cyklu. Zvýšený rast buniek po pôsobení extraktu Pycnogenol® pravdepodobne poukazuje na existenciu vyššieho množstva proliferujúcich buniek a menšieho množstva senescentných buniek v porovnaní s ED kontrolou.

#### Posttreatment

V tomto experimente boli bunky inkubované s extraktom Pycnogenol® 24 hodín po indukcii senescencie. V prípade peroxidom indukovanej senescencie posttreatment s extraktom Pycnogenol® v koncentracii 30, 40 alebo 50 µg·ml<sup>-1</sup> viedol k poklesu rastu buniek (81,89 ± 16,22 %, 68,92 ± 13,51 % a 60 ± 10,81 %), ktorý bol závislý od použitej koncentracie extraktu Pycnogenol® (Obrázok 3A). Pri etopozidom indukovanej senescencii sme signifikantný účinok pozorovali len pri ovplyvnení buniek s extraktom Pycnogenol® v koncentracii 30 alebo 40 µg·ml<sup>-1</sup>, čo viedlo k miernemu poklesu rastu buniek (86,94 ± 11,11 % alebo 88,61 ± 11,11 %) (Obr. 3B).



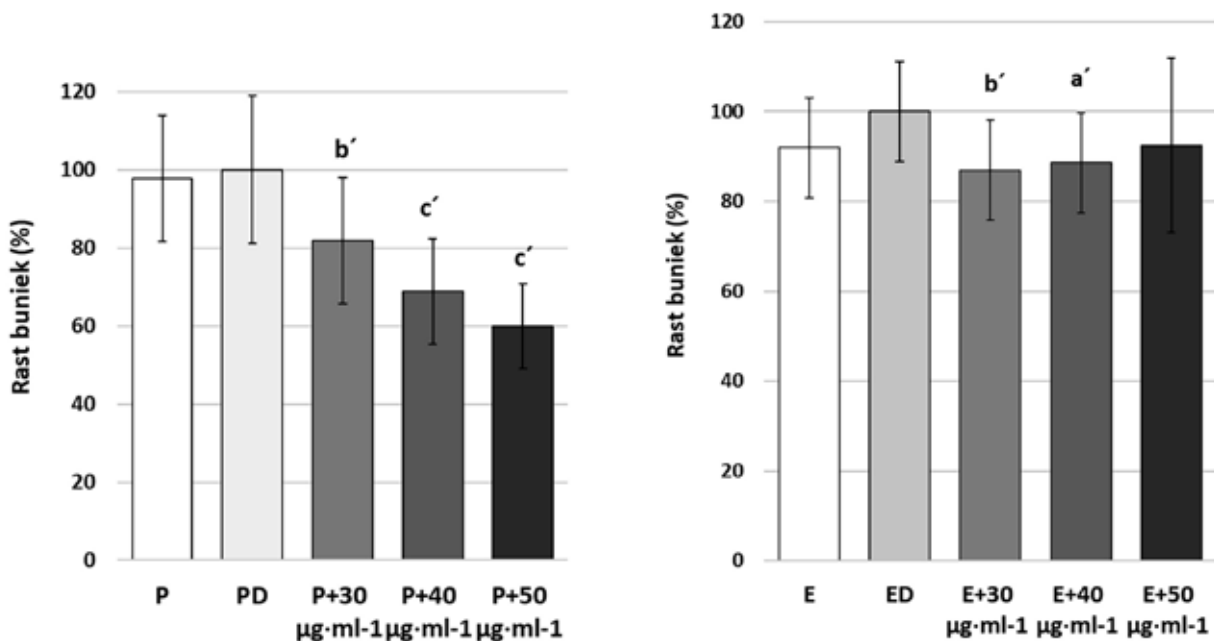
Obr. 1. Vplyv extraktu Pycnogenol® na viabilitu MRC-5 bunkovej línie NB – bunky neovplyvnené extraktom Pycnogenol® alebo DMSO, DMSO – bunky ovplyvnené inkubované s 1000× riedeným DMSO/24 h, 5, 10, 20, 30, 40 alebo 50 µg·ml<sup>-1</sup> – bunky ovplyvnené extraktom Pycnogenol® v koncentracii 5, 10, 20, 30, 40 alebo 50 µg·ml<sup>-1</sup>/24 hodín; Výsledky sú priemer ± SD 3 nezávislých experimentov, každý experiment bol robený v 5–6 jamkách; jednosmerná ANOVA s Bonferroniho korekciou; NB vs. DMSO:  $b - p < 0.01$ ; DMSO vs. 5, 10, 20, 30, 40 alebo 50 µg·ml<sup>-1</sup>



**Obr. 2. Vplyv extraktu Pycnogenol® na rast buniek v podmienkach indukujúcich senescenciu – pretreatment**

**A – peroxidom indukovaná senescencia; B – etopozidom indukovaná senescencia**

P – bunky ovplyvnené 100  $\mu\text{M}$  peroxidom vodíka/0,5 hod; E – bunky ovplyvnené 80  $\mu\text{M}$  etopozidom/1 hod; PD/ED – bunky inkubované s 1000x riedeným DMSO/24 h a následne ovplyvnené 100  $\mu\text{M}$  peroxidom vodíka/0,5 hod alebo 80  $\mu\text{M}$  etopozidom/1 hod, P/E + 30, 40 alebo 50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  – bunky inkubované s extraktom Pycnogenol® v koncentrácii 30, 40 alebo 50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ /24 hodín a následne ovplyvnené 100  $\mu\text{M}$  peroxidom vodíka/0,5 hod alebo 80  $\mu\text{M}$  etopozidom/1 hod; Výsledky sú priemer  $\pm$  SD 3 nezávislých experimentov, každý experiment bol robený v 4–6 jamkách; jednosmerná ANOVA s Bonferroniho korekciou; P vs. PD alebo E vs ED; PD vs. P + 30, 40 alebo 50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  alebo ED vs E + 30, 40 alebo 50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ : c' – p < 0.001



**Obr. 3. Vplyv extraktu Pycnogenol® na rast buniek v podmienkach indukujúcich senescenciu – posttreatment**

**A – peroxidom indukovaná senescencia B – etopozidom indukovaná senescencia**

P – bunky ovplyvnené 100  $\mu\text{M}$  peroxidom vodíka/0,5 hod; E – bunky ovplyvnené 80  $\mu\text{M}$  etopozidom/1 hod; PD/ED – bunky ovplyvnené 100  $\mu\text{M}$  peroxidom vodíka/0,5 hod alebo 80  $\mu\text{M}$  etopozidom/1 hod a následne inkubované s 1000x riedeným DMSO/24h, P/E+30, 40 alebo 50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  – bunky ovplyvnené 100  $\mu\text{M}$  peroxidom vodíka/0,5 hod alebo 80  $\mu\text{M}$  etopozidom/1 hod a následne inkubované s extraktom Pycnogenol® v koncentrácii 30, 40 alebo 50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ; Výsledky sú priemer  $\pm$  SD 3 nezávislých experimentov, každý experiment bol robený v 4–6 jamkách; jednosmerná ANOVA s Bonferroniho korekciou; P vs. PD alebo E vs ED; PD vs. P+30, 40 alebo 50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  alebo ED vs E+30, 40 alebo 50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ : a' – p < 0.05, b' – p < 0.01, c' – p < 0.001



## DISKUSIA

V našej práci sme sledovali vplyv extraktu Pycnogenol® na rozvoj peroxidom vodíka indukovanej predčasnej senescencie alebo etopozidom indukovanej predčasnej senescencie.

V prípade peroxidom vodíka indukovanej senescencie sme zaznamenali pokles rastu buniek, ak sa peroxid vodíka pridával k bunkám pred inkubáciou s extraktom Pycnogenol®, zatiaľ čo inkubácia buniek s extraktom Pycnogenol® pred pridaním peroxidu vodíka k bunkám nemala významný účinok na rast buniek.

V predchádzajúcich štúdiách sledujúcich vplyv extraktu Pycnogenol® na bunky vystavené oxidačnému stresu bolo pozorované zvýšené prežívanie buniek a pokles malondialdehydu – markeru lipoperoxidácie. Pycnogenol® bol pridaný k endotelovým bunkám pred ovplyvnením buniek t-butylhydroxyperoxidom (Rong a kol., 1994).

Z uvedeného vyplýva, že pretreatment s extraktom Pycnogenol® je schopný ochrániť bunky pred oxidačným stresom a mohol by viesť aj k poklesu tvorby senescentných buniek vyvolanej oxidačným stresom. V našom prípade sme však takýto účinok nepozorovali. Je možné, že pri pretreatmente s extraktom Pycnogenol® v iných koncentráciách by peroxidom indukovaná senescencia v MRC-5 bunkách bola potlačená.

Je tiež známe, že polyfenoly okrem antioxidantných účinkov môžu mať aj prooxidačné účinky (Trebatická, Ďuračková, 2015).

Za znížený rast buniek v našich experimentoch v prípade posttreatmentu s extraktom Pycnogenol® pri peroxidom indukovanej senescencii by mohol byť zodpovedný práve prooxidačný účinok polyfenolov tvoriacich zložky extraktu Pycnogenol®.

V prípade etopozidom indukovanej senescencie sme pozorovali zvýšenie rastu buniek, ak sa etopozid pridával k bunkám pred inkubáciou s extraktom Pycnogenol®. Posttreatment s extraktom Pycnogenol® viedol k miernemu poklesu rastu buniek.

