

## STUDIUM HLADINY METALOTHIONEINU V SÉRU PACIENTŮ SE ZHOUBNÝM NÁDOREM

LUDĚK MELICH<sup>a</sup>, MAGDALÉNA FOŘTOVÁ<sup>a</sup>, BOŽENA HOSNEDLOVÁ<sup>b</sup>, JAKUB PODHÁJSKÝ<sup>a</sup>, ONDŘEJ RYCHLÝ<sup>a</sup>, JULIA WERLE<sup>a</sup>, KRISTÝNA BUREŠOVÁ<sup>a</sup>, KATEŘINA DUNOVSKÁ<sup>a</sup>, LENKA VYSLOUŽILOVÁ<sup>c</sup>, EVA KLAPKOVÁ<sup>a</sup>, KAREL KOTAŠKA<sup>a</sup>, JANA ČEPOVÁ<sup>a</sup>, BLANKA JEDLIČKOVÁ<sup>a</sup>, OLGA ŠTĚPÁNKOVÁ<sup>c</sup>, RICHARD PRŮŠA<sup>a</sup> a RENÉ KIZEK<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Ústav lékařské chemie a klinické biochemie, 2. LF a FN Motol, V Úvalu 84, 150 06 Praha 5,

<sup>b</sup> BIOCEV, 1. Lékařská fakulta, Univerzita Karlova, Vestec, <sup>c</sup> Oddělení biomedicínského inženýrství a asistivní technologie, Český institut informatiky, robotiky a kybernetiky, České vysoké učení technické v Praze, Jugoslávských partyzánů 1580/3, 160 00 Praha 6, Česká republika  
kizekrene@gmail.com

Došlo 28.5.23, přijato 26.6.23.

Metalothionein (MT) je nízkomolekulární intracelulární protein, jehož primární funkcí je udržení homeostázy těžkých kovů v živých organismech. Molekulární mechanismus exprese MT je velmi málo prostudován. Nedávné výzkumy ukazují na jeho významný vztah ke karcinogenezi, spontánní mutagenezi a účinnosti protinádorových léčiv. Zvýšená hladina MT je studována jako potenciální ukazatel zvýšené metabolické aktivity u nádorových onemocnění. Elektrochemické metody jsou vhodným analytickým nástrojem pro detekci MT.

Za využití elektrochemické analýzy (Brdičkovy reakce) byly studovány teplotně denaturované vzorky krevních sér pacientů s diagnostikovaným nádorovým onemocněním. Získané voltamogramy byly vyhodnoceny jako plocha pod křivkou (AUC odpověď). Pro porovnání normální a abnormální hladiny MT bylo použito kontrolní sérum zdravých probandů ( $n = 38$ ) s průměrným množstvím MT  $2,2 \mu\text{g l}^{-1}$  a mediánem  $2,1 \mu\text{g l}^{-1}$ . Ve všech hodnocených vzorcích krevních sér pacientů s nádorovým onemocněním ( $n = 228$ ) bylo průměrné množství MT  $22,7 \mu\text{g l}^{-1}$  a medián  $18,1 \mu\text{g l}^{-1}$ . Rozdíl (10násobný) mezi skupinami byl statisticky vysoce významný.

Získaná data pilotního experimentu naznačují, že hladiny thiolových sloučenin, jako je MT, mohou mít u pacientů s nádorovým onemocněním klinický potenciál.

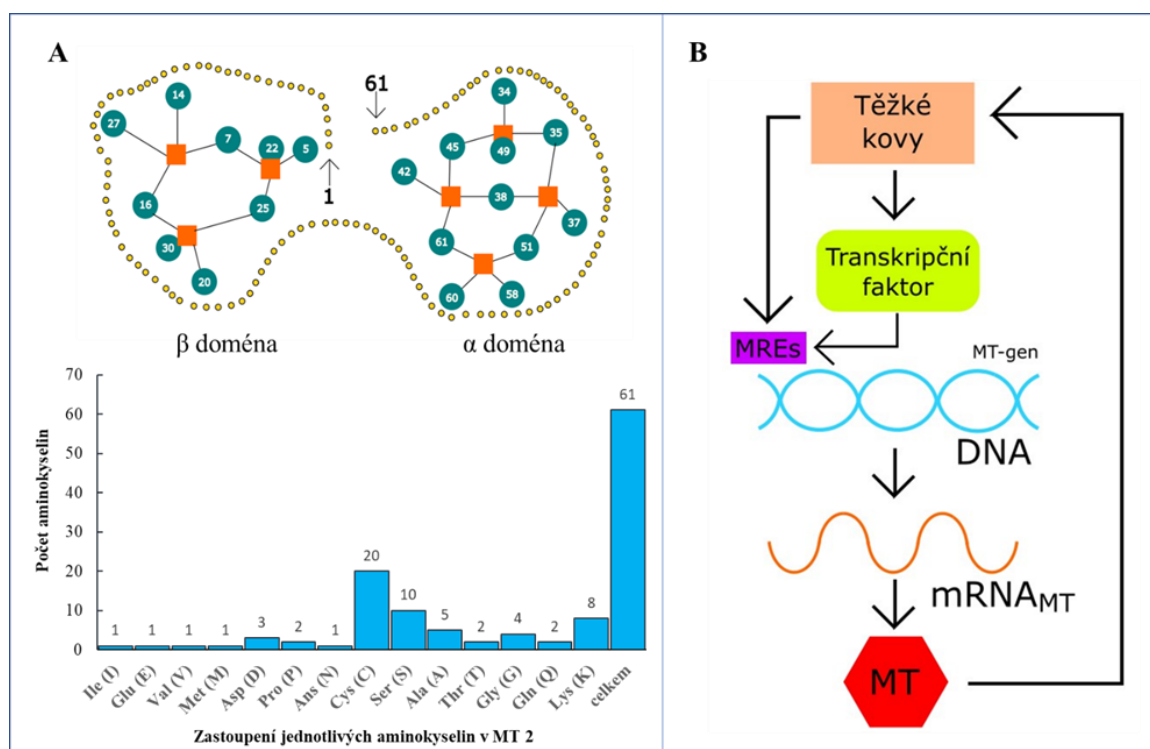
**Klíčová slova:** metalomika, nádorová onemocnění, játra, slinivka, žlučník, diagnostika, prognostický marker, elektrochemická analýza, Brdičkovy reakce

