



**UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE
FAKULTA MATEMATIKY, FYZIKY A INFORMATIKY**



Autoreferát dizertačnej práce

**ZMENY VO FLUORESCENCII METABOLITOV V
MOČI PACIENTOV S NÁDOROVÝM OCHORENÍM VOČI
ZDRAVÝM JEDINCOM**

Milan Zvarík

na získanie akademického titulu philosophiae doctor

v odbore doktorandského štúdia:

4.1.12 Biofyzika

Bratislava, 2012

Dizertačná práca bola vypracovaná v dennej forme doktorandského štúdia na Katedre jadrovej fyziky a biofyziky Fakulty matematiky, fyziky a informatiky Univerzity Komenského v Bratislave.

Predkladateľ: RNDr. Milan Zvarík
Katedra jadrovej fyziky a biofyziky
Fakulta matematiky fyziky a informatiky
Univerzita Komenského
Mlynská dolina
842 48 Bratislava

Školiteľ: prof. RNDr. Libuša Šikurova, PhD.
Katedra jadrovej fyziky a biofyziky
Fakulta matematiky fyziky a informatiky
Univerzita Komenského
Mlynská dolina
842 48 Bratislava

Oponenti:
.....
.....
.....
.....
.....

Obhajoba dizertačnej práce sa koná o h pred komisiou pre obhajobu dizertačnej práce v odbore doktorandského štúdia vymenovanou predsedom odborovej komisie

na Fakulte matematiky, fyziky a informatiky, Mlynská dolina, 842 48 Bratislava.

študijný odbor **4.1.12 Biofyzika**

Predseda odborovej komisie:

.....
.....
.....

Úvod

Rakovina je celospoločenským problémom, ktorý si každý rok vyžiada svoju daň. Patrí k hlavným príčinám úmrtia obyvateľstva priemyselne vyspelých krajín a je druhou hlavnou príčinou úmrtia v rozvojových krajinách. Podľa Svetovej zdravotníckej organizácie (WHO) v roku 2008 zomrelo v dôsledku onkologických ochorení 8 miliónov ľudí, čo predstavuje asi 13% všetkých úmrtí, čím sa rakovina zaraďuje do čela príčin mortality na svete (WHO, 2008). Predpokladá sa, že úmrtnosť bude stále rásť a v roku 2030 presiahne 13 miliónov. Práve rýchla detekcia choroby je základom pre účinnú liečbu a prispela by tak k zníženiu tak obrovského čísla.

Významné postavenie v oblasti detekcie a diagnostiky metabolických a kancerogénnych procesov v súčasnej dobe nadobúdajú moderné techniky fluorescenčnej spektroskopie. V porovnaní s inými technikami sú výhodné najmä pre ich rýchlosť, vysokú senzitivitu a neinvazívny charakter. Na tento cieľ môžu využiť charakteristickú vlastnosť tumorového tkaniva, ktoré v porovnaní so zdravým tkanivom vo väčšej miere akumuluje určité chemické látky s charakterom fluoroforov.

Zmenu v autofluorescencii malígneho tkaniva pozorovali už Policard et al. v roku 1924. Mnoho ďalších prác bolo venovaných meraniu autofluorescencie tkanív, v ktorých autori popisujú spektrálne zmeny fluorescencie tumorového tkaniva a jeho možného využitia na diagnostické účely (Alfano et al., 1984; Kapadia et al., 1990; Roy et al., 1995; etc.). Ďalší autori využitím týchto poznatkov, pomocou fluorescenčných endoskopických vyšetrení dosahovali pri odlíšení zdravých a tumorových tkanív vyššie hodnoty senzitivity a špecificity ako v prípade použitia bieleho svetla (De Veld et al., 2005; Ikeda et al., 2006; Buchweitz et al., 2006; etc.).

Sľubnou metódou, ktorá by odhalila včasné štádiá nádorových ochorení aj nedostupných orgánov a tkanív je meranie autofluorescencie telesných tekutín. Krv a moč ako telesné tekutiny priamo odrážajú aktuálne zmeny v organizme, pretože ich zloženie odráža metabolický stav každého orgánu. Rozdiel vo fluorescencii krvi a krvných zložiek pacientov s rôznym nádorovým ochorením viacerí autori úspešne použili na odlíšenie od zdravých dobrovoľníkov (Madhuri et al., 1997; Ganesan et al., 1999; Karthikeyan et al. 1999; Masilamani et al., 2004). Monitorovanie autofluorescencie moču na diagnostické účely je zatiaľ v ranom štádiu. Masilamani et. al (2010) sú zatiaľ jediní autori, ktorí sa v rozsiahlej štúdií zamerali na detekciu nádorových ochorení pomocou autofluorescencie moču a dosiahli sľubné výsledky.

Keďže moč patrí medzi viacložkové zmesi organických látok, pri ich vyšetrení sú potrebné nákladné a časovo náročné postupy (purifikácia, izolácia). Použitím rôznych fluorescenčných techník (excitačno-emisné matice, synchronne spektrá, koncentračné matice), je možné monitorovať autofluorescenciu moču, bez jeho predchádzajúceho spracovania.

Fluorofory teda predstavujú jeden z potenciálnych markerov, ktorý by mohol slúžiť na rýchlu a nenáročnú detekciu a skrining karcinómov, ale aj na špecifickejšie určenie typu a štádia ochorenia bez potreby odberu nádorového tkaniva. Ďalšou nemalou výhodou je jeho nenáročný odber a minimálna traumatizácia pacienta.