Bolo zistené, že etopozid okrem inhibície DNA topozimerázy II, dokáže zvyšovať oxidačný stres v bunkách. Konkrétne, etopozid vedie k zníženej expresii 8-oxoguanín glykozylázy, ktorá je potrebná pre opravu DNA, zvýšenej tvorbe 8-hydroxy-2-deoxyguanozínu, zvýšenej lipoperoxidácii a zníženiu množstva redukovaného glutatiónu. Ďalej sa zistilo, že oxidačný stres spôsobený etopozidom je mož-

né potlačiť pomocou flavonoidu wogonínu. Pretreatment s flavonoidom wogonínom zvýšil expresiu 8-oxoguanín glykozylázy, redukoval tvorbu 8-hydroxy-2-deoxyguanozínu a lipoperoxidáciu a zabránil zvýšenej redukcii glutatiónu (Attia a kol., 2013).

Pretreatment s flavonoidom wogonínom však neovplyvnil inhibičný účinok etopozidu na DNA topozimerázu II (Attia a kol., 2013). Podobne pretreatment s extraktom Pycnogenol® mohol potlačiť oxidačný stres vyvolaný etopozidom aj pri etopozidom indukovanej senescencii v MRC-5 bunkách, čo malo za následok zvýšenie rastu buniek, nakoľko Pycnogenol® je extrakt obsahujúci flavonoidy. Zvýšený rast buniek by mohol poukazovať na existenciu vyššieho množstva proliferujúcich buniek a menšieho množstva senescentných buniek, čo je však potrebné potvrdiť ďalšími experimentami detegujúcimi markery senescencie.

Pri posttreatmente s extraktom Pycnogenol® oxidačný stres vyvolaný etopozidom v kombinácii s extraktom Pycnogenol® pravdepodobne spôsobil, že Pycnogenol® reagoval ako prooxidant a následne sa znížil rast buniek.

## ZÁVER

Naše experimenty ukázali, že posttreatment s extraktom Pycnogenol® dokáže znížiť rast buniek pri peroxidom aj etopozidom indukovanej senescencii, zatiaľ čo pretreatment s extraktom Pycnogenol® vedie k zvýšeniu rastu buniek pri etopozidom indukovanej senescencii. Z našej práce vyplýva, že účinok extraktu Pycnogenol® pravdepodobne závisí od veľkosti oxidačného stresu, ktorému sú bunky vystavené.

## Podakovanie

*Práca je podporená z grantu EU, z programu CBC, Interreg V-A-NutriAging V-0014*

## LITERATÚRA

1. Attia, S. M. et al. (2013): Wogonin attenuates etoposide-induced oxidative DNA damage and apoptosis *via* suppression of oxidative DNA stress and modulation of OGG1 expression. *Food and Chemical Toxicology*, 59, pp. 724–730. doi: 0.1016/j.fct.2013.07.022.

2. **Bhat, R. et al. (2012):** Astrocyte senescence as a component of Alzheimer's disease. *PLoS One*, doi:10.1371/journal.pone.0045069.
3. **Campisi, J. and d'Adda di Fagagna, F. (2007):** Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(9), pp. 729–740. doi: 10.1038/nrm2233.
4. **DiLeonardo, A. et al. (1994):** DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Development*, 8, pp. 2540–2551. doi: 10.1101/gad.8.21.2540.
5. **Dimri, G. P. et al. (1995):** A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, pp. 9363–9367. doi: 10.1073/pnas.92.20.9363.
6. **Gulati, O. P. (2005):** The nutraceutical Pycnogenol: its role in cardiovascular health and blood glucose control. *Biomedical Reviews*, 16, pp.49–57. doi: 10.14748/bmr.v16.94
7. **Chen, Q. M. et al. (1998):** Molecular analysis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced senescent-like growth arrest in normal human fibroblasts: p53 and Rb control G1 arrest but not cell replication. *Biochemical Journal*, 332, pp. 43–50. doi: 10.1042/bj3320043.
8. **Iravani, S. and Zolfaghari, B. (2011):** Pharmaceutical and nutraceutical effects of *Pinus pinaster* bark extract. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 6(1), pp. 1–11.
9. **Jeyapalan, J. C. and Sedivy, J. M. (2008):** Cellular senescence and organismal aging. *Mechanisms of Ageing and Development*, 129(7–8), pp. 467–474. doi: 10.1016/j.mad.2008.04.001.
10. **Liu, F. J., Zhang, Y. X. and Lau, B.H. (1998):** Pycnogenol enhances immune and haemopoietic functions in senescence-accelerated mice. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 54(10), pp. 1168–1172. doi: 10.1007/s000180050245.
11. **Marini, A. et al. (2012):** Pycnogenol® effects on skin elasticity and hydration coincide with increased gene expressions of collagen type I and hyaluronic acid synthase in women. *Skin Pharmacology and Physiology*, 25(2), pp. 86–92. doi: 10.1159/000335261.
12. **Minamino, T. et al. (2002):** Endothelial cell senescence in human atherosclerosis: role of telomere in endothelial dysfunction. *Circulation*, 10, pp. 1541–1544. doi: 10.1161/01.cir.0000013836.85741.17.
13. **Munro, J. et al. (2004):** Histone deacetylase inhibitors induce a senescence-line state in human cells by a p16-dependent mechanism that is independent of a mitotic clock. *Experimental Cell Research*, 295, pp. 525–538. doi: 10.1016/j.yexcr.2004.01.017.
14. **Passos, J. F. et al. (2010):** Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence. *Molecular Systems Biology*, 6, pp. 1–14. doi: 10.1038/msb.2010.5
15. **Price, J.S. et al. (2002):** The role of chondrocyte senescence in osteoarthritis. *Aging Cell*, 1, pp. 57–65. doi: 10.1046/j.1474-9728.2002.00008.x.
16. **Rohdewald, P. (2002):** A review of the French maritime pine bark extract (Pycnogenol), a herbal medication with a diverse clinical pharmacology. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 40(4), pp. 158–168. doi: 10.5414/cpp40158.
17. **Rong, Y. et al. (1994):** Pycnogenol protects vascular endothelial cells from t-butyl hydroperoxide induced oxidant injury. *Biotechnology therapeutics*, 5(3-4), pp. 117–126.
18. **Serrano, M. et al. (1997):** Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16/INK4a. *Cell*, 88, pp. 593–602. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81902-9.
19. **Trebatická, J. and Ďuračková, Z. (2015):** Psychiatric Disorders and Polyphenols: Can They Be Helpful in Therapy ? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. doi: 10.1155/2015/248529.
20. **Wei, Z. H., Peng, Q. L. and Lau, B. H. (1997):** Pycnogenol enhances endothelial cell antioxidant defenses. *Redox Report*, 3(4), pp. 219–224. doi: 10.1080/13510002.1997.11747113.
21. **Ziegler, D.V., Wiley, C. D. and Velarde, M. C. (2015):** Mitochondrial effectors of cellular senescence: beyond the free radical theory of aging. *Aging Cell*, 14, pp. 1–7. doi: 10.1111/ace.12287.



Laboratórna Diagnostika, XXVIII, 1, 2023: 67–76

## ENERGETICKÝ METABOLIZMUS POČAS CHEMICKY INDUKOVANEJ RAKOVINY MOZGU LABORATÓRNYCH POTKANOV ENERGY METABOLISM DURING CHEMICALLY INDUCED BRAIN CANCER OF LABORATORY RATS

Zuzana Porvazová<sup>1</sup>, Andrea Leškaničová<sup>1</sup>, Peter Petík<sup>2</sup>, Nela Žideková<sup>3</sup>  
Alžbeta Blichárová<sup>2</sup>, Ľudmila Verbóová<sup>2</sup>, Martin Kertys<sup>3</sup>, Terézia Kisková<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ústav biologických a ekologických vied PF UPJŠ, Košice

<sup>2</sup>Ústav patológie UPJŠ LF a UN LP, Košice

<sup>3</sup>Ústav farmakológie JLF UK v Martine

e-mail: terezia.kiskova@upjs.sk

### SÚHRN

Metabolomika sa v súčasnosti používa na identifikáciu biomarkerov a zmenených metabolických dráh pri rakovine. Hladiny metabolitov reprezentujú priame molekulárne údaje o stave buniek, ktoré odrážajú zmysluplný fyziologický fenotyp. Cieľom tohto výskumu bolo sledovať metabolomické zmeny v krvi laboratórnych potkanov a vytipovať najdôležitejšie metabolity so zameraním sa na aminokyseliny, biogénne amíny a acylkarnitíny po chemickom navodení nádorov mozgu. V experimente bolo použitých 10 dospelých laboratórnych potkanov kmeňa Sprague Dawley a bolo detegovaných 81 metabolitov. Štatistickými multivariálnymi metódami sa ukázali ako významné metabolity acylkarnitíny s krátkym (C3-C5) resp. stredne dlhým reťazcom (C6) a metionín-sulfoxid (Met-SO), a to s ohľadom aj bez ohľadu na pohlavie. Zistené metabolity by mohli predstavovať potenciálne biomarkery, ktoré významne ovplyvňujú diagnostiku a liečbu.

