

Střední průmyslová škola chemická v Brně

Stredoškolská odborná činnost

06 ZDRAVOTNICTVÍ

ANALÝZA METALOTHIONEINU JAKO PROGNOSTICKÉHO MARKERU NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ

Michal Svoboda



BRNO 2006

Střední průmyslová škola chemická v Brně

Středoškolská odborná činnost

06 ZDRAVOTNICTVÍ

ANALÝZA METALOTHIONEINU JAKO PROGNOSTICKÉHO MARKERU NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ

Michal Svoboda



Konzultanti: Mgr. Věra Ehrenbergerová¹

Ing. René Kizek, Ph.D.²

¹Střední průmyslová škola chemická, Vranovská 65, 614 00 Brno

²Ústav chemie a biochemie, MZLU, Zemědělská 1, 613 00 Brno

BRNO, ÚNOR 2006

Journey forward
Cesta vpřed

Diagnóza: RAKOVINA
Tonutí v moři vzteku, zoufalství a beznaděje
Zrazení zevnitř.
Testy-operace-léčba
Potom; NADĚJE ... ZNOVUZROZENÍ
Nový začátek života plného vášně
ŠTĚSTÍ!
Budoucnost
A, ještě jednou
VYLÉČENÍ



Poděkování

Především bych chtěl poděkovat Ing. René Kizekovi, Ph.D. a Mgr. Věře Ehrenbergerové za velmi vstřícný přístup a skvělé vedení při zpracovávání práce.

Dále Vojtěchu Adamovi Bc. za cenné připomínky, konzultace nad výsledky a pomoc při překladech cizojazyčné literatury.

MUDr. Haně Binkové, Ph.D., prof. MUDr. Richardu Průšovi, CSc., a prof. MUDr. Tomáši Eckschlagerovi, CSc., za poskytnutí klinického materiálu pro práci.

Všem zaměstnancům a studentům pracujícím v Laboratoři molekulární biochemie a bioelektrochemie Ústavu chemie a biochemie Agronomické fakulty Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity v Brně za jejich ochotu, vstřícnost se kterou mě mezi sebe přijali, a obětavost při řešení problémů.

A samozřejmě i České onkologické společnosti za materiální zajištění výzkumu v podobě grantu RASO 8/2005.

Obsah

PODĚKOVÁNÍ	4
OBSAH.....	5
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	7
1. ÚVOD	8
I. TEORETICKÁ ČÁST	9
1. NÁDOROVÁ ONEMOCNĚNÍ.....	10
1.1. <i>Vznik zhoubného nádoru</i>	<i>10</i>
1.2. <i>Benigní a maligní nádory</i>	<i>12</i>
2. CHARAKTERISTIKA VYBRANÝCH ZHOUBNÝCH NÁDORŮ	14
2.1. <i>Maligní melanom.....</i>	<i>14</i>
2.2. <i>Zhoubný novotvar prsu.....</i>	<i>15</i>
2.3. <i>Zhoubný novotvar plic.....</i>	<i>16</i>
2.4. <i>Zhoubný novotvar štítné žlázy</i>	<i>17</i>
2.5. <i>Zhoubný novotvar ledviny</i>	<i>17</i>
2.6. <i>Zhoubný novotvar jícnu.....</i>	<i>18</i>
2.7. <i>Zhoubný novotvar tlustého střeva</i>	<i>18</i>
2.8. <i>Akutní lymfoblastická leukémie.....</i>	<i>19</i>
2.9. <i>Neuroblastom</i>	<i>19</i>
2.10. <i>Nádory hlavy a krku</i>	<i>20</i>
3. METALOTHIONEINY	21
3.1. <i>Biosyntéza metalothioneinů v lidském organismu</i>	<i>21</i>
4. NÁDOROVÉ MARKERY	24
4.1. <i>Nový nádorový marker?</i>	<i>25</i>
5. PROTINÁDOROVÁ LÉČBA.....	26
5.1. <i>Vznik mnohočetné rezistence na léčbu nádorových onemocnění.....</i>	<i>26</i>
5.1.1. <i>Cisplatina a hladina MT</i>	<i>28</i>
5.1.2. <i>Radioterapie a hladina MT</i>	<i>29</i>
6. ELEKTROCHEMICKÉ METODY VYUŽITELNÉ PRO STUDIUM PROTEINŮ.....	30
6.1. <i>Voltametrie a polarografie.....</i>	<i>30</i>
6.1.1. <i>Diferenční pulzní polarografie a voltametrie</i>	<i>33</i>
6.1.2. <i>Adsorptivní přenosová voltametrie</i>	<i>33</i>
6.1.3. <i>Chronopotenciometrická rozpouštěcí analýza</i>	<i>34</i>
6.2. <i>Katalytické vylučování vodíku.....</i>	<i>35</i>
6.2.1. <i>Brdičkova reakce.....</i>	<i>35</i>
6.2.2. <i>H pík (Heyrovského přenátriová vlna).....</i>	<i>37</i>
II. CÍLE PRÁCE	40
III. PRAKTICKÁ ČÁST	41
7. MATERIÁLY A METODY	41
7.1. <i>Chemikálie.....</i>	<i>41</i>
7.2. <i>Klinický materiál</i>	<i>41</i>

7.3.	<i>Buněčné linie</i>	42
7.4.	<i>Určení esterásové aktivity</i>	42
7.5.	<i>Biochemická analýza</i>	42
7.6.	<i>Příprava vzorků pro elektroanalytické stanovení metalothioneinu</i>	43
7.7.	<i>Elektroanalytické stanovení metalothioneinu</i>	43
8.	VÝSLEDKY A DISKUSE	44
8.1.	<i>Elektrochemické měření MT</i>	44
8.1.1.	Optimalizace elektroanalytických metod pro analýzu MT - pík H.....	46
8.1.2.	Analýza MT pomocí Brdičkovy reakce	47
8.1.3.	Využití navržených postupů pro stanovení metalothioneinu v krvi a krevním séru.	49
8.2.	<i>Vztah metalothioneinu k nádorovým onemocněním</i>	49
8.2.1.	Analýza MT v krevním séru pacientů se zhoubnými nádory.....	50
8.2.2.	Tvar a průběh voltametrických křivek v krevním séru pacientů se zhoubnými nádory	53
8.2.3.	Sledování hladiny MT v průběhu protinádorové léčby.....	54
8.2.4.	Množství MT v nádorové tkáni	56
8.3.	<i>Metalothionein a jeho vztah k MDR</i>	56
9.	ZÁVĚR	59
10.	SHRNUTÍ	60
11.	SUMMARY	62
12.	PŘEHLED LITERATURY	64

Seznam použitých zkratek

CV – cyklická voltametrie (Cyclic Voltammetry)
DPP – diferenční pulzní polarografie (Differential Pulse Polarography)
DPV – diferenční pulzní voltametrie (Differential Pulse Voltammetry)
CPSA – chronopotenciometrická rozpouštěcí analýza za konstantního proudu (Constant Current Chronopotentiometric Stripping Analysis)
AAS – atomová absorpční spektroskopie (Atomic Absorption Spectrometry)
HMDE – visící rtuťová kapková elektroda (Hanging Mercury Drop Electrode)
DME – kapající rtuťová elektroda (Dropping Mercury Electrode)
GCE – elektroda ze skelného uhlíku (Glassy Carbon Electrode)
PGE – elektroda z pyrolytického grafitu (Pyrolytic Graphite Electrode)
CPE – kompozitní uhlíkové elektrody (Composite Carbon Electrode)
HOPGE – elektroda z vysoce orientovaného pyrolytického grafitu (Highly Oriented Pyrolytic Graphite Electrode)
SCE – nasycená kalomelová elektroda (Saturated Calomel Electrode)
AdTSV – adsorptivní přenosová rozpouštěcí voltametrie (Adsorptive Transfer Stripping Voltammetry)
 E_p – potenciál píku (Potential of Peak)
 E_{sw} – potenciál bodu obratu (Switching Potential)
 I_c – kapacitní proud
 I_{ir} – ireverzibilní proud
 I_k – kinetický proud
 I_p – proud píku
 I_d – difúzní proud
 t_A – doba akumulace
MT – metalothionein (Metallothionein)
ZN – zhoubný novotvar

1. Úvod

Při pohledu na žebříček nejčastějších příčin úmrtí ve vyspělých zemích zjistíme, že první místo zaujímají kardiovaskulární následované nádorovými onemocněními. Podle Světové zdravotnické organizace (WHO) je každým rokem ve vyspělých zemích diagnostikováno asi 11 milionů případů onemocnění maligním nádorem a předpokládá se, že v roce 2020 bude nově diagnostikovaných případů více než 16 milionů. Nyní jsou nádorová onemocnění příčinou smrti více než 6,7 miliónu lidí celosvětově, což znamená, že přibližně každých pět sekund na Zemi umírá jeden člověk na zhoubný novotvar. Z těchto důvodů vytvořila WHO v roce 2002 Univerzální program pro kontrolu rakoviny, který je možný adaptovat pro jakoukoliv zemi na světě. Jedním z hlavních bodů tohoto programu je „Screening a včasná diagnostika nádorového onemocnění“. Je velmi dobře známo, že včasná diagnostika nádorového onemocnění velmi výrazně zvyšuje šanci na úspěšnou léčbu pacienta trpícího tímto onemocněním. Proto, abychom mohli nádorové onemocnění včas diagnostikovat, potřebujeme ukazatel – nádorový marker. Jsou to látky, obvykle proteiny, které jsou produkovány v těle jako odpověď na růst nádorového onemocnění anebo samotnou nádorovou tkání. Některé markery jsou specifické pouze pro jeden typ zhoubných nádorů, zatímco další jsou použitelné i pro více typů. Téměř všechny dnes používané markery jsou detekovatelné nejen v přítomnosti nádorového onemocnění. V dnešní době je v běžné praxi používána pouze hrstka nádorových markerů jako např. specifický antigen prostaty. Mnoho dalších potencionálních markerů je stále studováno, přičemž se kladou velké požadavky na snadnou detekci, dostupnost pro celou populaci (screening), závislost na stádiu onemocnění, ukazující vývoj onemocnění a objevující se již při samotném zrodu onemocnění – včasná diagnostika.



On Hearing the News. Vítězné dílo prvního ročníku soutěže Lilly Oncology on Canvas

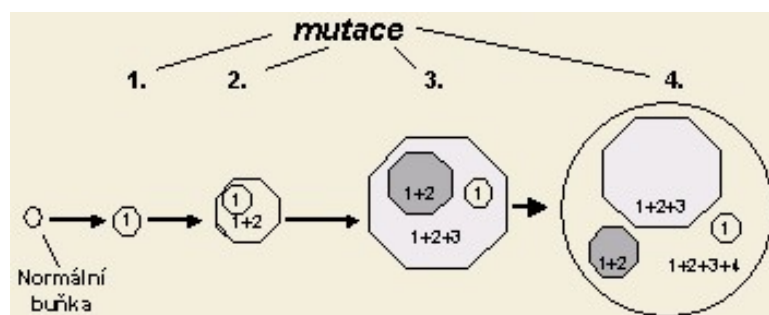
I. Teoretická část

Každým rokem je ve vyspělých zemích diagnostikováno asi 11 milionů případů onemocnění maligním nádorem a 6,7 milionu lidí na tuto nemoc umírá. Národní onkologický registr České republiky poskytuje cenné informace o nově diagnostikovaných případech zhoubných onemocnění (ABRHAMOVA 2005; ASCHERMANNNOVA 2005; JURICKOVA 2006). V roce 2003 bylo nahlášeno 66 637 nových případů zhoubných novotvarů a nádorů *in situ* (dg. C00-C97 a D00-D09 dle 10. revize MKN). Incidence onemocnění (absolutní i relativní počty) je u mužů v současnosti jen nepatrně vyšší než u žen. Dlouhodobě u obou pohlaví incidence zaznamenává rostoucí trend. Počet nově hlášených případů v roce 2003 byl u žen téměř dvojnásobný než v roce 1975 (ABRHAMOVA 2005). Incidence ZN u mužů narůstala pomaleji, mezi roky 1975 a 2003 se relativní ukazatel zvýšil o 80 %. Tempo nárůstu incidence novotvarů je plynulé a ani data pro rok 2003 nenaznačují zvrát v tomto vývoji. Absolutní počet zemřelých v roce 2003 narostl na 29 195 (16 208 mužů a 12 987 žen), což je 26,2 % z celkového počtu zemřelých v ČR. Podle statistik jsou jednou z nejčastějších onkologických diagnóz zhoubné nádory trávicího ústrojí, zejména kolorekta (dg. C18 až C21). Přes zmíněné pozitivní změny snížení standardizovaného počtu onemocnění Česká republika zaujímá těsně za Maďarskem druhou příčku v pomyslném žebříčku nejvyšší úmrtnosti na dg. C18 až C21 v Evropě. Jako pozitivní lze označit vývoj rakoviny děložního hrdla (dg. C53). Nově hlášené případy zhoubných onemocnění se týkají především osob starších 60ti let. Zhoubné nádory u žen jsou v úhrnu diagnostikovány v mladším věku než u mužů, neboť některé diagnózy jsou početné už ve věkové skupině 30-59 let (ABRHAMOVA 2005; JURICKOVA 2006). Z těchto důvodů vyhlásilo Ministerstvo zdravotnictví ČR a Česká onkologická společnost program zaměřený na pokles výskytu zhoubných onemocnění v české populaci, který se má, kromě jiného, zaměřit na zlepšení včasné diagnostiky mezi něž náleží i hledání nových potenciálních nádorových markerů.

1. Nádorová onemocnění

1.1. Vznik zhoubného nádoru

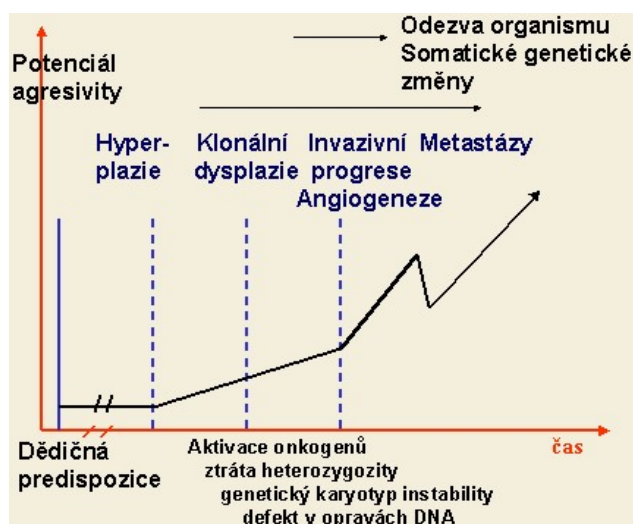
Definovat, co je vlastně rakovina, je poměrně obtížné. Slovo vychází z řeckého slova *karkinos* = *rak*, nebo *onkos* = *krab* a z latinského *cancer* = *rak*. Rychlost, s jakou se buňka množí a roste, patří k velmi přísně řízeným biologickým procesům, které zajišťují, aby míra buněčné proliferace odpovídala specifickým potřebám celého organismu. Vzácně dochází k poruchám těchto regulací a buňka se začíná nekontrolovatelně dělit. Populace takovýchto nechtěných buněk, které neodpovídají na přirozené signály pro utlumení růstu, pak tvoří nádor. Rychle proliferující nádorové buňky představují pro tělo jistou zátěž, ale pokud v nich nedojde k dalším změnám, které způsobují maligní konverzi, neohrozí život celého organismu. Buňky, které se sice rychle množí, ale jejich funkce a morfologie je zachována vytváří benigní nádory. Benigní nádory zůstávají velmi dobře lokalizované a nešíří se do svého okolí. Maligní buňky mají snahu pronikat do svého okolí (invazivita), ale i na vzdálená místa (metastázy). Podstata přeměny zdravé buňky na nádorovou – tzv. maligní transformace – je doposud zahalena řadou otázek a nejasností. U nádorových buněk jsou pozorovány výrazné změny v jejich diferenciaci a DNA (LEE *et al.* 2004). Vznik maligního onemocnění je několika stupňový proces vzniku mutací genů kontrolujících proliferaci, diferenciaci a zánik buněk (Obr. 1).



Obr. 1.: Klonální vývoj nádorových buněk. 1. mutace znamená počátek nádorové transformace. Buňky s 1. a 2. mutací postupně v nádorové tkáni přerůstají nebo nahrazují buňky s 1. mutací. Další mutace (genetické změny) podněcují buněčnou populaci k větší agresivitě. Subklonální genetická heterogenita nádoru je odrazem postupujícího vývoje nádorové tkáně. Převzato z https://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xchg/zc/xsl/3141_1486.html.

Ačkoli některé formy nádorů jsou dědičné, většina vzniká na podkladě mutace somatických buněk a je způsobena chybami v replikaci DNA nebo působením kancerogenů. Učebnicovým příkladem je efekt UV-záření na vzniku dimerů dvou sousedících pyrimidinů. Tato změna

překáží normální transkripci i replikaci DNA. Účinek X-paprsků (ionizující záření) je odlišný: dochází k rozštěpení (přerušení) DNA-řetězce; vznikají tak volné řetězce DNA, které musí být beze zbytku opět navázány opravným mechanismem. Nestane-li se tak, může dojít k translokaci určitých úseků chromosomů, což bývá příčinou aktivace speciálních genů označovaných jako protoonkogeny. Jedna genetická změna však nestačí navodit maligní transformaci buňky; ta obvykle vzniká až po několika (5ti až 10ti) genových mutacích v průběhu řady let. Genová změna navodí vznik nádorového fenotypu v možném sledu: proliferace epitelové buňky → hyperplazie → adenom → dysplazie → karcinom „*in situ*“ → karcinom invazivní. Přeměna normální tkáně organismu do stavu invazivní nádorové choroby trvá v průměru 5 – 10 let. Průběh kancerogeneze bývá členěn do tří stádií:



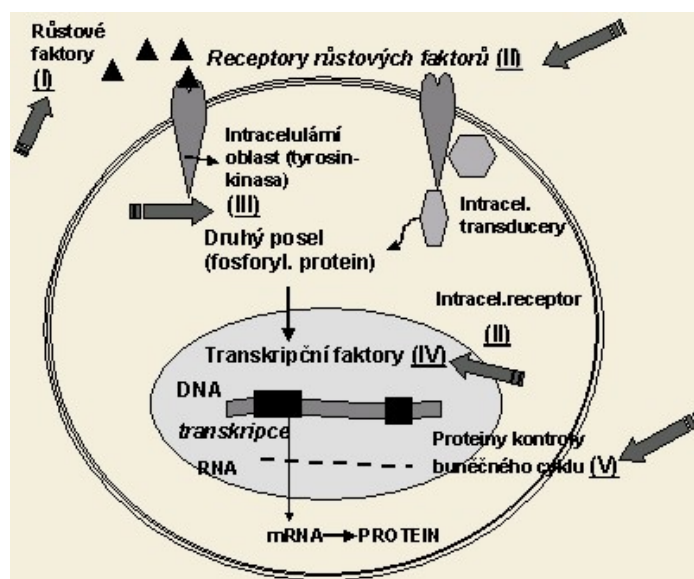
Obř. 2.: Schéma vývoje tumorigeneze. Převzato z https://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xchg/zc/xsl/3141_1486.html.

(1) **Iniciační stádium**, které představuje prvotní genetickou událost, tj. mutaci určitého kritického genu. Jde o období časově krátké, ale nevratné; iniciovaným buňkám přináší růstovou selekční výhodu. Buňka tak získává potenciál maligní transformace; v tomto stádiu se může proces zastavit. (2) **Promoční stádium**, které trvá léta, až desetiletí; postižené buňky (klon) jsou stimulovány ještě k intenzivnější proliferaci. Promoční faktory samy o sobě nejsou však schopny vyvolat maligní nádorovou transformaci, jen ji podpořit. Intenzita promočních mechanismů musí dosáhnout určitého stupně, aby byl iniciovaný klon stimulován, a naopak odstranění podpůrných faktorů může proces kancerogeneze zpomalit nebo i zastavit. (3) **Stádium progresse** je charakterizováno dalším postupným nahromaděním genetických změn jako je (a) nekontrolovaný růst pro trvalou aktivaci signální transdukce růstového stimulu, (b) alterace kritických bodů buněčného cyklu, (c) deregulace DNA- transkripčních faktorů. Nádor zůstává nejprve v místě svého vzniku, ale aktivací dalších faktorů se začne šířit do nejbližšího

okolí (invaze) a cestou krevního oběhu na místa vzdálená (metastázy). Velmi důležitou podmínkou pro růst nádoru je dostatečný přísun živin a kyslíku, který musí být zajištěn vytvořením cévního zásobení (nádorová neoangiogeneze), viz. **Obr. 2**.

1.2. Benigní a maligní nádory

Podle způsobu šíření nádoru, a tím daného klinického chování, rozdělujeme nádory na benigní a maligní. Rozdíl v šíření jednotlivých nádorů je dán hlavně růzností v enzymatické výbavě a vlastnostech buněčných povrchů u buněk různých nádorů ve srovnání s buňkami netransformovanými (**Obr. 3**).



Obr. 3.: Schéma buněčné regulace. Převzato z https://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xchg/zc/xsl/3141_1486.html.

Buňky benigních (nezhoubných) nádorů nemají oproti jiným proliferujícím buňkám buněčné povrchy výrazně změněny, a proto je jejich růst pouze expanzivní. Rostou většinou pomalu, mají organoidní stavbu a jsou homologní, zůstávají ohraničené, často vazivově opouzdřené a na okolí působí většinou pouze tlakem, který mechanismem atrofie může vytvářet sekundární pouzdro i u nádorů, které vlastní pouzdro nemají.

Maligní (zhoubné) nádory na rozdíl od benigních rostou vůči okolí agresivně a jsou nepřesně ohraničené. Změna povrchové struktury maligních buněk způsobuje změnu reaktivity při kontaktu s jinými buňkami. To má za následek propagaci tkáňovými štěrbinami – infiltrativní růst. Přítomnost proteáz a dalších enzymů na jejich povrchu vede při proliferaci k destrukci okolních tkání (invazivní růst), který je často provázen krvácením z narušených cév. K neohraničenosti přispívá i snížená kohezivita mezi maligními buňkami a snížená adhezivita nádorových buněk ke tkáňovým membránám, obě podmíněné poruchou mezibuněčných spojů

v rámci změn buněčných povrchů. Změny povrchů vedou i k získání větší motility nádorové buňky, a tím k usnadnění prostupu hostitelskou tkání (VORLÍČEK 1995). Všechny zmíněné vlastnosti enzymatické výbavy a povrchů buněk maligních nádorů podmiňují i další velmi charakteristickou vlastnost maligního nádoru, kterou je nádorový rozsev – metastázování. Metastázování nádoru je vytváření dceřiných patologických ložisek v místech vzdálených od primárního nádoru. Celý proces probíhá ve třech fázích. První fází je uvolnění nádorových buněk z primárního nádoru hystolytickými faktory agresivního růstu, ale i mechanickými vlivy, např. intratumorózním tlakem. Druhá fáze je představována transportem nádorových buněk na nové místo, probíhající buď ve formě implantačních metastáz (oddělování částic a jejich ujímání na vzdáleném místě dutiny), lymfogenních metastáz (šíření nádorových buněk lymfatickými cévami) nebo hematogenních metastáz (šíření nádorových buněk krevními cévami). Třetí fází je etablování uvolněných a transportovaných nádorových buněk na novém místě. Tato fáze je pro výsledný nádorový rozsev nejpodstatnější a její úspěšnost je, stejně jako u obou předchozích, dána faktory nádorové buňky i faktory hostitelskými (PEPPER *et al.* 2003).

2. Charakteristika vybraných zhoubných nádorů

Tato práce byla zaměřena na studium změny obsahu metalothioneinu u deseti různých druhů zhoubných nádorových onemocnění.