V našej práci sme sa preto zamerali na stanovenie spektrálnych vlastností moču využitím viacerých fluorescenčných techník. Pokúsili sme sa navrhnúť vhodnú metódu na meranie a vyhodnotenie spektrálnych zmien v autofluorescencii moču pacientov s nádorovým ochorením. Pomocou dostupnej literatúry sme sa pokúsili o identifikáciu fluoroforov v moči a vysvetlenie mechanizmu vzniku zmien vo fluorescenčných spektrách. Použitím techniky vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie (HPLC) sme určili hladiny vybraných fluoroforov v moči, dôležitých v diagnostike nádorových ochorení.

Ciele

V našej práci sa zameriame na stanovovanie zmien vo fluorescencii metabolitov vylúčených močom, ktoré súvia so špecifickými nádorovými ochoreniami. Budeme skúmať vzorky moču pacientov s rakovinou vaječníka a rakovinou prsníka a porovnávať ich so vzorkami moču pacientov s benignými a hraničnými nádormi a tiež so vzorkami moču od zdravých darcov. Na základe pozorovaných zmien zhodnotíme možnosti ich využitia ako potencionalneho skriningového nástroja prítomnosti nádorových ochorení.

K základným cieľom predkladanej práce patrí:

1. Štúdium celkovej autofluorescencie vzoriek moču zdravých dobrovoľníkov pomocou excitačno-emisných matíc (EEM) a synchronných fluorescenčných spektier.
2. Zhodnotenie vplyvu koncentrácie moču na jeho fluorescenciu, návrh spôsobu normovania a stanovenie jeho kvalitatívnych a kvantitatívnych parametrov.
3. Meranie celkovej autofluorescencie vzoriek moču pacientov s vybranými druhmi rakoviny pomocou EEM a synchronných fluorescenčných spektier.
4. Návrh testu na prítomnosť nádorového ochorenia zo vzoriek moču a určenie špecificity a senzitivity navrhnutého testu.
5. Stanovenie metabolitov moču, ktoré sú zodpovedné za autofluorescenciu moču. Popis zmien vo fluorescencii patologického moču na úrovni metabolitov.
6. Pomocou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie (HPLC) stanoviť a porovnať koncentrácie sledovaných fluorescenčných metabolitov moču od zdravých dobrovoľníkov a pacientov s nádorovým ochorením.

Materiál a metódy

Konkrétne vzorky moču (kontrol) pochádzajú od 32 zdravých dobrovoľníkov vo veku 23 – 64 rokov. Vzorky moču pacientov s diagnostikovaným tumorom vaječníka boli získané od 86 pacientov vo veku 18 - 87 rokov, ktorí boli hospitalizovaní na oddelení gynekologickej onkológie v Národnom onkologickom ústave, Bratislava. Vzorky moču pacientov s diagnostikovanou rakovinou prsníka boli získané od pacientov liečených na mamologickom oddelení Onkologického ústavu sv. Alžbety v Bratislave. Podľa patologického nálezu boli pacienti rozdelení do štyroch skupín: pacienti s malígnym, benígnym alebo hraničným tumorom vaječníka a pacienti s rakovinou prsníka.

Skupinu pacientov s malígnym nádorom vaječníkov (rakovina/zhubný nádor vaječníkov) tvorilo 39 pacientov vo veku 37 – 87 rokov. Podľa Medzinárodnej klasifikácie chorôb (MKCH 10) im bola diagnostikovaná choroba C56 – zhubný nádor vaječníka. Skupina bola podľa rôzneho štádia rakoviny rozdelená na 4 podskupiny (I, II, III, IV) podľa štandardu FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics).

V skupine s benígnym nádorom vaječníka bolo 40 pacientov vo veku 18 - 85 rokov. Podľa MKCH-10 im bola zistená diagnóza D27 – nezhubný nádor vaječníka.

V skupine s hraničným nádorom (borderline, nádory s hraničnou malignitou) bolo 7 pacientov vo veku 39 – 72 rokov. Podľa MKCH-10 im bola priradená diagnóza D39.1 – nádor vaječníkov neurčitého alebo neznámeho správania alebo D48.9 nádor vaječníka neurčitého alebo neznámeho správania bez špecifikácie.

Skupinu s rakovinou prsníka tvorilo 23 pacientov vo veku 36 – 83 rokov, ktorým bola podľa MKCH-10 určená diagnóza C50 – zhubný nádor prsníka.

Emisné fluorescenčné spektrá moču

Všetky emisné fluorescenčné spektrá moču boli merané v mikrokývete s objemom 100 μ l, s optickou dráhou excitácie 5 mm a optickou dráhou emisie 2 mm. Vzorky moču boli analyzované pri 11-tich rôznych koncentráciách, od neriedeného moču až po riedenie moču destilovanou vodou v pomere 1:1024. Vzorky moču boli excitované pri 15-tich rôznych vlnových dĺžkach v oblasti 250 - 530 nm, s 20 nm prírastkom (λ_{ex} = 250, 270, 290, 310, 330, 350, 370, 390, 410, 430, 450, 470, 490, 510, 530 nm). Emisia fluorescencie bol snímaná v oblasti vlnových dĺžok 270 – 650 nm.

Excitačno-emisné matice moču

Z nameraných emisných spektier boli pre každé riedenie vytvorené 3D vrstevnicové grafy – excitačno-emisné matice (EEM), kde os x predstavuje emisnú vlnovú dĺžku (λ_{em}), os y excitačnú vlnovú dĺžku (λ_{ex}) a os z (vrstevnice) intenzitu fluorescencie (I_F). EEM nám tak poskytli celú UV VIS spektrálnu charakteristiku (spektrálnu mapu) vzorky moču.