### Úvod

Molekulární podstata biologické funkce metalothioneinů

Metalothioneiny (MT) patří do skupiny intracelulárních, nízkomolekulárních, na cystein velmi bohatých proteinů (obsah Cys až 30 % v molekule proteinu) o molekulové hmotnosti 6–10 kDa (cit.<sup>1</sup>). Díky své vysoké afinitě k těžkým kovům, např. k zinku, mědi nebo kadmii, zajišťují homeostatickou kontrolu a detoxikaci těžkých kovů u vývojově rozdílných organismů<sup>2</sup>. Bylo prokázáno, že vazba kadmia na MT zabránila toxickým účinkům, ale docházelo ke zvýšení transportu kadmia do ledvin. Pro hodnocení toxicity byl v případě ledvin prokázán význam poměru Cd/Zn v MT (cit.<sup>2</sup>). Objev MT je datován k roku 1957, kdy Margoshes a Vallee izolovali MT z koňských ledvin<sup>3</sup>. V molekule MT nejsou přítomny aromatické ami-

nokyseliny. V primární sekvenci MT se vyskytuje 20 cysteinů obvykle v těchto repetitcích: Cys-X-Cys, Cys-Cys-X-Cys-Cys, Cys-X-Cys-Cys, kde X představuje jinou aminokyselinu než cystein. MT se skládají ze dvou vazebných domén ( $\alpha$  a  $\beta$ ). Kovalentní vazby atomů kovů se účastní sulfhydrylové zbytky cysteinů v klastrech (obr. 1). N-terminální část peptidu je označena jako  $\beta$ -doména, má tři vazebná místa pro dvojmocné ionty. C-terminální  $\alpha$ -doména má schopnost vyvázat čtyři dvojmocné ionty kovů. V případě jednomocných iontů kovů je MT schopen vázat celkem 12 atomů<sup>4</sup>. MT jsou rozděleny do tříd MT-I a MT-II s ohledem na jejich primární strukturu a organismus, ze kterého byly izolovány<sup>5</sup>. 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, které mají odlišné rozmístění Cys zbytků v molekule proteinu ve srovnání s I. třídou MT (obr. 1)<sup>6</sup>.



Obr. 1. **Pravděpodobné schéma struktury metalothioneinů ( $\alpha$  a  $\beta$  doména) (A).** Zelené kruhy zastupují SH skupiny (cysteinylové zbytky) a oranžové čtverce označují vázané atomy těžkých kovů (zinek, kadmium, stříbro a další). Ve vloženém obrázku je obsah jednotlivých aminokyselin v MT. **Pravděpodobný vztah koncentrace MT k buněčné proliferaci (B).** Po navázání MT na kov jsou uvolněny transkripční faktory, které dále ovlivňují replikaci a transkripci genové informace MT. Transkripční faktor nasedá na MRE (metal-responsive element) v promotorové oblasti MT-genu a spouští jeho transkripci. Upraveno podle Kági, Schäffer 1988 (cit.<sup>1</sup>) a z databáze Swiss-Prot (ExpPASY Molecular Biology Server, zdroj: <http://www.expasy.ch>).

Hladiny MT s potenciálním využitím v klinické praxi

Sledování změny hladin MT u různých onemocnění člověka se věnuje několik výzkumných skupin<sup>7–16</sup>. Sérové hladiny MT byly u kontrolních skupin zdravých osob kolem  $10 \mu\text{g l}^{-1}$  (cit.<sup>17</sup>), u kuřáků kolem  $20–25 \mu\text{g l}^{-1}$  (cit.<sup>18</sup>). V případě zánětu byly hladiny zvýšené nad  $20 \mu\text{g l}^{-1}$  (cit.<sup>18</sup>). Ve slinách se hladina MT pohybovala mezi 50 a  $100 \text{ ng l}^{-1}$  (cit.<sup>18</sup>). Hladiny MT jsou ovlivněny prostředím a fyzickou aktivitou<sup>19</sup>. U pracovní expozice kadmium se hladiny MT v moči pohybovaly v rozmezí  $2–155 \text{ ng g}^{-1}$  moči,  $2–11 \text{ ng g}^{-1}$  plazmy (cit.<sup>20</sup>). Swierczek a spol. studovali hladiny MT v moči po environmentální kontaminaci a zjistili 6–15násobný nárůst po expozici kadmium<sup>21</sup>. Předpokládá se, že kadmium by mohlo souviset s nádorovou transformací. V práci Wolfa a spol. byly analyzovány vzorky moči pacientů s nádory močového měchýře s důrazem na MT s vázaným kadmium. Získané výsledky ukázaly, že kadmium je převážně vázáno na sledovanou MT frakci. Medián koncentrace kadmia vázaného na MT u kontrolní skupiny byl kolem  $0,8 \mu\text{g l}^{-1}$ , zatímco skupina se zhoubným nádorem vykazovala statisticky zvýšenou hladinu kolem  $1,8 \mu\text{g l}^{-1}$  (cit.<sup>22</sup>). U expozice rtuti se sérové