2.1. Maligní melanom

Maligní melanom vzniká maligní přeměnou melanocytů, buněk neuroektodermálního původu, vyskytujících se především v kůži, v duhovce a spojivce, méně ve sliznicích. Nejčastěji se vyskytují kožní formy melanomu. Slizniční melanomy jsou vzácné. Uveální melanom je přes relativně nízkou incidenci nejčastějším zhoubným nádorem oka. Incidence melanomu trvale roste u mužů i u žen. Vyskytuje se prakticky během celého produktivního věku s maximem od 30 do 70 let. Mírnou tendenci pomalejšího nárůstu mortality ve srovnání s růstem incidence lze vysvětlit jen vyšším záchytem poněkud časnějších, a tedy prognosticky příznivějších stadií vlivem obecně lepší informovanosti obyvatelstva, protože k výraznějšímu pokroku v léčbě melanomu dosud nedošlo. Rizikovým faktorem pro vznik maligního melanomu vznikajícího nejčastěji z plošného pigmentového pigmentového névu je expozice UV záření, zejména jeho B složce. Maligní melanom se vyskytuje ve čtyřech formách: Lentigo maligna, akrální melanom, nejčastěji se vyskytující Superficiální melanom a prognosticky velmi nepříznivý nodulární melanom s výrazným vertikálním růstem do hlubších vrstev kůže. Občas se setkáváme s melanomem až ve fázi uzlinových metastáz, aniž se podaří nalézt primární ložisko (LAUEROVA *et al.* 2002). Průběh onemocnění je velmi variabilní vzácné nejsou případy velmi pomalé progresy trvající mnoho let, ani fulminantní průběhy s rychlou orgánovou diseminací z primárního ložiska během několika měsíců. Melanom metastazuje lymfogenně i hematogenně, ve většině případů se však metasázy objeví nejprve v regionálních uzlinách nebo lymfatických ve směru k regionální uzlinové oblasti. Značnou afinitu má melanom ke kůži a podkoží. I vzdálený rozsev je často po dlouhou dobu omezen pouze na výsev kožních a podkožních metastáz, jichž může být i několik desítek až stovek, bez viscerální diseminace. Kromě psychické alternace z progresy onemocnění tito pacienti nijak zvlášť netrpí a zlom se dostaví až při rozvoji plicních, jaterních nebo mozkových metastáz. Základní a jedinou vskutku účinnou léčbou je chirurgický výkon, jehož kurativní možnosti jsou však omezeny pouze na lokalizované fáze onemocnění. Radioterapie se běžně neprovádí a chemoterapie vykazuje velmi malou účinnost s příznivým efektem trvajícím jen několik měsíců (KAVANAGH *et al.* 2005).



Obr. 4.: Morfologický projev maligního melanomu. Převzato z <http://www.onmeda.de/krankheiten/melanom.html>.

2.2. Zhoubný novotvar prsu

Zhoubné nádory mléčné žlázy jsou nejčastějším nádorovým onemocněním ženské části populace ve vyspělých zemích. U mužů je výskyt zanedbatelný – asi 1 %. Počet nově hlášených onemocnění rakovinou prsu se za posledních 20 let téměř zdvojnásobil. Výskyt karcinomu prsu je ojedinělý u žen mladších 25 let, zvyšuje se s věkem a nejčastější je mezi 40. až 60. rokem. Většina zhoubných lézí prsu jsou primárně epitelární karcinomy. U tohoto zhoubného nádoru rozlišujeme pět forem: lobulární karcinom, nejčastější duktální invazivní karcinom, Pagetův karcinom, cystosarcoma phyllodes a inflamatorní typ difúzního karcinomu vyznačující se vysokou agresivitou a velmi špatnou prognózou. Karcinom prsu se šíří lymfatickou cestou do regionálních mízních uzlin, běžný hematogenní rozsev je do plic, kostí jater, vzácností nejsou metastázy do mozku. Postižení měkkých tkání hrudní stěny včetně kůže bývá časté (HARRIS *et al.* 1992; VORLÍČEK 1995).



Obr. 5.: Zhoubný nádor prsu patří k velmi závažným onemocněním současnosti načež záslužně upozorňují i některé společnosti. Prevence je základním kamenem boje se zhoubnými nádory. Převzato z <http://www.brantese.cz/default.html>.

Nejběžnějším příznakem choroby je více či méně nápadný infiltrát tuhé konzistence v kterékoliv oblasti prsu, nejčastěji v zevních kvadrantech, který nemusí činit žádné obtíže, obvykle však na sebe upozorní tupou nebo bodavou bolestí. Jindy jde o plošnou infiltraci

nebo ztlustění některé části prsu, bez zřejmé ložiskové infiltrace. Nádor může být fixován ke kůži nebo hrudní stěně, je-li uložen při bázi. Kožní změny představují vtaženiny kůže nad nádorem, edém kůže, ekzematoidní změny nebo infiltrace bradavky a dvorce, rozšíření žilní kresby prsu, lokalizovaný nebo difúzní erytém, nádorová infiltrace a exulcerace kůže. Postup při léčbě nádoru prsu závisí na klinickém stadiu nemoci. Je-li nemoc zachycena již v počátcích, přistupuje se ke kurativnímu chirurgickému zákroku. V pozdějších stádiích je léčba prováděna radioterapeuticky, chemoterapeuticky, popřípadě v pozdních stádiích nemoci paliativně (ABE *et al.* 1992).

2.3. Zhoubný novotvar plic

V České republice zaujímá zhoubný nádor plic první místo mezi zhoubnými nádory u mužů a je na prvním místě v příčinách úmrtí na zhoubné nádory. Obvykle bývá diagnostikován u osob ve věku 35 až 75 let, nejčastější výskyt je mezi 55. až 60. rokem života. Incidence karcinomu plic má stoupající tendenci, a to především u žen. Podobně jako u jiných onemocnění se na vzniku karcinomu podílí celá řada faktorů exogenních (kouření, pracovní prostředí), genetických, imunologických, hormonálních i metabolických (HECHT 1999). Karcinomy plic představují velmi různorodou skupinu nádorů. Podle některých teorií vznikají ze společné buňky. Jiné teorie zastávají názor, že původ malobuněčných a nemalobuněčných karcinomů je odlišný. Růst začíná v bazální vrstvě epitelu bronchu, později nádor intenzivně prorůstá do okolí a většinou metastazuje. Bronchogenní karcinomy můžeme rozdělit podle histologického typu do 5 skupin: epidermoidní karcinom, malobuněčný karcinom, adenokarcinom, karcinom z velkých buněk a adenoepidermoidní karcinom, přičemž první tři typy se dělí stejnou měrou asi o 90% diagnostikovaných nádorů. Malobuněčný karcinom se vyznačuje rychlým růstem a výrazným sklonem k metastázování do kostí, jater, centrálního nervového systému, nadledvin, citlivostí k radioterapii i chemoterapii. Ostatní druhy karcinomu plic rostou sice pomaleji, metastazují později, jsou však málo citlivé na chemoterapii i radioterapii. Příznaky onemocnění závisejí na lokálním rozsahu nádoru, na prorůstání do okolí (mediastina, hrudní stěny, přilehlých orgánů) a na vzniku metastáz (metastazuje lymfatickou i krevní cestou). Jejich rozsah je značný, od příznaků souvisejících přímo s karcinomem (kašel, bolest hrudníku, dušnost) až po příznaky metastáz (bolesti hlavy, patologické zlomeniny kostí, poškození jater) (ZIEGLER *et al.* 1996). Při léčbě musíme vycházet z histologického typu nádoru, ze stádia onemocnění a z celkového klinického stavu. Malobuněčný karcinom je léčen ve většině případů chemoterapeuticky, radioterapie či chirurgický zákrok jsou indikovány velmi zřídka. U ostatních druhů karcinomu je naopak

chirurgický zákrok jedinou cestou k uzdravení a chemoterapie či radioterapie se zařazují pouze pro zlepšení kvality života (BECK *et al.* 1988).

2.4. Zhoubný novotvar štítné žlázy

Maligní onemocnění štítné žlázy tvoří heterogenní skupinu nádorů, které se vyskytují v každém věku, ale nejzávažnější průběh mají u starších pacientů. Štítná žláza je nejčastější lokalizací tumorů endokrinního systému a tvoří 89 % všech endokrinních malignit. Nejčastěji se vyskytuje u pacientů ve věku od 25 do 65 let. Prognóza onemocnění závisí na typu karcinomu, rozsahu onemocnění a u určitých druhů karcinomu také na věku pacienta. Některé dobře diferencované karcinomy rostou tak pomalu, že diagnóza malignity zde záleží spíše na lokální invazivní progresi než na histologickém typu. Prognóza dobře diferencovaných typů je výrazně lepší u mladších nemocných. Mezi možné příčiny karcinomu štítné žlázy patří chronická TSH stimulace štítné žlázy, nedostatek či nadbytek jódu, anamnéza radiační terapie v oblasti krku. Svoji roli hrají i genetické faktory, přítomnost některých onkogenů a přítomnost uzlů ve štítné žláze. Zhoubný nádor štítné žlázy se vyskytuje ve čtyřech formách: nečastější papilární adenokarcinom, folikulární karcinom, medulární karcinom a anaplastický karcinom vyznačující se velice špatnou prognózou (doba přežití pacienta většinou nepřesáhne 2 roky) (FARID *et al.* 1994). Jediné kauzální řešení karcinomů štítné žlázy je chirurgické, a proto se chirurgický zákrok doporučuje u všech uzlů prokazatelně maligních a suspektně maligních. Radiační terapie, chemoterapie a terapie radioaktivním jódem se užívá u inoperabilních karcinomů či v terapii metastáz a pokročilého onemocnění (SCHMUTZLER and KOEHRLE 2000).

2.5. Zhoubný novotvar ledviny

Tento nádor tvoří asi 3 % všech malignit. Postihuje častěji muže než ženy, v poměru 2 : 1, a vyskytuje se převážně u osob nad 60 let věku nebo u dětí. Zvýšené riziko vzniku nádoru ledvin je popisováno u obezity, roli hraje také zevní prostředí, vlivy hormonální, faktory a významný vliv byl potvrzen u kouření cigaret. Nádory se také vyskytují u nemocných v terminální fázi onemocnění ledvin, například u cystické choroby ledvin. Riziko vzniku nádoru ledvin u dialyzovaných pacientů vzrůstá 30x (MCLAUGHLIN and LIPWORTH 2000). Nádor vzniká z epitelálních buněk proximálního tubulu a vyskytuje se v několika variantách buněčných typů: karcinom ze světlých buněk, z granulárních buněk a vřetenitá nebo sarkomatoidní varianta. Prognosticky nejpříznivější je varianta ze světlých buněk.

Sarkomatoidní varianta má nejhorší prognózu. Většina zhoubných nádorů ledvin zůstává dlouhou dobu němá. S typickou triádou potíží – bolest v bederní krajině nebo břicho, hematurie a hmatný tumor v břicho – přichází jen necelá pětina nemocných. Mnohdy se nádor poprvé manifestuje až vzdálenými metastázami. Nejčastější lokalizací metastáz jsou plíce, pak měkké tkáně, kostní metastázy, metastázy do kůže a mozku. Z klinických obtíží jsou časté horečky, malátnost, těžká únava a hubnutí. Pouze chirurgická léčba dává nemocnému s lokalizovaným zhoubným nádorem ledviny naději na vyléčení. Zhoubný nádor ledviny je totiž znám svou rezistencí k cytostatikům i hormonální léčbě (VORLÍČEK 1995).

2.6. Zhoubný novotvar jícnu

Zhoubný nádor jícnu představuje 4 % nádorů trávicího traktu. Jako možné příčiny onemocnění se udává častá konzumace vřelých nápojů a kancerogenů v potravě. Zhoubné nádory jícnu se vyskytují častěji u kuřáků a pravidelných konzumentů alkoholu, rovněž je pozorován častější výskyt malignit doprovázejících různá jiná onemocnění jícnu. Nejčastěji bývá postižena střední část jícnu. Makroskopicky se jedná hlavně o ulcerózní formu, polypózní nebo infiltrativní růst. Mikroskopicky bývá nejčastější formou skvamózní plochobuněčný karcinom. O adenokarcinom se jedná méně než v 10 % nádorů. Protože jícen není kryt serózou, nádor se velmi rychle a lehce šíří do okolí. Metastazuje lymfatickou i krevní cestou, nejčastěji do mediastina, plic, jater, mozku a kostí (RIBEIRO *et al.* 1996). Onemocnění je provázeno bolestí na hrudi při polykání, infiltrací okolních struktur pak vzniká bolest stálá. Ztížená průchodnost jícnu způsobuje regurgitaci, při které hrozí aspirace. Chirurgická léčba je metodou první volby. Pokud to lze je provedena totální ezofagektomií s náhradou žaludkem nebo tlustým střevem. Chemoterapie je problematická a radioterapii lze využít k předoperačnímu zmenšení nádoru. Samostatná radioterapie má pouze paliativní efekt (LEE *et al.* 2005).

2.7. Zhoubný novotvar tlustého střeva

Až v 99 % jsou zhoubné nádory tlustého střeva tvořeny karcinomem, kterého v poslední době neustále přibývá. V České republice patří maligní nádor tlustého střeva k nejzávažnějším malignitám, protože v incidenci jej předčí jen karcinom prsu u žen a karcinom plic u mužů. Původ výskytu rakoviny tlustého střeva není sice plně objasněný, ale je jisté například to, že v 50 % zde hraje roli vrozená dispozice. Z dalších faktorů je možno jmenovat: nadbytečný příjem živočišných tuků, nedostatek vlákniny a kancerogeny ve stravě. Typickým příznakem

onemocnění je krvácení. Při větších krevních ztrátách se objevuje krev ve stolici, nápadné jsou i jiné změny ve vyprazdňování. Karcinom tlustého střeva se vyskytuje ve 3 hlavních makroskopických formách: exofytický, exulcerovaný a cirkulárně stenózující nádor. Mikroskopicky jde většinou o adenokarcinom a hlenotvorný karcinom. Více než 50 % malignit se nachází v rektu, téměř 25 % v esovité kličce a zbytek v ostatních částech tračníku. Asi 2 % karcinomů se vyskytují ve více lokalizacích (KELVIN and MAGLINTE 1987). Základním terapeutickým postupem u kolorektálního karcinomu je jeho chirurgické odstranění. Chirurgická léčba spočívá v radikálním odstranění nádoru včetně jeho spádových lymfatických uzlin a v obnovení kontinuity zažívacího traktu. Chemoterapie je buď součástí přípravy na operaci nebo je užívána při adjuvantní léčbě. Radiační terapie se rutinně aplikuje v různých dávkách před operací. Záření je užíváno k zmenšení nádoru. Pooperační radioterapie se aplikuje výběrově podle stadia onemocnění (KEMENY 1987; TOMITA *et al.* 1999).

2.8. Akutní lymfoblastická leukémie

Jde o maligní hemopatii charakterizovanou anomální proliferací a diferenciací hematopoetické prekursorové buňky, která není schopna vývinu do normální zralé funkční populace. Hlavní rizikovou skupinou jsou děti do 10 let, druhým vrcholem výskytu je pak skupina lidí nad 50 let. U ALL rozeznáváme tři základní typy: L1 častý u dětí, vyznačující se dobrou prognózou, L2 a na léčbu velmi špatně reagující typ L3. Onemocnění se vyznačuje vysokou afinitou k postižení centrálního nervového systému, který může být často i prvním místem klinické manifestace onemocnění nebo prvním místem postižení při relapsu choroby i po dlouho trvající remisi onemocnění. V dětském věku je lymfoblastická leukémie (zejména typ L1) úspěšně léčena, řada dětí se zdá být trvale vyléčena. U dospělých je prognóza podstatně horší (PUI and EVANS 1998). Léčba se řídí dle kombinovaných protokolů obsahujících chemoterapii, hormonální terapii a radioterapii. V první, u prognosticky příznivých případů však spíše v druhé remisi, se pak přistupuje ke transplantaci kostní dřeně (ARMITAGE 1994).

2.9. Neuroblastom

Neuroblastom je třetí nejčastější pediatrický nádor, který je v průměru zodpovědný za 15 % ze všech úmrtí dětí způsobených rakovinou (MARIS and MATTHAY 1999). Je to maligní nádor skládající se z nediferenciovaných neuroektodermálních buněk (SCHWAB 1999). Klinickým

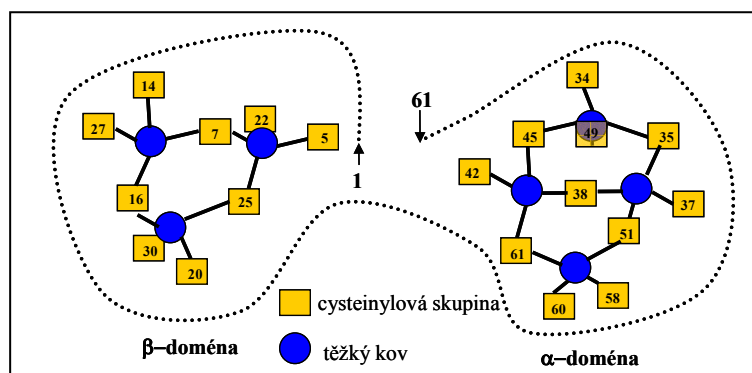
znakem neuroblastomu je heterogenita. Některé z těchto nádorů podléhají spontánní regresi nebo diferenciaci do benigních ganglioneuronů, některé jsou léčitelné chirurgicky s nepatrnou nebo žádnou pooperační léčbou, ale objevily se také případy, kdy se nádor rozšiřoval i navzdory intenzivní multimodální léčbě. Tato klinická diverzita úzce koreluje s molekulárně biologickými znaky tohoto nádoru (BEDRNICEK *et al.* 2005).

2.10. Nádory hlavy a krku

Nádory hlavy a krku zahrnují oblast která je anatomicky vymezena od spodiny báze lebni až po horní aperturu hrudníku. Oblast je velmi významná smyslovými centry, dále zde je i společný začátek a křížení polykacích a dýchacích cest a touto oblastí procházejí významné cévy nervy a bohatě propojená síť lymfatických uzlin s vyústěním mizovodu. Tyto mnohočetné nádory mají několik společných rysů. Je to jednak predominance mužského pohlaví a společný obecný rizikový faktor – alkohol, tabák, azbest a nikl (VOKES *et al.* 1993). V oblasti hlavy a krku se nachází obrovské množství buněk, které mohou dát vznik nádorovému bujení, avšak velká většina nádorů se vytváří ze sliznic této oblasti. Mezi celou řadou nejružnějších maligních nádorů jde v převážné většině o karcinomy v různém stupni diferenciaci (MCKAIG *et al.* 1998). Obecně platí že chirurgická resekce a na ni navazující radioterapie je jednou z hlavních léčebných metod nádorů hlavy a krku. U malých nádorů bez metastáz je někdy dostatečná chirurgická léčba bez radioterapie, je též používána i radioterapie bez chirurgické léčby. Chemoterapii je možno použít buďto ke zmenšení inoperabilního nádoru, který se takto stane resekovatelným nebo k likvidaci metastáz (DIMERY and HONG 1993).

3. Metalothioneiny

Metalothioneiny (MT) patří do skupiny intracelulárních, nízkomolekulárních na cystein bohatých proteinů o molekulové hmotnosti od 6–10 kDa (KASAHARA *et al.* 1991; KIZEK *et al.* 2004b; KIZEK *et al.* 2004d). Díky své vysoké afinitě k těžkým kovům (Zn, Cd, As, atd.) je jejich hlavní funkcí homeostatická kontrola a detoxikace iontů kovů. Ze strukturních modelů lze předpokládat, že molekula MT se skládá ze dvou vazebných domén α a β které jsou složeny z cysteinových klastrů. Kovalentní vazby atomů kovů se účastní sulfhydrylové zbytky cysteinů (Obr. 6). N-terminální část peptidu je označena jako β -doména, má tři vazebná místa pro dvojmocné ionty a C-terminální část (α -doména) má schopnost vyvázat čtyři dvojmocné ionty kovů. V případě jednomocných iontů kovů je MT schopen vázat celkem až 12 atomů. Klasifikačně byly MT rozděleny do tříd MT-I a MT-II s ohledem na jejich primární strukturu a organismus, ze kterého byly izolovány. I. třída zahrnuje savčí metalothioneiny tvořené 61 až 68 aminokyselinami s molekulovou hmotností 6–7 kDa. Ve II. třídě jsou zařazeny bakteriální MT, proteiny se vzdálenou podobností k I. třídě (HAMER 1986).

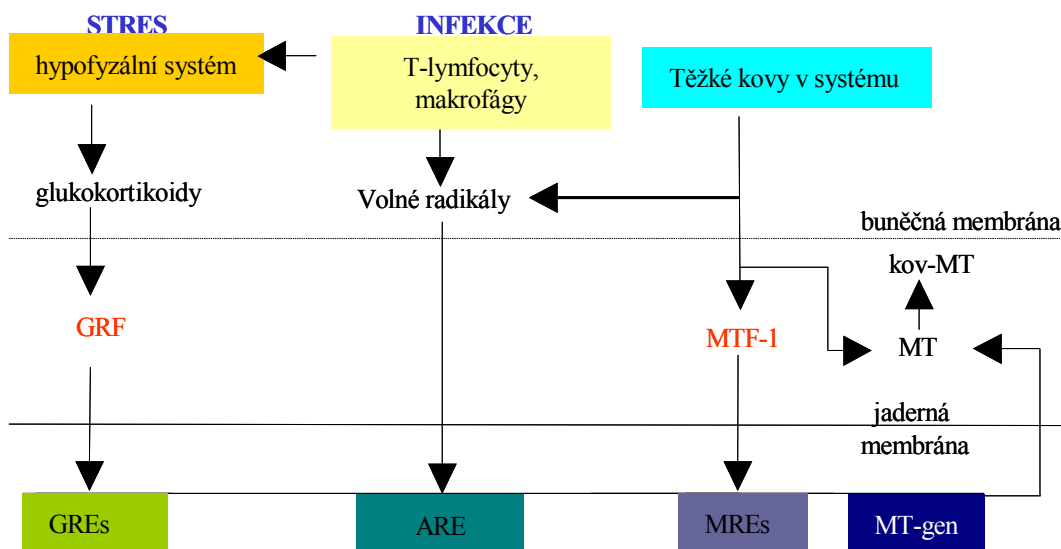


Obr. 6.: Předpokládané schéma vazebných domén (α a β) v molekule metalothioneinu. S: sulfhydrylové zbytky v molekule MT váží ionty kovů.

3.1. Biosyntéza metalothioneinů v lidském organismu

Lidské MT patří do I. třídy metalothioneinů a jsou kódovány rodinou genů vytvářejících 10 isoform. Vzniklé proteiny jsou rozděleny do čtyř skupin: MT-1, MT-2, MT-3 a MT-4. MT-1 protein existuje ve více isoformách, respektive MT-1 protein vytváří více subtypů kódovaných sadou *MT-1* genů (*MT-1A*, *MT-1B*, *MT-1E*, *MT-1F*, *MT-1G*, *MT-1X*). V organismu dospělých jedinců jsou nejvíce zastoupeny dvě isoformy MT (*MT-1A*, *MT-2A*), které se exprimují ve většině lidských tkání, v mozkové tkáni je přítomna pouze isoforma MT-3 (někdy označována jako růstový inhibiční faktor - GIF). V dlaždicovém epitelu je hojně

zastoupena isoforma MT-4. MT-1 a MT-2 isoformy jsou obvykle exprimovány v lidském organismu ve velmi nízkých koncentracích. Jejich exprese výrazně stoupá při indukcí mnoha exogenními a endogenními faktory jako jsou UV záření, těžké kovy, stresové hormony, volné kyslíkové radikály a cytokiny uvolňující se z poškozené tkáně či xenobiotika. O molekulárním mechanismu exprese MT je prozatím známo velmi málo, ale pravděpodobně se ho účastní samotný kov vazbou na specifický transkripční faktor, protein označený jako metal transription factor 1 (MTF-1).



Obr. 7.: Schéma regulace exprese *MT* genu. Vlivem stresových faktorů se zvyšuje hladina cytokinů v aktivovaných T-lymfocytech a makrofázích. Hladina glukokortikoidů se při stresu prostřednictvím těchto cytokinů zvyšuje přes aktivovaný hypofyzální systém. Glukokortikoidy se v cytoplazmě vážou na GRF (glucocorticoid receptor complex) a ten pak aktivuje GRE (glucocorticoid responsive element). Zvýšená hladina kovů vazbou na MTF-1 (metal transkripční faktor) naopak aktivuje MRE (metal response element) (MRE) v promotorové oblasti MT genu. Reaktivní kyslíkové radikály jsou schopny aktivace MT genu prostřednictvím antioxidant response elementu (ARE).