**Kľúčové slová:** metabolomika, nádor mozgu, acylkarnitíny, aminokyseliny, biogénne amíny

### ABSTRACT

The metabolomics is used for identification of biomarkers and altered metabolic pathways in cancer. The direct molecular data of cell status that display a meaningful physiological phenotype are ultimately represented by the levels of metabolites. The aim of this research was to follow metabolomical changes in the blood of laboratory rats and identify the most important metabolites with focus on amino acids, biogenic amines and acylcarnitines after chemical induction of brain tumors. In the experiment were used 10 adult laboratory rats and were detected 81 metabolites. By using statistical multivariate methods, the acylcarnitines with short (C3-C5) or medium long chains (C6) and methionine sulfoxide were shown to be significant metabolites with the fact that gender was also was not considered. Detected metabolites could represent potential biomarkers that significantly influence diagnosis and treatment.

**Key words:** the metabolomics, the brain tumor, acylcarnitines, amino acids, biogenic amines

## ÚVOD

Nádory centrálneho nervového systému (CNS) tvoria heterogénnu skupinu jednotlivých druhov nádorov, kde patria nádory benígne a malígne (Fadrus et al., 2010). Gliómy predstavujú 75 % malígnych nádorov centrálneho nervového systému s celosvetovou incidenciou 7 na 100 000 obyvateľov (Reynoso-Noverón et al., 2021). Medzi najzhubnejšie a najagresívnejšie formy týchto nádorov patrí multiformný glioblastóm (GBM) (Abou-Antoun et al., 2017). Klasifikácia nádorov CNS je založená najmä na štyroch morfológických kritériách: cytologická atypia, mitotická aktivita, mikrovaskulárna proliferácia (proliferácia endotelových buniek) a nekróza (Gupta, Dvidei, 2017). Najnovšia klasifikácia mozgových nádorov CNS podľa svetovej zdravotníckej organizácie (WHO). Táto klasifikácia z roku 2021 zahŕňa 13 rôznych nádorov CNS (Torp et al., 2022). Klasifikácia vychádza z WHO a gradingu delí gliómy na dve základné skupiny, ktoré sa medzi sebou značne odlišujú svojimi biologickými vlastnosťami, a tým aj celkovou prognózou pacienta: gliómy nízkeho stupňa malignity (low grade glioma – LGG) a gliómy vysokého stupňa malignity (high grade glioma – HGG) (Fadrus et al., 2015). Metabolomika, podobne ako iné omické technológie, sa v súčasnosti používa na identifikáciu biomarkerov a metabolických dráh zmenených pri rakovine a používa sa na hodnotenie účinnosti lekárskeho zásahu pri rakovine (Beger, 2013). Je dobre známe, že metabolizmus rakoviny sa líši od metabolizmu normálneho tkaniva a dôležitá hypotéza publikovaná v 50. tých rokoch Ottom Warburgom predpovedala, že nádorové bunky sa spoliehajú na anaeróbny metabolizmus ako na zdroj energie, dokonca aj pri fyziologických hladinách kyslíka (Armitage, Barbas, 2014). Rýchlosť metabolizmu glukózy prostredníctvom aeróbnej glykolýzy je však vyššia, takže dochádza k produkcii laktátu z glukózy 10 až 100-krát rýchlejšie ako úplná oxidácia glukózy v mitochondriách. V tomto procese sa zvýšená spotreba glukózy využíva ako zdroj uhlíka pre anabolické procesy potrebné na podporu nekontrolovateľnej bunkovej proliferácie (Liberti, Locasale, 2016). Nádorové bunky sa prispôbujú, aby maximalizovali svoju schopnosť syntetizovať substráty pre membrány, nukleové kyseliny a proteíny pre zvýšenú rýchlosť proliferácie, čo je hlavná charakteristika týchto buniek. Je potrebné veľké množstvo energie (adenozíntrifosfátu – ATP), ktoré sa získa mnohonásob-

ným zvýšením spotreby glukózy a glutamínu (Marie, Shinjo, 2011). Na rozdiel od normálneho mozgu, ktorý na energiu oxiduje glukózu aj ketolátky, zhubné mozgové nádory z ľudských alebo zvieracích modelov nemajú takú metabolickú flexibilitu a sú do značnej miery závislé od glukózy ako energie (Seyfried, Mukherjee, 2005).

## METÓDA

### Materiál a indukcia GBM

V experimente bolo použitých 10 dospelých laboratórnych potkanov kmeňa Sprague Dawley (5 samíc a 5 samcov; Velaz, Praha, Česká republika). Zvieratá boli kŕmené štandardnými granulovanými peletami Altromin 1328 (Velaz, Praha, Česká republika) podľa legislatívy EÚ o krmivách pre zvieratá a mali voľný nepretržitý prístup k vode. Rodičovské samice sa páрили so samcami, pričom ich potomstvo sa využilo na ďalšie experimenty. So zvieratami sa zaobchádzalo podľa usmernení ustanovených zákonom č. 377 a 436/2012 Slovenskej republiky o starostlivosti a používaní laboratórnych zvierat a schválených Štátnou veterinárnou a potravinovou správou Slovenskej republiky (číslo schválenia: Ro-2219/19 -221/3).

Gravidné samice boli rozdelené do dvoch skupín. Jedna skupina slúžila ako kontrolná resp. intaktná skupina. Tejto skupine nebol podaný chemokarcinogén a potomstvu nevznikli nádory. Druhá skupina bola opísaná ako skupina GBM (zvieratá nesúce nádor). Na vyvolanie nádoru bola jednorazovo podaná intraperitoneálna dávka chemokarcinogénu etylnitrozourea (ENU) gravidným samicam na 15. deň gravidity v dávke 100mg/kg hmotnosti. Po narodení bolo potomstvo držané s matkami. Vo veku 30 dní po narodení bolo potomstvo rozdelené podľa pohlavia. Vytvorili sa 4 experimentálne skupiny – zdravé samice a samce (FEMALE a MALE) a samice a samce s nádorom na mozgu (FEMALE + GBM a MALE + GBM). Vo veku 4 mesiacov boli potkany usmrtené a tiež bola odobratá krv, aby sa zistili rozdiely v jednotlivých metabolitoch.

### Odoberanie vzoriek a analýza metabolitov

Krv bola odoberaná z *vena caudalis* v celkovom objeme 100 µl do mikroskúmaviek. Miesto odberu bolo ošetrené dezinfekčným prostriedkom. Získané krvné sérum bolo následne uskladnené pri –80 °C. Následne bolo sérum rozmrazené na suchom ľade a bolo použité na ďalšiu analýzu.

Vzorky boli merané súpravou AbsoluteIDQ p180 (BIOCRATES Life Sciences AG, Innsbruck (Rakúsko) – prietokovou injekčnou analýzou (FIA) s cieľným metabolickým meraním na báze kvapalinovej chromatografie a tandemovej hmotnostnej spektrometrie (LCMS/MS) vybraných skupín metabolitov – aminokyselín, biogénnych amínov a acylkarnitínov (Tab. 2). Nasledoval plne automatizovaný test, počas ktorého boli vzorky najskôr podrobené derivatizácii PITC (fenylozotioyanát) v prítomnosti vnútorných štandardov, následne prebehla FIA-MS/MS a LC-MS/MS s použitím prístroja SCIEX 4000 QTRAP® (SCIEX, Darmstadt, Nemecko) alebo prístroja Waters XEVO™ TQMS (Waters, Viedeň, Rakúsko) s elektrosprejovou ionizáciou. Údaje boli transformované log<sub>2</sub>, aby sme získali relevantné hodnoty a stabilizoval sa rozptyl.

### Štatistická analýza

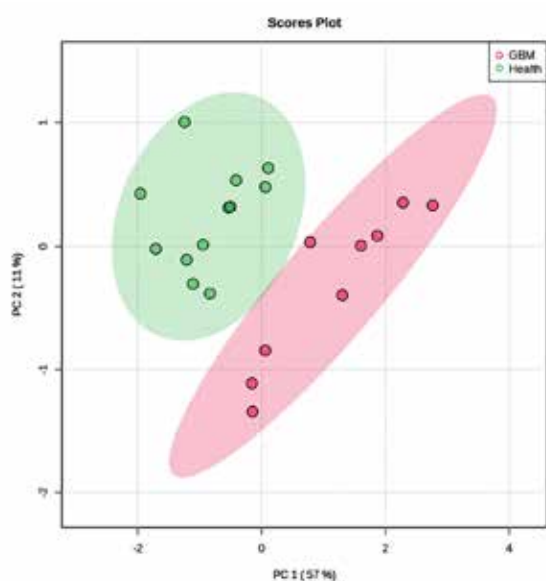
Výpočet koncentrácií metabolitov a hodnotenie kvality získaných údajov sme uskutočnili pomocou softvérového balíka MetIQ (BIOCRATES Life Sciences AG, Innsbruck, Rakúsko). Vnútorné štandardy slúžili ako referencia pre výpočty koncentrácie metabolitov. Údaje sme spracovali v programe GraphPad Prism 8.0, a to nepárovým t-testom na porovnanie vybraných skupín dát. Porovnávali sme zdravé jedince s nádorovými, a to s prihliadnutím na pohlavie alebo bez ohľadu na pohlavie. Okrem toho boli vykonané i jednorozmerná (t-test) a viacrozmerná štatis-

tika (diskriminačná analýza – partial least squares – PLS-DA), ako aj premenná dôležitosť v projekčnom (VIP) grafe pomocou voľne dostupného internetového štatistického softvéru MetaboAnalyst 5.0 (Xia Lab @ McGill, Ste. Anne de Bellevue, Quebec, US). Taktiež bola vykonaná PCA analýza (Principal Component Analysis), ktorá analyzuje údaje, v ktorých sú pozorovania opísané niekoľkými vzájomne korelovanými kvantitatívnymi závislými premennými.