Synchrónne fluorescenčné spektrá moču

Okrem emisných spektier boli pre všetky vzorky a riedenia merané aj synchrónne fluorescenčné spektrá (SFS) s konštantným rozdielom vlnových dĺžok $\Delta\lambda = (\lambda_{em} - \lambda_{ex})$. Spektrá boli snímané v oblasti excitačných vlnových dĺžok 250 – 550 nm. Zvolených bolo 9 rozdielov medzi emisiou a excitáciou $\Delta\lambda$, a to 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 a 100 nm.

Koncentračné matice synchrónnych spektier moču

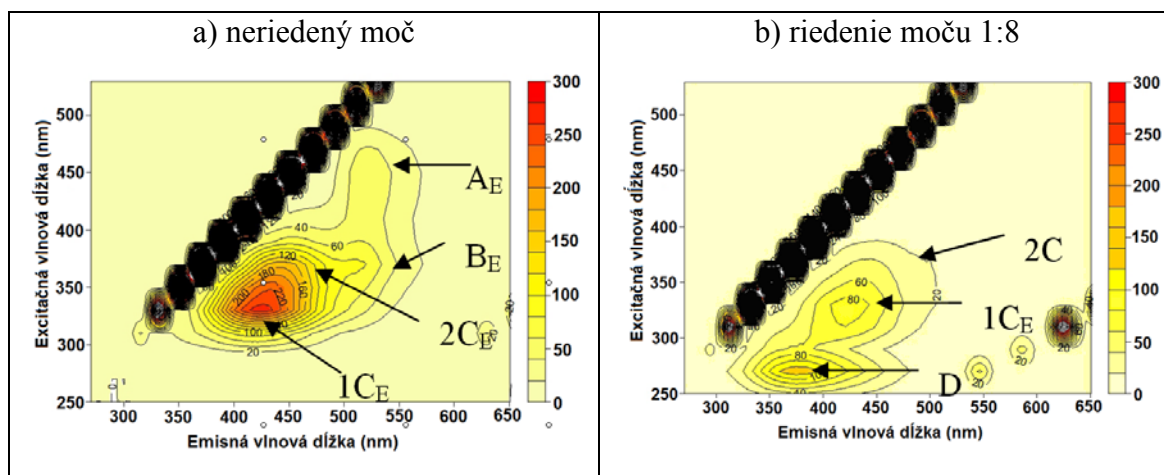
Z nameraných synchrónnych spektier boli pre rôzne $\Delta\lambda$ vytvorené 3D vrstevnicové grafy – koncentračné matice synchrónnych fluorescenčných spektier (KMSS), ktoré tak vyjadrujú vzťah medzi excitačnou vlnovou dĺžkou (λ_{ex}), intenzitou fluorescencie (I_F) a riedením moču.

Stanovovanie pterínov a kreatinínu

Koncentrácie pterínov a kreatinínu vo vzorkách moču boli stanovované pomocou HPLC analýzy. Bol použitý izokratický HPLC systém, kde mobilnú fázu tvoril 10 mmol/l roztok KH_2PO_4 a obsahom 3% metanolu. Prietok mobilnej fázy bol nastavený na 0,6 ml/min. Teplota systému bola nastavená na 25 °C. Na analýzu bola použitá kolóna Nucleosil® veľkosti 15 cm x 3,2 mm so stacionárnou fázou C18 a veľkosťou častíc 5 μ m. Objem vstrekovanej vzorky bol 0,5 μ l. Po každom meraní bol HPLC systém prepláchnutý roztokom metanolu a vody v pomere 1:1.

Výsledky a diskusia

Štúdiom excitačno-emisných matíc a synchronných fluorescenčných spektier moču zdravých darcov sme zistili štyri oblasti autofluorescencie moču (označené ako A, B, C a D; Obr. 1).



Obr. 1 Príklady excitačno-emisných matíc moču zdravého jedinca pri rôznych riedeniach. (a) neriedený moč, (b) riedenie moču 1:8 s destilovanou vodou; excitácia 250 – 530 nm; emisia 270 – 650 nm.

Fluorescenčné píky A a B dosahovali maximá pri excitáciách 370 nm resp. 450 nm a emisii 520 nm spôsobené fluorescenciou flavínov a ich metabolitmi.

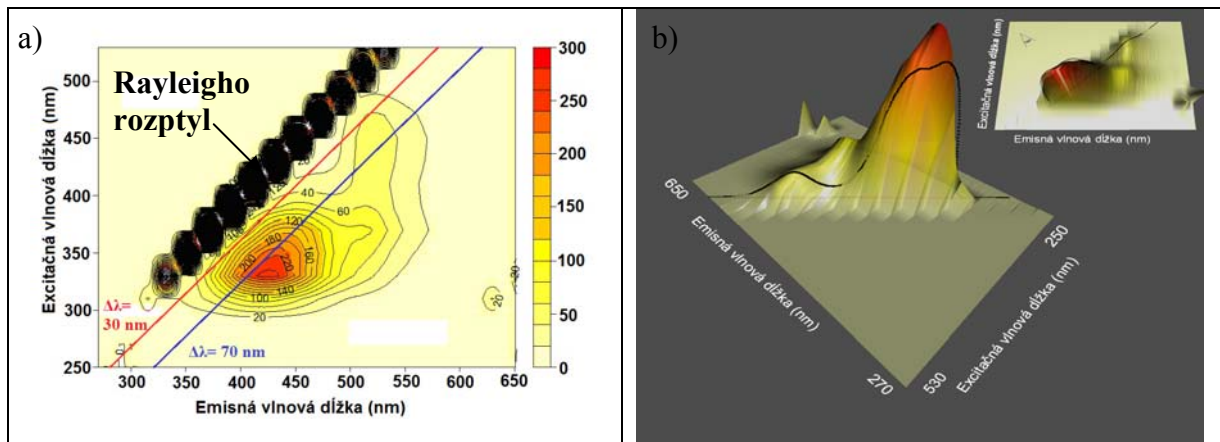
Široký fluorescenčný pás C dosahoval maximum 1C pri excitácii 330 nm a emisii 420 nm s fluorescenčným ramenom 2C pri excitácii 370 nm a emisii 440 nm. Fluorescenčné maximum 1C môže byť spôsobené fluorescenciou viacerých metabolitov, hlavne kyselinou 4-pyridoxínovou, xantínom, kyselinou 3-hydroxyantranilovou a kyselinou močovou. Pík 2C pochádza hlavne od fluorescencie kynurenínu a pterínov.