Komplex kov-MTF-1 pak v jádře nasedá na metal-responsive element (MRE) v promotorové oblasti MT-genu a spouští jeho transkripci. Na syntéze MT se mohou podílet další regulační proteiny prostřednictvím responzivních elementů jako je glucocorticoid response element (GRE), interferon response element (IRE), signal transducers and activator protein (STAT) nebo antioxidant response element (ARE), dále vazebné receptory spojené s tvorbou druhých posílů či aktivací běžných transkripčních faktorů (Obr.7). Jednotlivé isoformy metalothioneinů se pak podílejí na metabolismu detoxikace a homeostázy těžkých kovů, účastní se ochrany organismu před vzniklými volnými kyslíkovými radikály a podporují regeneraci poškozené tkáně (ANDREWS 2001; HAMER 1986).

Souvislost mezi hladinou metalothioneinu a rakovinou je na samém počátku zkoumání. Nejnovější výzkumy ovšem naznačují, že existuje vztah mezi množstvím metalothioneinu a rychlostí rozvoje zhoubného nádoru (NAKAYAMA *et al.* 2002; THEOCHARIS *et al.* 2002). Druhou a velmi závažnou otázkou při studiu souvislosti mezi rakovinou a metalothioneinem je změna jeho množství v přítomnosti protinádorových léčiv (především na bázi platiny). Pro ověření těchto předpokladů je potřebné studovat změny hladiny MT u pacientů se zhoubnými nádory.

4. Nádorové markery

Nádorové markery jsou látky, které je možno v organismu prokázat v souvislosti s přítomností zhoubného nádoru. Jejich specifita, ale hlavně senzitivita jsou limitovány celou řadou faktorů. Většinou negativní nález nevylučuje přítomnost zhoubného nádoru. Pokud byl nádorový marker nalezen, má význam pro sledování vývoje onemocnění u téhož nemocného a může být využit pro určení prognózy a sledování účinnosti léčby (BATES 1991; VORLÍČEK 1995).

V současnosti je známa celá skupina různých látek, především proteinů využívaných jako nádorové markery. Jejich přehled je uveden v následující tabulce.

Humorální nádorové markery

- S nádorem asociované antigeny
 - diferenciační, onkofetálního typu
 - CEA (karcinoembryonální antigen)
 - AFP (a –fetoprotein)
 - PSA (prostatický specifický antigen)
 - Antigeny CA-typu (CA 15-3, CA 72-4, CA 19-9)
 - MCA (antigen mucinózních karcinomů)
 - CYFRA 21-1 (fragment cytokeratinu 19)
 - SCC (antigen skvamózních buněk)
 - spojené s procesem proliferace (apoptózy?)
 - TPA/S (tkáňový polypeptidový antigen (specifický))
- Enzymy
 - NSE (neuron-specifická enoláza)
 - TK (thymidinkináza)
 - PAP (prostatická frakce kyselých fosfatáz)
 - LD (laktátdehydrogenáza)
- Hormony
 - HCG (lidský choriogonadotropin)
 - TG (thyreoglobulin)
 - CT (kalcitonin)
 - PRL (prolaktin)
 - GH (růstový hormon)

- PTH (parathormon)
- ADH (antidiuretický hormon)
- Sérové proteiny
 - FER (ferritin)
 - B2M (b 2-mikroglobulin)
 - RAF (reaktanty akutní fáze)
 - CIC (cirkulující imunokomplexy)
- Další metabolity
 - VMK (kyselina vanilmandlová)
 - HIOK (kyselina hydroxyindolactová)
 - MEL (melanogeny)
 - UGP (močový gonadotropinový peptid)
 - NMP-22 (proteiny nukleární matrix)
 - S-100 (protein S-100)

Celulární nádorové markery

- ER, PR (receptory estradiolu a progesteronu)
- CD (katepsin D)
- HER-2/neu (onkoprotein HER-2/neu)
- p 53 (protein kódovaný tumorsupresorovým genem p53)

4.1. Nový nádorový marker?

Nedávno Theocharis a spolupracovníci publikovali, že množství metalothioneinu (MT) se mění u řady zhoubných nádorů (nádory prsu, kůže a pankreatu a další) (THEOCHARIS *et al.* 2004). Je pravděpodobné, že změny v expresi MT mohou být prognostickým markerem u různých typů zhoubných nádorových onemocnění (ZELENÁ *et al.* 2004). Nadměrná exprese MT byla pozorována u maligních a více gradinovaných typů zhoubných nádorů prsu, kožních karcinomů, hepatocelulárního karcinomu, kožních melanomů, cervikálních karcinomů, akutní lymfoblastické leukémie, karcinomů pankreatu a je významně spojena s progresí a horší prognózou v nádorovém onemocnění. Naproti tomu bylo zjištěno, že nadměrná exprese MT souvisí s méně gradinovými typy nádorů u karcinomu tlustého střeva, karcinomu močového měchýře a fibroblastických kožních nádorů. Novější studie potvrdily korelaci mezi nadměrnou expresí MT a gradingem u karcinomu vaječníku a karcinomu plic (WEINLICH *et al.* 2003; WHITE 1998; ZELGER *et al.* 1993; ZELGER *et al.* 1994).

5. Protinádorová léčba

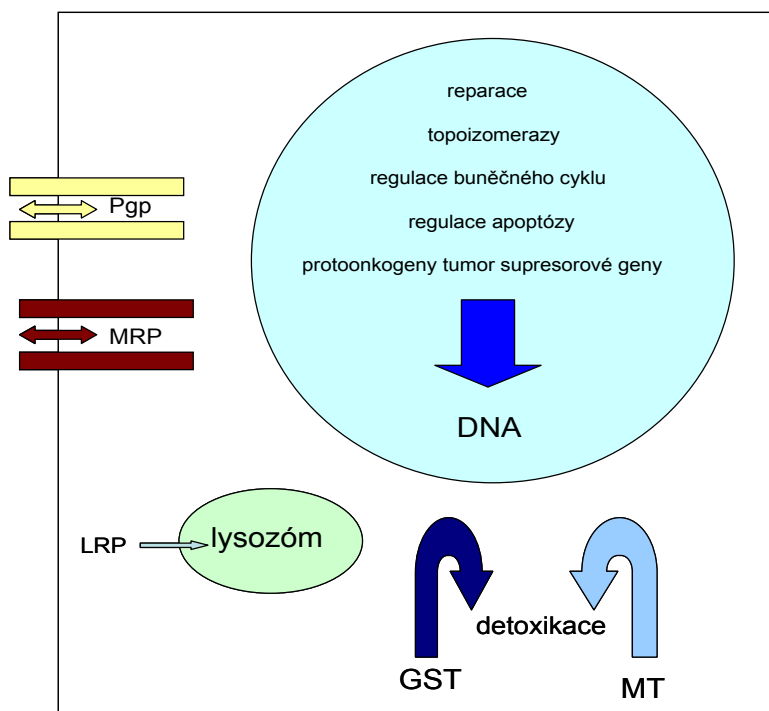
Léčba zhoubných nádorů se dělí na kurativní a paliativní. Kurativní léčba je volena v případě, že charakter a rozsah nádoru dávají předpoklad pro jeho odstranění z organismu, a tím vyléčení nemocného. Nejčastěji se používá kombinace léčebných metod. Paliativní léčba se používá v případě, že není možné celkové odstranění nádoru. Léčebným cílem je zlepšení stavu nemocného, a to léčbou bolesti a obstrukčních příznaků. V minulosti se za jedinou účinnou léčbu zhoubných nádorů považoval chirurgický výkon. V poměrně nedávné době však byly vypracovány léčebné postupy, které jsou účinné a které daly podnět k přehodnocení všech léčebných metod. Dnes je zcela jasné, že nejlepších výsledků se dosahuje, když se léčba provádí multidisciplinárně. Chirurgická léčba má zásadní význam u solidních nádorů a v paliativním léčení. Léčba zářením se používá v kurativní léčbě u mnoha nádorů a má velký význam i v paliativním léčení. Chemoterapie a hormonální terapie se používá v samostatné léčbě jen u několika nádorů, ale při kombinované léčbě a v paliativní léčbě má velký význam u mnoha nádorů (SMITH *et al.* 1993; VORLÍČEK 1995).

5.1. Vznik mnohočetné rezistence na léčbu nádorových onemocnění

Z řady klinických studií je známo, že rezistence vůči cytostatikům je vážnou komplikací léčby nemocných se zhoubnými nádory (LINDGREN *et al.* 2006; LOGASHENKO *et al.* 2005). Rezistence nádorových buněk k cytostatikům pravděpodobně vzniká z různých příčin a celý proces je na úrovni buňky zcela jistě multifaktoriální (Obr. 8). Obzvláště komplikovaná je terapie nádorového onemocnění v případě mnohočetné rezistence (MDR; multidrug resistance). Jednou z příčin rezistence nádorových buněk je snížená koncentrace cytostatik v místě cíle působení léčiva. Na změny hladiny cytostatik v buňkách se podílí některé membránové proteiny jako Pgp, MRP a LRP. Pgp je membránový fosfoglykoprotein s ATPázovou aktivitou, který se nachází v cytoplazmatické membráně. S tímto proteinem byla asociována MDR rezistence především na cytostatika vyrobená z alkaloidy rodů Vinca, antracykliny, taxany a epipodofylotoxiny. Dalším významným je protein MRP (membránový transportní protein), který se nachází v cytoplazmatické membráně i membránách uvnitř buňky. Úroveň exprese MRP v nádorových buňkách se liší od exprese v normálních buněčných typech, což naznačuje buď změněnou funkci nebo aktivitu v rezistentních nádorových buňkách. Pro vznik MDR rezistence je také významný LRP je cytosolový protein (DOLLNER *et al.* 2004; HOFFMANN and KROEMER 2004; RIHOVA *et al.* 2005). Funkce

LRP zatím není plně vysvětlena. Lze předpokládat, že LRP umožňuje ukládání cytostatik v buňce do vezikulů či lysozomů. Zajímavé je také to, že většinu těchto receptorů blokuje flavonodini sloučeniny jako genistein. Rezistence způsobená změnami topoizomeráz vede k rezistenci způsobené změnou molekulárního cíle cytostatik. Mechanismus účinku těchto látek spočívá ve stabilizaci štěpného komplexu, a tím inhibicí opětovného spojení rozštěpené DNA. Složitost vzniku MDR rezistence je možné spojit s řadou genů účastnících se apoptózy nebo nádorových supresorů. Takovým proteinem je protein Bcl-2 jehož změněná exprese rodiny byla nalezena v mnoha nádorových buňkách. Velice často dochází v nádorových buňkách k poškození genů, které se účastní v regulaci buněčného cyklu. Tato poškození vedou ke zvýšené aktivitě cyklin dependentních kináz a nekontrolované proliferaci. Je známo, že v některých nádorových buňkách je poškozena funkce nádorových supresorů. V neposlední řadě je možné vznik MDR rezistence spojit se zvýšenou činností reparačních mechanismů DNA. Cytostatika indukující různé primární změny v molekule DNA (např. cisplatina se vmezeřuje mezi dva guaniny v DNA). Léčebný efekt může být právě potlačen vlivem oprav reparačními enzymy. Z hlediska výsledku reparačního procesu je možné sledovat různé mechanismy reparací: reverze poškození DNA, excizní reparace DNA a inducibilní reparační mechanismy související s tzv. SOS reparací. Dalším faktorem MDR rezistence může být přímá detoxikace cytostatik. Nejčastěji je zvýšena aktivita enzymů, které xenobiotika oxidují či konjugují s endogenními konjugičními činidly. Enzymy oxidující xenobiotika tvoří početnou skupinu enzymů, z nichž největší roli hrají mikrosomální monooxygenázy. Ke konjugičním enzymům, inaktivujícím cytostatika konjugací s endogenními substráty, patří zejména glutathion-S-transferázy. Právě glutathiontransferázový systém byl rozsáhle studován v souvislosti s rezistencí k cytostatikům u leukemických buněk (SKORSKI 2002; VENDRIK *et al.* 1992; VOLM 1998). Navíc, kromě všech výše uvedených mechanismů je možné spojovat vznik MDR rezistence se zvýšenou expresí nízkomolekulárního proteinu metalothioneinu (MT). Biologickou funkcí MT je vazba a homeostáza iontů kovů v organismech. O molekulárním mechanismu exprese MT je prozatím známo velmi málo, ale pravděpodobně se ho účastní samotný kov vazbou na specifický transkripční faktor, protein označený jako metal transcription factor 1 (MTF-1). Komplex kov-MTF-1 pak v jádře nasedá na metal-responsive element (MRE) v promotorové oblasti MT-genu a spouští jeho transkripci (CAI *et al.* 2005; GOODMAN *et al.* 2005; IL'YASOVA and SCHWARTZ 2005). Mimo jiné v okamžiku, kdy se v organismu objeví externě podaný kov (protinádorové léčivo) dojde k rychlému nárůstu MT koncentrace (KIZEK *et al.* 2004b; ZELENÁ *et al.* 2004). Exprimovaný MT začne okamžitě vyvazovat námi podávané protirakovinové léčivo. Výsledkem je prudký pokles koncentrace

léčiva, a jeho množství se stane biologicky velmi málo účinné (ALBERTS *et al.* 1998; KIZEK *et al.* 2004a; NAITO *et al.* 1999; ZELENÁ *et al.* 2004).

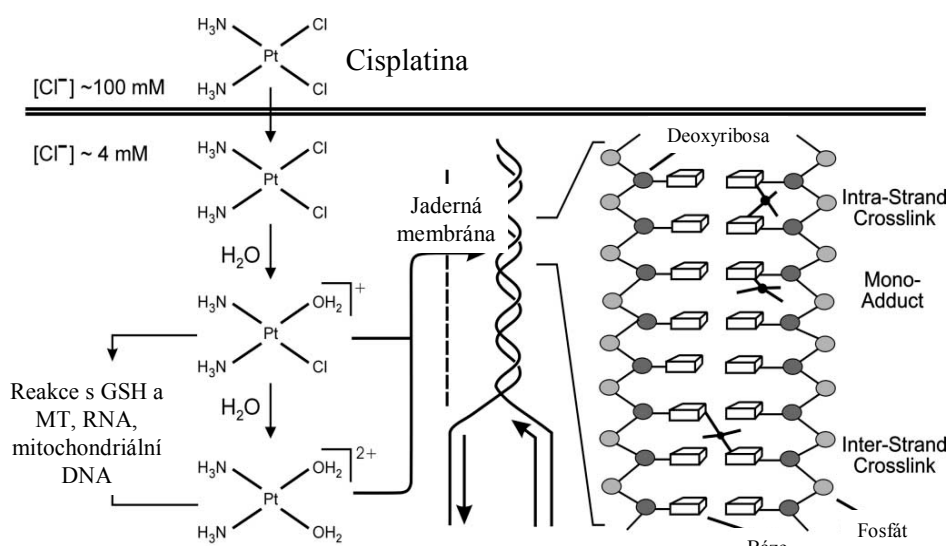


Obr. 8.: Možné buněčné mechanismy účastníci se procesu rezistence nádorových buněk vůči cytostatikům; **Pgp** = membránový fosfoglykoprotein, **MRP** = membránový transportní protein, **LRP** = cytosolový protein, **Bcl-2** = protiapoptický protein, **GST** = glutation-S-transferázy, **MT** = metalothionein

5.1.1. Cisplatina a hladina MT

Koncem šedesátých let minulého století byl do klinické praxe zaveden cis-diammindichlorplatnatý komplex. Tento komplex vytváří adukty platina-DNA. Ani po tak dlouhé době není zcela jasné, zda cytotoxický efekt nesouvisí s vazbou cisplatinu k jinému cílovému místu v buňce – nějakému proteinu nebo RNA. Bylo prokázáno, že cisplatina se váže v počtu asi 22 molekul na jednu molekulu DNA, na jednu molekulu RNA je to 170 – 33 tisíckrát méně a na molekulu proteinu ještě 33 tisíckrát méně než na RNA. Dalším významným problémem je, že vlastní testy byly prováděny pouze na izolovaných molekulách a ne v samotných buňkách, kde jsou takové analýzy velmi problematické. U savčí buňky vystavené cisplatině dochází k inhibici syntézy DNA, ale i RNA a bílkovin. DNA-polymeráza nemůže dané místo přečíst a vzniká tak poškození, které vede k razantní inhibici replikace DNA (BRABEC and KASPARKOVA 2005). Celý proces je opravdu komplikovaný, vzniklý adukt DNA cisplatina je faktická chyba v primární struktuře DNA (Obr. 9). Proti takovým chybám se organismus brání a má vypracovaný mechanismus jak tyto struktury opravovat (mutátorové geny). Jsou to excizní *uvrA* nebo SOS opravné mechanismy (*recA*). Pokud byly experimentálně tyto opravné mechanismy v buňkách vyřazeny z činnosti došlo k vyšší vazbě

cisplatiny na DNA. Ze získaných experimentálních dat vyplývá, že mutátorové proteiny velmi intenzivně ovlivňují protirakovinovou léčbu. Mimo jiné v okamžiku, kdy se v organismu objeví externě podaný kov (protinádorové léčivo) dojde k rychlému nárůstu MT koncentrace. Exprimovaný MT začne okamžitě vyvazovat podávané protirakovinové léčivo. Výsledkem je prudký pokles koncentrace léčiva, a jeho množství se stane biologicky velmi málo účinné (SATOH *et al.* 1993).



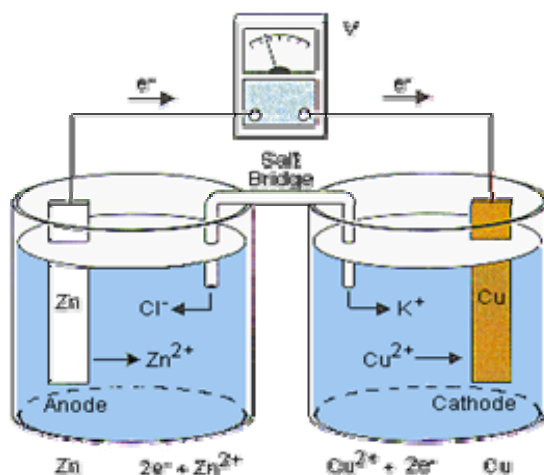
Obř. 9.: Schema interakce cis-diammindichlorplatnatého komplexu (cis platiny) s DNA.

5.1.2. Radioterapie a hladina MT

Radioterapie je léčebná metoda založená na účinku ionizujícího záření na živé tkáni. Při interakci energie záření s tkáněmi dochází v určitých časových sledech ke změnám, které v závislosti na druhu, kvalitě, velikosti ozářeného tělního objemu a dávce záření vedou k funkčním a morfologickým změnám tkáni. Důsledkem je dočasné či trvalé poškození, nebo i smrt buněk (VORLÍČEK 1995). Ionizující záření však také rozkládá v organismu přítomnou vodu na volné hydroxylové a superoxidové radikály. Převaha volných radikálů nad antioxidanty se nazývá oxidační stres. Volné radikály jsou charakterizovány nepárovými elektrony. V přítomnosti kyslíku se na místo nepárového elektronu okamžitě naváže molekula kyslíku a vzniká peroxylový radikál, který se snaží získat z jiné sloučeniny chybějící elektron, čímž vytváří jiný volný radikál. Tato řetězová reakce je přerušena buď vazbou dvou radikálů na sebe nebo reakcí s antioxidantem. Jedním z těchto antioxidantů je, vedle glutathionu nebo vitamínů C a E, také metalothionein (CHUBATSU and MENEGHINI 1993; TAKEMURA *et al.* 1995).

6. Elektrochemické metody využitelné pro studium proteinů

Vysoce citlivé, rychlé a selektivní metody detekce anorganických i organických látek ve složité biologické matrici jsou metody elektrochemické a elektroanalytické (HARRIS 2003; HEYROVSKÝ and KŮTA 1962; KLOUDA 2003). Podstatou elektrochemických metod je studium závislosti elektrochemického chování roztoků na jejich složení a koncentraci. Objektem zkoumání je elektrochemický článek – soustava, v níž je analyzovaný roztok v kontaktu s elektrodami (Obr. 10). Elektrody zprostředkují jeho spojení s měřícím přístrojem, který sleduje některé z elektrických veličin (proud I , potenciál E , vodivost G , elektrický náboj Q , kapacitu C , aj. (GARAJ *et al.* 1977; HARRIS 2003; HEYROVSKÝ and KŮTA 1962; MARKUŠOVÁ 2000).

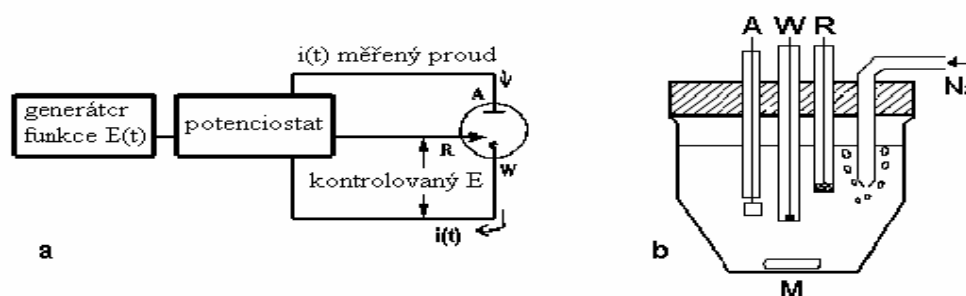


Obr. 10.: Schéma elektrochemického článku, který je tvořen minimálně dvěma elektrodami (poločlánky). Přenos elektronů mezi elektrodami je umožněn vnějším vodičem a obě elektrody jsou fyzicky odděleny (MARKUŠOVÁ 2000).

6.1. Voltmetrie a polarografie

Voltmetrie a polarografie jsou elektrochemické metody založené na sledování intenzity proudu na velikosti proměnlivého vloženého napětí vkládaného mezi pracovní (polarizovatelnou) a referentní (nepolarizovatelnou) elektrodu – dvouelektrodové zapojení. Z důvodu eliminace rušivých elementů plynoucích z dvouelektrodového zapojení (např. proudového zatížení referentní elektrody) se v dnešní době používá kromě pracovní a referentní i elektroda pomocná – tříelektrodové zapojení (Obr. 11a). Schéma elektrolytické nádoby v tříelektrodovém zapojení je zobrazeno na Obr. 11b. Na pracovní elektrodě probíhá elektrodový proces, který sledujeme. Jako pracovní elektrody se nejčastěji používají rtuťové (DME – kapající rtuťová elektroda, HMDE – visící rtuťová kapková elektroda) anebo pevné

(uhlíkové – pastová uhlíková elektroda, elektroda ze skelného uhlíku a elektroda z pyrolytického uhlíku; kovové – zlatá, stříbrná apod.). Potenciál pracovní elektrody je kontrolovaný vůči elektrodě referentní s konstantním potenciálem. Vlastní referentní elektroda je od měřeného roztoku oddělena solným můstkem se zatavenou hustou skleněnou fritou. Nejvíce používanou referentní elektrodou v dnešní době je elektroda argentchloridová (Ag/AgCl/3 M KCl). Proud protéká elektrodami pomocnou a pracovní. Pomocná elektroda je převážně z ušlechtilého kovu (Au, Ag, Pt). Metody, kde se stále využívá rtuťové kapkové elektrody, se nazývají polarografické (HEYROVSKÝ and KŮTA 1962; KLOUDA 2003; MARKUŠOVÁ 2000).



Obr.11.: (a) Schéma tříelektrodeového zapojení ve voltametrii; (b) Schéma elektrolytické nádoby: W – pracovní elektroda, R – referentní elektroda, A – pomocná elektroda, M - míchadélko, N₂ – přívod inertního plynu.

Roztokem neprochází proud, pokud zkoumaný vzorek neobsahuje elektroaktivní látku, tzv. depolarizátor, který se v daném potenciálovém rozsahu oxiduje nebo redukuje. Přítomnost depolarizátoru se při určitém potenciálu projeví zvýšením proudu. Elektrodové děje (oxidace anebo redukce) způsobují změny jen ve velmi těsné blízkosti povrchu polarizovatelné elektrody. Samotný elektrodový proces zahrnuje děje, které jsou spojeny s transportem elektroaktivní látky (analytu) k elektrodě, vlastním elektrodovým dějem a vylučováním produktu na elektrodě, případně jeho transportem od elektrody (GARAJ *et al.* 1977; HEYROVSKÝ and KŮTA 1962; SOMMER *et al.* 2000). Transport elektroaktivní látky je ke elektrodě zprostředkován třemi pochody:

- Difúzí, která je řízena koncentračním spádem v těsné blízkosti elektrody. Koncentrační spád je vyvolán úbytkem elektroaktivní látky u povrchu elektrody způsobeným jejím vylučováním na elektrodě.