hladiny MT pohybovaly od  $0,5$  do  $1,5 \mu\text{g l}^{-1}$  (cit.<sup>23</sup>). Hladiny MT detegované metodou RIA se u kontrolní skupiny pohybovaly v rozmezí  $1–16 \text{ ng g}^{-1}$  séra/plazmy a  $5–400 \mu\text{g g}^{-1}$  kreatininu v moči<sup>24–27</sup>. Bylo zjištěno, že hladiny MT mají souvislost se změnou fyziologické funkce ledvin<sup>27,28</sup>. Změny hladiny MT byly pozorovány také u jaterní dysfunkce<sup>29</sup>. Milnerowicz a spol. pozorovali zvýšení exprese MT u pankreatitidy a lze předpokládat, že MT bude hrát roli i v syntéze hormonů pankreatu<sup>30</sup>.

U pacientů se zhoubným nádorem lze předpokládat zvýšení hladiny MT<sup>31,32</sup>. O hladinách MT u pacientů s nádorovým onemocněním není příliš mnoho dostupných informací<sup>31,33,34</sup>. Přehled o této problematice podávají Si a Lang<sup>16</sup>. Je známo, že hladiny MT jsou ovlivněny hladinami iontů těžkých kovů<sup>35</sup>. Zvýšené množství MT v nádorových buňkách pravděpodobně souvisí s buněčnou proliferací<sup>34,36,37</sup>. Studuje se zapojení MT do procesu karcinogeneze a spontánní mutagenese<sup>38</sup> a vztah nadměrné exprese MT a koncentrace protinádorových léčiv obsahujících ve své molekule kov<sup>39</sup>. U pacientů s primárním kožním melanomem byla Weinlichem a spol. statisticky potvrzena spojitost zvýšené hladiny MT s progresí onemocnění a úmrtím pacientů na metastázy<sup>40</sup>. Nadměrná exprese MT je iniciována maligními typy nádorů, což bylo zjiště-

no např. u karcinomu prsu<sup>41</sup>, kožních karcinomů<sup>42</sup>, hepatocelulárního karcinomu<sup>43</sup> a karcinomů pankreatu<sup>44</sup>.

### Stanovení MT

Přehled základních analytických metod stanovení metalothioneinů je popsán v práci Šestákové<sup>45</sup>. Profesor Brdička a profesor Heyrovský publikovali v časopise Nature informace o využití polarografie při diagnostice nádorového onemocnění<sup>46–48</sup>. Předpokládá se, že thiolové skupiny přítomné v molekule metalothioneinů jsou odpovědné za katalytické signály vylučování vodíku. Elektrochemickému stanovení MT se věnovala řada experimentálních studií<sup>49</sup>. Podrobné studie provedla řada autorů<sup>50–53</sup>. Thompson a Cosson popisují elektrochemické signály různých proteinů včetně aplikace metody na reálné vzorky *Scylla serrata* a *Crassostrea gigas*<sup>54</sup>. Ke stanovení MT je využíváno široké spektrum metod chemické analýzy<sup>55</sup>. Nejčastěji se využívají elektromigrační metody – gelová a kapilární elektroforéza a chromatografické metody<sup>56</sup>. Dále se využívají elektrochemické metody, mezi něž patří diferenční pulsní voltametrie (DPV) nebo derivační chronopotenciometrie s konstantním proudem (CPSA)<sup>49,57–59</sup>. Pomocí CPSA v kombinaci s technikou adsorptivního přenosu (AdTS) lze stanovovat koncentrace MT na úrovni femtomolů ve velmi malých objemech (jednotky  $\mu\text{l}$ ) vzorku<sup>58</sup>. Imunochemické metody (RIA a ELISA metody) jsou přesné a citlivé<sup>24</sup>. V klinické praxi se celková koncentrace MT deteguje nejčastěji imunohistochemicky s použitím monoklonální myši protilátky E9 (cit.<sup>60</sup>). Pro analýzu MT a interakcí je také možné využít nanotechnologického přístupu syntetizovaných zlatých nanočástic (AuNPs)<sup>61</sup>. AuNPs s pseudoperoxidasovou aktivitou byly využity pro koncentrační rozsah MT 10–50  $\text{nmol l}^{-1}$  (cit.<sup>62</sup>), kdy MT vytváří kolem nanočástice proteinovou korunu<sup>63</sup> a mez detekce se pohybuje kolem 1,5  $\text{nmol l}^{-1}$  (cit.<sup>63</sup>).