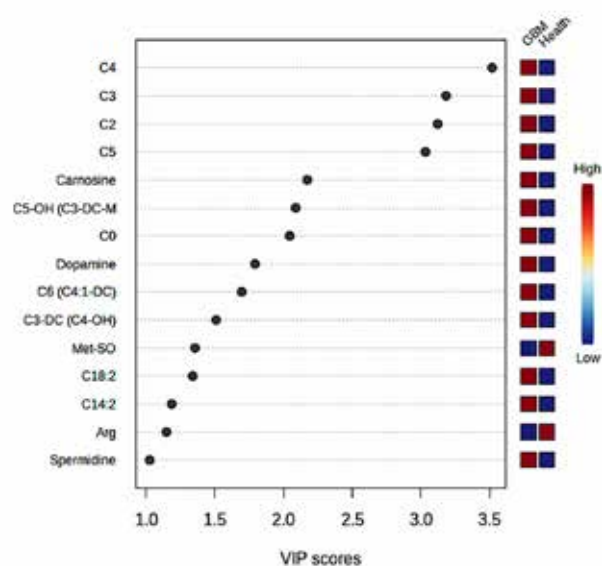
### VÝSLEDKY

Celkovo sme v našej štúdií detegovali 81 metabolitov zo skupín aminokyselín (21), biogénnych amínov (20) a acylkarnitínov (41). Po nameraní hodnôt sme zistili, že spermín nameraný nebol (pravdepodobne chyba prístroja) a vylúčili sme ho z analýz. Získané dáta sme najprv vyhodnotili bez ohľadu na pohlavie, aby sme „simulovali“ situáciu, aká by mohla nastať v klinickej praxi, kde pri množstve dát nie je možné zameriavať sa na pohlavia a zároveň sme chceli vytipovať metabolity, všeobecne charakteristické pre nádorové ochorenia mozgu.

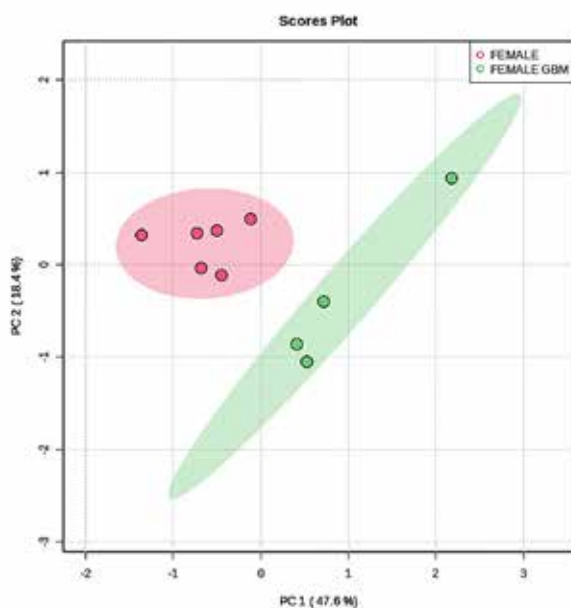
Zo skúmaných metabolitov sme zistili 18 štatisticky významných metabolitov pri porovnávaní intaktnej skupiny a skupiny s GBM bez ohľadu na pohlavie. Najväčšiu skupinu tvorili acylkarnitíny, ktorých bolo trinásť a všetky vykazovali zvýšené koncentrácie, konkrétne išlo o C2, C5,



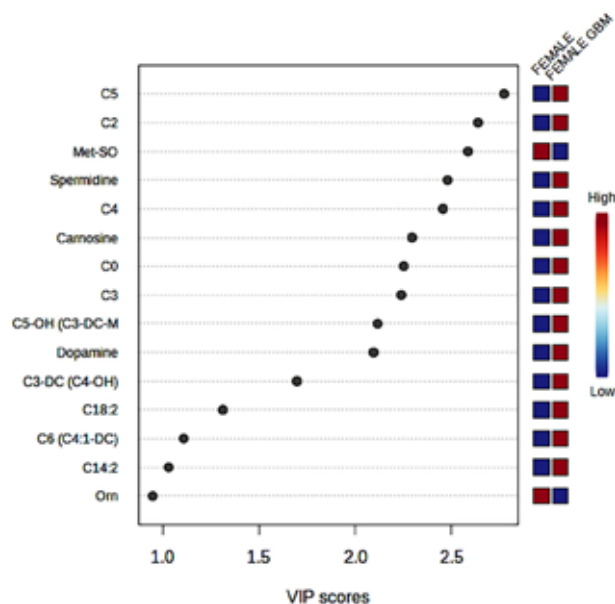
Obr. 1. Scores plot diagram PCA analýzy metabolitov intaktnej skupiny a GBM skupiny bez ohľadu na pohlavie



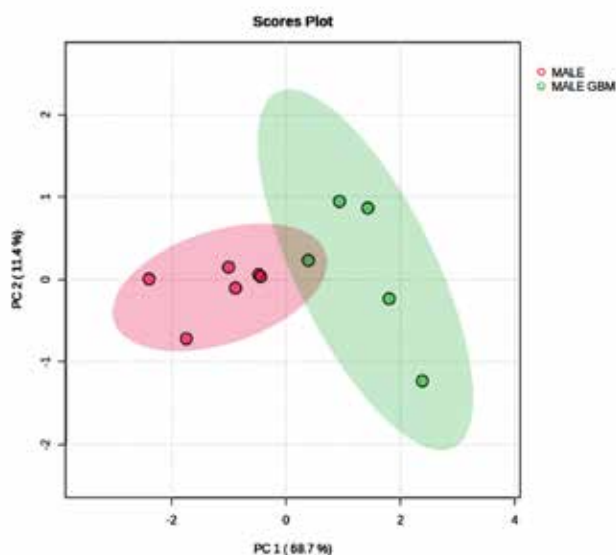
Obr. 2. VIP skóre (PLS-DA test) – porovnanie koncentrácie metabolitov skupiny zdravých jedincov so skupinou jedincov s GBM bez ohľadu na pohlavie



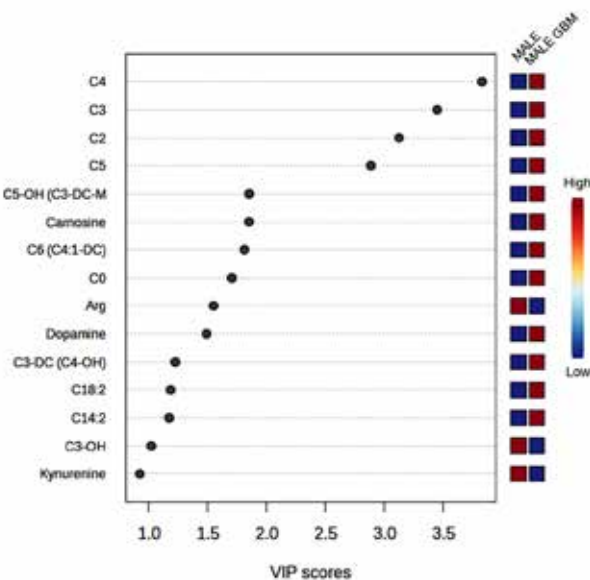
Obr. 3. Scores plot diagram PCA analýzy metabolitov experimentálnych skupín samíc



Obr. 4. VIP skóre (PLS-DA test) – porovnanie koncentrácie metabolitov experimentálnych skupín samíc



Obr. 6. VIP skóre (PLS-DA test) – porovnanie koncentrácie metabolitov experimentálnych skupín samcov



Obr. 5. Scores plot diagram PCA analýzy metabolitov experimentálnych skupín samcov

C3, C4, C0, C3-DC (C4-OH), C5-OH (C3-DC-M), C18:2, C5:1, C6 (C4:1-DC), C16:2, C14:2, C14:1. K zvýšenej koncentrácii došlo aj v prípade troch biogénnych amínov, a to kreatíninu, dopamínu a karnozínu. Znížená koncentrácia bola nameraná v prípade dvoch biogénnych amínov, konkrétne ADMA – asymetrický dimetylarginín a Met-SO – metionín sulfoxid. Zo skupiny aminokyselín sme nezistili ani jednu významnú aminokyselinu (dáta nie sú zobrazené).

Analýza hlavných komponentov (PCA) je matematická štatistická metóda, ktorá hľadá kombinácie pozorovaní so zachovaním čo najväčšieho množstva informácií o týchto pozorovaniach (premenných). Obr. 1. znázorňuje scores plot diagram, ktorý bol vyhodnotený PCA analýzou. Diagram porovnáva intaktnú skupinu so skupinou jedincov s GBM, pričom jasne znázorňuje viditeľnú separáciu skupín, čo signalizuje značnú zmenu koncentrácie detegovaných metabolitov.