- Migrací, kterou vyvolává elektrické pole mezi elektrodami svým působením na nabitě částice.
- Konvekcí, kterou je tok částic vyvolaný mícháním.

Cílem elektrochemické detekce je zjištění koncentrace elektroaktivní látky. Z tohoto důvodu je sledována především difúze, která na ní závisí, a naopak potlačena migrace elektroaktivní látky. Přidáme-li do zkoumaného roztoku nosný (indiferentní) elektrolyt v koncentraci asi stokrát převyšující koncentraci elektroaktivní látky, převážnou část náboje přenášejí ionty nosného elektrolytu a migrace elektroaktivní látky je zanedbatelně malá. Současně je tím významně snížen elektrický odpor roztoku. Dále je nezbytné před samotným měřením odstranit z nosného elektrolytu veškerý kyslík, protože jeho vylučování na povrchu elektrody znemožňuje detekci ostatních elektroaktivních látek přítomných v roztoku, protože se sám zúčastňuje elektrodové reakce. Odstranění kyslíku se provádí probubláváním roztoku inertním plynem (např. dusík, argon) (HEYROVSKY and KŮTA 1962; SOMMER *et al.* 2000; WANG 1994). Dosáhne-li potenciál polarizované elektrody hodnoty rozkladného potenciálu elektroaktivní látky, kdy začne její vylučování, snižuje se koncentrace této látky na povrchu elektrody v důsledku elektrodové reakce. Vylučovat se může jen ta látka, která se nachází těsně u povrchu elektrody, a tam se dostane difúzí (migraci eliminuje přítomnost nosného elektrolytu). Proto je procházející proud označován jako difúzní. Zvyšuje-li se dále vložené napětí, narůstá vylučování elektroaktivní látky. Tento růst nastává pouze potud, pokud se nezačne vylučovat každá částice elektroaktivní látky, která je k povrchu elektrody difúzí transportována. Tím klesne koncentrace elektroaktivní látky u povrchu elektrody na nulovou hodnotu. Zvyšování napětí již neurychluje její vylučování, protože tato látka u povrchu elektrody prostě není. Proud dosáhl hodnoty *limitního difúzního proudu*. Jeho velikost je určena rychlostí difúze elektroaktivní látky k povrchu elektrody. Elektroda se polarizovala koncentrační polarizací (BARD and FAULKNER 1980; GARAJ *et al.* 1977; HARRIS 2003; HEYROVSKY and KŮTA 1962; KLOUDA 2003; MARKUŠOVÁ 2000; MINDL 2000; WANG 1994).

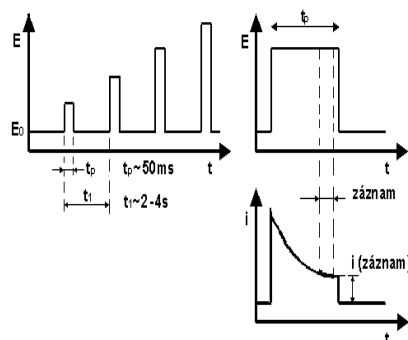
Proudová odezva při aplikaci pulsu se skládá ze dvou složek:

- *kapacitní proud* (I_C) – je potřebný k vytvoření elektrické dvojvrstvy na rozhraní rtuť – roztok. Tento proud nesouvisí s přeměnou elektroaktivní látky. U DME dochází k neustálému obnovování povrchu, a proto se musí každá kapka nabít na daný potenciál a tak vzniká kapacitní proud, který je funkcí vloženého potenciálu, velikosti povrchu kapky a povahy základního elektrolytu. Tento proud snižuje citlivost měření.

- *difúzní proud* (I_D) – má faradaický charakter a je rozhodující pro stanovení koncentrace depolarizátoru. Jeho velikost je dána: velikostí náboje vyměňovaného mezi polarizovanou elektrodou a roztokem za jednotku času, počtem elektronů vyměňovaných v elektrodové reakci, koncentrací depolarizátoru a rychlostí jeho přenosu z roztoku na povrch elektrody.

6.1.1. Diferenční pulzní polarografie a voltametrie

Při diferenční pulzní polarografii (DPP) a voltametii (DPV) jsou na lineární potenciálovou rampu aplikovány pulsy s konstantní amplitudou. Měřený signál odpovídá rozdílu proudů (ΔI), které jsou měřeny v krátkých intervalech, a to před začátkem napěťového pulsu a těsně před koncem napěťového pulsu. U DPP má závislost proudu na napětí tvar píku. Při DME je doba kapky seřízená na určitý čas kratší než přirozená doba kapky. Délka doby kapky se užívá obvykle 2 až 3 s. Puls je vložen na kapku ve stejnou dobu jejího trvání.



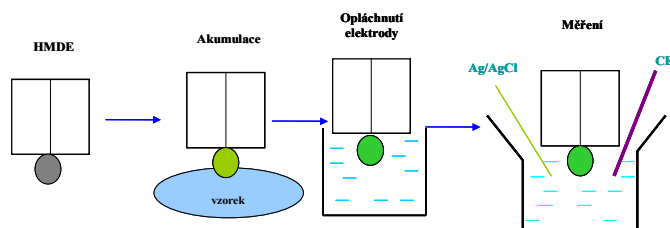
Obr. 12.: Diferenční pulzní voltametrie/polarografie - Na elektrodu je přiváděn lineárně rostoucí potenciál. Na konci doby časového kroku je přiveden na elektrodu potenciálový puls s konstantní amplitudou. Proud je měřen před vložením potenciálového pulsu a před koncem tohoto pulsu. Převzato z (MARKUŠOVÁ 2000).

Je nutné použít co nejkratší dobu k měření, aby byla získána co největší proudová odezva, ale současně dostatečně dlouhou dobu, aby kapacitní proud byl nízký. Doba pulsu se využívá řádově desítky ms. Další charakteristikou je tzv. doba předpolarizace, což je doba odkápnutí předešlé kapky do vložení pulsu. Velikost amplitudy se v praxi obvykle používá 5 až 100 mV (**Obr. 12**). V případě DPV kapka neodkapává a celé měření probíhá na jedné visící rtuťové kapkové pracovní elektrodě (HMDE) (BARD and FAULKNER 1980; MARKUŠOVÁ 2000).

6.1.2. Adsorptivní přenosová voltametrie

Adsorptivní přenosová voltametrie je modifikací voltametrie, při níž je stanovovaná látka na pracovní visící rtuťovou kapkovou elektrodu danou dobu akumulována z kapky vzorku, poté

je přebytek vzorku omyt a zahájeno měření pomocí vybrané elektrochemické techniky v klasickém tříelektrodovém zapojení (ADAM *et al.* 2005), viz. Obr. 13.



Obr. 13.: Schéma adsorptivní přenosové voltametrie

6.1.3 Chronopotenciometrická rozpouštěcí analýza

Potenciometrická rozpouštěcí analýza (potentiometric stripping analysis, PSA),(ANDERSEN 1997; GARAI *et al.* 1992; HONEYCHURCH and RIDD 1995) byla vyvinuta před zhruba dvaceti lety pro stanovení iontů kovů v roztocích za pomoci rtuťové filmové elektrody.(ESTELA *et al.* 1995) PSA vznikla kombinací klasické analytické potenciometrie a katodického rozpouštění kovů v materiálu pracovní elektrody. (BIXLER and STAFFORD 1968) Při PSA se zaznamenává potenciál pracovní elektrody jako funkce času v závislosti na potenciálu po derivaci obvykle dt/dE křivka.

$$\left(\frac{dE}{dt}\right)^{-1} = f(E)$$

Elektrochemický děj na elektrodě přitom probíhá díky oxidaci (případně redukci) analytu chemickým činidlem přítomným v roztoku (kyslík, ionty rtuťnaté, atd.).(JAGNER 1982; JAGNER and AREN 1978; JAGNER and GRANALI 1976) PSA poskytovala od počátku oproti voltametričtým metodám některé výhody, zejména při stanovení stopových množství kovů anodickým rozpouštěním. Hlavní výhodou je, že jedním z výstupních signálů je čas, veličina měřitelná přesněji než proud. Další výhody, např. možnost měření bez odstranění kyslíku ze vzorku, jsou využívány jen při některých způsobech užití této metody. Při aplikaci negativních proudů (při CPSA) přítomnost kyslíku ve vzorku za určitých podmínek dokonce zesiluje signál poskytovaný redukcí analytu (HONEYCHURCH and RIDD 1995). Adsorpce analytu na elektrodě byla využita např. v pracích týkajících se CPSA sloučenin obsahujících adenin a jeho deriváty. Pro studium biopolymerů jsou PSA a CPSA využívány až v posledních několika letech. K analýze peptidů a proteinů na rtuťové elektrodě využil obou technik Honeychurch (HONEYCHURCH and RIDD 1995). Jeho práce se týkaly jak možnosti stanovení peptidů, proteinů nebo jejich složek (cystein, insulin, BSA apod.), tak i studia mechanismu přenosu náboje v těchto látkách. Nukleové kyseliny byly

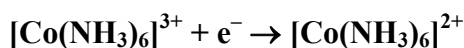
chronopotenciometricky stanoveny poprvé na uhlíkových elektrodách v r. 1995(CAI *et al.* 1996). Uhlíkovou pastovou elektrodu modifikovanou DNA v kombinaci s CPSA použil Wang mimo jiné k hybridizačním experimentům a k detekci mnoha látek interagujících s DNA(WANG *et al.* 1996a; WANG *et al.* 1996b; WANG *et al.* 1996c; WANG *et al.* 1998) (aromatické aminy, hydraziny, daunomycin). Nověji bylo CPSA využito pro ultrasenzitivní stanovení thiolových sloučenin, především metalothioneinu (KIZEK *et al.* 2001; STROUHAL *et al.* 2003; TRNKOVA *et al.* 2002).

6.2. Katalytické vylučování vodíku

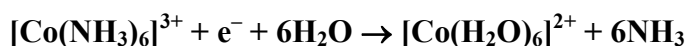
Ve třicátých letech bylo zjištěno, že proteiny poskytují na rtuťové elektrodě dva typy katalytických signálů, Heyrovské prenatriovou vlnu a Brdičkovu reakci.

6.2.1 Brdičková reakce

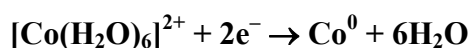
Metodu pro polarografické stanovení proteinů obsahujících –SH skupiny na rtuťové elektrodě publikoval Brdička(BRDIČKA 1933a; BRDIČKA 1933b) a dále ji vyvíjeli Paleček a kol. (PALEČEK and PECHAN 1971). Jedná se o katalytické reakce proteinů v Brdičkově soluci, která se sestává z amoniakálního pufru (NH₄OH + NH₄Cl) a komplexu [Co(NH₃)₆]Cl₃(BRDIČKA 1936; BRDIČKA *et al.* 1965). Brdičková procedura byla původně navržena pro analýzu sirných látek jako jsou organické sloučeniny (2-merkaptopropionová kyselina, 2-diethylaminoethanthiol hydrochlorid) aminokyseliny (cystein, cystin) a proteiny (nejčastěji albuminy) (KOLTHOFF *et al.* 1975a; KOLTHOFF *et al.* 1975b). Za poznámku bezesporu také stojí možnost využití Brdičkou navrženého postupu jako diagnostické metody v klinické medicíně a farmakologii (BŘEZINA and ZUMAN 1952; BŘEZINA and ZUMAN 1958). Možnosti stanovení MT prostřednictvím Brdičkových proudů publikoval Olafson (OLAFSON and OLSSON 1991). Bylo zjištěno, že za katalytický signál proteinu v Brdičkově soluci jsou odpovědní limitní proudy (I_{lim}). Autoři popisují ireverzibilní redukci amoného komplexu Co³⁺ podle reakce:



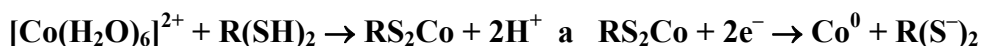
Vzniklý amonný komplex je nestabilní a je hydrolyzován podle reakce:



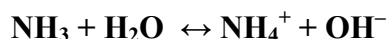
Pravděpodobně po redukci Co³⁺ na Co²⁺ pokračuje reakční mechanismus zredukováním komplexu [Co(H₂O)₆]²⁺ na Co⁰:



Samotné stanovení MT se obvykle realizuje při negativních potenciálech a měření se většinou provádí v potenciálovém rozsahu od (E_{init}) 0 do (E_{end}) $-1,6$ V. První redukce komplexu CoI probíhá kolem $-0,2$ V a druhý redukční pík Co(II) je zaznamenán při $-1,0$ V. Celý redukční proces na povrchu rtuťové elektrody je katalyzován vylučováním vodíku. V případě samotné redukce komplexů kobaltu se předpokládá difúzně řízený proces. (RASPOR *et al.* 2001b) Reakční mechanismus je ovlivněn přítomností $-SH$ skupin proteinu a nestabilní $[Co(H_2O)_6]^{2+}$ komplex je zapojen do reakce typu:

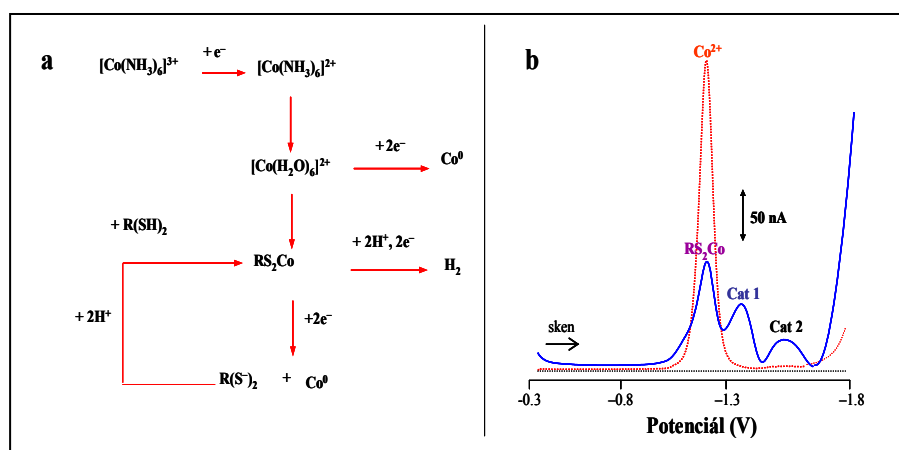


V prostředí Brdičkovy soluce stanovované bílkoviny a peptidy způsobují potlačení proudového maxima komplexu Co(II) (díky povrchové aktivitě stanovovaných bílkovin nebo peptidů) a vznik jedné nebo dvou polarografických vln (nebo voltametrických píků) proteinu v oblasti potenciálů E_p $-1,2$ až $-1,5$ V. Bylo prokázáno, že tuto reakci způsobují sulfidické skupiny (proteinů, peptidů i jednodušších látek) ve spojení s komplexy iontů kobaltu (BRDIČKA *et al.* 1965). Jak popisuje reakce preferuje $[Co(H_2O)_6]^{2+}$ komplex vazbu s $-SH$ skupinou. Za první katalytický signál je odpovědná redukce $R(SH)_2$ komplexu a probíhá kolem E_p $-1,35$ V. Proudová odezva se mění v závislosti na teplotě, proto se předpokládá, že se jedná o difúzně řízený proces. Výška prvního katalytického signálu odpovídá za koncentraci MT v analytu. Koncentrace $[Co(NH_3)_6]^{3+}$ musí být dostatečná vůči analyzovanému MT, aby signál redukovaného komplexu RS_2Co mohl narůstat proporcionálně s koncentrací proteinu. Další pík je závislý na katalytickém vylučování vodíku. Pokles tohoto píku s rostoucí teplotou indikuje povrchovou reakci (MAIRANOVSKII 1968). Rasporová a kol. uvádí, že reakce Brdičkovy soluce s MT a povrchem elektrody je protonizována přítomností amonného pufru podle reakce (RASPOR *et al.* 2001b):



Ani mechanismus elektrodového procesu Brdičkovy reakce není dodnes detailně znám, předpokládá se, že v katalytickém procesu hraje komplex Co(II) s proteinem významnou roli. Reakční schéma MT na rtuťové elektrodě v Brdičkově soluci je ilustrováno na **obrázku 14**. Při stanovení MT procedurou Brdičkovy reakce se nejčastěji využívá metody DP-polarografie a voltametrie. Brdičkova reakce byla použita ke studiu fyziologických koncentrací MT u celé řady organismů (BEBIANNIO and MACHADO 1997). Široké uplatnění našla Brdičkova reakce pro stanovení MT u řady mořských a sladkovodních živočichů (OLAFSON 1988; OLAFSON and OLSSON 1991). Bylo zjištěno, že stanovení izolovaných MT z biologického materiálu je

závislé na množství kovů v doménách proteinu (OLAFSON and SIM 1979). Experimentální podmínky detekce MT Brdičkovou reakcí byly modifikovány, autoři se liší především v koncentračním zastoupení složek roztoku. Rasporová a spol. použili k přípravě roztoku 2 mol.dm⁻³ NH₄Cl + NH₄OH, s 1,2 mmol.dm⁻³ [Co(NH₃)₆]Cl₃ a redukci prováděli v rozsahu potenciálů od -0,9 do -1,9 V (RASPOR *et al.* 2001b), Olafson a další navrhuje použití pro stanovení MT roztoku o složení 1 mol.dm⁻³ NH₄Cl + NH₄OH, s 0,6 mmol.dm⁻³ [Co(NH₃)₆]Cl₃ (OLAFSON and OLSSON 1991). Postup stanovení proteinů pomocí Brdičkovy reakce má široké spektrum použití, např. nedávno byla publikována práce pojednávající o stanovení čistoty separovaného supresorového proteinu p53 (BRAZDOVA *et al.* 2002). Byly vypracovány metody stanovení proteinů nejen na rtuťových, ale i pevných elektrodách, jako např. Tomschik a kol., kteří se zabývali rozpouštěcí chronopotenciometrií vazopresinu a angiotenzinu za konstantního proudu na uhlíkové pastové elektrodě (CPE) (TOMSCHIK *et al.* 1998).

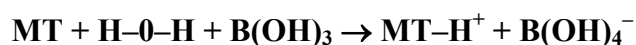


Obr. 14.: a) pravděpodobné schéma katalytického vylučování vodíku při Brdičkově reakci; b) DPV voltamogramy čistého elektrolytu 1mmol [Co(NH₃)₆]Cl₃ v 1 mol amonném pufru (červená) a elektrolytu s přidavkem proteinu (modrá).

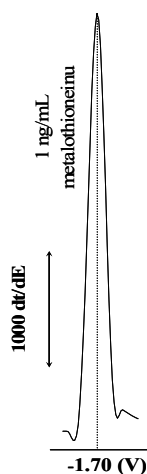
6.2.2. H pík (Heyrovského prenátriová vlna)

Prenátriová (někdy také presodiová) vlna je katodická odezva proteinů zaznamenaná na rtuťové elektrodě při negativních potenciálech předcházejících redukcí sodných iontů základního elektrolytu. Typ tohoto signálu byl poprvé pozorován Heyrovským a Babičkou (Heyrovský and Babička). Měření bílkovin v přítomnosti amonných iontů ukázalo, že katodické proudy odpovídající za prenátriovou vlnu souvisí s vylučováním vodíku. Celý elektrodový proces je katalyzován proteiny a bylo navrženo, že by tento signál mohl sloužit k jejich kvantitativní analýze. Později se také ukázalo, že původně použitý chlorid sodný nebo amonný pufr, který se mimo jiné zúčastňuje protonizace elektrodového procesu, může být

zaměněn za jiný základní elektrolyt s podobnou aciditou. Prenatriovou vlnu lze pozorovat přibližně o 100 až 250 mV pozitivněji od potenciálu vylučování základního elektrolytu. Za katalytickou reakci jsou pravděpodobně odpovědné –SH a –NH₂ skupiny proteinu. Původní pokusy byly prováděny s proteiny krevního séra (Heyrovský and Babička) a později i s mnoha dalšími látkami jako jsou alkaloidy, pyrimidiny (HEYROVSKÝ and KŮTA 1962) a jiné. Prenátriové vlny bylo Tomschikem a spolupracovníky využito pro stanovení vazopresinu a angiotenzinu (TOMSCHIK 1995). K měření byla použita derivační chronopotenciometrie s konstantním proudem (Chrono-Potentiometric Stripping Analysis – CPSA). Chronopotenciometrický signál, ekvivalentní polarografické prenátriové vlně byl autory pracovně označen jako „pík H“ (TOMSCHIK *et al.* 1998). Píku H bylo použito pro stanovení MT izolovaného z králíčích jater v prostředí borátového pufru (pH 8), který je pravděpodobně protonizován podle reakce (TRNKOVÁ *et al.* 2002a):



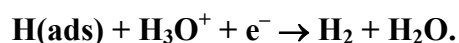
Redukce je iniciována při (E_{init}) 0 V a ukončena při potenciálu (E_{end}) –1,9 V. Pík H metalothioneinu byl pozorován v oblasti negativních potenciálů kolem –1,7 V (Obr. 15).



Obr. 15.: Elektrochemický signál katalytického vylučování vodíku ve velmi negativních potenciálech (pík H)

Metodou CPSA v kombinaci s adsorptivní přenosovou rozpouštěcí technikou (Adsorptive Transfer Stripping Technique – AdTS) je možné detekovat až femtomolární množství MT ve velmi malých (5 μ l) objemech vzorku (KIZEK *et al.* 2001). Dále bylo zjištěno, že jak výška tak potenciál píku H je závislý na pH základního elektrolytu, což má pravděpodobně souvislost s izoelektrickou pohyblivostí (pI) proteinu, a že katalytický proces MT je značně ovlivněn

koncentrací kyslíku v základním elektrolytu (TRNKOVÁ *et al.* 2002b). Ukázalo se, že nepřítomnost kyslíku dramaticky snižuje výšku píku H a naopak přítomnost kyslíku je pro katalytický proces příznivá (TRNKOVÁ *et al.* 2002b). Metoda AdTS CPSA byla použita pro studium produkce metalothioneinu u buněk kvasinky *Yarrowia lipolytica*, které byly vystaveny různým koncentracím Zn, Co, Ni a Cd. Předběžné výsledky ukazují, že AdTS CPSA by mohla nalézt uplatnění i pro stanovení fytochelatinů (VACEK *et al.* 2002). Elektrodové procesy, které odpovídají za pík H nebyly doposud detailně objasněny i přesto, že vylučování vodíku je jedním z nejdéle studovaných elektrochemických dějů. Proces vylučování vodíku na rtuťové elektrodě je charakteristický a je popsán Heyrovského reakcí:



Dále Tafelovou empirickou rovnicí a rovnicí adsorbovaného vodíkového atomu podle Volmera (DVOŘÁK *et al.* 1975). Vzhledem ke složitosti katalytického procesu, který zasahuje do vylučování vodíku je kromě katalyzujícího proteinu velmi důležitá koncentrace, složení, pH a teplota roztoku základního elektrolytu. Nové poznatky dosažené v derivační chronopotenciometrii s konstantním proudem naznačují možnost jejího širšího využití, s tím že se jedná o nejsenzitivnější elektrochemickou metodu pro stanovení proteinů (KIZEK *et al.* 2001).

II. CÍLE PRÁCE

Předložená práce je orientována na využití moderních elektroanalytických postupů pro studium metalothioneinu. Jejím cílem je ukázat, že aplikace moderních elektrochemických metod při řešení určitých problémů v biologii může být velmi výhodná. Jak se v poslední době ukazuje, důležitou oblast představuje přímé stanovení některých biologicky aktivních sloučenin přímo v tělních tekutinách. Navíc, důležitým cílem je studium obsahu metalothioneinu u pacientů se zhoubnými nádory.