V naší práci se dlouhodobě snažíme využít elektrochemických přístupů pro potenciální experimentální využití v diagnostice vážných onemocnění<sup>31–33</sup>. Cílem této práce bylo elektrochemické studium obsahu MT ve vzorcích krevního séra a jejich změn u pacientů se zhoubnými nádory jater, slinivky a žlučníku.

## Experimentální část

### Použité chemikálie

MT byl zakoupen od společnosti Sigma-Aldrich (USA) a ostatní chemikálie použité pro analýzu byly zakoupeny od společnosti Merck (Darmstadt, Německo) v čistotě p.a. Pro chemicko-biochemickou analýzu byly využity pracovní roztoky od společnosti Siemens (USA).

### Biologický materiál

Vzorky séra byly získány ze zbytků séra jako směs anonymních vzorků před jejich likvidací (FN Motol)

a jejich použití je v souladu s vnitřními předpisy. Všechna vyšetření jsou v souladu se zásadami Helsinské deklarace. Kontrolní skupina byla vybrána podle dostupných údajů ( $n = 38$ , věk 16 až 18 let). Početní zastoupení biologických vzorků ( $n = 228$ ) jednotlivých kategorií podle mezinárodní klasifikace nemocí je uvedeno na obr. 2. Byly sledovány následující kategorie: C250 (nádor slinivky), C23, C241 (nádory žlučníku), C220, C222 (nádory jater). Početní zastoupení věkových kategorií bylo sestaveno podle doporučení WHO. Nejpočetnější skupinu tvoří pacienti ve věkovém rozmezí 61–75 let, nejméně zastoupena je skupina ve věku 19–30 let.

### Příprava roztoků a vzorků

Sběr vzorků venózní krve probíhal na jednotlivých odděleních FN Motol a bylo získáno přibližně 5 ml krve do zkumavek Vacuette s akcelerátorem hemokoagulace. Následnou centrifugací (Avanti J-15R, Beckman Coulter (USA) 1500 g, 10 min, 4 °C) bylo odděleno krevní sérum pro biochemickou analýzu. Individuální vzorky pro stanovení MT byly smíchány s ultračistou vodou do zkumavky (objem minimálně 500  $\mu\text{l}$ ; v poměru ředění 10krát). Následně byl biologický vzorek denaturován (termomixer, 99 °C po dobu 20 min, zkumavka Eppendorf), poté byl centrifugován (po dobu 30 min při 14 000 g, 4 °C, zkumavka Eppendorf). Pro elektrochemickou analýzu byl použit supernatant.