Fluorescenčný pík D dosahuje maximum pri excitácii 270 nm a emisii 380 nm a je spôsobený fluorescenciou indoxyl sulfátu, tryptofánu a jeho metabolitom, tyrozínom a skatolmi. Zistili sme, že pri normalizácii koncentrácie moču, fluorescenčné spektrá moču zdravých jedincov majú jednotné charakteristiky.

Analýzou vplyvu koncentrácie moču na jeho fluorescenčné parametre sme stanovili normovanie riedenia moču vzhľadom na excitačno-emisné maximum píku D, ktoré odpovedá fluoroforom indolového typu pochádzajúcich z metabolizmu bielkovín a bolo sledované vo všetkých vzorkách moču.

Tento prístup k získavaniu spektrálnej charakteristiky moču je potrebný hlavne z hľadiska identifikácie fluoroforov, avšak ako skrínningová metóda by bol značne

komplikovaný a časovo náročný. Ako vhodnejšia fluorescenčná technika na rýchlu analýzu viaczložkových zmesí, teda aj moču, je meranie synchronných spektier. Jedným synchronným spektrom je možné pri zvolení vhodnej $\Delta\lambda$ nahradiť celú EEM (Obr.2).

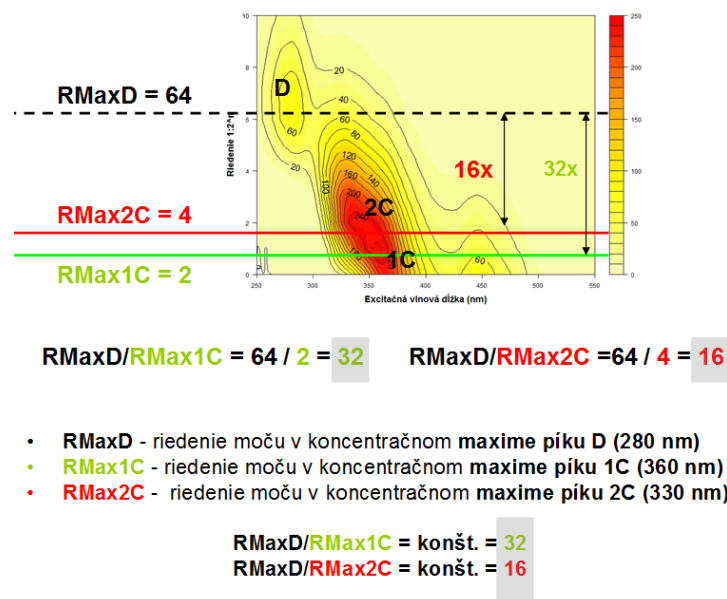


Obr. 2 Vyznačenie synchronného spektra v EEM neriedeného moču pre zvolené posuny $\Delta\lambda = 30$ nm a $\Delta\lambda = 70$ nm medzi excitačným a emisným monochromátorom. a) EEM vo forme 2D vrstevnicového grafu; b) EEM vo forme 3D povrchového grafu (pre $\Delta\lambda = 70$ nm, výrez – pôvodné natočenie EEM, pre prehľadnosť bol Rayleigho rozptyl odstránený).

Ako najvhodnejší posun medzi excitačným a emisným monochromátorom sme na základe analýzy EEM vybrali $\Delta\lambda = 70$ nm, pretože pri tomto posune synchronne spektrá prechádzali v EEM cez maximá všetkých píkav. EEM tiež ukázali závislosť na koncentrácii fluorescenčných látok v moči. Z tohto dôvodu boli aj synchronne spektrá merané pri rôznych riedeniach moču. Vytvorené koncentračné matice synchronných spektier (KMSS) tak poskytovali úplnú fluorescenčnú spektrálnu mapu (charakteristiku) moču. Meranie autofluorescencie moču pomocou synchronných spektier bolo s nádejnými výsledkami publikované aj v práci Dubayová et al. (2003), v ktorej autori demonštratívne ukázali zmeny vo fluorescenčných spektrách moču pacientov s rôznymi nenádorovými chorobami. V práci Kušnir et al. (2005) autori poukázali na charakteristický obrazec KMSS zdravého moču a porovnávali ho z KMSS moču pacientov z rôznymi poruchami. V práci ukázali, že v KMSS sú komplexné informácie o vzťahu medzi intenzitou fluorescencie a koncentráciou moču a KMSS tak poskytuje komplexné informácie o zložení fluoroforov v moči, ktoré je možné využiť na diagnostické účely.

Najväčším problémom pri vyhodnocovaní spektrálnej charakteristiky je variabilná koncentrácia vylúčeného moču. Objem, a teda aj koncentrácia vylúčeného moču je závislá hlavne od príjmu tekutín. Z tohto dôvodu nebolo možné kvantitatívne vyhodnocovať a porovnávať intenzitu fluorescencie píkav medzi dvomi vzorkami moču.