Pro tuto práci byly zvoleny následující dílčí cíle:

- Optimalizace elektroanalytických metod pro analýzu metalothioneinu.
- Využití navržených postupů pro stanovení metalothioneinu v krvi a krevním séru.
- Vztah metalothioneinu k nádorovým onemocněním.
- Sledování hladiny MT v průběhu protinádorové terapie

III. PRAKTICKÁ ČÁST

7. Materiály a metody

7.1. Chemikálie

Metalothionein (MW 7143), obsahoval 5,9 % Cd a 0,5 % Zn, a byl zakoupen u Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Tris(2-karboxyethyl)fosfin (TCEP) byl získán od Molecular Probes (Eugen, Oregon, USA). Další chemikále (NH_4OH , NH_4Cl , H_3BO_3 , $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 a $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$) byly zakoupeny od Sigma Aldrich. Zásobní roztok MT byl připraven v ACS vodě jako 10 μg MT/ml s 1 mM TCEP (KIZEK *et al.* 2004c) a uchováván v mrazícím boxu při -20 °C (PETRLOVA *et al.* 2006). Pracovní roztoky byly připravovány každý den ředěním zásobního roztoku. pH bylo měřeno za použití WTW inoLab Level 3 instrument (Weilheim, Německo) řízeného pomocí osobního počítače a programu (MultiLab Pilot; Weilheim, Německo). Pro kalibraci pH-elektrody (SenTix H) byl použit set WTW pufrů (Weilheim, Německo). Voda byla demineralizována pomocí reverzní osmózy na přístrojích Aqua Osmotic 02 (Aqua Osmotic, Tišnov, Česká republika) a dále čištěná pomocí Millipore RG (Millipore Corp., USA, 18 M Ω).

7.2. Klinický materiál

V průběhu roku 2005 byla získána séra od pacientů léčených pro zhoubný nádor na různých odděleních FN Motol (Radioterapeutické oddělení dospělí, Kožní oddělení a III. chirurgická klinika 1. LF UK). Pokud to bylo možné, byly sledovány základní biochemické ukazatele (ALP, AST, ALT, GMT a nádorový marker CA 15-3). Krevní séra byla ihned zmrazena na -20 °C do doby jejich dalšího zpracování. Celkem bylo analyzováno 80 sér pacientů; z toho pro zhoubný nádor tlustého střeva $n = 9$ s průměrným věkem 55 roků; melanom $n = 4$ s průměrným věkem 59,5 roku; zhoubný nádor prsu $n = 14$ s průměrným věkem 51,5 roku; zhoubný nádor plic $n = 12$ s průměrným věkem 62 roků; zhoubný nádor štítné žlázy $n = 12$ s průměrným věkem 57 roků; zhoubný nádor ledviny $n = 7$ s průměrným věkem 31 roků; lymfoidní leukémii $n = 18$ s průměrným věkem 19 roků; a zhoubný nádor jícnu $n = 4$ s průměrným věkem 55,5 roku. Dále byly v průběhu roku 2006 získány vzorky krve od 25 pacientů Kliniky otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně s průměrným věkem 62 roků a chirurgicky získané vzorky nádorové tkáně od 7

pacientů téže kliniky s průměrným věkem 60,4 roku. Krev i nádory byly ihned zmrazeny na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do doby jejich dalšího zpracování.

7.3. Buněčné linie

Neuroblastomové buněčné linie byly odvozeny z kostních metastáz neuroblastomů u pacientů v relapsu onemocnění. Jednotlivé rezistentní linie byly dále vystaveny působení zvyšující se koncentrace cisplatin. Buňky byly kultivovány v běžném Dulbecco médiu obohaceném o 10% fetálního telecího séra při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vzorky testovaných linií byly získány z Kliniky dětské hematologie a onkologie, 2. lékařské fakulta Univerzity Karlovy v Praze.

7.4. Určení esterásové aktivity

Kultura byla ošetřena trypsinem po dobu 2 minut a následným protřepáním (60 ot/min) pro uvolnění přisedlých buněk. Biomasa byla separována centrifugací (50 g, 5 min) a 1× promyta PBS (pH 7,4). Lýze buněk byla provedena na ledové lázni přidávkem Tritonu X100 do výsledné koncentrace 0,1 % (v/v) po dobu 20 min. Mechanické nečistoty z lyzátu byly odstraněny centrifugací (10 000 g, 15 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Supernatant byl po skončení centrifugace ihned zpracován. Stanovení intracelulárních esterás bylo provedeno fluoresceindiacetátovým testem podle (VITECEK *et al.* 2005; VITECEK *et al.* 2004) s těmito modifikacemi: pro inkubaci reakční směsi byla zvolena teplota $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Hodnota celkových proteinů byla stanovena podle Bradforda. Buněčná hustota (počet buněk na 1 ml suspenze) byla stanovena pomocí Fuchs-Rosenthalovy počítací komůrky.

7.5. Biochemická analýza

Hladiny vybraných jaterních enzymů ALP (S-alkalická fosfatasa), AST (S-aspartátamino-transferasa), ALT (S-alaninamino-transferasa) a GMT (S- γ -glutamyl-transferasa) byly analyzovány spektrofotometricky na automatickém biochemickém analyzátoru Advia 1650 (Bayer, Tarrytown USA) za využití setu Bayer při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Množství nádorového markeru CA 15-3 bylo stanoveno na analyzátoru Centaur (Bayer, Tarrytown, USA) imunochemiluminiscenční metodou. Analýzy byly provedeny na Ústavu klinické biochemie a pathobiochemie, 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

7.6. Příprava vzorků pro elektroanalytické stanovení metalothioneinu

Ze získaných vzorků krevních sér bylo odebráno 100 μl a umístěno na 15 min. při 99 °C do termobloku (Eppendorf 5430, USA). Poté byly vzorky ochlazeny na 4 °C a centrifugovány při 4 °C, 15 000 g po dobu 30 min. (Eppendorf 5402, USA). Metalothioneiny patří k termostabilním proteinům, které zůstávají přítomné v roztoku i po jeho tepelné denaturaci. Takto připravené vzorky byly 1000 \times zředěny a analyzovány námi upraveným postupem adsorptivní přenosové techniky (AdTS) s diferenční pulsní voltametrií (DPV). Množství analyzovaného vzorku bylo 5 μl . Ze vzorku krve byl odebrán 1 ml vzorku, který byl následně tepelně denaturován, centrifugován, zředěn a analyzován stejným postupem jako krevní sérum. Vzorky nádorové tkáně byly homogenizovány kapalným dusíkem, zředěny fosfátovým pufrům v množství ekvivalentním hmotnosti tkáně (10x), a třepány 15 minut na třepáče (Vortex-2 Genie, Scientific industries, USA). Poté byly vzorky denaturovány při 99 °C v termobloku (Eppendorf 5430, USA), ochlazeny na 4 °C a centrifugovány při 4 °C, 15 000 g po dobu 30 min. (Eppendorf 5402, USA). Odebraný supernatant byl analyzován stejným postupem jako vzorky krevního séra

7.7. Elektroanalytické stanovení metalothioneinu

Vzorky byly analyzovány na přístroji AUTOLAB Analyser (EcoChemie, Netherlands) ve spojení s VA-Stand 663 (Metrohm, Switzerland) v klasickém tříelektrodevém uspořádání. Pracovní elektrodou byla visící rtuťová kapková elektroda (HMDE) s plochou kapky 0,4 mm^2 ; referenční elektrodou byla Ag/AgCl/3M KCl a pomocnou grafitová elektroda. Základní elektrolyt (1 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ $\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ a 1 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ amonný pufr; $\text{NH}_3(\text{aq}) + \text{NH}_4\text{Cl}$ (Sigma Aldrich, ACS), pH = 9,6) byl po každých 3 analýzách vyměněn. AdTS DPV parametry byly následující: čas akumulace 120 s, počáteční potenciál -0,6 V, konečný potenciál -1,6 V, modulační čas 0,057 s, časový interval 0,2 s, potenciálový krok 1,05 mV/s, modulační amplituda 250 mV, $E_{\text{ads}} = 0$ V, teplota 20 °C. V případě adsorptivní přenosové techniky v kombinaci s chronopotenciometrickou rozpouštěcí analýzou (AdTS CPSA) byly parametry následující: čas akumulace 120 s, $I_{\text{str}} -1$ μA . Po adsorpci MT na HMDE byla elektroda omyta a přenesena do elektrochemické nádobky obsahující 0,1 M $\text{H}_3\text{BO}_3 + 0,05$ M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (Sigma Aldrich, ACS).

8. VÝSLEDKY A DISKUSE

8.1. Elektrochemické měření MT

Proto, aby bylo možné studovat hladinu MT u pacientů je nezbytné mít k dispozici analytické nástroje. Současné metody používané pro kvantifikaci celkového množství MT v biologických materiálech je možné rozdělit do několika skupin (Tab. 1). První skupina je založena na měření množství iontu kovu vázaného na molekulu MT. Množství vázaného kovu je pak úměrné k množství MT. Bylo prokázáno, že afinita MT k různým iontům kovům se liší $Hg(II) > Ag(I) \sim Cu(I) > Cd(II) > Zn(II)$ (MOFFATT and DENIZEAU 1997). Mechanismus interakce MT k jednotlivým těžkým kovům není doposud uspokojivě vysvětlen, ale je využitelný pro analýzu obsahu MT. Nejjednodušší metoda pro stanovení kvantifikace MT je Cd-hem metoda. Cd-hem metoda využívá dvou vlastností MT, jednak jde o tepelně stabilní protein, který je navíc schopný vázat sedm atomů kadmia místo zinku. Podobný princip využívají saturační techniky využívající Ag(I) a Hg(II). Druhá skupina metod je založena na kvantifikaci celkového obsahu MT s ohledem na množství vázaného těžkého kovu. Pro identifikaci kovu navázaného v MT, stanovení obsahu izoform MT a celkového obsahu MT je možné využít řady kombinovaných analytických jako atomová absorpční spektrometrie s grafitovou kyvetou (GPC–AAS), vysokoúčinná kapalinová chromatografie v kombinaci s AAS (HPLC–AAS). Analýzu jednotlivých iontů kovů vázaných do struktury MT je možné kvantifikovat pomocí indukčně vázaného plazmatu v kombinaci s hmotnostní detekcí (ICP–MS). Relativně často využívaným způsobem detekce MT je kombinace nízkotlaké chromatografie na Sephadexu G-75 v kombinaci s atomovou absorpční spektrometrií (AAS). Třetí skupina metod je založena na analýze sulfhydrylových zbytků na molekule MT většinou za využití chemické modifikace Ellmanovým činidlem. Chemická modifikace umožňuje analytické stanovení MT pomocí detekce v UV oblasti a fluorescence. Bez této modifikace je detekce MT pomocí výše uvedených metod velmi obtížná. Čtvrtá skupina metod využívá protilátek proti MT. Mezi tyto metody se řadí radioimunoanalýza (RIA) a enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). ELISA a RIA metody vykazují vysokou senzitivitu pro detekci hladiny MT v tkáních. Z tohoto důvodu jsou poměrně často využívány pro studium exprese MT v tkáňových řezech. Pátá skupina metod jsou metody separační. Separační techniky umožňují rozlišení jednotlivých izoform MT. Pro separaci MT se často používá gelová permeační chromatografie na Sephadexu G-75 (GPC). Velmi málo je známo o separaci MT pomocí iontově výměnné chromatografie či vysoko účinné kapalinové

chromatografie (HPLC). Nedávno byly identifikovány jednotlivé izoformy a pod-izoformy MT pomocí kombinace technik HPLC-MS (HATHOUT *et al.* 2002; CHASSAIGNE and LOBINSKI 1998). Více pozornosti je věnováno stanovení MT za pomoci kapilární zónové elektroforézy (CZE). Separáčnická technika CZE byla vyvinuta v 1990 a je využívána pro studium MT od roku 1993 (BEATTIE and RICHARDS 1994). Šestá skupina metod je založená na detekci mRNA. Rodina lidského genu MT má 17 sub-genů (13 sub-genů náleží MT-1, dva náleží MT-2, jeden náleží MT-3, a jeden patří MT-4) na chromozomu 16 (MILES *et al.* 2000). Proč má rodina genů MT tak mnoho sub-genů? Souvisí exprese genu se zvýšenou hladinou proteinu a každé izoformy MT? Jsou nějaké rozdíly ve funkci mezi izoformami? Pro odpověď na tyto otázky je nezbytné studovat expresi každého sub-genu a funkci každé izoformy MT. Hladiny mRNA je možné studovat za využití polymerázové řetězové reakce v kombinaci s reverzní transkriptázou (RT-PCR) (HATHOUT *et al.* 2002). Jak je z uvedeného přehledu zřejmé všechny doposud využívané analytické techniky pro stanovení MT vyžadují poměrně složitou přípravu biologického vzorku.

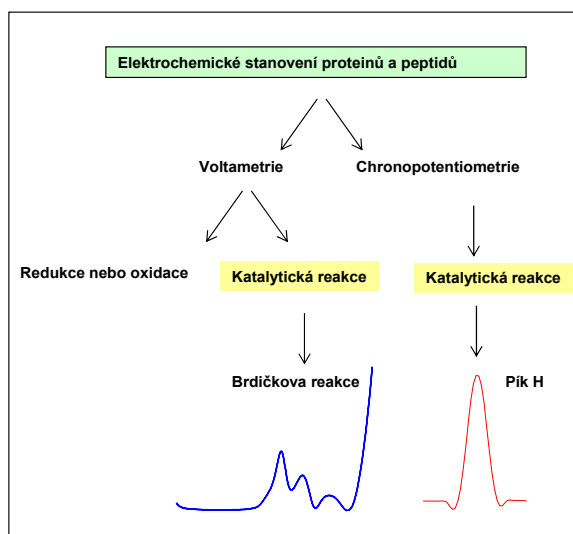
Tab. 1.: Porovnání analytických metod pro stanovení metalothioneinu

Metoda ^{a)}	Detekční limit (ng/100 µl)	Vzorek
ELISA	0,2	lidská, krysí moč
Western blotting	10 ng proteinu	vzorky MT-1, MT-2, MT-3
CZE-UV detekce	27,2	ovčí jaterní buňky
HPLC-UV detekce	3,1	lidské jaterní buňky
GPC-fluorimetrie	2	krysí tkáňové buňky
DPP	62	vzorky Cd, ZnMT
AdTS-CPSA ^{b)}	0,16	krabí tkáň

Vysvětlivky: ELISA: enzymová imunoanalýza, CZE: kapilární zónová elektroforéza, HPLC: vysokoučinná kapalinová chromatografie, GPC: gelová permeační chromatografie, DPP: diferenční pulzní polarografie, AdTS-CPSA: adsorptivní přenosová technika kombinovaná s chronopotenciometrickou rozpuštěcí analýzou za konstantního proudu.

Je potřeba také připomenout, že uvedenou analytickou instrumentaci musí také obsluhovat vysoce specializovaný technik. Sedmá skupina metod je založená na elektrochemické detekci MT, viz. **Obr. 16** (DABRIO *et al.* 2002; DORCAK and SESTAKOVA 2006; SESTAKOVA and NAVRATIL 2005). Před více jak před 70 lety byla objevena Brdičkova reakce, využívající komplexy kobaltu pro stanovení proteinů obsahující řadu sufhydrolových skupin ve své molekule. Vzniklý katalytický signál má tvar dvojvlny, tento tvar závisí na počtu cysteinu v molekule, na velikosti molekuly a její koncentraci (KIZEK *et al.* 2004d; PETRLOVA *et al.* 2005a; PETRLOVA *et al.* 2005b; PETRLOVA *et al.* 2005c; PETRLOVA *et al.* 2005d). Další

elektrochemická metoda, která také využívá katalytický signál vodíku vylučovaného ze základního elektrolytu v přítomnosti proteinu se nazývá pík H (KIZEK *et al.* 2001; TRNKOVA *et al.* 2002).



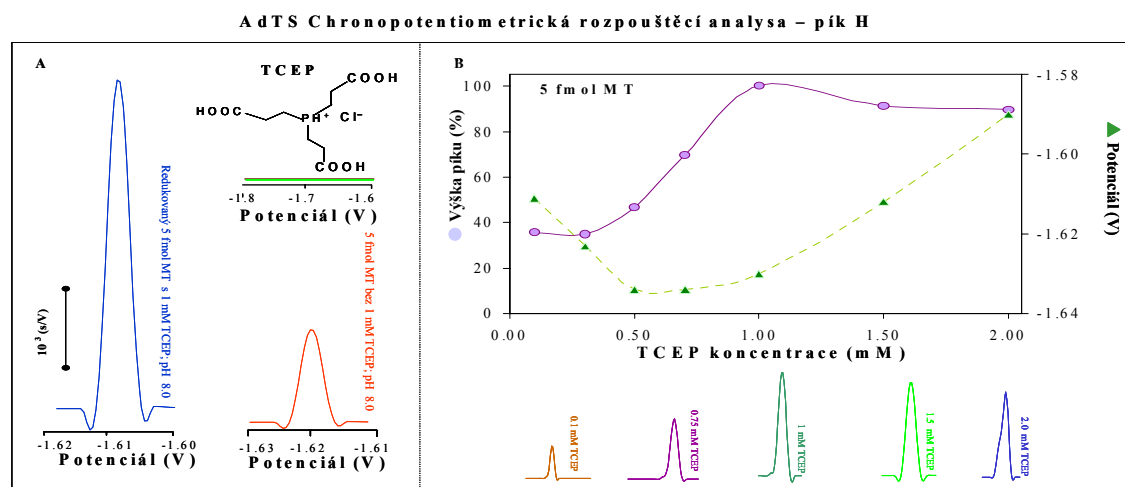
Obr.16.: Schéma elektroanalytického stanovení proteinů a peptidů

Jak je z uvedeného přehledu zřejmé, analytických metod pro senzitivní analýzu MT není v současné době mnoho. Většina z nich vyžaduje velmi složitou přípravu vzorku náročnou a drahou laboratorní instrumentací. Mezi analytické metody vyžadující minimální přípravu vzorku a velmi nízké provozní a pořizovací náklady patří elektroanalytické techniky.

8.1.1. Optimalizace elektroanalytických metod pro analýzu MT - pík H

Je známo, že hladiny nádorových markerů jsou často velmi nízké, a proto je potřebné pro jejich pravidelné monitorování získávat větší objemy krve. Literatura poukazuje na možnost využít pro ultrasenzitivní stanovení MT pomocí chronopotentiometrické rozpouštěcí analýzy (CPSA) ve spojení s adsorptivní přenosovou technikou (AdTS). V této práci byl však celý postup znovu přehodnocen a nalezeny vhodnější parametry pro detekci MT. Nejzajímavějšího výsledku však bylo dosaženo při studiu signálu MT v přítomnosti redukčního činidla fosfinu (TCEP). Samotný TCEP neposkytuje žádný signál v negativních potenciálech kolem $-1,7$ V (Obr. 17 inset). Avšak přidávkem 1 mM TCEP k 500 fmol MT došlo ke zvýšení signálu o více jak 50 %. Další otázkou bylo, zda vybraná koncentrace TCEP je nejvhodnější pro stanovení MT. Proto byla postupně přidávána rozdílná koncentrace TCEP (0,1 – 1,5 mM) k MT. Po dosažení maxima (kolem 1 mM TCEP) se pík H měnil již minimálně (Obr. 17). Pozorovaný nárůst signálu MT pravděpodobně souvisí s úplnou redukcí oxidovaných SH

skupin v klasterech MT. Volné SH skupiny MT jsou pak schopny mnohem intenzivněji katalyzovat vylučování vodíku ze základního elektrolytu.



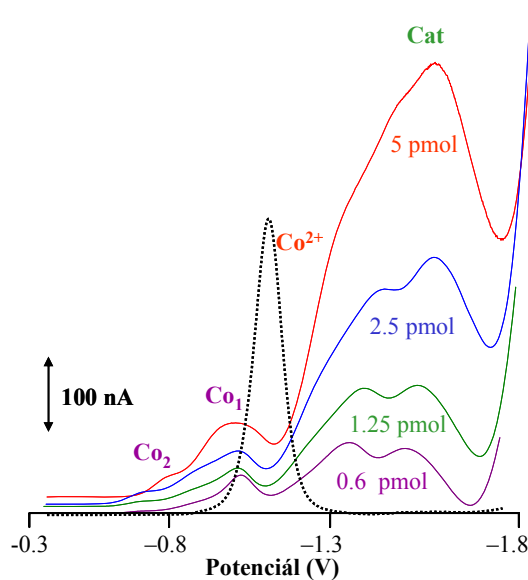
Obr.17.: AdTS CPSA voltamogramy MT bez TCEP a MT s TCEP (A); Vložený obrázek: chemická struktura TCEP a CPSA signál TCEP. Závislost výšky pík H anebo potenciálu na různé koncentraci TCEP (B); Vložený obrázek: CPSA voltamogramy pík H různé TCEP koncentrace (40 fmol MT). Výška píku 35 000 s/V odpovídá 100 %. CPSA základní elektrolyt obsahoval borátový pufr, pH 8,0. AdTS CPSA parametry byly následující: iniciační potenciál 0 V, konečný potenciál $-1,85$ V, teplota 25°C , doba akumulace 100 s.

Navíc bylo stanovení MT testováno v přítomnosti složité biologické matrice (lidská moč a sérum). Bylo zjištěno, že s narůstající osmolalitou moči dochází k poklesu signálu MT a pík MT se posouvá k negativnějším potenciálům. Při osmolalitě moči nad 50 mmol/kg již není vhodné provádět stanovení (pozorovaný signál se snížil o více jak 50 %). Proto je pro analytické stanovení proteinů (MT) pomocí AdTS CPSA potřebné studovaný biologický vzorek vhodně naředit, aby byla snížena jeho specifická hustota a senzitivita stanovení zůstala zachována. K moči (0,25 mmol/kg) bylo postupně přidáváno rozdílné množství MT. Získali jsme lineární závislost na koncentraci ($y = 11317x + 9133,4$, $R^2 = 0,9994$). I při těchto velmi nízkých množstvích MT byly pozorované píky velmi úzké, dobře vyvinuté, separované a vlastní analýza proběhla do 5 min. Díky tomuto nově modifikovanému postupu bylo možné určit limit detekce 3S/N metalothioneinu v čistém základním elektrolytu jako 11 zmol. Dosažená senzitivita navíc usnadní konstrukci jednoduchého senzoru pro monitorování hladiny MT za využití jednotek nanolitru krevního séra.

8.1.2. Analýza MT pomocí Brdičkovy reakce

V námi modifikovaném stanovení MT pomocí Brdičkovy reakce byly pozorovány čtyři signály. Je pravděpodobné, že katalytické signály vylučování vodíku ze základního

elektrolytu jsou pozorovány kolem potenciálu $-1,5$ V). Další signál, který se objevuje kolem potenciálu $-1,3$ V odpovídá redukci komplexu RS_2Co . Na **obrázku 18** jsou ukázány voltamogramy MT při koncentraci 0,6; 1,25; 2,5 a 5 pmol MT. Na získaných voltamogramech je jasně viditelný výrazně měnící se charakter jednotlivých signálů MT v závislosti na jeho koncentraci. Při 5 pmol MT je možné popsat výrazný katalytický signál při potenciálu $-1,5$ V, a méně vyvinutý signál komplexu RS_2Co , dále signály pravděpodobné redukce $[Co(H_2O)_6]^{2+}$ kolem potenciálu $-1,2$ V (označeno jako Co_1) a $-0,8$ V (Co_2). Signál Co_2 se snižující koncentrací MT postupně snižuje a posouvá se směrem k negativním potenciálům. Od koncentrace 0,5 pmol MT je signál již velmi málo rozlišitelný a byl pozorován kolem potenciálu $-1,1$ V. U ostatních pozorovaných signálů s klesající koncentrací roste rozlišitelní jednotlivých signálů Brdičkovy reakce. Nedávno bylo ukázáno, že pro senzitivní stanovení MT pomocí Brdičkovy procedury je výhodné provádět měření za snížené teploty v rozmezí $5 - 10$ °C (RASPOR 2001; RASPOR *et al.* 2001a; RASPOR and PASIČIČ 1996; RASPOR *et al.* 1994). V našem experimentu jsme také testovali vliv teploty na stanovení MT. Námí studovaný protein (10 fmol) byl po dobu 120 s adsorbován na povrch HMDE, elektroda byla omyta a následně probíhalo měření v Brdičkově soluci o různé teplotě (5, 10, 18, 25 a 30 °C). V průběhu experimentu byl pozorován pokles Cat signálu na rostoucí teplotě asi o 0.6 % na °C. A proto je také výhodné provádět měření pomocí AdTS DPV při nízké teplotě základního elektrolytu. Ze získaných experimentálních výsledků byly vybrány nejvhodnější podmínky pro senzitivní stanovení MT. Při relativně nízké koncentraci MT (40 fmol) byla studována závislost na době adsorpce na povrch HMDE. Výška Cat signálu se s narůstající dobou akumulace zvyšovala. V našich experimentech jsme dále používali 120 s dobu akumulace (pro více jako 80 % maximální výšky) pro rychlé stanovení MT. Navíc jsme studovali vliv koncentrace (0,12; 0,25; 0,5; 0,7 a 1 mM) kobaltové sloučeniny $Co(NH_3)_6Cl_3$ na pozorované AdTS DPV signály MT. Ze získaných výsledků bylo zřejmé, že zvyšující se koncentrace kobaltové sloučeniny zvyšuje katalytický signál Cat. A signál Cat se s touto zvyšující koncentrací posouvá směrem k pozitivnějšímu potenciálu. V další části experimentů jsme sledovali závislost na koncentraci. Sledovali jsme signály RS_2Co a Cat. Oba sledované signály se s klesající koncentrací lineárně snižovaly ($y_{RS_2Co} = 0.9002x + 15.521$; $R^2 = 0.995$ a $y_{Cat} = 0.6616x + 10.211$; $R^2 = 0.9955$). Limit detekce byl určen jako $3S/N$ a pohyboval se kolem 500 amol ($750 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$; 100 fM).