PLS-DA analýza (partial least squares-discrimination analysis) využíva prvky PCA analýzy a na základe závislých a nezávislých premenných hľadá vo vzorke dát vzťahy a rovinu medzi nimi. Na základe týchto vzťahov je možné v dátach určiť tie najvýznamnejšie na základe VIP skóre (Variable Importance Point). Pri porovnaní skupiny zdravých jedincov so skupinou jedincov s chemicky navodeným nádorom mozgu bolo zistené zvýšenie koncentrácie trinástich významnejších metabolitov v skupine jedincov s GBM – Obr. 2. Najväčšiu časť z nich tvoria acylkarnitíny, konkrétne C4, C3, C2, C5, C5-OH (C3-DC-M), C0, C6(C4:1-DC), C3-DC (C4-OH), C18:2, C14:2. Zo skupiny biogénnych amínov ide o karnozín, dopamín a spermidín. Naopak k zníženej koncentrácii v skupine jedincov s GBM došlo len v prípade metionín-sulfoxidu (Met-SO) a aminokyseliny arginínu (Arg).

V skupinách experimentálnych samíc sme detegovali 5 štatisticky najvýznamnejších metabolitov vyhodnotených t-testom. U 4 z nich ide o zvýšenie koncentrácie v skupine samíc s GBM oproti skupine zdravých samíc. Ide o tri ACs, ktoré vykazujú zvýšenie koncentrácie, konkrétne C5, C2 a C0 a dva biogénne amíny, konkrétne spermidín (zvýšená koncentrácia) a Met-SO (znížená koncentrácia) (dáta nie sú zobrazené).

Scores plot diagram, ktorý bol vyhodnotený PCA analýzou, znázornený na Obr. 3. porovnáva experimentálnu skupinu zdravých samíc a skupinu samíc s vyvolaným GBM. Diagram zreteľne segreguje uvedené skupiny, keďže nedochádza k žiadnemu prekryvu, čo značí podstatnú zmenu koncentrácie skúmaných metabolitov.

PLS-DA testom bolo vykonané aj VIP skóre experimentálnych skupín s ohľadom na pohlavie jedincov, pričom bolo zistených tiež pätnásť štatisticky najvýznamnejších metabolitov. V prípade intaktnej skupiny zdravých samíc v porovnaní so skupinou samíc s indukovaným GBM tvoria najväčšiu skupinu signifikantných metabolitov ACs (Obr. 4.). V skupine samíc s GBM došlo k zvýšeniu koncentrácie desiatich ACs, konkrétne – C5, C2, C4, C0, C3, C5-OH (C3-DC-M), C3-DC (C4-OH), C18:2, C6 (C4:1-DC), C14:2. Vyššia koncentrácia v uvedenej skupine bola zistená aj v prípade spermidínu, karnozínu a dopamínu. Naopak znížená koncentrácia bola pozorovaná v prípade Met-SO a aminokyseliny ornitínu (Orn).

V rámci porovnania experimentálnych skupín samcov došlo k výrazným štatistickým zmenám u 13 metabolitov, pričom až u 12 z nich ide o zvýšenie koncentrácie v skupi-

ne samcov s GBM oproti zdravým samcom. Nemalú skupinu tvoria acylkarnitíny, ktorých je desať a všetky vykazujú zvýšenie koncentrácie, konkrétne ide o C3, C2, C4, C5, C3-DC (C4-OH), C18:2, C5:1, C5-OH (C3-DC-M), C0 a C5-DC (C6-OH). Zvýšenú koncentráciu vykazuje aj kreatinín a zníženie koncentrácie bolo zistené len v prípade kynurenínu, oba zo skupiny biogénnych amínov. Zo skupiny aminokyselín patrí medzi štatisticky významnejšie len jedna aminokyselina, konkrétne ornitín, kde bola zaznamenaná zvýšená koncentrácia v skupine samcov s GBM (dáta nie sú zobrazené).

Scores plot diagram, znázornený na Obr. 5. porovnáva experimentálnu skupinu zdravých samcov a skupinu samcov s GBM. Na diagrame pozorujeme z väčšej časti oddelenie uvedených skupín, čo signalizuje značnú zmenu koncentrácie sledovaných metabolitov.

PLS-DA testom vyhodnotené VIP skóre experimentálnych skupín samcov znázorňuje Obr. 6. Ide o porovnanie skupiny zdravých samcov so skupinou samcov s vyvolaným nádorom mozgu, kde najväčšiu skupinu signifikantných metabolitov tvoria ACs. V skupine samcov s GBM došlo k zvýšeniu koncentrácie desiatich ACs, konkrétne – C4, C3, C2, C5, C5-OH (C3-DC-M), C6 (C4:1-DC), C0, C3-DC (C4-OH), C18:2, C14:2. Zvýšenie koncentrácie v skupine samcov s GBM bolo zistené aj v prípade karnozínu a dopamínu. Oproti tomu stoja znížené koncentrácie Arg, C3-OH a kynurenínu.

## DISKUSIA

Keďže abnormálny energetický metabolizmus a biologický chaos charakterizujú nádory mozgu, všeobecné princípy analýzy metabolickej kontroly môžu byť účinné pri liečbe rakoviny mozgu. Táto hypotéza je založená na rozdieloch v energetickom metabolizme medzi normálnymi mozgovými bunkami a neoplastickými nádorovými bunkami. Pokiaľ majú mozgové nádory fyziologické prostredie vhodné pre ich energetické potreby, prežijú. Keď je toto prostredie nevyhovujúce, obmedzené alebo náhle zmenené, rastú pomalšie, rast sa zastaví alebo zahynú (S e y f r i e d et al., 2011). Rozmanitosť gliómov je zakorenená v ich pôvode, ako aj v oblasti nádoru, z ktorej sa vzorky odoberajú. Gliómy sa vyznačujú pozoruhodnou biochemickou plasticitou, pokiaľ ide o prispôsobenie sa mikroprostrediu, čo môže viesť k rozvoju rezistencie na liečbu.

Metabolizmus nádorových buniek je definovaný mnohými faktormi, ako je zvýšená spotreba glukózy, hypoxia alebo infiltrácia imunitných buniek, ktoré by sa mali všetky zväžiť pri určovaní najvhodnejšej liečby. Súčasným „zlatým štandardom“ v terapii gliómu je odstránenie najväčšej časti nádoru, ktorá je bezpečne možná chirurgickou resekciou, po ktorej nasleduje temozolomid a radiačná terapia. Temozolomid je alkylačný liek, ktorý je schopný prejsť hematoencefalickou bariérou a pacient ho zvyčajne dobre znáša. Napriek tomu rezistencia rakoviny na tento liek stále predstavuje výzvu, vďaka čomu je štandardná liečba menej ako uspokojuvajúca. Okrem toho výskumníci predpokladali, že zvýšenú mieru prežitia pacientov možno dosiahnuť resekciou >98% nádoru, no žiaľ, v mnohých prípadoch je to veľmi ťažké dosiahnuť (G a c a - T a b a s z e w s k a et al., 2022).

GBM dospelých je jedným z najsmrteľnejších a najodolnejších zo všetkých malígnych solídnych nádorov. Incidencia sa dramaticky zvyšuje po dosiahnutí veku 54 rokov a dosahuje maximálnu incidencia vo veku 75 až 84 rokov (A l e x a n d e r, C l o u g h e s y, 2017). V Spojených štátoch má GBM priemernú ročnú mieru incidence upravenú podľa veku s konštantným rastom o 3 % ročne u mužov aj žien. Zatiaľ čo incidencia gliómov nižšieho stupňa je takmer podobná u mužov a žien, zhubné nádory mozgu, vrátane GBM, sa vyskytujú 1,6-krát častejšie u mužov (C a r r a n o et al., 2021). Doba perzistencie je u pacientov s diagnózou GBM mimoriadne nízka. Pri diagnostikovanom GBM je priemerná miera prežitia 8 až 15 mesiacov (A n j u m et al., 2017). Napriek niekoľkým medzinárodným snahám je liečba GBM stále najnáročnejšou úlohou v klinickej onkológii. Počas posledného desaťročia sa skúmalo množstvo rôznych spôsobov liečby s veľmi obmedzeným úspechom. Hlavné výzvy v terapii GBM súvisia s lokalizáciou ochorenia a jeho komplexnou a heterogénnou biológiou. Prognóza pacientov s GBM je stále deprimujúca aj napriek postupným pokrokom v chirurgických prístupoch, rádioterapii a adjuvantnej chemoterapii. Na zlepšenie prežitia a kvality života pacientov je však potrebné výraznejšie tempo na dosiahnutie analogických výsledkov s tými, ktoré sa vyskytujú pri niektorých iných druhoch rakoviny (H a n i f et al., 2017).

Metabolomika ako „omická“ veda poskytuje funkčné údaje o bunkovej aktivite, ktoré výrazne prispievajú k pochopeniu biológie rakoviny vrátane biológie mozgových nádorov. Metabolity sú vysoko informatívne ako priamy

znak biochemickej aktivity, preto sa profilovanie metabolitov stalo sľubným prístupom pre klinickú diagnostiku a prognostiku (P a n d e y et al., 2017). Objav onkometabolitov (prostredníctvom metabolomiky) bol tiež doplnený objavom mnohých ďalších metabolitov spojených s rakovinou, ktoré by mohli potenciálne slúžiť ako biomarkery rakoviny. Patria sem početné biomarkery metabolitov nachádzajúce sa v sére, plazme, moči, slinách a vzorkách tkanív (W i s h a r t et al., 2016).