V našom výskume sme dospeli k názoru, že nie je možné intenzitu fluorescence vzoriek moču vyhodnocovať pri rovnakom riedení. Vyplýva to z vlastnosti fluorescence moču, ktorá pre rôzne píky dosahuje excitačno-emisné maximá pri rôznych riedeniach. Pri analýze KMSS vzoriek zdravého moču sme zistili, že sledované fluorescenčné píky síce nenadobúdajú koncentračno-emisné maximá pri rovnakých riedeniach, avšak posuny medzi nimi sú konštantné (Obr. 3). Z tohto dôvodu bolo možné zvoliť na analýzu píkov vhodné riedenie, pri ktorom odčítaná intenzita fluorescence ležala v oblasti lineárnej závislosti fluorescence na koncentrácii moču. Za parameter koncentrácie sme vybrali koncentračno-emisné maximum píku D, ktoré ležalo až pri vyšších riedeniach, a preto bolo sledované aj v prípade málo koncentrovaného moču.

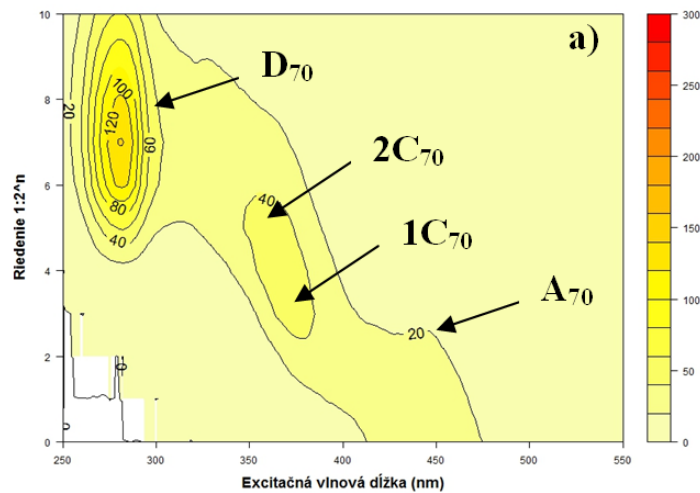


Obr. 3 Názorná ukážka konštantných posunov koncentračno-fluorescenčných maxim v KMSS zdravého moču.

Takto normalizované vzorky moču sme mohli kvantitatívne vyhodnocovať a porovnávať sledovanú intenzitu fluorescence. Navyše, autofluorescencia zdravého moču normovaného na pík D, vykazuje jednotné charakteristiky.

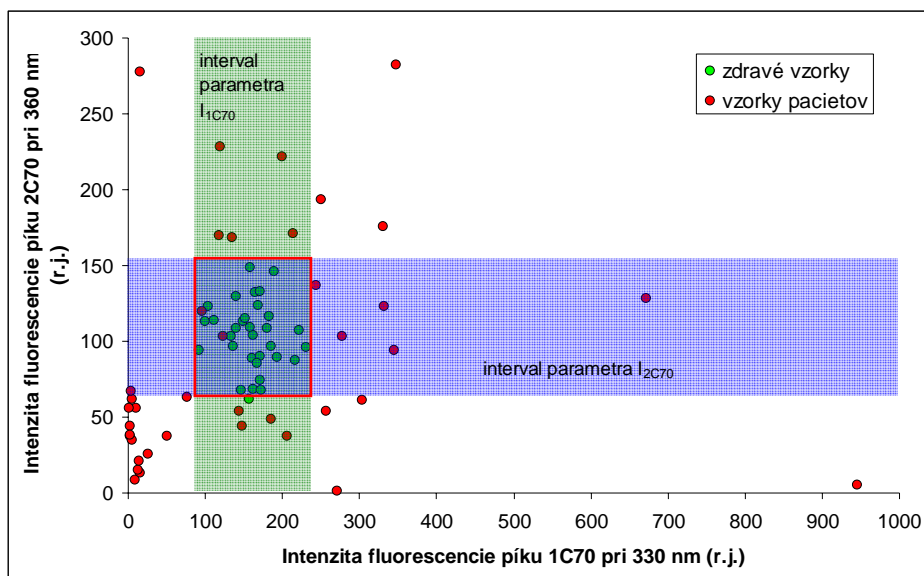
Štúdiom excitačno-emisných matíc a synchronných fluorescenčných spektier moču pacientov s nádorovým ochorením sme potvrdili rovnako ako pre moč zdravých darcov, štyri hlavné oblasti autofluorescencie A, B, C a D, ale odlišnej intenzity a pomerného zastúpenia píkov. Na rozdiel od zdravých dobrovoľníkov bola fluorescence patologických vzoriek značne variabilná. Špecificky pri vzorkách moču od pacientov s rakovinou vaječníka sme pozorovali nízku intenzitu fluorescence v celej sledovanej oblasti. Významné zmeny

vykazovala hlavne oblast fluorescenčného pásu C v oblasti excitácie 300 – 400 nm a oblasti emisie 400 – 450 nm (Obr. 4).



Obr. 4 Príklad koncentračných matíc synchronných spektier moču pacienta s malígnym tumorom vaječníka.

Využitím štatistickej analýzy sme vybrali pre možný test moču na prítomnosť karcinómu vaječníka intenzity fluorescence píku 1C a 2C, so senzitivitou 92 % a špecificitou 97 % z emisných spektier a senzitivitou 95 % a špecificitou 97 % zo synchronných spektier (Obr. 5).