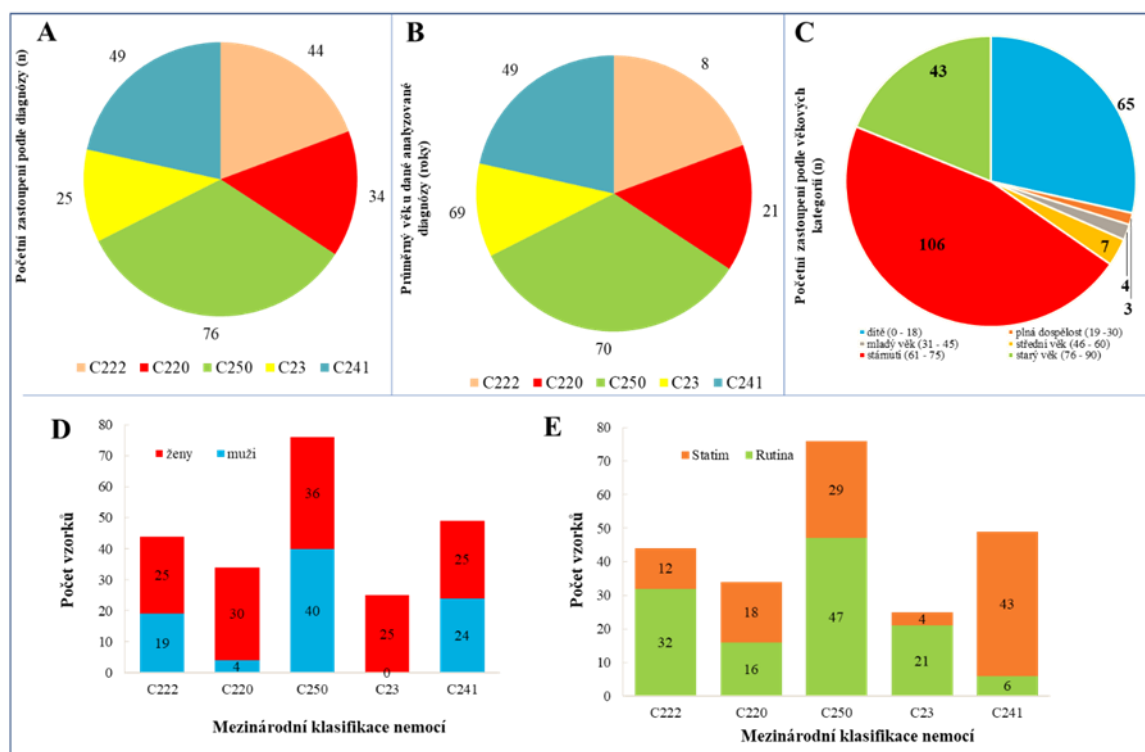
### Přístrojové vybavení

#### Elektrochemická analýza

Elektrochemická analýza byla provedena v tříelektrodovém zapojení pomocí VA-Stand 663 (Metrohm, Herisau, Švýcarsko). Byla použita pracovní elektroda HMDE s plochou 0,4  $\text{mm}^2$ , referenční Ag/AgCl/3M KCl a pomocná elektroda z uhlíku (obr. 3A). Brdičkův základní elektrolyt obsahoval 1  $\text{mmol l}^{-1}$   $\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$  a 1  $\text{mol l}^{-1}$  amonný pufr (pH 9,6). Teplota měřicí nádoby byla udržována na 5 °C. AdTS DPV parametry: počáteční potenciál  $-0,35$  V, konečný potenciál  $-1,95$  V, modulační čas 0,057 s, potenciálový krok 1,05  $\text{mV s}^{-1}$ , modulační amplituda 250 mV. Postup byl proveden podle SOP a podrobně byla námi modifikovaná metodika popsána v pracích<sup>32,57,64</sup>. Pro kalibraci MT byly použity koncentrace 100, 50, 25, 12, 6, 3, 1,5  $\mu\text{g l}^{-1}$ . Pro výpočet koncentrace MT z AUC voltamogramů byla použita následující rovnice:  $y$  ( $\mu\text{C}$ ) =  $12,07x$  ( $\mu\text{g l}^{-1}$ ) + 70,9 (cit.<sup>65</sup>).

#### Chemická analýza

Ultračistá voda byla připravena na zařízení ELGA (Londýn, Spojené království), pH bylo kontrolováno na pH metru (VWR, USA). Pro chemickou analýzu vzorků byl použit analyzátor Atellica Solutions CH 930 (Siemens, USA) a Atellica Solutions IM (Siemens, USA), který využívá mikroobjemovou technologii pro fotometrické analýzy. U vzorků pacientů byly stanoveny koncentrace Ca, Mg, Fe, P, glukosy, ALP, AST, ALT, GGT, LD,



Obr. 2. Početní zastoupení biologických vzorků ( $n = 228$ ) podle mezinárodní klasifikace nemocí C250 (nádor slinivky), C23, C241 (nádory žlučnicku), C220, C222 (nádory jater) (A). Průměrný věk (roky) u pacientů s danou diagnózou (B). Početní zastoupení věkových kategorií (podle WHO) pacientů s nádorovým onemocněním. Nejpočetnější skupinou je věková skupina 61–75 let, nejméně zastoupena je skupina 19–30 let (C). Rozřazení analyzovaných vzorků podle pohlaví (D). Počet analyzovaných vzorků podle diagnózy a žádosti o rychlost vyšetření (E).

amylasy, lipasy, celkového bilirubinu, močové kyseliny, močoviny, kreatininu, cholesterolu, albuminu, celkové bílkoviny, C-reaktivního proteinu. U vybraných skupin pacientů pak byly stanoveny vybrané nádorové markery: S-100, PSA, CEA, CA 19-9, CA 72-4, CA 15-3, CA 125, NSE. Pro detekci iontů Na, K, a Cl bylo využito integrované multisenzorové technologie (IMT) na tištěných elektrodách.

#### Statistické a matematické vyhodnocení

Veškerá analyzovaná data byla převedena do laboratorní databáze QINSLAB a statisticky vyhodnocena. Všechny elektrochemické analýzy byly provedeny minimálně v pěti opakováních. Analytické parametry LOD a LOQ byly vypočítány podle práce Hubaux a Vos<sup>66</sup>.

## Výsledky a diskuse

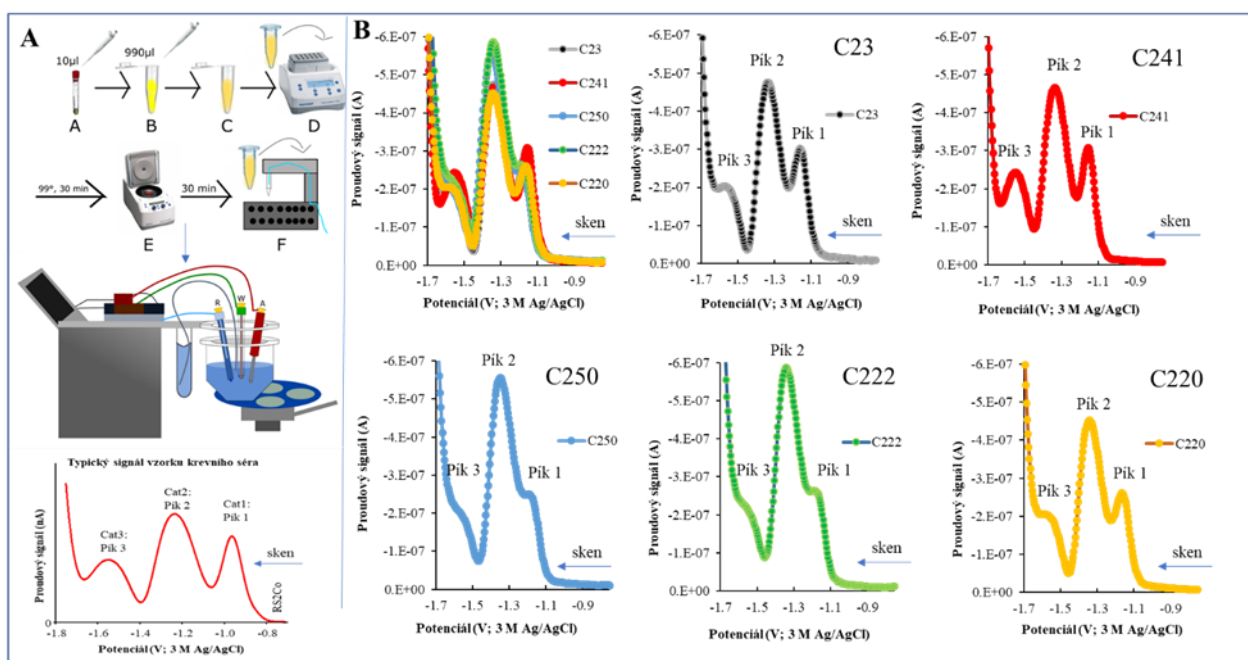
### Základní elektrochemické chování metalothioneinů