V oblasti mozgových nádorov sú biomarkery získavané neinvazívnymi alebo minimálne invazívnymi technikami veľmi žiadané vzhľadom na ich potenciálne využitie ako doplnok preventívnej medicíny alebo na skrátenie obdobia medzi prvými nešpecifickými príznakmi a konečnou diagnózou (P i e n k o w s k i et al., 2022).

V našej štúdii sa ukázala ako najviac významná skupina metabolitov – acylkarnitíny (ACs), ktoré dominujú pri porovnávaní jedincov bez ohľadu na pohlavie, ale aj pri porovnaní experimentálnych skupín s ohľadom na pohlavie. V oboch pohlaviach, ale aj v skupine jedincov bez ohľadu na pohlavie, ide o zvýšenie koncentrácie v skupinách s GBM oproti zdravým intaktným jedincom. Medzi najvýznamnejšie ACs môžeme zaradiť C5 (izovalerylkarnitín/valerylkarnitín), C3 (propionylkarnitín), C0 (karnitín), C4 (butyryl/ izobutyrylkarnitín), C2 (acetylkarnitín), C5-OH (C3-DC-M) (hydroxyizovalerylkarnitín), C6 (C4:1-DC) (hexanoylkarnitín), či C3-DC (C4-OH) (hydroxybutyrylkarnitín). Uvedené ACs patria medzi ACs s krátkym reťazcom (C3-C5) a stredne dlhým reťazcom (C6).

B j ö r k b l o m, B. a kol. vykonali komplexnú analýzu metabolomického profilovania metabolitov odvodených z nádorového tkaniva, kde detegovali 224 gliových nádorov resekovaných dospelým pacientom vo veku 25 až 84 rokov. Zo všetkých gliových nádorov predstavoval GBM až 72,3 %. Táto štúdia ukázala, že najzreteľnejšie boli nízke hladiny širokého spektra ACs nájdené v mutovanom astrocytóme v porovnaní s mutovaným oligodendrogliómom a GBM, kde boli hladiny ACs vysoké (B j ö r k b l o m et al., 2022). ACs sú považované za kľúčovú skupinu metabolitov, v ktorej dochádza k narušeniu metabolických dráh v GBM (G i l a r d et al., 2021). Primárnou funkciou karnitínu v bunkách je metabolizmus mastných kyselín. Estery AC sú transportované do mitochondrií na následnú oxidáciu mastných kyselín a produkciu energie. Pri rýchlym raste nádoru a zlyhaní správneho zásobovania krvou chýba nádorovým bunkám dostatok kyslíka pre metabolizmus



energetických zdrojov. V glykolytickej dráhe sa cytosolická glukóza normálne premieňa na pyruvát v aeróbných podmienkach a laktát, keď je nedostatok kyslíka. Hoci sa glukóza považuje za primárny zdroj energie pre normálny mozog dospelých, modelové štúdie ukázali, že hypoxické prostredie podnecuje nádorové bunky k syntéze mastných kyselín a k využívaniu oxidácie mastných kyselín ako primárneho zdroja energie (Björklom et al., 2022).

Štúdia Randa et al., E. C. a kol. ukázala zvýšené hladiny ACs na okraji nádoru v porovnaní s jadrom nádoru, ako aj na rozhraní medzi nádorom a normálnym tkanivom a nie na okraji nádoru susediaceho s vonkajším okrajom mozgu. Toto zistenie naznačuje, že GBM bunky v jadre a na proliferujúcom okraji nádoru podliehajú rôznym úrovňam metabolizmu mastných kyselín, čo vedie k intratumorovej metabolickej heterogenite (Randa et al., 2020).

Yu, D. a kol. vykonali štúdiu, v ktorej odoberali počas operácie tkanivá mozgového nádoru u 76 pacientov. Uskutočnený výskum bol zameraný na metabolické zmeny súvisiace s rôznymi stupňami gliómov na pochopenie molekulárneho mechanizmu progresie gliómu. Detegovali štyri ACs s krátkym reťazcom, ktoré boli významne zvýšené v gliómovom tkanive stupňa III/IV v porovnaní s tkanivami gliómu stupňa II, konkrétne išlo o acetyl-(C2-), propionyl-(C3-), butyryl-(C4-) a hexanoylkarnitín (C6-). Je dobre známe, že ACs úzko súvisia s metabolizmom BCAA a oxidáciou mastných kyselín, pričom pri  $\beta$ -oxidácii mastných kyselín s krátkym reťazcom zohráva kľúčovú úlohu aj séria acylkoenzým A (CoA) dehydrogenáz. Ide o dehydrogenázy, ktoré sa špecificky zameriavajú na butanoyl-CoA (C4-CoA) a hexanoyl-CoA (C6-CoA). V tkanivách gliómu vysokého stupňa boli zistené zvýšené C4- a C6-, avšak hladiny ich dehydrogenáz boli znížené. Táto štúdia naznačuje, že viac ACs s krátkym reťazcom sú silne spojené s progresiou gliómu a ďalej ovplyvňujú prežitie pacientov s gliómom, čo môže byť kľúčový cieľ liečby gliómu a hodnotenia prognózy (Yu et al., 2020).

Na definovanie špecifických metabolických programov, ktoré prispievajú ku gliomagenéze vykonali metabolické profilovanie nádorov a bunkových línií vo svojej štúdii aj Kant, S. a kol. (2020). Skúmali profil astrocytómu nízkeho stupňa (LGA) a GBM, kde všetky identifikované ACs boli zvýšené v GBM v porovnaní s LGA, pričom niektoré vykazovali viac ako 20-násobné zvýšenie. Pri podrobnejšom skúmaní GBM pozorovali značnú heterogenitu a zároveň preukázali dva fenotypy, ktoré definovali ako

AC „vysoký“ a „nízky“. Tieto fenotypy vykazovali rozdiely aj pri vykonaní analýz s použitím RNA (profilovania génovej expzie v mezenchymálnych bunkách) a DNA (mutáciou izocitrátdehydrogenázy – IDH1 a metyláciou promótoru O-6-metylguanín-DNA metyltransferázy) (Kant et al., 2020).

Okrem zvýšenej koncentrácie ACs s krátkym resp. stredne dlhým reťazcom pozorujeme v našej štúdii aj zvýšené množstvo karnitínu. Bogusiewicz, J. a kol. porovnávali vzorky rakoviny s rôznym stupňom. Ich štúdia ukázala, že hladina karnitínu bola významne vyššia v gliómech vysokého stupňa (HGG) v porovnaní s gliómami nízkeho stupňa (LGG). Karnitín je neoddeliteľnou súčasťou správneho fungovania enzýmov (CPT-1, CPT-2, CACT), ktoré sa podieľajú na transporte mastných kyselín s dlhým reťazcom cez vnútornú mitochondriálnu membránu. Tento metabolit sa teda považuje za rozhodujúci regulátor karnitínového kyvadlového systému. Hrá dôležitú úlohu pri plasticite rakoviny a umožňuje splnenie metabolických požiadaviek proliferujúcich nádorových buniek aj v nepriaznivých podmienkach (Bogusiewicz et al., 2021).

Pohlavné dimorfne mechanizmy majú veľký vplyv na biológiu rakoviny a génovej expzie v mozgových nádoroch, ako je GBM. Hoci sú v GBM dobre opísané účinky špecifické pre pohlavie v incidencii, fenotype choroby a výsledku, je k dispozícii len málo poznatkov na rozlíšenie mužských a ženských pacientov s GBM na molekulárnej úrovni (Carrano et al., 2021). V našom experimente pri porovnávaní experimentálnych skupín samíc a samcov tvoria najväčšiu skupinu signifikantných metabolitov ACs, u ktorých došlo k zvýšeniu koncentrácie. Medzi významné metabolity, u ktorých koncentrácia naopak klesla patrí Met-SO, ktorý patrí do skupiny biogénnych amínov. Pokles pozorujeme v skupine samíc s GBM, ale aj v skupine s GBM pri porovnaní jedincov bez ohľadu na pohlavie, a teda Met-SO môže vystupovať ako potenciálny biomarker.

Met-SO je hlavným produktom oxidácie metionínu (Met), ktorý je vysoko citlivý na oxidáciu prostredníctvom reaktívnych foriem kyslíka. Oxidácia proteínov sa považuje za jeden z hlavných mechanizmov, ktorým je oxidačný stres integrovaný do dráh bunkovej signálnej transdukcie. Vo veľkej miere sa uvádza, že oxidačný stres sa podieľa na progresii rôznych ľudských chorôb vrátane rakoviny, neurodegeneratívnych porúch a cukrovky (Garciaga et al., 2012). Met je esenciálna aminokyselina, ktorá sa

podieľa na niekoľkých kritických metabolických procesoch (Lee, Gladyshev, 2011). Normálne bunky sa množia *in vitro* v prítomnosti homocysteínu, metabolického prekursora metionínu, zatiaľ čo mnohé rakovinové bunkové línie to nedokázali. Pozorovanie tejto závislosti na metioníne predstavuje biochemický rozdiel medzi normálnymi a malígnymi bunkami (Sowers, Sowers, 2022). Nawashiro, H. a kol. preukázali vysokú expresiu aminokyselinového transportéra, a tým zvýšený transport metionínu do gliómových buniek, čo naznačuje mechanizmus reakcie na defekty v intracelulárnej syntéze metionínu (Nawashiro et al., 2005). Wang, Z. a kol. vo svojej štúdií zistili vysokú aktivitu metionínového cyklu čo spôsobuje, že spotreba metionínu ďaleko prevyšuje jeho regeneráciu, čo vedie k návyku na exogénny metionín (Wang et al., 2019). Je pravdepodobné, že viaceré faktory v nádorových bunkách sa kombinujú a vytvárajú závislosť od exogénneho metionínu a relatívny príspevok týchto faktorov by sa mohol líšiť od jednej bunky k druhej a silne závisieť od podmienok v mikroprostredí nádoru (Sowers, Sowers, 2022). Bol zistený priamy vzťah medzi oxidačným stresom a rakovinou (Martinez et al., 2017). Nádorové bunky sú vo všeobecnosti závislé od metionínu v dôsledku povahy ich nepretržitej proliferácie. Wang, L. a kol. vo svojej štúdií vytvorili bunky tolerantné voči metionínu, aby študovali odpoveď gliómu na prostredie s obmedzeným metionínom, pričom zistili, že došlo k zníženiu proliferácie nádorových buniek pri nedostatku metionínu (Wang et al., 2021).