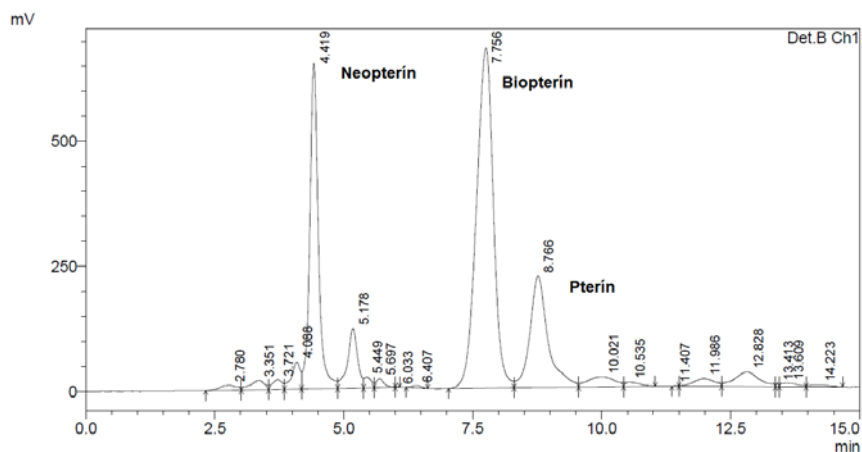


Obr. 5 Závislosť intenzity fluorescence píku 1C₇₀ pri 330 nm a píku 2C₇₀ pri 360 nm v synchronnom spektre vzoriek moču zdravých dobrovoľníkov a pacientov s rakovinou vaječníka.

Pri testovaní hraničných nádorov vaječníka sme s rovnakými parametrami synchronných spektier dosiahli senzitivitu 83,3 % a špecificitu 96,9 %.

V prípade rakoviny prsníka sme ako parametre vybrali intenzitu a polohu maxima píku 1C v synchronných spektrách. S týmito parametrami sme dosiahli senzitivitu 93,8 % a špecificitu 87 %.

Vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou sme v moči zdravých dobrovoľníkov a pacientov s nádorovým ochorením určovali hladiny troch pterínov: neopterín, biopterín a pterín (Obr. 6).

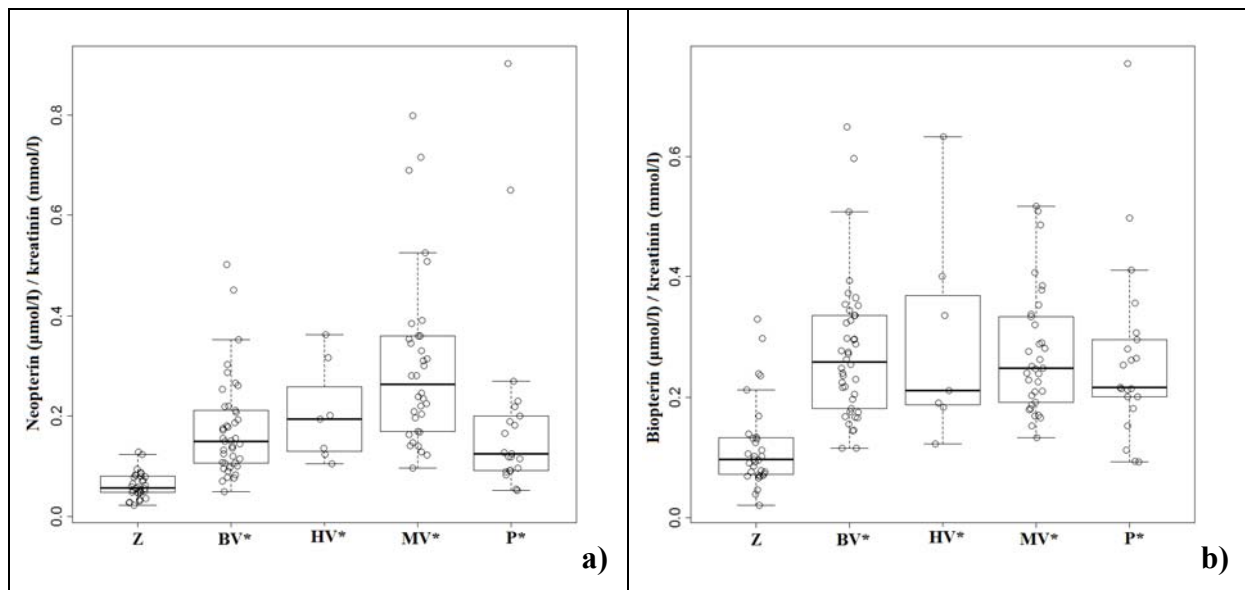


Obr. 6 Chromatogram vzorky moču pri excitácii 350 nm a emisii 450 nm

Ako štatisticky významné zmeny v hladinách pterínov v patologických vzorkách moču oproti hladinám pterínov v moči zdravých jedincov sme hodnotili zmeny pri $P < 0,001$.

Vo vzorkách moču od pacientov s benígnym, hraničným a malígnym tumorom vaječníka sme zaznamenali signifikantne zvýšené hladiny neopterínu oproti zdravému moču. Navyše hladiny neopterínu sa zvyšovali so stupňujúcou malignitou (benígnym, hraničným, malígnym tumorom). Neopterín bol signifikantne zvýšený aj v moči pacientov s rakovinou prsníka (Obr. 7a).