Elektroanalýza thiolových sloučenin je dlouhodobě studována a popsána v řadě prací mnoha autorů<sup>47,48,50,51,67–69</sup>.

MT jsou charakteristické vysokým obsahem thiolových skupin, které jsou vhodným cílem pro elektrochemické sledování<sup>24,53</sup>. Pro tyto analýzy bylo využíváno různých analytických přístupů včetně Brdičkovy reakce využívající ionty kobaltu, niklu či platiny<sup>64,70–72</sup>. Dlouhodobým cílem pro rychlou diagnostiku různých zhoubných nádorů je intenzivní hledání nových přístupů a molekul<sup>33,73</sup>.

### Analýza voltametrických křivek

V experimentu byla testována hladina MT ve vzorcích sér pomocí Brdičkovy reakce. Typické voltametrické záznamy jsou ukázány na obr. 3. Jedním z našich cílů bylo vyhodnocení získaných voltametrických křivek (určení ploch pod křivkou, AUC). Pro tento účel byla v laboratorní databázi vytvořena matematická funkce. U získaných voltamogramů byla vyhodnocena AUC ve čtyřech námi navržených zónách (zóna od  $-0,6$  V do  $-1,0$  V, druhá od  $-1,0$  V do  $-1,3$  V, třetí od  $-1,3$  V do  $-1,6$  V a čtvrtá zóna od  $-1,6$  V do  $-1,95$  V). Získané AUC pro jednotlivé zóny ukázaly nejlepší závislost na koncentraci pro zónu 2 a 3. Zaznamenané AUC odezvy jednotlivých zón narůstaly v závislosti na množství aplikovaného vzorku. Stanovené relativní chyby v mezidenním stanovení



Obr. 3. Příprava biologického vzorku pro analýzu (A): Odebraných 10 µl zředíme 990 µl ultračisté vody. Vzorek je denaturován při 99 °C po dobu 30 minut. Následuje centrifugace při teplotě 4 °C, po dobu 30 minut. Vlastní elektrochemické měření (DPV, Brdičkova reakce, počáteční potenciál:  $-0,35$  V, konečný potenciál:  $-1,95$  V, modulační čas 0,057 s, potenciálový krok: 1,05 mV/s, modulační amplituda: 250 mV). Typické voltametrové záznamy vzorků krevního séra kontrolní skupiny (A) a pacientů s diagnózou C23, C241, C250, C222 a C220 (B). Voltamogramy ukazují tři katalytická maxima (pík 1, 2 a 3). Data vyhodnocena jako plochy signálů pod křivkou (AUC). DP voltamogram biologického vzorku s redoxním signálem RS2Co a katalytickými signály Cat1, Cat2 a Cat3. Bylo dávkováno 100 µl vzorku do 5 ml základního elektrolytu.