Fukagawa, N. K. a kol. študovali rozdiely súvisiace s pohlavím v kinetike metionínového cyklu. Ide o prvú štúdiu, ktorá uvádza a kvantifikuje rozdiely v rýchlosti remetylácie homocysteínu medzi mužmi a ženami. Štúdie sa zúčastnilo 11 mužov a 11 žien, pričom zistili podobné koncentrácie homocysteínu nalačno. Po perorálnom podaní metionínu boli miery remetylácie a transmetrylácie vyššie u žien ako u mužov. Uvedené zistenia pripisujú rozdielom, ktoré súvisia s pohlavím v metionín syntáze (5-metyltetrahydrofolát-homocysteín metyltransferáza) alebo betaín homocysteín metyltransferázovej dráhe alebo v oboch uvedených metabolických krokoch (Fukagawa et al., 2000). Posúdenie úlohy akumulácie a metabolizmu Met pri zvýšenej citlivosti mužských hepatocytov na toxicitu Met v porovnaní so ženskými hepatocytmi vykonali aj Dever a Elfarrá. Ich štúdia preukázala vyššie celkové hladiny Met v mužských hepatocytoch ako v žen-

ských, čo môže naznačovať zvýšenú citlivosť mužských hepatocytov na toxicitu Met (Dever, Elfarrá, 2009). V našej štúdií sme detegovali Met-SO ako významný metabolit, avšak v znížených koncentráciách v skupinách s GBM oproti zdravým jedincom. Mnohé štúdie popisujú závislosť nádorových buniek od metionínu. Met-SO môže byť redukovaný späť na Met (Lee, Gladyshev, 2011), a teda významne znížená koncentrácia Met-SO môže signalizovať zvýšenú spotrebu Met nádorovými bunkami, aj napriek tomu, že samotný Met nepatrí medzi významné metabolity nášho experimentu.

Zhao, H. a kol. vykonali metabolické profilovanie vzoriek plazmy od pacientov s gliómom a získali päť metabolitov, arginín, uracil, laktát, cysteamín a ornitín, ktorých hladiny sa medzi pacientmi s LGG a HGG významne líšili. Hladiny arginínu boli vyššie v LGG ako v HGG. Viaceré štúdie naznačujú, že zvýšená závislosť od exogénneho arginínu je typická pre mnohé malígne nádorové bunky *in vitro* aj *in vivo*. Tieto zistenia naznačujú významné zmeny v dráhach súvisiacich s metabolizmom aminokyselín (Zhao et al., 2016). V našej štúdií sa ukázal arginín ako významný metabolit, ktorého koncentrácia v skupinách jedincov s GBM bez ohľadu na pohlavie, ako aj v skupine samčích jedincov s GBM klesla.

Cieľom mnohých štúdií v súčasnosti je detegovať významné metabolity, ktoré by obsiahli funkciu biomarkera, a tým poskytli priaznivejšiu predpoveď pre pacientov nielen s rakovinou mozgu, ale aj inými typmi rakoviny. Je dobre známe, že nádorové bunky sú charakterizované metabolickým preprogramovaním a agresívnym postupom, preto je nevyhnutné určiť správne medicínske postupy na zlepšenie života pacientov.

## ZÁVER

V tejto štúdií boli analyzované krvné séra experimentálnych zvierat po chemicky indukovanom nádore mozgu. Vytvorili sa experimentálne skupiny, ktoré sa následne vyhodnocovali pomocou štatistických multivariačných metód ako je PCA analýza, PLS-DA analýza alebo t-test. Hlavným cieľom tejto práce bolo vytipovať najdôležitejšie metabolity zmenené v študovaných mozgových ochoreniach so zameraním sa na aminokyseliny, biogénne amíny a acylkarnitíny. Štatistickou analýzou 81 metabolitov boli porovnávané skupiny zdravých intaktných jedincov

so skupinami jedincov s indukovaným glioblastómom, či už s ohľadom alebo bez ohľadu na pohlavie. Pri nediferencovanom rode bolo detegovaných 15 významných metabolitov, kde najväčšiu skupinu tvorili acylkarnitínny s krátkym resp. stredne dlhým reťazcom, ktorých koncentrácie boli zvýšené v skupinách s vyvolaným nádorom mozgu. Tie patrili medzi štatisticky významné aj pri porovnaní samčích a samičích experimentálnych skupín, čo naznačuje, že nádorové bunky v hypoxickom prostredí sú podnecované k využitiu ako primárneho zdroja energie oxidáciu mastných kyselín.

Ako ďalší významný metabolit sa ukázal metionín-sulfoxid (Met-SO), ktorého koncentrácia oproti acylkarnitínom klesla v skupinách jedincov s vyvolaným nádorom mozgu. Viaceré štúdie dokázali závislosť nádorových buniek na metioníne. Ten sa v oxidačnom strese oxiduje na Met-SO, ktorý môže byť spätne redukovaný na metionín. Keďže došlo k zníženiu koncentrácie Met-SO predpokladáme spätnú reakciu v prospech metionínu pre potreby proliferácie nádorových buniek.

Našou štúdiou sme vytypovali štatisticky najvýznamnejšie metabolity, no napriek veľkej pozornosti rôznych výskumov je dôležité realizovať ďalšie experimenty, ktoré by uvedené metabolity, ako potenciálne biomarkery, potvrdili resp. vyvrátili. Využitie biomarkerov v praxi, či už pričasnej diagnostike alebo pri samotných liečebných postupoch, predstavuje základný pilier metabolomiky na určenie účinnosti lekárskeho zásahov pri rakovine.

## PodĎakovanie

Táto práca bola podporená grantovou agentúrou VEGA (VEGA-1/0658/20; VEGA-1/0081/20) a internými grantovými systémami UPJŠ (VVGs-PF-2022-2136; VVGs-2023-2561).

## LITERATÚRA

1. ABOU-ANTOUN, T. J., HALE, J. S., LATHIA, J. D., DOMBROWSKI, S. M. (2017): Brain Cancer Stem Cells in Adults and Children: Cell Biology and Therapeutic Implications. *Neurotherapeutics*, 14, 372–384.
2. ALEXANDER, B. M., CLOUGHESY, T. F. (2017): Adult Glioblastoma. *Journal of Clinical Oncology*, 35, 2402–2409.
3. ANJUM, K., SHAGUFTA, B. I., ABBAS, S. Q., PATEL, S., KHAN, I., SHAH, S. A. A., AKHTER, N., HASSAN, S. S. U. (2017): Cur-

rent status and future therapeutic perspectives of glioblastoma multiforme (GBM) therapy: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 92, 681–689.

4. ARMITAGE, E. G., BARBAS, C. (2014): Metabolomics in cancer biomarker discovery: Current trends and future perspectives. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 87, 1–11.
5. BEGER, R. D. (2013): A review of applications of metabolomics in cancer. *Metabolites*, 3, 552–574.
6. BJÖRKBLOM, B., WIBOM, C., ERIKSSON, M., BERGENHEIM, A. T., SJÖBERG, R. L., JONSSON, P., BRÄNNSTRÖM, T., ANTTI, H., SANDSTRÖM, M., MELIN, B. (2022): Distinct metabolic hallmarks of WHO classified adult glioma subtypes. *Neuro-Oncology*, 24, 1454–1468.
7. BOGUSIEWICZ, J., BURLIKOWSKA, K., JAROCH, K., GORYNSKA, P. Z., GORYNSKI, K., BIRSKI, M., FURTAK, J., PACZKOWSKI, D., HARAT, M., BOJKO, B. (2021): Profiling of Carnitine Shuttle System Intermediates in Gliomas Using Solid-Phase Microextraction (SPME). *Molecules*, 26, 6112.
8. CARRANO, A., JUAREZ, J. J., INCONTRI, D., IBARRA, A., GUERRERO CAZARES, H. (2021): Sex-Specific Differences in Glioblastoma. *Cells*, 10, 1783.
9. DEVER, J. T., ELFARRA, A. A. (2009): Gender differences in methionine accumulation and metabolism in freshly isolated mouse hepatocytes: potential roles in toxicity. *Toxicol Appl. Pharmacol.*, 236, 358–65.
10. FADRUS, P., LAKOMÝ, R., HÜBNEROVÁ, P., SLABÝ, O., KEŘKOVSKÝ, M., SVOBODA, T., VYBÍHAL, V., NEUMAN, E., KRYŠTOFOVÁ, S., SOVA, M., SMRČKA, M. (2010): *Intrakraniální nádory – diagnostika a terapie*.
11. FADRUS, P., ŠLAMPÁ, P., LAKOMÝ, R., SMRČKA, M. (2015): Komplexní terapie gliomů mozku. *Onkologie*, 9, 214–217.
12. FUKAGAWA, N. K., MARTIN, J. M., WURTHMANN, A., PRUE, A. H., EBENSTEIN, D., O'ROURKE, B. (2000): Sex-related differences in methionine metabolism and plasma homocysteine concentrations. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 72, 22–29.
13. GACA-TABASZEWSKA, M., BOGUSIEWICZ, J., BOJKO, B. (2022): Metabolomic and Lipidomic Profiling of Gliomas-A New Direction in Personalized Therapies. *Cancers (Basel)*, 14.
14. GARCIA-GARCIA, A., RODRIGUEZ-ROCHA, H., MADAYIPUTHIYA, N., PAPPAS, A., PANAYIOTIDIS, M., FRANCO, R. (2012): Biomarkers of protein oxidation in human disease. *Current Molecular Medicine*, 12, 681–697.
15. GILARD, V., FERREY, J., MARGUET, F., FONTANILLES, M., DUCATEZ, F., PILON, C., LESUEUR, C., PEREIRA, T., BASSET,