Obr.18.: AdTS DPV voltamogramy MT v závislosti na různé koncentraci (0,6; 1,25; 2,5 a 5 pmol). Základní elektrolyt obsahoval amonný pufr, pH 9,6. AdTS DPV parametry byly následující: iniciační potenciál -0,3 V, konečný potenciál -1,8 V, teplota 0°C, doba akumulace 120 s.

8.1.3. Využití navržených postupů pro stanovení metalothioneinu v krvi a krevním séru

V současnosti prakticky není známa žádná analytická metoda pro rutinní stanovení MT v tělních tekutinách. Proto byl námi navržený postup ověřen pro detekci MT v lidském krevním séru a plné krvi. Každý vzorek byl nejdříve pečlivě upraven podle postupu uvedeném v kapitole 6. Získané homogenáty obsahují pouze termostabilní proteiny, mezi něž MT náleží. Vlastní analýza MT byla provedena modifikovaným elektroanalytickým postupem (kapitola 8.1.2.). Studovaný vzorek byl adsorbován z 5 μ l kapky na povrch pracovní elektrody, poté je přebytečný roztok z povrchu elektrody omyt a modifikovaná elektroda je umístěna do měřicí nádoby. V případě, že místo vzorku (obsahujícího proteiny) použijeme vodu, získáme záznam redukce iontů kobaltu (Co^{2+}) bez pozorovaných katalytických signálů. Při další analýze MT byl vyhodnocován katalytický signál Cat_2 . Množství obsaženého MT ve studovaných vzorcích bylo určeno metodou standardního přídávku. Výsledkem byla velmi dobrá lineární závislost standardního přídávku MT na zvyšující se koncentraci ($y = 7177,7x + 7939,3$; $R^2 = 0,9925$) s limitem detekce (3 S/N) kolem 350 fmol ($n = 10$) a střední chybou stanovení 4,5 %.

8.2. Vztah metalothioneinu k nádorovým onemocněním

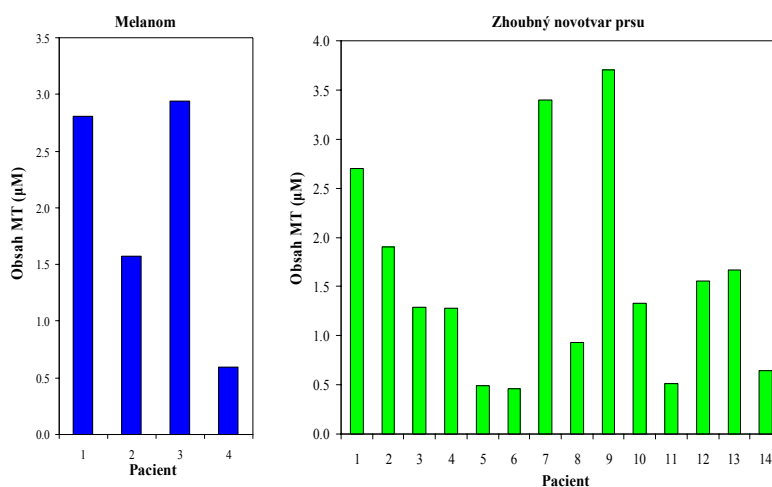
Před více než sedmdesáti lety objevil Rudolf Brdička katalytické vylučování vodíku ze základního elektrolytu v přítomnosti proteinů (BRDICKA 1937a; BRDICKA 1937b). Elektroanalytická metoda byla dále vylepšena a využita pro analýzu proteinů krevních sér

pacientů s rakovinou. Získaná experimentální data přinesla zajímavé výsledky ukazující na možnost využívat tzv. Brdičkovu filtrátovou reakci pro studium prognózy zhoubných onemocnění. Nebylo však zcela zřejmé, které proteiny byly podle vypracované metodiky stanovovány. Později se podařilo objevit skupinu mukoproteinů (MP-1, MP-2 a MP-3), ale proteinům o nižší molekulové hmotnosti nebyla věnována žádná pozornost. Jak se však v poslední době ukazuje, nízkomolekulární proteiny (jako je metalothionein) a peptidy (jako je glutathion) hrají významnou roli v řadě biologických procesů včetně regulace buněčného dělení.

8.2.1. Analýza MT v krevním séru pacientů se zhoubnými nádory

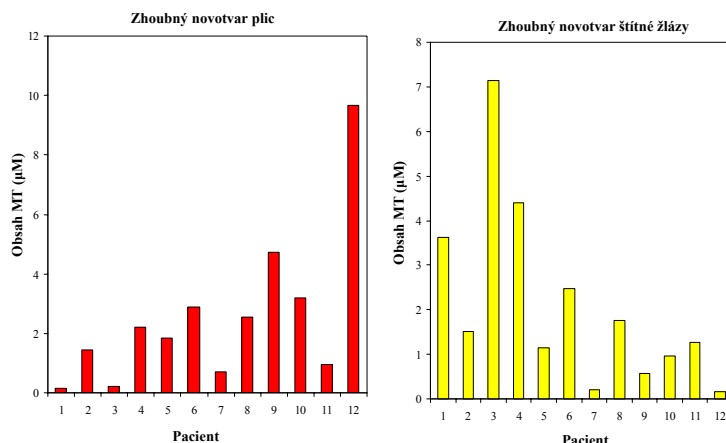
V další části práce nás zajímalo, zda se bude měnit hladina MT u pacientů se ZN. Zcela jistě je na místě otázka, jaká je tedy hladina MT u zdravých lidí. Otázka vsutku jednoduchá, ale odpověď je velmi komplikovaná a bude vyžadovat dlouhodobé a pečlivé sledování řady „zdravých lidí“. Pro naše účely jsme zvolili jako hladinu MT zdravých lidí z krevního séra dárců krve. V těchto testovaných vzorcích lidského séra byla zjištěna průměrná koncentrace MT $0,62 \pm 0,02 \mu\text{M}$ ($n = 5$).

Sledovali jsme hladiny MT u pacientů na různých klinikách FN Motol v průběhu roku 2005. Zjistili jsme, že u pacientů s nádory prsu byl průměrný obsah MT $1,57 \mu\text{mol.dm}^{-3}$, přičemž u devíti pacientů překročila hladina MT $1 \mu\text{mol.dm}^{-3}$ (64 %) a u tří byla hladina MT vyšší než $2 \mu\text{mol.dm}^{-3}$ (21 %). V případě pacientů s melanomem byla průměrná hladina MT $1,97 \mu\text{mol.dm}^{-3}$, u 3 pacientů byl obsah MT vyšší než $1 \mu\text{mol.dm}^{-3}$ (75 %) a u 2 pacientů přesáhla hladina MT $2 \mu\text{mol.dm}^{-3}$ (50%), viz. Obr. 19.



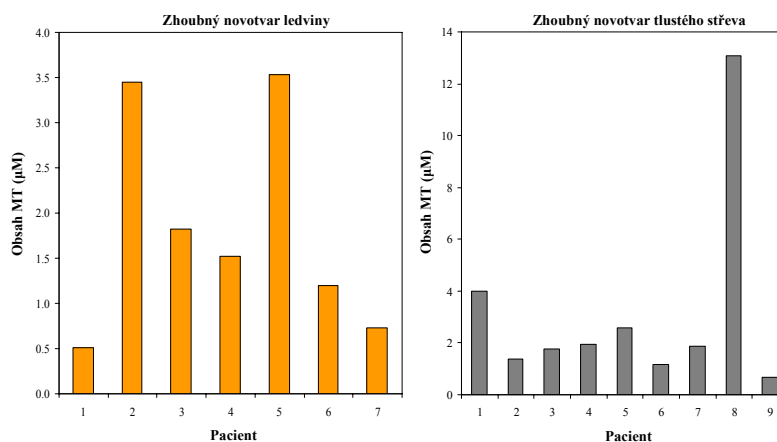
Obr.19.: Množství MT u pacientů s melanomem a zhoubným novotvarem prsu.

U pacientů se zhoubným nádorem tlustého střeva byla průměrná hladina MT $3,2 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, tedy 2krát vyšší než u pacientů s nádorem prsu. Obsah MT vyšší než $1 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ byl pozorován u 8 pacientů (88 %), u 3 byla hladina MT vyšší než $2 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (33 %) a u 2 pacientů (22 %) se hladina sérového MT pohybovala nad hodnotou $4 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. V případě pacientů se zhoubným nádorem plic byl průměrný obsah MT $2,54 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, u 8 pacientů byl obsah MT vyšší než $1 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (66 %), u 6 pacientů přesáhla hladina MT $2 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (50 %) a v případě 2 pacientů byl obsah MT vyšší než $4 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (16 %), viz. **Obr. 20**.



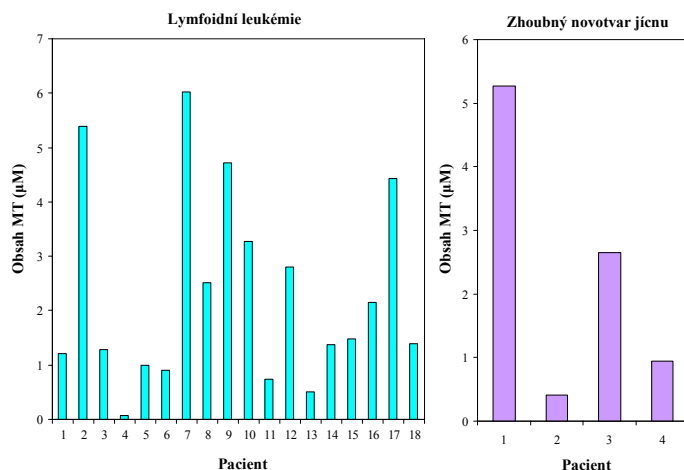
Obr. 20.: Množství MT u pacientů s melanomem a zhoubným novotvarem prsu.

U pacientů se zhoubným nádorem štítné žlázy byl průměrný obsah MT $2,11 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, přičemž u osmi pacientů přesáhla hladina MT $1 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (66 %), u čtyřech byla hladina MT vyšší než $2 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (33 %) a u dvou pacientů překročila hladina MT $4 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (16 %). Průměrná hladina sérového MT pacientů se zhoubným nádorem ledvin činila $1,82 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, u 5 pacientů přesáhl obsah MT $1 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (71 %) a u 2 byla hladina MT vyšší než $2 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (28 %), viz. **Obr. 21**.



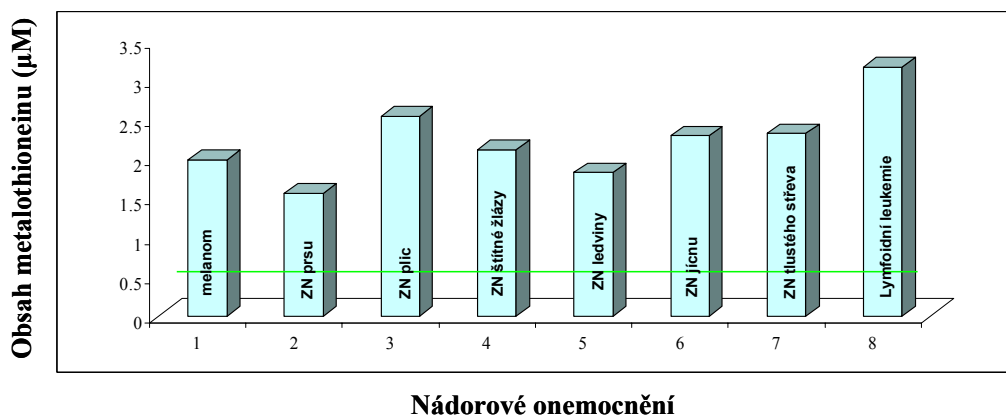
Obr. 21.: Množství MT u pacientů se zhoubným novotvarem ledviny a tlustého střeva.

U pacientů trpících lymfoidní leukémií byl průměrný obsah MT $2,29 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, u 13 byl obsah MT vyšší než $1 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (72 %), u 8 pacientů přesáhla hladina MT $2 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (44 %) a v případě 4 pacientů překročil obsah MT hodnotu $4 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (22 %). V případě pacientů s diagnostikovaným zhoubným nádorem jícnu byla průměrná hladina MT $2,32 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, přičemž u 2 pacientů překročila hladina MT $1 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (50 %), u 2 pacientů byla hladina MT vyšší než $2 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (50 %) a u 1 pacienta přesáhla hladina MT $4 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (25 %), viz. Obr. 22.



Obr. 22.: Množství MT u pacientů s lymfoidní leukémií a zhoubným novotvarem jícnu.

Zjistili jsme, že průměrné hladiny metalothioneinu v krevním séru pacientů s různými druhy zhoubných nádorů kolísají od $1,5$ do $3,5 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Navíc je zřejmé, že hladina MT je v případě všech studovaných nádorových onemocnění zvýšena oproti námi zjištěné průměrné hladině v krevním séru zdravých lidí. Nejnížší hladiny MT byly pozorovány u ZN prsu a ledviny, výrazně vyšší hodnoty byly pozorovány u ZN plic a lymfoidní leukémie (Obr. 23). Získaná unikátní data přináší první hodnoty obsahu MT v krevním séru lidí.

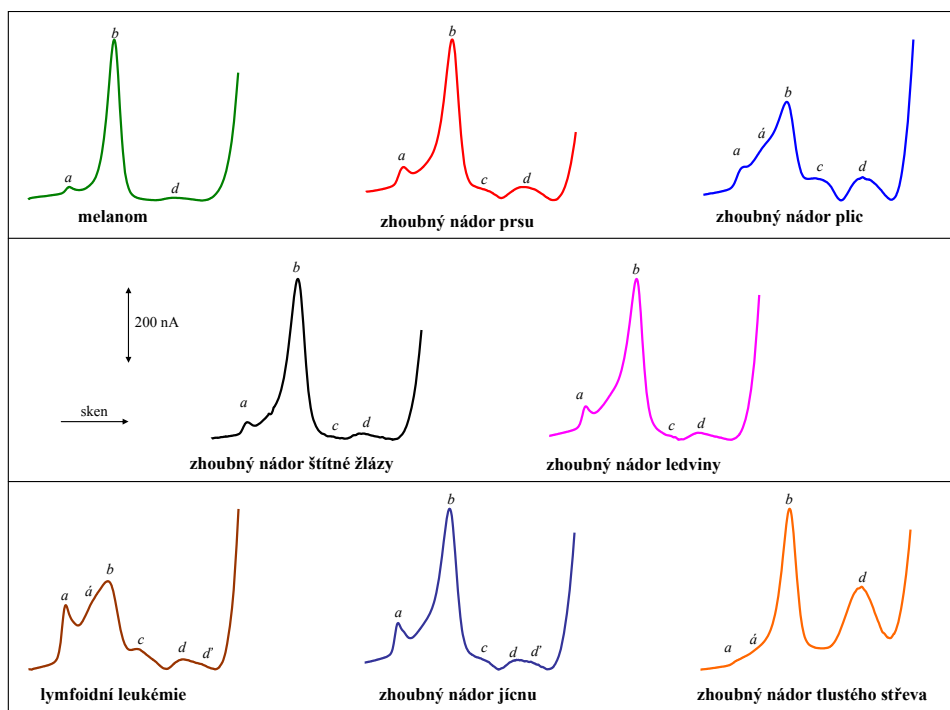


Obr. 23.: Průměrné množství MT u pacientů se zhoubnými nádory. Celkový počet analyzovaných pacientů s nádorovým onemocněním – 80 pacientů (44 mužů a 36 žen). Průměrná hladina metalothioneinu v krevním séru zdravého člověka – $0,6 \mu\text{M}$.

Získané výsledky naznačují na možnost využívat katalytických signálů nejen pro kvantifikaci MT, ale i pro hledání souvislostí s průběhem nádorového onemocnění.

8.2.2. Tvar a průběh voltametrických křivek v krevním séru pacientů se zhoubnými nádory

Již profesor Brdička si povšimnul, že průběh voltametrických křivek se mění u jednotlivých pacientů se ZN (BRDICKA 1934; BRDICKA 1937a; BRDICKA 1937b). Bohužel se této otázce dále nevěnoval. V našich experimentech jsme si také povšimli rozdílného průběhu získaných voltametrických křivek. Popis elektrochemických dějů probíhajících na elektrodě bude zcela jistě velmi obtížný, avšak záznamy by mohly být využity pro rychlé odhalení typu zhoubného nádoru. U různých nádorových onemocnění byly pozorovány velmi dobře charakterizované a reprodukovatelné katalytické signály; RS_2Co , Cat_1 a Cat_2 . Pozorovaná variabilita sledovaných katalytických signálů analyzovaných vzorků kolísala mezi 10 – 20 %. Získané výsledky naznačují na možnost využívat katalytických signálů pro jednoduchou diagnózu ZN, avšak bude potřebné velmi intenzivní a podrobné studium tohoto fenoménu (Obr. 24).

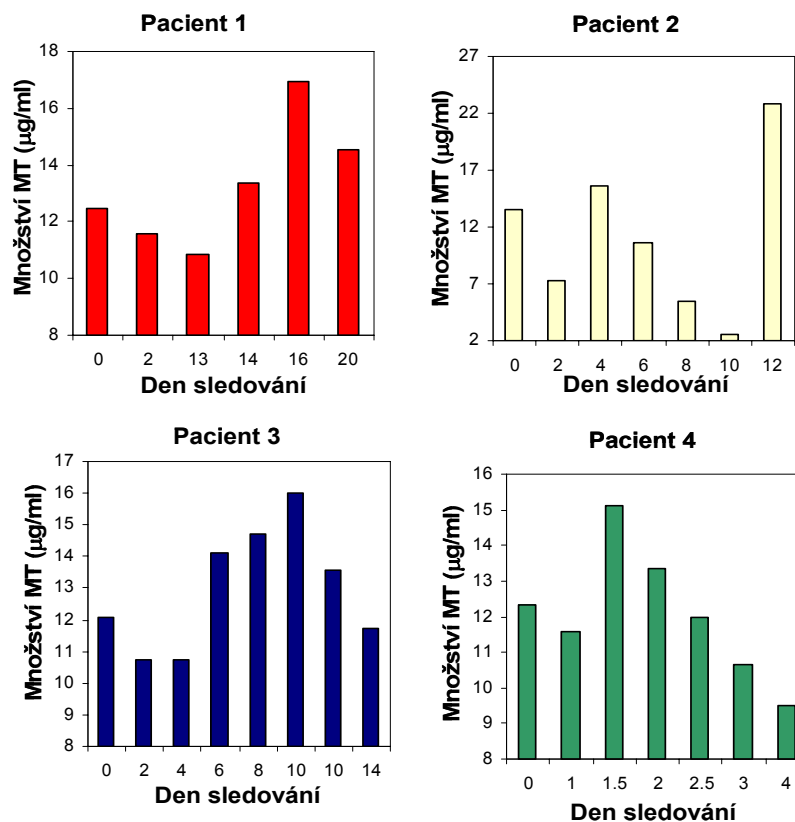


Obr. 24.: Voltametrické křivky u různých ZN. Na voltamogramech je pozorovatelná řada rozdílných signálů, jejichž výška může jednoznačně identifikovat charakteristicky daný ZN.

8.2.3. Sledování hladiny MT v průběhu protinádorové léčby

Mezi proteiny, které mohou ovlivňovat průběh léčby ZN je možné zařadit také metalothionein (PRUSA *et al.* 2005a; PRUSA *et al.* 2005b; PRUSA *et al.* 2005c; PRUSA *et al.* 2004; SVOBODA *et al.* 2005; SVOBODA *et al.* 2006). Z tohoto důvodu jsme se zaměřili na sledování hladiny MT u pacientů se zhoubnými nádory v oblasti hlavy a krku v průběhu jejich protinádorové léčby.

Pacient 1 (muž, 65 let) byl k terapii přijat pro zhoubný nádor (ZN) hrtanu na konci prosince 2005. U pacienta nebyly pozorovány žádné metastázy do lokálních lymfatických uzlin ani vzdálené metastázy. Na základě histologické analýzy byl ZN diagnostikován jako dobře diferencovaný spinocelulární karcinom ve stádiu 3. Léčba byla zahájena chirurgickým odstraněním ZN a následnou radioterapií. Sledovali jsme změnu hladiny MT v plné krvi, která kolísala od 12,5 $\mu\text{g/ml}$ do 10,9 $\mu\text{g/ml}$. Ve třináctém dni po diagnóze onemocnění byl proveden chirurgický zákrok, což se projevilo prudkým vzestupem hladiny MT na hodnotu 13,4 $\mu\text{g/ml}$ ve čtrnáctém dni, respektive 16,9 $\mu\text{g/ml}$ ve dni šestnáctém. Poté hladina MT v krvi klesala k hodnotě 14,5 $\mu\text{g/ml}$ ve dvacátém dni léčby. Následná léčba primárního ZN byla složena z lokální radioterapie (Obr. 25).



Obr. 25.: Změny obsahu MT v průběhu terapie u čtyř sledovaných pacientů se ZN v oblasti hlavy a krku

Pacient 2 (muž, 60 let) byl k léčbě přijat na začátku roku 2006 pro diagnózu ZN hypofaryngu. Histologicky byl ZN středně diferencovaný spinocelulární karcinom ve stádiu 3. U pacienta bylo pozorováno více metastáz do lokálních lymfatických uzlin, ale žádné vzdálené metastázy. Obsah MT v krvi při přijetí k terapii byl 13,5 µg/ml. Chirurgický zákrok byl proveden hned ve druhém dni a hladina MT po něm prudce klesla na hodnotu 7,33 µg/ml. Poté však opět prudce vzrostla na hodnotu 15,6 µg/ml ve čtvrtém dni léčby, ze které pozvolna klesala až k velmi nízké hodnotě 2,5 µg/ml v dni desátém. Dvanáctý den došlo ke skokovému nárůstu hladiny MT v krvi na hodnotu 22,8 µg/ml. Pacient byl léčen chirurgickým odstraněním ZN a následnou chemoterapií (Obr. 25).