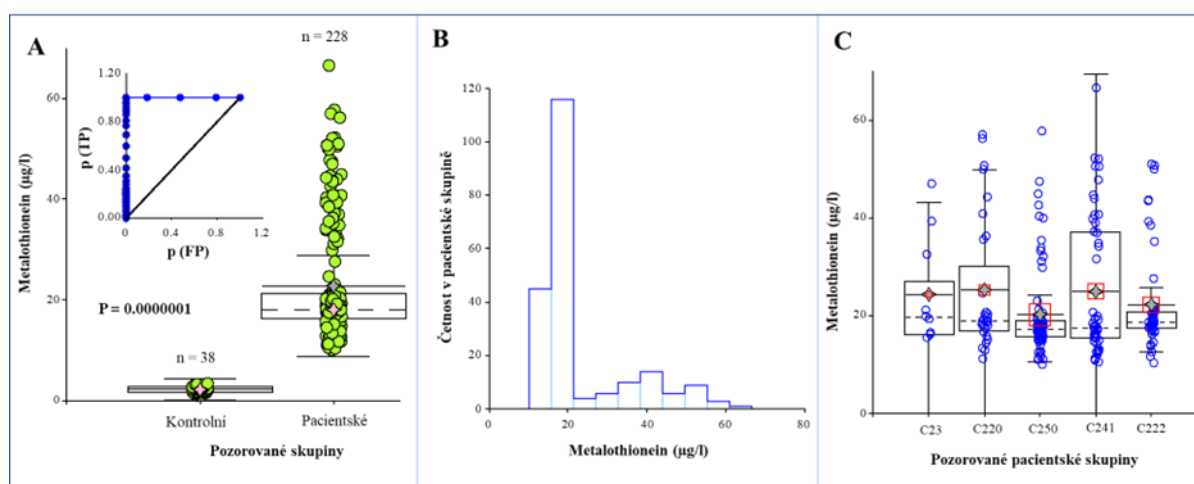
MT se pohybovaly v rozmezí 20–40 % (cit.<sup>65,74,75</sup>). Výše uvedený postup a matematické vyhodnocení jsme se rozhodli aplikovat na elektrochemickou analýzu vzorků sér u pacientů. Získaný vzorek byl připravován podle námi optimalizovaného postupu (obr. 3A). Připravený vzorek byl ihned elektrochemicky analyzován a byl získán typický voltametrový signál s katalytickými signály Cat1 (pík 1); Cat2 (pík 2); Cat3 (pík 3). Na obr. 3B jsou ukázány typické voltametrové signály vzorků sér pacientů s diagnostikovaným nádorovým onemocněním (C23, C241, C250, C222, C220). Povedli jsme také modifikace výchozí metody přípravy vzorku změnou různých faktorů měření. Teplota denaturace je klíčovým bodem pro přípravu vzorku. Ve většině prací je k denaturaci vzorku používána teplota kolem bodu varu<sup>8,57,64</sup>. V získané závislosti AUC signálů můžeme pozorovat efekt teploty denaturace biologického vzorku. Nedenaturovaný vzorek poskytuje elektrochemické signály všech elektroaktivních složek obsažených v biologickém vzorku. U teploty kolem 50 °C jsme pozorovali pokles signálů, pravděpodobně spojený s denaturací většiny bílkovin ve vzorku. U dalších denaturačních teplot došlo k postupnému nárůstu signálu mezi 70 a 80 °C. Lze předpokládat, že pravděpodobně dochází ke změnám struktury proteinů. V procesu tepelné denaturace bílkovin je k dispozici více aminokyselinových zbytků interagujících s povrchem elektrody. U vyšších denaturač-

ních teplot byl pozorován nevýrazný pokles AUC sledovaných signálů. Změna potenciálů jednotlivých signálů nebyla příliš výrazná. Samozřejmě s přidáním vzorku (množství analytu) jsou změny jednotlivých signálů typické a dochází k posunu potenciálu katalytických signálů, především píku 3. Čas vlastní denaturace nemá příliš výrazný vliv na změny voltamogramů.

Spojitosť nadměrné exprese MT s nádorovým onemocněním

V posledních letech je studována nadměrná exprese MT u různých nádorů. Jedná se o expresi dvou isoformů MT (konkrétně MT-1a a MT-2a). Nadměrná exprese těchto MT isoformů je převážně spojena s maligními nádory a je studována jako nový prognostický marker<sup>76,77</sup>. Je známo, že zhoubné nádory (jater, slinivky a žlučníku) mají špatnou prognózu dlouhodobého přežití.

V námi zkoumaném souboru bylo analyzováno 228 vzorků pacientů (C220 11 %, C222 19 %, C241 14 %, C23 5 %, C250 51 % (obr. 4). Asi 30 % analyzovaných vzorků pacientů bylo analyzováno v režimu statim. Ze získaných AUC voltamogramů jsme určili koncentrace MT ve vzorcích. Bylo provedeno porovnání voltamogramů vzorků kontrolní skupiny a pacientů. Průměrná koncentrace MT u kontrolní skupiny ( $n = 38$ ) byla  $2,2 \pm 0,6$



Obr. 4. Pro porovnání normální a abnormální hladiny MT bylo použito sérum kontrolní skupiny ( $n = 38$ ) s průměrem  $2,2 \mu\text{g l}^{-1}$ , medián  $2,1 \mu\text{g l}^{-1}$  a pacientů s nádory ( $n = 228$ ) s průměrem  $22,7 \mu\text{g l}^{-1}$  a mediánem  $18,1 \mu\text{g l}^{-1}$ . Ve vloženém obrázku ROC křivka,  $p$  (FP) – pravděpodobnost falešně pozitivního výsledku,  $p$  (TP) – pravděpodobnost pozitivního výsledku (A). Distribuční diagram četností jednotlivých koncentrací MT u testovaných patientských vzorků (B). Změna hladiny MT v séru pacientů s nádorovým onemocněním (C23,  $n = 25$ , průměrný věk = 70; C220,  $n = 34$ , průměrný věk = 32; C250,  $n = 76$ , průměrný věk = 69; C241,  $n = 49$ , průměrný věk = 69; C222,  $n = 44$ , průměrný věk = 4) určená elektrochemicky (C). Legenda: modré body představují jednotlivá měření pacientů; červený čtvereček je průměrná hodnota, velikost určuje počet analyzovaných případů. Další experimentální podrobnosti jsou uvedeny v části Materiál a Metody.