- C., SCHMITZ-AFONSO, I., DI FIORÉ, F., LAQUERRIÈRE, A., AFONSO, C., DERREY, S., MARRET, S., BEKRI, S., TEBANI, A. (2021): Integrative Metabolomics Reveals Deep Tissue and Systemic Metabolic Remodeling in Glioblastoma. *Cancers*, 13, 5157.
16. GUPTA, A., DWIVEDI, T. (2017): A Simplified Overview of World Health Organization Classification Update of Central Nervous System Tumors 2016. *J. Neurosci. Rural Pract.*, 8, 629–641.
17. HANIF, F., MUZAFFAR, K., PERVEEN, K., MALHI, S. M., SIM-JEE SH, U. (2017): Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment. *Asian Pac. J. Cancer. Prev.*, 18, 3–9.
18. KANT, S., KESARWANI, P., PRABHU, A., GRAHAM, S. F., BUELOW, K. L., NAKANO, I., CHINNAIYAN, P. (2020): Enhanced fatty acid oxidation provides glioblastoma cells metabolic plasticity to accommodate to its dynamic nutrient microenvironment. *Cell Death & Disease*, 11, 253.
19. LEE, B. C., GLADYSHEV, V. N. (2011): The biological significance of methionine sulfoxide stereochemistry. *Free Radical Biology and Medicine*, 50, 221–227.
20. LIBERTI, M. V., LOCASALE, J. W. (2016): The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends in Biochemical Sciences*, 41, 211–218.
21. MARIE, S. K. N., SHINJO, S. M. O. (2011): Metabolism and Brain Cancer. *Clinics*, 66, 33–43.
22. MARTÍNEZ, Y., LI, X., LIU, G., BIN, P., YAN, W., MÁZ, D., VALDIVIÉ, M., HU, C.-A. A., REN, W., YIN, Y. (2017): The role of methionine on metabolism, oxidative stress, and diseases. *Amino Acids*, 49, 2091–2098.
23. NAWASHIRO, H., OTANI, N., UOZUMI, Y., OOIGAWA, H., TOYOOKA, T., SUZUKI, T., KATOH, H., TSUZUKI, N., OHNURI, A., SHIMA, K., SHINOMIYA, N., MATSUO, H., KANAI, Y. (2005): High expression of L-type amino acid transporter 1 in infiltrating glioma cells. *Brain Tumor Pathology*, 22, 89–91.
24. PANDEY, R., CAFLISCH, L., LODI, A., BRENNER, A. J., TIZIANI, S. (2017): Metabolomic signature of brain cancer. *Molecular Carcinogenesis*, 56, 2355–2371.
25. PIENKOWSKI, T., KOWALCZYK, T., GARCIA-ROMERO, N., AYUSO-SACIDO, A., CIBOROWSKI, M. (2022): Proteomics and metabolomics approach in adult and pediatric glioma diagnostics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Reviews on Cancer*, 1877, 188721.
26. RANDALL, E. C., LOPEZ, B. G. C., PENG, S., REGAN, M. S., ABDELMOULA, W. M., BASU, S. S., SANTAGATA, S., YOON, H., HAIGIS, M. C., AGAR, J. N., TRAN, N. L., ELMQUIST, W. F., WHITE, F. M., SARKARIA, J. N., AGAR, N. Y. R. (2020): Localized Metabolomic Gradients in Patient-Derived Xenograft Models of Glioblastoma. *Cancer Research*, 80, 1258–1267.
27. REYNOSO-NOVERÓN, N., MOHAR-BETANCOURT, A., ORTIZ-RAFAEL, J. (2021): Epidemiology of Brain Tumors. In MONROY-SOSA, A., CHAKRAVARTHI, S. S., DE LA GARZA-SALAZAR, J. G., MENESES GARCIA, A., KASSAM, A. B. (eds.): *Principles of Neuro-Oncology: Brain & Skull Base*. Springer International Publishing.
28. SEYFRIED, T. N., KIEBISH, M. A., MARSH, J., SHELTON, L. M., HUYSENTRUYT, L. C., MUKHERJEE, P. (2011): Metabolic management of brain cancer. *Biochim. Biophys. Acta*, 1807, 577–94.
29. SEYFRIED, T. N., MUKHERJEE, P. (2005): Targeting energy metabolism in brain cancer: review and hypothesis. *Nutrition & Metabolism*, 2, 30.
30. SOWERS, M. L., SOWERS, L. C. (2022): Glioblastoma and Methionine Addiction. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 7156.
31. TORP, S. H., SOLHEIM, O., SKJULSVIK, A. J. (2022): The WHO (2021) Classification of Central Nervous System tumours: a practical update on what neurosurgeons need to know—a minireview. *Acta Neurochir (Wien)*, 164, 2453–2464.
32. WANG, L., HU, B., PAN, K., CHANG, J., ZHAO, X., CHEN, L., LIN, H., WANG, J., ZHOU, G., XU, W. (2021): SYVN1-MTR4-MAT2A signaling Axis regulates methionine metabolism in glioma cells. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 633259.
33. WANG, Z., YIP, L. Y., LEE, J. H. J., WU, Z., CHEW, H. Y., CHONG, P. K. W., TEO, C. C., ANG, H. Y.-K., PEH, K. L. E., YUAN, J., MA, S., CHOO, L. S. K., BASRI, N., JIANG, X., YU, Q., HILLMER, A. M., LIM, W. T., LIM, T. K. H., TAKANO, A., TAN, E. H., TAN, D. S. W., HO, Y. S., LIM, B., TAM, W. L. (2019): Methionine is a metabolic dependency of tumor-initiating cells. *Nature Medicine*, 25, 825–837.
34. WISHART, D. S., MANDAL, R., STANISLAUS, A., RAMIREZ-GAONA, M. (2016): Cancer Metabolomics and the Human Metabolome Database. *Metabolites*, 6, 10.
35. YU, D., XUAN, Q., ZHANG, C., HU, C., LI, Y., ZHAO, X., LIU, S., REN, F., ZHANG, Y., ZHOU, L., XU, G. (2020): Metabolic Alterations Related to Glioma Grading Based on Metabolomics and Lipidomics Analyses. *Metabolites*, 10.
36. ZHAO, H., HEIMBERGER, A. B., LU, Z., WU, X., HODGES, T. R., SONG, R., SHEN, J. (2016): Metabolomics profiling in plasma samples from glioma patients correlates with tumor phenotypes. *Oncotarget*, 7, 20486–95.

# A great innovation for Worldlab & Euromedlab Congresses

## EFLM Continuing Professional Education Credit System - CPECS®

25<sup>th</sup> International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) WorldLab and 25<sup>th</sup> European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) EuroMedLab and 55<sup>th</sup> Annual Congress of the Italian Society of Clinical Biochemistry and Clinical Molecular Biology (SIBioC) are accredited by the EFLM CPECS® to provide the following CPD activity for participants.

EFLM CPECS® is an administrative system that provides a quality assurance mechanism for the accreditation of continuing education programs and events offered based on high-quality continuing education content in laboratory medicine and relevant scientific topics.

\*The CPECS® Continuing Professional Education Credit System is a unique acronym for laboratory medicine and an EFLM trademark registered by the European Union Intellectual Property Office (EUIPO) for professional recognition of continuing education.

A maximum of 19,5 CPECS® credits can be awarded for the scientific sessions of the 25th IFCC-EFLM EuroMedLab Congress. Each participant should receive credit only for the hours corresponding to the extent of his/her participation in the scientific part. Information on CPECS® credits per session can be found in the scientific program and the mobile app, which will be available for download during the congress.

Don't miss this great opportunity  
Take advantage of the reduced registration fee  
within March 31

[www.2023roma.org](http://www.2023roma.org)



ORGANISING SECRETARIAT

Via Carlo Farini 81 - 20159 Milano (Italy)

Ph. +39 02 66802323 - [info@2023roma.org](mailto:info@2023roma.org)