Hladiny biopterínu boli signifikantne zvýšené vo vzorkách moču všetkých sledovaných pacientov oproti moču zdravých jedincov, ale bez vplyvu malignity na hladiny biopterínu (Obr. 7b)



Obr. 7 Hladiny (a) neopterinu a (b) biopterinu v moči skúmaných skupín ľudí. Zdraví dobrovoľníci (Z), pacienti s benígnym (BV), malígnym (MV) a hraničným (HV) tumorom vaječníka, pacienti s rakovinou prsníka (P). * - významná zmena hladiny pterínu v moči pacientov oproti zdravým kontrolám pre $P < 0,001$.

Hladiny pterínu vo vzorkách moču pacientov s tumorom vaječníka boli signifikantne zvýšené len pre vzorky moču od pacientov malígnym tumorom vaječníka. Hladiny pterínu v prípade benígneho a hraničného tumoru ukazovala len tendenciu zvyšovania s malignitou. Hladiny pterínu vo vzorkách moču pacientov s rakovinou prsníka neboli signifikantne zvýšené oproti vzorkám moču od zdravých jedincov (signifikantne zvýšené hladiny pterínu len na hladine významnosti 0,01).

Použitá literatúra

- ALFANO, R. R., PRADHAN, A., TANG, G. C., WAHL, S. J. 1989. Optical spectroscopic diagnosis of cancer and normal breast tissues. *Journal of the Optical Society of America B*, 6: p. 1015-1023.
- BUCHWIETZ, O., STAEBLER, A., TIO, J., KIESEL, L. 2006. Detection of peritoneal endometriotic lesions by autofluorescence laparoscopy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 195(4): p. 949-954.
- DE VELD, D. C., WITJES, M. J., STERENBORG, H. J., ROODENBURG, J. L. 2005. The status of in vivo autofluorescence spectroscopy and imaging for oral oncology. *Oral Oncology*, 41(2): p. 117-131.
- DUBAYOVÁ, K., KUŠNÍR, J., PODRACKÁ, L. 2003. Diagnostic monitoring of urine by means of synchronous fluorescence spectrum. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 55: p. 111-119.
- GANESAN, S., MADHURI, S., ARUNA, P., SUCHITRA, S., SRINIVASAN, T. G. 1999. Native fluorescence characterization of human liver abnormalities. *Proceedings of SPIE*, 3599: p. 20-24, *Optical Diagnostics of Biological Fluids IV*, Priezzhev, A. V., Asakura, T. (Eds.)
- IKEDA, N., HONDA, H., HAYASHI, A., USUDA, J., KATO, Y., TSUBOJ, M., OHIRA, T., HIRANO, T., KATO, H., SERIZAWA, H., AOKI, Y. 2006. Early detection of bronchial lesions using newly developed videoendoscopybased autofluorescence bronchoscopy. *Lung Cancer*, 52(1): p. 21-27.
- KAPADIA, C. R., CUTRUZZOLA, F. W., O'BRIEN, K. M., STETZ, M. L., ENRIQUEZ, R., DECKELBAUM, L. I. 1990. Laser-induced fluorescence spectroscopy of human colonic mucosa. Detection of adenomatous transformation. *Gastroenterology* 99(1): p. 150-157.
- KARTHIKEYAN, K., MASILAMANI, V., GOVINDASAMY, S. 1999. Spectrofluorimetric detection of DMBA-induced mouse skin carcinoma. *Pathology & Oncology Research*, 5: p. 46-48.
- KUŠNÍR, J., DUBAYOVÁ, K., LEŠKOVÁ, L., LAJTAR, M. 2005. Concentration matrices - Solutions for fluorescence definition of urine. *Analytical Letters*, 38: p. 1559-1567.
- MADHURI, S., ARUNA, P., BIBI, M., GOWRI, V., KOTESSWARAN, D., GANESAN, S. 1997. Ultraviolet fluorescence spectroscopy of blood plasma in the discrimination of cancer from normal. *Proceedings of SPIE*, 2982: p. 41-45.
- MASILAMANI, V., AL-ZHRANI, K., AL-SALHI, M., AL-DIAB, A., AL-AGEILY, M. 2004. Cancer diagnosis by autofluorescence of blood components. *Journal of Luminescence*, 109: p. 143-154.
- MASILAMANI, V., RABAH, D., ALSALHI, M., TRINKA, V., VIJAYARAGHAVAN, P. 2011. Spectral discrimination of benign and malignant prostate tissues--a preliminary report. *Photochemistry and Photobiology*, 87(1): p. 208-214.
- POLICARD, A. 1924. Etudes sur les aspects offerts par des tumeurs experimentales examinees a la lumiere de Wood. *Comptes Rendues Hebdomadaires des Séances Mémoires la Société Biologie ses Filiales*, 91: p. 1423-1424.
- ROY, K., BOTTRILL, I., INGRAMS, D. R., PANKRATOV, M. M., REBEIZ, E. E., WOO, E., KABANI, S., SHAPSHAY, S. M., MANOHARAN, R., ITZKAN, I., FELD, M. S. 1995. Diagnostic fluorescence spectroscopy of oral mucosa. *Proceedings of SPIE*, 2395: p. 135-142.
- WHO 2008. World health statistics. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data.