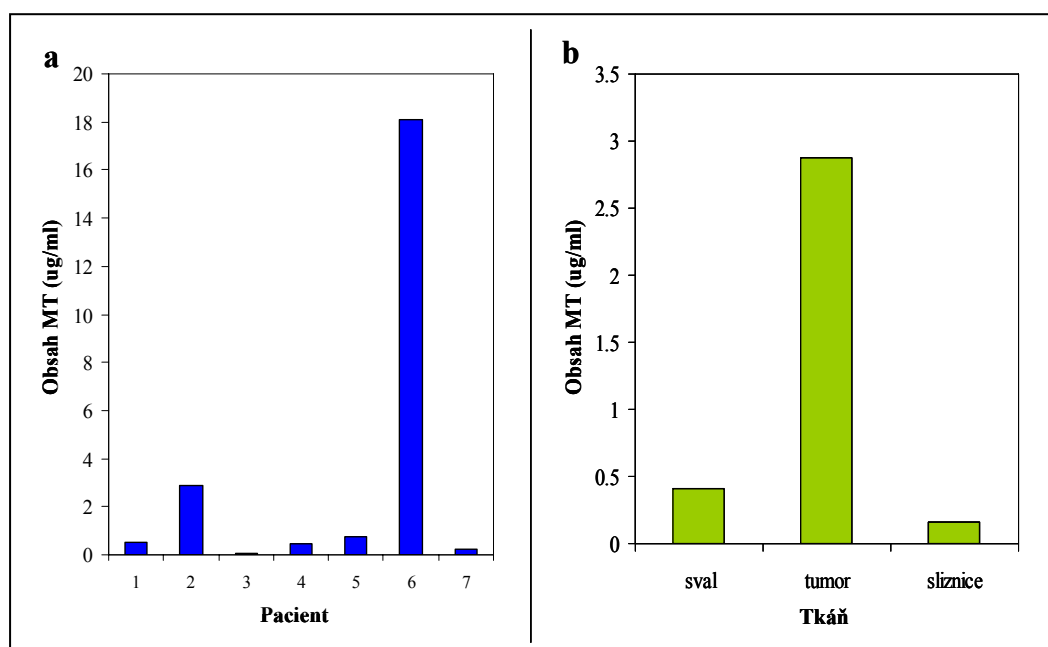
Pacient 3 (muž, 65 let) byl k léčbě přijat na konci roku 2005 pro pokročilý ZN laryngu. Histologicky byl ZN středně diferencovaný spinocelulární karcinom ve stádiu 3. U pacienta nebyly pozorovány žádné vzdálené metastázy. Hladina MT v krvi byla při přijetí k léčbě 12,1 µg/ml. Operace byla provedena hned ve druhém dni a obsah MT v krvi po ní klesl na hodnotu 10,7 µg/ml. Po krátké čtyřdenní stagnaci na této hodnotě začala hladina MT pozvolna stoupat až k maximu 16,0 µg/ml v desátém dni léčby. Od tohoto dne započal pokles až k hladině 11,7 µg/ml ve čtrnáctém dni. Pacient byl léčen chirurgickým odstraněním ZN a následnou radioterapií (Obr. 25).

Pacient 4 (muž, 65 let) byl k léčbě přijat v lednu 2006 pro velmi pokročilý ZN orofaryngu. Histologicky byl ZN středně diferencovaný spinocelulární karcinom ve stádiu 4a, navíc u pacienta byl prokázán ZN prostaty. Dále bylo u pacienta bylo pozorováno více metastáz do lokálních lymfatických uzlin, ale žádné vzdálené metastázy. Pacient byl léčen radioterapií a následnou radioterapií cisplatinou. Hladina MT v jeho krvi byla po první dávce radioterapie 12,3 µg/ml. Následně byla podána chemoterapie cisplatinou a pozorovaná hladina MT klesla k hodnotě 10,6 µg/ml. Ještě týž den večer však hladina MT skokově vzrostla na 15,1 µg/ml. Z této hodnoty započal pozvolný pokles obsahu MT v krvi, který se ve čtvrtém dni ustálil na hodnotě 9,5 µg/ml. Na získaném záznamu je velmi dobře patrný pokles MT po podání cisplatinu z důvodu jeho vazby na toto léčivo a následný výrazný skokový vzestup jako odpověď na přítomnost platinového kovu v krvi pacienta (Obr. 25).

Získané experimentální výsledky naznačují, že studium hladiny metalothioneinu u onkologických pacientů je nejen zajímavé z hlediska obecného poznání, ale přináší i nové poznatky pro pochopení léčebné odpovědi (KIZEK *et al.* 2004a).

8.2.4. Množství MT v nádorové tkáni

Nedávno byly publikovány experimentální práce, které ukazují na změny obsahu kovů v nádorové tkáni (BECKER *et al.* 2005a; BECKER *et al.* 2005b; ZORIY *et al.* 2005). Proto jsme se zaměřili na sledování obsahu metalothioneinu přímo v nádorové tkáni. Obsah MT jsme sledovali v nádorové tkáni sedmi pacientů kliniky ORL a chirurgie hlavy a krku Fakultní nemocnice U svaté Anny v Brně. Jednalo se v šesti případech o spinocelulární karcinom a jeden případ lymfoepiteliomu, lokalizované v pěti případech v hrtanu, dále v nosohltanu a dolní části hltanu. Metalothionein byl přítomen ve všech vzorcích nádorové tkáně, avšak u pacientů 2 a 6 byl jeho obsah výrazně vyšší než v ostatních případech (Obr. 26a). Dále jsme porovnali obsah MT v nádorové tkáni a v okolní zdravé tkáni. Ve všech sledovaných případech byl obsah MT v nádorové tkáni zřetelně vyšší (Obr.26b).

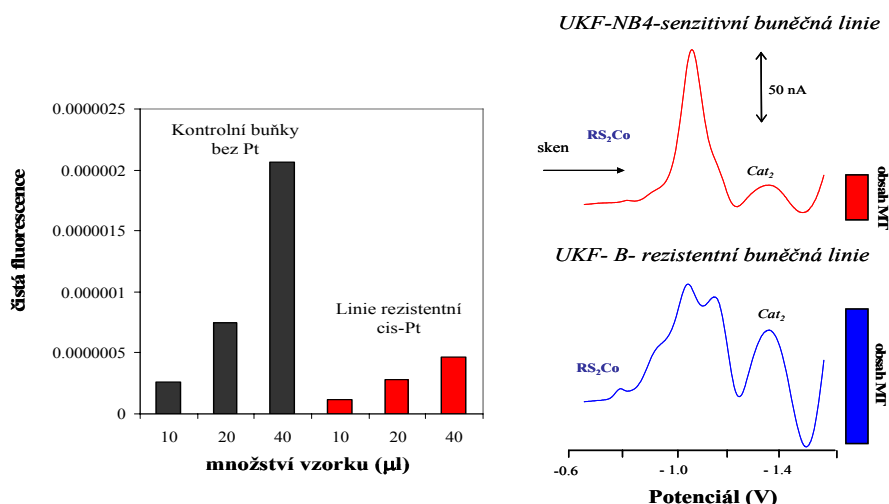


Obr.26.: a) obsah metalothioneinu v nádorové tkáni pacientů s diagnostikovanými nádory hlavy a krku. b) porovnání obsahu MT ve svalu, sliznici a nádorové tkáni jednoho pacienta.

8.3. Metalothionein a jeho vztah k MDR

Dalším významným cílem studia je hledání vztahu metalothioneinu v procesu vzniku MDR rezistence vůči cytostatikům na bázi platiny. Mezi buněčnými liniemi neuroblastomu byly izolovány linie senzitivní a rezistentní vůči cisplatině. V předešlé práci byly jednotlivé buněčné linie charakterizovány z hlediska chromozomových změn (BEDRNICEK *et al.* 2005). Nyní jsme charakterizovali neuroblastomové buněčné linie v závislosti na aktivitě intracelulárních esteráz. V experimentu byla testována možnost detekce počtu živých buněk

ve vzorcích neuroblastomových buněčných linií senzitivních a rezistentních k cisplatině. Na základě známého počtu buněk, které byly homogenizovány v daném objemu byly do reakční směsi pro stanovení intracelulárních esterás vnášeny ekvivalenty počtu buněk v rozmezí 0 až 7000. U senzitivních buněčných linií byla aktivita esterás výrazně vyšší v porovnání s kulturou rezistentní buněčné linie. Detekovaná aktivita intracelulárních esterás byla přímo úměrná počtu buněk a limit detekce byl asi kolem 600 buněk v případě senzitivní neuroblastomové kultury a asi kolem 1000 buněk v případě rezistentní buněčné kultury. Dále byla sledována změna hladiny metalothioneinu u těchto linií pomocí námi navrženého elektroanalytického stanovení (kapitola 7.1.1). Z našich předešlých experimentálních prací je zřejmé, že interakce mezi platinovým léčivem a metalothioneinem je poměrně silná (ADAM *et al.* 2005; PRUSA *et al.* 2005b; PRUSA *et al.* 2005c; PRUSA *et al.* 2004). Získané experimentální výsledky ukazují, že u linií rezistentních k cisplatině dochází k výraznému vzestupu hladiny MT. Tento pozorovaný jev pravděpodobně naznačuje na spojitost mezi MT a vytvořenou rezistencí buněčné linie na toto běžně používané cytostatikum (Obr. 27).



Obr. 27.: Aktivita intracelulárních esteráz a hladina metalothioneinu u senzitivní a rezistentní neuroblastomové buněčné linie. Esterázová aktivita byla určena fluorimetricky a množství MT bylo analyzováno pomocí Brdičkovy reakce

Pro řešení vzniklého problému MDR rezistence související s hladinou MT bylo navrženo několik možných postupů. Jednou z možností je blokovat syntézu MT proteinu využitím antisense mRNA (protismyslné RNA). Tato molekula vytvoří s mRNA metalothioneinu komplex, který je z organismu velmi rychle odbouráván. Následně tedy nedochází k nárůstu hladiny MT v organismu a externě podané léčivo může intenzivněji působit v nádorové tkáni. Tento způsob byl již experimentálně ověřován. Zbylé způsoby jsou zatím jen možnou cestou kam se vydat při řešení tak složité otázky. Nabízí se vytvoření nefunkčního genu, který bude

blokovat syntézu MT, případně reparačních mechanismů buňky. Další možností je pokusit se vzniklý protein degradovat specifickou proteázou nebo se pokusit jej vyvazovat dalším kovem např. zinkem či mědí (BLASTIK *et al.* 2005; BLASTIK *et al.* 2006; BLAŠTÍK *et al.* 2005; KERR *et al.* 1994).

9. ZÁVĚR

Proto, aby bylo možné studovat hladinu MT u pacientů je nezbytné mít k dispozici analytické nástroje. Zjistili jsme, že elektrochemických metod lze využít pro vysoce senzitivní stanovení metalothioneinu s limitem detekce v řádech desítek zeptomolů. Dále se nám podařilo prokázat, že elektrochemické metody jsou vhodné pro stanovení metalothioneinu v řadě biologických vzorků (nádorové tkáně). Navíc jsme uvedených metod a postupů, vůbec jako první, využili pro monitorování hladiny MT v tělních tekutinách (krevní sérum i plná krev). K dnešnímu dni bylo analyzováno více jako 110 vzorků krevních sér nebo plné krve.

Ze získaných výsledků dále vyplývá, že v případě všech zkoumaných zhoubných novotvarů dochází ke znatelnému nárůstu průměrné hladiny metalothioneinu v krevním séru pacientů se ZN (od 1,5 do 3,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) ve srovnání s námi definovanou průměrnou hladinou v séru zdravých lidí. Zajímavá je i pozorovaná souvislost mezi konkrétní diagnózou zhoubného novotvaru a průběhem elektrochemického záznamu, popřípadě rozložením charakteristických katalytických signálů. Hladina metalothioneinu v krvi pacientů se mění i v průběhu léčby zhoubného novotvaru, kdy narůstá nejen po podání cytostatik nebo radioterapeutickém ozáření, ale i po kurativním chirurgickém zákroku. Lze předpokládat, že metalothionein také pravděpodobně značnou měrou zasahuje do procesu vzniku mnohočetné rezistence k cytostatikům na bázi těžkých kovů, což dokazuje výrazně vyšší hladina metalothioneinu v buněčných kulturách rezistentních vůči těmto léčivům.

Metalothionein by tedy mohl být potencionálním novým nádorovým markerem jak pro včasnou diagnostiku zhoubného novotvaru, sledování prognózy onemocnění, tak i pro monitorování průběhu léčby. Dočasné omezení jeho funkce by také mohlo vést k zlepšení citlivosti na chemoterapeutickou léčbu a tím i k větší pravděpodobnosti úspěchu v boji se zhoubnými novotvary.

10. SHRNU TÍ

Podle Světové zdravotnické organizace (WHO) je každým rokem ve vyspělých zemích diagnostikováno asi 11 milionů případů onemocnění maligním nádorem a předpokládá se, že v roce 2020 bude nově diagnostikovaných případů více než 16 milionů. Nyní jsou nádorová onemocnění příčinou smrti více než 6,7 milionu lidí celosvětově, což znamená, že přibližně každých pět sekund na Zemi umírá jeden člověk na zhoubný novotvar. Z těchto důvodů vytvořila WHO v roce 2002 Univerzální program pro kontrolu rakoviny, který je možný adaptovat pro jakoukoliv zemi na světě. Česká republika zahájila intenzivní program boje se zhoubnými nádory a v roce 2006 spustila unikátní vyhodnocení získaných dat o onkologických pacientech – Národní onkologický registr. Navíc v České republice vyhlásilo Ministerstvo zdravotnictví ČR a Česká onkologická společnost program zaměřený na pokles výskytu zhoubných onemocnění v české populaci, který se má, kromě jiného, zaměřit na zlepšení včasné diagnostiky mezi něž náleží i hledání nových potencionálních nádorových markerů. Jak se ukazuje, jedním z nových potencionálních markerů by mohl být protein metalothionein (MT). MT patří do skupiny intracelulárních, nízkomolekulárních na cystein velmi bohatých proteinů o molekulové hmotnosti 6 – 10 kDa. Souvislost mezi MT a rakovinou je na samém počátku zkoumání. Nejnovější výzkumy ovšem naznačují, že existuje vztah mezi množstvím MT a rychlostí rozvoje zhoubného nádoru. Analytických metod pro senzitivní analýzu MT však není v současné době mnoho. Většina z nich vyžaduje velmi složitou přípravu vzorku náročnou a drahou laboratorní instrumentací. Proto jsme se nejdříve zaměřili na výběr a optimalizaci metody vhodné nejen pro velmi citlivou analýzu MT ale také metody vhodné pro stanovení MT v krvi a krevním séru. Nejcitlivější námi optimalizovanou metodou byla chronopotenciometrická rozpouštěcí analýza ve spojení s adsorptivní přenosovou technikou, kde jsme dosáhli detekčního limitu 11 zmolů, který nám umožňuje analyzovat MT v kapkách lidské krve. Naším dalším a neméně důležitým cílem bylo studovat vztah MT k nádorovým onemocněním. Pro tyto účely jsme zvolili elektrochemickou metodu Brdičkovy reakce, která splňovala nejen podmínky dostatečné sensitivity a zároveň nám umožnila rychlou analýzu většího množství vzorků krve a krevního séra. Analyzovali jsme krevní séra pacientů s různými druhy zhoubných nádorů (melanom, lymfoidní leukémie, zhoubný nádor prsu, plic, štítné žlázy, ledviny, jícnu a tlustého střeva, a nádory v oblasti hlavy a krku). Naše výsledky ukazují, že hladina MT je u všech studovaných nádorových onemocněních zvýšená ve srovnání s kontrolním vzorkem, v případě lymfoidní leukémie a

zhoubného nádoru plic dokonce více jak pětkrát. Kromě toho, že můžeme MT považovat za potencionální nádorový marker, také patří do skupiny proteinů, které mohou ovlivňovat průběh léčby zhoubných nádorů. Z tohoto důvodu jsme se zaměřili na sledování hladiny MT u nádorových buněčných linií a dále u čtyř pacientů se zhoubnými nádory v oblasti hlavy a krku v průběhu jejich protinádorové léčby. Získané experimentální výsledky naznačují, že studium hladiny MT u onkologických pacientů je nejen zajímavé z hlediska obecného poznání, ale přináší i nové poznatky pro pochopení léčebné odpovědi.

11. SUMMARY

According to World Health Organisation (WHO), more than 11 million people are diagnosed with tumour disease every year. It is estimated that there will be 16 million new cases every year by 2020. Tumour disease causes more than 6.7 million deaths every year, which means that one man dies every fifth second by tumour disease. As a response to the cancer epidemic, WHO suggested National Cancer Control Programmes, which was published in 2002, that can be adapted to socioeconomic and cultural contexts in all countries. Czech Republic has been beginning an intensive program to fight with tumour diseases and triggered a unique evaluation of data obtained from oncological patients – National Oncological register. In addition, Ministry of Health of Czech Republic and Czech Oncological Society proclaimed a programme lowering cancer incidence at population, which are aimed on, besides others, improving of early detection of tumour disease including searching for new potential markers of tumour diseases. It seems to be according to recently published papers that metallothionein (MT) could serve as a new potential marker. MT belongs to group of intracellular, low molecular and cysteine-rich proteins with molecular weight from 6 to 10 kDa. The link between MT and a tumour disease is at the very beginning of investigations. Recently published papers showed a possibility that link between amount of MT and rate of tumour disease progression really exists. On the other hand, few analytical techniques could be used now for very sensitive determination of MT. Most of them need very difficult and time consuming sample preparation and/or high cost laboratory equipment. Thus, we aimed primarily on selection and optimization of a method suitable not only for very sensitive determination of MT but also for determination of MT in blood and blood serum. Chronopotentiometric stripping analysis in connection with adsorptive transfer technique was the most sensitive method for the above mentioned purposes. The detection limit of the method was 11 zmoles, which enable to us analyse MT in few drops of human blood. Studying of link between MT and tumour disease was another, important aim. We used electrochemical method – Brdicka reaction – for these purposes. This method was everything one expects including not only high sensitivity but also requirements for routine analysis. We analysed blood serum of patients with different tumour diseases (melanoma, leucemia, breast, lung, thyroid gland, kidney, oesophagus and colon cancer, and otorhinolaryngological tumour diseases). We found out that metallothionein content at human blood serum of the mentioned patients increased in comparison with control. As for leucemia and lung cancer, we

determined that content of MT was more than five times higher in comparison with control. Besides that we could consider MT to be a new potential tumour diseases marker, MT also belongs to group of proteins influencing way of a treatment of cancer. For that reason we aimed on determination of MT at tumour cell lines and, moreover, at four patients with cancer of head and neck during their treatment. The results obtained shows that investigating of MT level at oncological patients is not only interesting with regards to common knowledge but also brings new pieces of knowledge needed to better understanding of tumour disease treatment response.

12. PŘEHLED LITERATURY

- ABE, O., R. ABE, K. ASAISHI, K. ENOMOTO, T. HATTORI *et al.*, 1992 Systemic Treatment of Early Breast-Cancer by Hormonal, Cytotoxic, or Immune Therapy - 133 Randomized Trials Involving 31000 Recurrences and 24000 Deaths among 75000 Women. *Lancet* **339**: 71-85.
- ABRHAMOVA, J., 2005 Národní onkologický registr. <http://www.uzis.cz/cz/nor/norindx.htm>.
- ADAM, V., J. PETRLOVA, D. POTESIL, J. ZEHNALÉK, B. SURES *et al.*, 2005 Study of metallothionein modified electrode surface behaviour in the presence of heavy metal ions - biosensor. *Electroanalysis* **17**: 1649-1657.
- ALBERTS, B., D. BRAY, A. JHONSON, J. LEWIS, M. RAFF *et al.*, 1998 *Základy buněčné biologie*. Espero Publishing, Ústí nad Labem.
- ANDERSEN, J. E. T., 1997 Analysis of lead and zinc by mercury-free potentiometric stripping analysis. *Anal. Lett.* **30**: 1001-1012.
- ANDREWS, G. K., 2001 Cellular zinc sensors: MTF-1 regulation of gene expression. *Biometals* **14**: 223-237.
- ARMITAGE, J. O., 1994 Bone-Marrow Transplantation. *New England Journal of Medicine* **330**: 827-838.
- ASCHERMANNNOVA, A., 2005 Úvodník. *The Lancet Oncology - Czech* **4**: 81-81.
- BARD, A. J., and L. R. FAULKNER, 1980 *Electrochemical Methods*. John Wiley and Sons, New York.
- BATES, S. E., 1991 Clinical-Applications of Serum Tumor-Markers. *Annals of Internal Medicine* **115**: 623-638.
- BEATTIE, J. H., and M. P. RICHARDS, 1994 Separation of Metallothionein Isoforms by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography. *Journal of Chromatography A* **664**: 129-134.
- BEBIANNO, M. J., and L. M. MACHADO, 1997 Concentrations of metals and metallothioneins in *Mytilus galloprovincialis* along the south coast of Portugal. *Marine Poll. Bull.* **34**: 666-671.
- BECK, L. K., M. A. KANE and P. A. BUNN, 1988 Innovative and Future Approaches to Small Cell Lung-Cancer Treatment. *Seminars in Oncology* **15**: 300-314.
- BECKER, J. S., M. ZORIY, C. PICKHARDT, E. DAMOC, G. JUHACZ *et al.*, 2005a Determination of phosphorus-, copper-, and zinc-containing human brain proteins by LA-ICPMS and MALDI-FTICR-MS. *Analytical Chemistry* **77**: 5851-5860.
- BECKER, J. S., M. V. ZORIY, C. PICKHARDT and K. ZILLESB, 2005b Copper, zinc, phosphorus and sulfur distribution in thin section of rat brain tissues measured by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry: possibility for small-size tumor analysis. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **20**: 912-917.
- BEDRNICEK, J., A. VICHA, M. JAROSOVA, M. HOLZEROVA, J. CINATL *et al.*, 2005 Characterization of drug-resistant neuroblastoma cell lines by comparative genomic hybridization. *Neoplasma* **52**: 415-419.
- BIXLER, J. W., and W. F. STAFFORD, 1968 Chemical stripping of copper with cerium(IV). *Anal. Chem.* **40**: 425-427.
- BLASTIK, O., M. SVOBODA, R. PRUSA, J. KUKACKA, M. STIBOROVA *et al.*, 2005 Overeni senzitivity elektrochemickeho stanoveni metalothioneinu jako potencialniho markeru nadorovych onemocneni, pp. 35-36 in *Dny diagnosticke, prediktivni a experimentalni onkologie*, edited by M. HAJDUCH. Solen, Olomouc, Czech republic.
- BLASTIK, O., M. SVOBODA, R. PRUSA, J. KUKACKA, M. STIBOROVA *et al.*, 2006 Evaluation of sensitivity of electrochemical determination of metallothionein, pp. 58-59 in *X*.

- Pracovní setkání biochemiků a molekulárních biologů*, edited by M. WIMMEROVÁ and P. BENES. Masarykova univerzita, Brno, Czech republic.
- BLAŠTÍK, O., J. PETRLOVÁ, V. ADAM, D. POTĚŠIL, R. PRŮŠA *et al.*, 2005 Metallothionein - tumour disease marker?, pp. 41-42 in *IX. Pracovní setkání biochemiků a molekulárních biologů*, edited by M. WIMEROVÁ. MU Brno, Brno.
- BRABEC, V., and J. KASPARKOVA, 2005 Modifications of DNA by platinum complexes - Relation to resistance of tumors to platinum antitumor drugs. *Drug Resistance Updates* **8**: 131-146.
- BRAZDOVA, M., R. KIZEK, L. HAVRAN and E. PALECEK, 2002 Determination of glutathione-S-transferase traces in preparations of p53 C-terminal domain (aa320-393). *Bioelectrochemistry* **55**: 115-118.
- BRDICKA, R., 1934 Wielands labiler wasserstoff der schwermetallkatalytischen oxydation von sulhydrylverbindungen. *Biochemische Zeitschrift* **272**: 104-112.
- BRDICKA, R., 1937a Application of the polarographic effect of proteins in cancer diagnosis. *Nature* **139**: 330-330.
- BRDICKA, R., 1937b Polarographic investigation in serological cancer diagnosis. *Nature* **139**: 1020-1021.
- BRDIČKA, R., 1933a Polarographic Studies with the Dropping Mercury Kathode. -Part XXXI. - A New Test for Proteins in The presence of Cobalt Salts in Ammoniacal Solutions of Ammonium Chloride. *Coll. Czech. Chem. Commun.* **5**: 112-128.
- BRDIČKA, R., 1933b Polarographic Studies with the Dropping Mercury Kathode. -Part XXXII. - Activation of Hydrogen in Sulphydryl Group of Some Thio-Acids in Cobalt Salts Solutions. *Coll. Czech. Chem. Commun.* **5**: 148-164.
- BRDIČKA, R., 1936 Polarographic Studies with the Dropping Mercury Kathode. -Part LXI. - The Effect of buffer Solutions on the Reaction of Proteins. *Coll. Czech. Chem. Commun.* **8**: 366-376.
- BRDIČKA, R., M. BŘEZINA and V. KALOUS, 1965 Polarography of proteins and its analytical aspects. *Talanta* **12**: 1149-1162.
- BŘEZINA, M., and P. ZUMAN, 1952 *Polarografie v lékařství, biochemii a farmacii*. SZN, Praha.
- BŘEZINA, M., and P. ZUMAN, 1958 *Polarography in Medicine, Biochemistry and Pharmacy*. Interscience Publ., New York.
- CAI, L., X. K. LI, Y. SONG and M. G. CHERIAN, 2005 Essentiality, toxicology and chelation therapy of zinc and copper. *Current Medicinal Chemistry* **12**: 2753-2763.
- CAI, X., G. RIVAS, P. A. M. FARIAS, H. SHIRAIISHI, J. WANG *et al.*, 1996 Trace Measurements of Plasmid DNAs by Adsorptive Stripping Potentiometry at Carbon Paste Electrodes. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **40**: 41-47.
- DABRIO, M., A. R. RODRÍGUEZ, G. BORDIN, M. J. BEBIANNO, M. DE LEY *et al.*, 2002 Recent developments in quantification methods for metallothionein. *J. Inorg. Biochem.* **88**: 123-134.
- DIMERY, I. W., and W. K. HONG, 1993 Overview of Combined Modality Therapies for Head and Neck-Cancer. *Journal of the National Cancer Institute* **85**: 95-111.
- DOLLNER, R., C. GRANZOW, J. A. WERNER and A. DIETZ, 2004 Is there a role for chemosensitivity tests in head and neck cancer? *Onkologie* **27**: 310-315.
- DORCAK, V., and I. SESTAKOVA, 2006 Electrochemical behavior of phytochelatin and related peptides at the hanging mercury drop electrode in the presence of cobalt(II) ions. *Bioelectrochemistry* **68**: 14-21.
- DVOŘÁK, J., J. KORYTA and V. BOHÁČKOVÁ, 1975 *Elektrochemie*. Academia, Praha.
- ESTELA, J. M., C. TOMÁS, A. CLADERA and V. CERDÁ, 1995 Potentiometric Stripping Analysis: A Review. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **25**: 91-141.