Summary

The presented work deals with differences in the metabolites fluorescence in urine of patients with tumor disease comparing to healthy volunteers. Using the excitation-emission matrices and synchronous fluorescence spectra we have set four bands of healthy volunteers urine autofluorescence. These bands have been caused by various fluorescent metabolites fluorescence. The analysis of of the urine synchronous spectra concentration matrices provided us with the normalization of urine dilution to reach the excitation-emission maximum. The maximum existed due to indol-type fluorophores fluorescence, caused by the protein-metabolism. After the normalization of urine concentration, the fluorescence spectra of healthy patients have shown uniform characteristics. We have revealed that intensity of urine autofluorescence of patients with tumors, as well as relationship in proportionality of fluorescence peaks are utterly variable. Really significant differences have been observed mostly in the area of excitation at 300 - 400 nm and emission at 400 - 450 nm. Based on changes in urine synchronous fluorescence spectra we could differ the samples of patients with ovarian cancer from healthy ones with 95% of sensitivity and 97% of specificity. In case of the border-line ovarian tumor we could distinguish it with 83.3% of sensitivity and 96.9% of specificity, whilst distinguishing of breast cancer patients from healthy volunteers has shown 93.8% of sensitivity and 87% of specificity. Using a high performance liquid chromatography (HPLC) we have identified the neopterin, biopterine and pterine levels in healthy volunteers urine as well as in the urine of patients with tumor disease. We have found that the urine neopterin levels in patients with ovarian tumor disease were significantly ($\alpha=0.001$) increased comparing to healthy volunteers. In addition, these levels have been increasing with a malignity of tumor (benign < borderline < malign). There were larger amounts of neopterin in urine of patients with breasts cancer. Comparing the biopterine levels in urine of healthy volunteers to urine of patients with tumors, we have revealed that there are higher biopterine levels in the urine of patients with any tumor. Urine pterine levels were significantly higher only in patients with ovarian cancer.

Key words: **urine, autofluorescence, tumor, pterins, synchronous fluorescence spectra**

Publikačná činnosť autora

ADC Vedecké práce v zahraničných karentovaných časopisoch

- ADC ŠIKUROVÁ, L., BALIŠ, P., ZVARÍK, M. 2011. Penetration of laser light through red blood cell ghosts. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 103(3): p. 230 - 233.
- ADC FEDOR, P., DORIČOVÁ, M., DUBOVSKÝ, M., PROKOP, P., SIERKA, W., KISELÁK, J., ZVARÍK, M. 2010. Cereal pests among nest parasites – a story of barley thrips. *Entomologica Fennica* 21(4): p. 221 -231.

AED Vedecké práce v domácich recenzovaných vedeckých zborníkoch, monografiách

- AED ŠIKUROVÁ, L., ZVARÍK, M., 2011. Modular set of prominence 20A Shimadzu HPLC for identification of biomacromolecules by UV-VIS absorption and fluorescence detectors. *Acta Physica Universitatis Comenianae – New Series*, Bratislava, Comenius University Press, 52: p. 77 – 82.

AFD Publikované príspevky na domácich vedeckých konferenciách

- AFD ZVARÍK, M., WACZULÍKOVÁ, I., ŠIKUROVÁ, L. 2008. The effect of salt solution on absorption and fluorescence spectra of thiadicarbocyanine tribromide. 16th Conference of Slovak Physicists Proceedings, Košice: Slovak Physical Society, p. 107 – 108.
- AFD ZVARÍK, M., ŠIKUROVÁ, L., ULIČNÁ, O. 2009. Fluorescent measurement of hypercholesterolemia-induced changes in mitochondria. 17th Conference of Slovak Physicists Proceedings (CD ROM), Bratislava: Slovak Physical Society, p. 181 – 182.

AFG Abstrakty príspevkov zo zahraničných konferencií

- AFG ZVARÍK, M., ŠIKUROVÁ, L., HUNÁKOVÁ, E. 2011. Complex fluorescence analysis of human urine from patients with ovarian cancer. 21th International Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics: Abstracts, Cracow: J. Haber Institute of Catalysis and Surface Chemistry, PAS, p. 291.
- AFG ZVARÍK, M., ŠIKUROVÁ, L., HUNÁKOVÁ, E., MARTINICKÝ, D. 2011. Synchronous fluorescence spectra of urine from normal and oncological individuals. 61. Česko-slovenské farmakologické dny a EPHAR symposium, Brno: Tribun EU, p. 166.

AFH Abstrakty príspevkov z domácich konferencií

- AFH HABODÁSZOVÁ, D., WACZULÍKOVÁ, I., MATEAŠÍK, A., FERKO, M., ZVARÍK, M., ŠIKUROVÁ, L. 2004. Diabetes induced changes in biophysical properties of rat heart mitochondrial membranes. *Slovak Biophysical Symposium*, Herľany, p. 44 -45.
- AFH ZVARÍK, M., ŠIKUROVÁ, L., HUNÁKOVÁ, E. 2010. Possible cancer diagnosis by synchronous fluorescence spectra of urine. *Analytické metódy a zdravie človeka*,

Zborník abstraktov (elektronický dokument), Bratislava: Slovenská vákuová spoločnosť. Nestr.

AFK Postery zo zahraničných konferencií

AFK ZVARÍK, M., ŠIKUROVÁ, L. 2007. Spectral characteristics of thiadicyanobenzene tribromide – a perspective probe for membrane potential. Regional Biophysics Conference 2007, Szeged: Institute of Biophysics, p. 179.

AFK MACHALA, Z., JEDEOVSKÝ, I., GIERTL, D., CHLÁDEKOVÁ, L., PONGRÁC, B., ZVARÍK, M., ŠIKUROVÁ, L. 2008. Sterilisation by DC discharges at atmospheric pressure. Programme & Abstract Book of the 23rd Symposium on Plasma Physics and Technology, Praha, České vysoké učení technické, p. 130.

AFL Postery z domácich konferencií

AFL ZVARÍK, M., ŠIKUROVÁ, L. 2008. Monitoring possibilities of the mitochondrial membrane potential by a thiadicyanobenzene tribromide fluorescent probe. Proceedings of the III. Slovak Biophysical Symposium, Bratislava, FMFI UK, p. 51 – 52.