- FARID, N. R., Y. F. SHI and M. J. ZOU, 1994 Molecular-Basis of Thyroid-Cancer. *Endocrine Reviews* **15**: 202-232.
- GARAI, T., Z. NAGY, L. MÉSZÁROS, L. BARTALITS, C. LOCATELLI *et al.*, 1992 Theory of Derivative and Differential Potentiometric Stripping Analysis and Stripping Chronopotentiometry. *Electroanalysis* **4**: 899-904.
- GARAJ, J., J. BERČÍK, D. BUSTIN, J. ČERŇÁK, J. ŠTEFANEC *et al.*, 1977 *Fyzikálne a fyzikálnochemické analytické metódy*. Vydavateľstvo technickej a ekonomickej literatúry, Bratislava.
- GOODMAN, V. L., G. J. BREWER and S. D. MERAJVER, 2005 Control of copper status for cancer therapy. *Current Cancer Drug Targets* **5**: 543-549.
- HAMER, D. H., 1986 Metallothionein. *Annual Review of Biochemistry* **55**: 913-951.
- HARRIS, D. C., 2003 *Quantitative chemical analysis*. W. H. Freeman and Company, New York.
- HARRIS, J. R., M. E. LIPPMAN, U. VERONESI and W. WILLETT, 1992 Medical Progress .1. Breast-Cancer. *New England Journal of Medicine* **327**: 319-328.
- HATHOUT, Y., K. J. REYNOLDS, Z. SZILAGYI and C. FENSELAU, 2002 Metallothionein dimers studied by nano-spray mass spectrometry. *Journal of Inorganic Biochemistry* **88**: 119-122.
- HECHT, S. S., 1999 Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute* **91**: 1194-1210.
- HEYROVSKÝ, J., and J. BABIČKA, Polarographic Studies with the Dropping Mercury cathode. Part XIII - The Effect of Albumins.
- HEYROVSKY, J., and J. KŮTA, 1962 *Základy polarografie*. Nakladatelství Československé akademie věd, Praha.
- HEYROVSKÝ, J., and J. KŮTA, 1962 *Základy polarografie*. ČS AV, Praha.
- HOFFMANN, U., and H. K. KROEMER, 2004 The ABC transporters MDR1 and MRP2: Multiple functions in disposition of xenobiotics and drug resistance. *Drug Metabolism Reviews* **36**: 669-701.
- HONEYCHURCH, M. J., and M. J. RIDD, 1995 The Effect of Nonadsorbing Electroactive Species on the Transition Time in Derivative Adsorptive Chronopotentiometric Stripping Analysis. *Electroanalysis* **11**: 1041-1047.
- CHASSAIGNE, H., and R. LOBINSKI, 1998 Characterization of horse kidney metallothionein isoforms by electrospray MS and reversed-phase HPLC-electrospray MS. *Analyst* **123**: 2125-2130.
- CHUBATSU, L. S., and R. MENEGHINI, 1993 Metallothionein Protects DNA from Oxidative Damage. *Biochemical Journal* **291**: 193-198.
- IL'YASOVA, D., and G. G. SCHWARTZ, 2005 Cadmium and renal cancer. *Toxicology and Applied Pharmacology* **207**: 179-186.
- JAGNER, D., 1982 Potentiometric Stripping Analysis A review. *Analyst* **107**: 593-599.
- JAGNER, D., and K. AREN, 1978 Derivative potentiometric stripping analysis with a thin film of mercury on a glassy carbon electrode. *Anal. Chim. Acta* **100**: 375-388.
- JAGNER, D., and GRANALI, 1976 Potentiometric stripping analysis. *Anal. Chim. Acta* **83**: 19-26.
- JURICKOVA, L., 2006 Zhoubné nádory v roce 2003. Aktuální informace ústavu zdravotnických informací a statistiky České republiky: 1-4.
- KASAHARA, K., Y. FUJIWARA, K. NISHIO, T. OHMORI, Y. SUGIMOTO *et al.*, 1991 Metallothionein content correlates with the sensitivity of human small cell lung cancer lines to cisplatin. *Cancer Res.* **51**: 3237-3242.
- KAVANAGH, D., A. D. K. HILL, B. DIJKSTRA, R. KENNELLY, E. M. W. MCDERMOTT *et al.*, 2005 Adjuvant therapies in the treatment of stage II and III malignant melanoma.

- Surgeon-Journal of the Royal Colleges of Surgeons of Edinburgh and Ireland **3**: 245-256.
- KELVIN, F. M., and D. D. T. MAGLINTE, 1987 Colorectal-Carcinoma - a Radiologic and Clinical Review. *Radiology* **164**: 1-8.
- KEMENY, N., 1987 Role of Chemotherapy in the Treatment of Colorectal-Carcinoma. *Seminars in Surgical Oncology* **3**: 190-214.
- KERR, J. F. R., C. M. WINTERFORD and B. V. HARMON, 1994 Apoptosis - Its Significance in Cancer and Cancer-Therapy. *Cancer* **73**: 2013-2026.
- KIZEK, R., L. TRNKOVA and E. PALECEK, 2001 Determination of metallothionein at the femtomole level by constant current stripping chronopotentiometry. *Anal. Chem.* **73**: 4801-4807.
- KIZEK, R., J. VACEK, V. ADAM and B. VOJTĚŠEK, 2004a Metallothionein - cisplatin and anticancer therapy. *Klin. Biochem. Metab.* **13**: 72-78.
- KIZEK, R., J. VACEK, V. ADAM and B. VOJTĚŠEK, 2004b Vztah metallothioneinu k rakovině a protinádorové léčbě. *Klin. Biochem. Metab.* **12**: 72-78.
- KIZEK, R., J. VACEK, L. TRNKOVA and F. JELEN, 2004c Cyclic voltammetric study of the redox system of glutathione using the disulfide bond reductant tris(2-carboxyethyl)phosphine. *Bioelectrochemistry* **63**: 19-24.
- KIZEK, R., J. VACEK, L. TRNKOVA, B. KLEJDUS and L. HAVEL, 2004d Application of catalytic reactions on a mercury electrode for electrochemical detection of metallothioneins. *Chemicke Listy* **98**: 166-173.
- KLOUDA, P., 2003 *Moderní analytická chemie*. Pavel Klouda, Ostrava.
- KOLTHOFF, I. M., K. YAMASHITA and T. B. HIE, 1975a Brdička Currents Observed with Bovine Serum Albumin and Completely Reduced Bovine Serum Albumin in Presence of Urea. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **72**: 2044-2048.
- KOLTHOFF, I. M., K. YAMASHITA, T. B. HIE and A. KANBE, 1975b Brdička Currents Observed with Bovine Serum Albumin in Tris and Borate Buffers. *J. Electroanal. Chem.* **58**: 375-386.
- LAUEROVA, L., L. DUSEK, M. SIMICKOVA, I. KOCAK, M. VAGUNDOVA *et al.*, 2002 Malignant melanoma associates with Th1/Th2 imbalance that coincides with disease progression and immunotherapy response. *Neoplasma* **49**: 159-166.
- LEE, B. N., R. DANTZER, K. E. LANGLEY, G. J. BENNETT, P. M. DOUGHERTY *et al.*, 2004 A cytokine-based neuroimmunologic mechanism of cancer-related symptoms. *Neuroimmunomodulation* **11**: 279-292.
- LEE, S. J., K. S. LEE, Y. J. YIM, T. S. KIM, Y. M. SHIM *et al.*, 2005 Recurrence of squamous cell carcinoma of the oesophagus after curative surgery: rates and patterns on imaging studies correlated with tumour location and pathological stage. *Clinical Radiology* **60**: 547-554.
- LINDGREN, M., K. ROSENTHAL-AIZMAN, K. SAAR, E. EIRIKSDOTTIR, Y. JIANG *et al.*, 2006 Overcoming methotrexate resistance in breast cancer tumour cells by the use of a new cell-penetrating peptide. *Biochemical Pharmacology* **71**: 416-425.
- LOGASHENKO, E. B., A. V. VLADIMIROVA, A. N. ZENKOV, M. N. REPKOVA, A. G. VEN'YAMINOVA *et al.*, 2005 Reversion of the multiple-drug resistance phenotype mediated by short interfering RNAs. *Russian Chemical Bulletin* **54**: 1298-1305.
- MAIRANOVISKII, S. G., 1968 *Catalytic and kinetic waves in polarography*. Plenum Press, New York.
- MARIS, J. M., and K. K. MATTHAY, 1999 Molecular biology of neuroblastoma. *J. Clin. Oncol.* **17**: 2264-2279.
- MARKUŠOVÁ, K., 2000 *Elektrochemické metody*. Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Košice.

- MCKAIG, R. G., R. S. BARIC and A. F. OLSHAN, 1998 Hunan papillomavirus and head and neck cancer: Epidemiology and molecular biology. *Head and Neck-Journal for the Sciences and Specialties of the Head and Neck* **20**: 250-265.
- MCLAUGHLIN, J. K., and L. LIPWORTH, 2000 Epidemiologic aspects of renal cell cancer. *Seminars in Oncology* **27**: 115-123.
- MILES, A. T., G. M. HAWKSWORTH, J. H. BEATTIE and V. RODILLA, 2000 Induction, regulation, degradation, and biological significance of mammalian metallothioneins. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **35**: 35-70.
- MINDL, J., 2000 *Základy elektro organické chemie*. Academia, Praha.
- MOFFATT, P., and F. DENIZEAU, 1997 Metallothionein in physiological and physiopathological processes. *Drug Metabolism Reviews* **29**: 261-307.
- NAITO, S., A. YOKOMIZO and H. KOGA, 1999 Mechanisms of drug resistance in chemotherapy for urogenital carcinoma. *International Journal of Urology* **6**: 427-439.
- NAKAYAMA, A., H. FUKUDA, M. EBARA, H. HAMASAKI, K. NAKAJIMA *et al.*, 2002 A new diagnostic method for chronic hepatitis, liver cirrhosis, and hepatocellular carcinoma based on serum metallothionein, copper, and zinc levels. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **25**: 426-431.
- OLAFSON, R. W., 1988 Electrochemical characterisation of metallothionein metal-mercaptide complex: application of cyclic voltammetry to investigation of metalloproteins. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **19**: 111-125.
- OLAFSON, R. W., and P. E. OLSSON, 1991 Electrochemical detection of metallothionein. *Meth. Enzymol.* **205**: 205-283.
- OLAFSON, R. W., and R. G. SIM, 1979 An electrochemical approach to quantification and characterization of metallothionein. *Anal. Biochem.* **100**: 343-351.
- PALEČEK, E., and Z. PECHAN, 1971 Estimation of nanogram quantities of proteins by pulse polarographic techniques. *Anal. Biochem.* **42**: 59-71.
- PEPPER, M. S., J. C. TILLE, R. NISATO and M. SKOBE, 2003 Lymphangiogenesis and tumor metastasis. *Cell and Tissue Research* **314**: 167-177.
- PETROVA, J., O. BLASTIK, V. ADAM, R. MIKLOVA, D. POTESIL *et al.*, 2005a Detekce zeptomolárních hladin metalothioneinu chronopotenciometrickou rozpouštěcí analýzou na rtuťové elektrodě, pp. 111-113 in *XXIX. Brněnské onkologické dny*, edited by J. ZALOUDEK and R. VYZULA. Masarykův onkologický ústav v Brně, Brno, Česká republika.
- PETROVA, J., O. BLASTIK, R. PRUSA, J. KUKACKA, R. MIKLOVA *et al.*, 2006 Analýza obsahu metalothioneinu u pacientů se zhoubným nádorem prsu, tlustého střeva a nebo melanomem. *Klin. Onkol.* **19**: in press.
- PETROVA, J., O. BLASTIK, R. PRUSA, J. KUKACKA, D. POTESIL *et al.*, 2005b Using of electrochemical methods for studying of metallothionein content in the human blood serum of a patient poisoned by lead and treated by platinum. *Biomedical Papers* **149**: 485-488.
- PETROVA, J., O. BLASTIK, O. ZITKA, V. ADAM, D. POTESIL *et al.*, 2005c An electrochemical study of metallothionein as a potential tumour disease marker. *Annals the Polish Chemical Society* **in press**.
- PETROVA, J., D. POTESIL, R. MIKLOVA, O. BLASTIK, V. ADAM *et al.*, 2005d Attomole voltammetric determination of metallothionein. *Electrochim. Acta* **submitted**.
- PRUSA, R., O. BLASTIK, J. KUKACKA, J. ZEHNALÉK, V. ADAM *et al.*, 2005a The influence of platinum-based drugs on the amount of metallothionein. *Toxicol. Lett.* **158**: S66-S67.
- PRUSA, R., O. BLASTIK, D. POTESIL, L. TRNKOVA, J. ZEHNALÉK *et al.*, 2005b Analytic method for determination of metallothioneins as tumor markers. *Clinical Chemistry* **51**: A56-A56.

- PRUSA, R., O. BLASTIK, D. POTESIL, L. TRNKOVA, J. ZEHNALÉK *et al.*, 2005c Metallothioneins as a marker of tumor diseases. *Clin. Chem.* **51**: A56-A56.
- PRUSA, R., R. KIZEK, L. TRNKOVA, J. VACEK and J. ZEHNALÉK, 2004 Study of relationship between metallothionein and heavy metals by CPSA method. *Clinical Chemistry* **50**: A28-A29.
- PUI, C. H., and W. E. EVANS, 1998 Acute lymphoblastic leukemia. *New England Journal of Medicine* **339**: 605-615.
- RASPOR, B., 2001 Elucidation of the mechanism of the Brdička reaction. *J. Electroanal. Chem.* **503**: 159-162.
- RASPOR, B., M. PAIČ and M. ERK, 2001a Analysis of metallothioneins by modified Brdička procedure. *Talanta* **55**: 109-115.
- RASPOR, B., M. PAIČ and M. ERK, 2001b Analysis of metallothionein by the modified Brdička procedure. *Talanta* **55**: 109-115.
- RASPOR, B., and PASIČIČ, 1996 Electrochemical methods for quantification and characterization of metallothioneins induced in *Mytilus galloprovincialis*. *Fresenius J. Anal. Chem.* **354**: 529-534.
- RASPOR, B., I. PIZETA and M. BRANICA, 1994 Comparative quantitative analysis of overlapping voltammetric signals. *Anal. Chim. Acta* **285**: 103-111.
- RIBEIRO, U., M. C. POSNER, A. V. SAFATLERIBEIRO and J. C. REYNOLDS, 1996 Risk factors for squamous cell carcinoma of the oesophagus. *British Journal of Surgery* **83**: 1174-1185.
- RIHOVA, B., J. STROHALM, M. KOVAR, T. MRKVAN, V. SUBR *et al.*, 2005 Induction of systemic antitumour resistance with targeted polymers. *Scandinavian Journal of Immunology* **62**: 100-105.
- SATOH, M., Y. KONDO, M. MITA, I. NAKAGAWA, A. NAGANUMA *et al.*, 1993 Prevention of Carcinogenicity of Anticancer Drugs by Metallothionein Induction. *Cancer Research* **53**: 4767-4768.
- SESTAKOVA, I., and T. NAVRATIL, 2005 Voltammetric methods in metallothionein research. *Bioinorganic Chemistry and Applications* **3**: 43-53.
- SCHMUTZLER, C., and J. KOEHRLE, 2000 Innovative strategies for the treatment of thyroid cancer. *European Journal of Endocrinology* **143**: 15-24.
- SCHWAB, M., 1999 Human neuroblastoma: From basic science to clinical debut of cellular oncogenes. *Naturwissenschaften* **86**: 71-78.
- SKORSKI, T., 2002 Oncogenic tyrosine kinases and the DNA-damage response. *Nature Reviews Cancer* **2**: 351-360.
- SMITH, T. J., B. E. HILLNER and C. E. DESCH, 1993 Efficacy and Cost-Effectiveness of Cancer-Treatment - Rational Allocation of Resources Based on Decision-Analysis. *Journal of the National Cancer Institute* **85**: 1460-1474.
- SOMMER, L., Z. ŠIMEK and P. VOZNICA, 2000 *Analytická chemie II*. Vutium, Brno.
- STROUHAL, M., R. KIZEK, J. VACEK, L. TRNKOVA and M. NEMEC, 2003 Electrochemical study of heavy metals and metallothionein in yeast *Yarrowia lipolytica*. *Bioelectrochemistry* **60**: 29-36.
- SVOBODA, M., O. BLASTIK, R. PRUSA, J. KUKACKA, O. ZITKA *et al.*, 2005 Analyza obsahu metallothioneinu u pacientu s nádorovým onemocněním, pp. 48 in *Dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie*, edited by M. HAJDUCH. Solen, Olomouc, Czech republic.
- SVOBODA, M., O. BLASTIK, R. PRUSA, J. KUKACKA, O. ZITKA *et al.*, 2006 Changing of metallothionein content at patients with tumour diseases, pp. 96-97 in *X. Pracovní setkání biochemiku a molekulárních biologů*, edited by M. WIMMEROVA and P. BENES. Masarykova univerzita, Brno, Czech republic.

- TAKEMURA, Y., T. MUKAI, K. SENOO and M. SUZUKI, 1995 Decomposition of Organic Chlorine Compounds by Fentons Reaction on Reticulated Iron. *Kagaku Kogaku Ronbunshu* **21**: 32-40.
- THEOCHARIS, S., C. KARKANTARIS, T. PHILIPIDES, E. AGAPITOS, A. GIKA *et al.*, 2002 Expression of metallothionein in lung carcinoma: correlation with histological type and grade. *Histopathology* **40**: 143-151.
- THEOCHARIS, S. E., A. P. MARGELI, J. T. KLIJANIENKO and G. P. KOURAKLIS, 2004 Metallothionein expression in human neoplasia. *Histopathology* **45**: 103-118.
- TOMITA, H., P. W. MARCELO and J. W. MILSOM, 1999 Laparoscopic surgery of the colon and rectum. *World Journal of Surgery* **23**: 397-405.
- TOMSCHIK, M., 1995 Thesis, pp. in *Faculty of Science*. Masaryk University, Brno.
- TOMSCHIK, M., L. HAVRAN, M. FOJTA and E. PALEČEK, 1998 Constant current chronopotentiometric stripping analysis of bioactive peptides at mercury and carbon electrodes. *Electroanalysis* **10**: 403-409.
- TRNKOVA, L., R. KIZEK and J. VACEK, 2002 Catalytic signal of rabbit liver metallothionein on a mercury electrode: a combination of derivative chronopotentiometry with adsorptive transfer stripping. *Bioelectrochemistry* **56**: 57-61.
- TRNKOVÁ, L., R. KIZEK and J. VACEK, 2002a Catalytic signal of rabbit liver metallothionein on a mercury electrode: combination of derivative chronopotentiometry with adsorptive transfer stripping. *Bioelectrochem.* **56**: 57-61.
- TRNKOVÁ, L., R. KIZEK and J. VACEK, 2002b Catalytic signal of rabbit liver metallothionein on a mercury electrode: a combination of derivative chronopotentiometry with adsorptive transfer stripping. *Bioelectrochem.* **56**: 57-61.
- VACEK, J., J. PETŘEK, L. HAVEL, D. KOUTNÁ, V. ADAM *et al.*, 2002 Stanovení olova a rostlinných metallothioneinů v explantátových kulturách smrku ztepilého (*Picea abies* L.). In: VI. Pracovní setkání biochemiků a molekulárních biologů **Brno**.
- VENDRIK, C. P. J., J. J. BERGERS, W. H. DEJONG and P. A. STEERENBERG, 1992 Resistance to Cytostatic Drugs at the Cellular-Level. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **29**: 413-429.
- VITECEK, J., V. ADAM, J. PETREK, P. BABULA, P. NOVOTNA *et al.*, 2005 Application of fluorimetric determination of esterases in plant material. *Chemicke Listy* **99**: 496-501.
- VITECEK, J., V. ADAM, J. PETREK, J. VACEK, R. KIZEK *et al.*, 2004 Esterases as a marker for growth of BY-2 tobacco cells and early somatic embryos of the Norway spruce. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **79**: 195-201.
- VOKES, E. E., R. R. WEICHELBAUM, S. M. LIPPMAN and W. K. HONG, 1993 Medical Progress - Head and Neck-Cancer. *New England Journal of Medicine* **328**: 184-194.
- VOLM, M., 1998 Multidrug resistance and its reversal. *Anticancer Research* **18**: 2905-2917.
- VORLÍČEK, J., 1995 *Klinická onkologie II. díl*. Vydavatelství Masarykovy Univerzity, Brno.
- WANG, J., 1994 *Analytical Chemistry*. VCH Publishing, New York.
- WANG, J., X. CAI, C. JONSSON and M. BALAKRISHNAN, 1996a Adsorptive Stripping Potentiometry of DNA at Electrochemically Pretreated Carbon Paste Electrodes. *Electroanalysis* **8**: 20-24.
- WANG, J., X. CAI, G. RIVAS and H. SHIRAISHI, 1996b Stripping potentiometric transduction of DNA hybridization processes. *Anal. Chim. Acta* **326**: 141 - 147.
- WANG, J., X. CAI, G. RIVAS, H. SHIRAISHI, P. A. M. FARIAS *et al.*, 1996c DNA Electrochemical biosensor for the Detection of Short DNA Sequences Related to the Human Immunodeficiency Virus. *Anal. Chem.* **68**: 2629 - 2634.
- WANG, J., M. OZSOZ, X. H. CAI, G. RIVAS, H. SHIRAISHI *et al.*, 1998 Interactions of antitumor drug daunomycin with DNA in solution and at the surface. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* **45**: 33-40.

- WEINLICH, G., W. BITTERLICH, V. MAYR, P. O. FRITSCH and B. ZELGER, 2003 Metallothionein-overexpression as a prognostic factor for progression and survival in melanoma. A prospective study on 520 patients. *Brith. J. of Dermatol.* **149**: 535-541.
- WHITE, R. L., 1998 Tumor suppressing pathways. *Cell* **92**: 591–592.
- ZELENÁ, J., D. POTEŠIL, J. VACEK, V. ADAM, J. HRADECKÝ *et al.*, 2004 Metalothionein jako prognostický marker nádorového onemocnění. *Klinická onkologie* **17**: 190-195.
- ZELGER, B., A. HITTMAIR, M. SCHIR and E. AL., 1993 Metallothionein expression in nonmelanoma skin cancer. *Appl. Immunohistochem.* **2**: 254-260.
- ZELGER, B. W. H., A. SIDOROFF and U. STANZL, 1994 Deep penetrating dermatofibroma vs. dermatofibrosarcoma protruberans - a clinicopathologic comparison. *Am. J. Surg. Pathol.* **18**: 677-686.
- ZIEGLER, R. G., S. T. MAYNE and C. A. SWANSON, 1996 Nutrition and lung cancer. *Cancer Causes & Control* **7**: 157-177.
- ZORIY, M. V., M. DEHNHARDT, A. BAUER, A. MATUSCH, C. PICKHARDT *et al.*, 2005 Metal-ion concentrations in human and rat brain tumors: A laser ablation induction plasma coupled MS study. *Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology* **371**: R103-R103.