$\mu\text{g l}^{-1}$  s mediánem  $2,1 \mu\text{g l}^{-1}$ . Průměrná hladina MT u skupiny pacientů s diagnostikovaným zhoubným nádorem ( $n = 228$ ) byla asi 10krát zvýšená ( $22,7 \pm 11,7 \mu\text{g l}^{-1}$  s mediánem  $18,1 \mu\text{g l}^{-1}$ ). Rozdíl mezi kontrolní skupinou a skupinou pacientů byl statisticky vysoce průkazný ( $P = 0,000001$ )<sup>65,74</sup>. ROC křivka ukazuje velmi dobrou citlivost a specifitu stanovení MT na námi analyzovaném souboru pacientů (obr. 4). Na obr. 4B je zobrazen frekvenční diagram hodnocených vzorků. Jak je zřejmé, většina hodnocených vzorků se pohybovala v oblasti koncentrací mezi  $10$  a  $20 \mu\text{g l}^{-1}$ . Na obr. 4C jsou shrnuty získané výsledky hladiny MT u pacientů se zhoubnými nádory v krabicových grafech: C23 ( $n = 25$ ) s průměrem  $24,3 \pm 11,2 \mu\text{g l}^{-1}$  (medián  $11,6 \mu\text{g l}^{-1}$ ); C220 ( $n = 34$ ) s průměrem  $25,3 \pm 13,8 \mu\text{g l}^{-1}$  (medián  $18,3 \mu\text{g l}^{-1}$ ); C250 ( $n = 76$ ) s průměrem  $20,3 \pm 9,3 \mu\text{g l}^{-1}$  (medián  $17,3 \mu\text{g l}^{-1}$ ); C241 ( $n = 49$ ) s průměrem  $24,9 \pm 14,3 \mu\text{g l}^{-1}$  (medián  $17,5 \mu\text{g l}^{-1}$ ); C222 ( $n = 44$ ) s průměrem  $22,3 \pm 10,2 \mu\text{g l}^{-1}$  (medián  $18,8 \mu\text{g l}^{-1}$ ). Jak je na těchto výsledcích zřejmé, byla většina výsledků stanovené hladiny MT u pacientů s nádory C220, C250, C241 a C222 pod  $20 \mu\text{g l}^{-1}$ . Ve skupině pacientů C241, C222, C220 i C250 byly pozorovány velmi vysoké hladiny MT nad  $50 \mu\text{g l}^{-1}$ . Provedená korelační analýza mezi vybranými analyty krevního séra (uvedeny v části Materiál) a MT ukázala silnou korelaci s nádorovým markerem CA19-9 ( $r = -0,979$ ). Byl prokázán vztah mezi vybranými jaterními enzymy: ALT ( $r = 0,594$ ); AST ( $r = 0,513$ ) a ALP ( $r = 0,560$ ) a hladinou MT.

## Závěr

V této práci jsme se snažili poukázat na využití elektroanalytického stanovení metalothioneinů v krevním séru pacientů se zhoubným nádorem. Zvýšená hladina MT v séru u pacientů by mohla být novým markerem progresu u nádorového onemocnění. U pacientů s nádorovým onemocněním byly hladiny MT zvýšeny více než desetkrát v porovnání s kontrolní skupinou. V navazující experimentální práci bude sledována změna hladiny MT u primozáchtů v průběhu onemocnění a probíhající léčby. Velmi vysoké hladiny MT (nad  $50 \mu\text{g l}^{-1}$ ) by měly být dále velmi pečlivě studovány s vazbou na průběh onemocnění. Z výše uvedeného vyplývá, že by se MT mohl stát také vhodným terapeutickým cílem u řady onemocnění.

*Práce byla řešena jako součást projektu Liga proti rakovině Praha a EURO-CHOLANGIO-NET: The European Cholangiocarcinoma Network (CA18122). Naše velké poděkování patří panu RNDr. Josefovi Růžičkovi za vytváření laboratorní databáze a algoritmů pro vyhodnocování experimentálních dat.*

## Zkratky

MT	metalothioneiny
SH	sulfhydrylová skupina
GIF	růstový inhibiční faktor
MTF-1	metal transkripční faktor
MRE	metal responsive element

DPV	diferenční pulzní voltametrie
AdTS CPSA	adsorptivní přenosová technika kombinovaná s chronopotenciometrickou rozpouštěcí analýzou za konstantního proudu
ELISA	enzymová imunoanalýza
R.S.D.	relativní standardní odchylka
AUC	plocha pod křivkou
ALT	alaninaminotransferasa
AST	aspartátaminotransferasa
ALP	alkalická fosfatasa
CA 19-9	nádorový marker ze skupiny glycidových antigenů. Není nádorově ani orgánově specifický
SOP	standardní operační postup

## LITERATURA

- Kagi J. H. R., Schaffer A.: *Biochemistry* 27, 8509 (1988).
- Nordberg M., Nordberg G. F.: *Biomolecules* 12, 360 (2022).
- Margoshes M., Vallee B. L. A.: *J. Am. Chem. Soc.* 79, 4813 (1957).
- Kagi J. H. R., Kojima Y.: *Experientia. Suppl.* 52, 25 (1987).
- Kojima Y.: *Methods Enzymol.* 205, 8 (1991).
- Binz P. A., Kagi J. H. R.: *Metallothionein IV*. Birkhäuser Verlag, Basel 1999.
- Krizkova S., Masarik M., Majzlik P., Kukacka J., Kruseova J., Adam V., Prusa R., Eckschlager T., Stiborova M., Kizek R.: *Acta Biochim. Pol.* 57, 561 (2010).
- Tariba B., Zivkovic T., Krasnici N., Marijic V. F., Erk M., Gamulin M., Grgic M., Pizent A.: *Cancer Chemother. Pharmacol.* 75, 813 (2015).
- Fabrik I., Kukacka J., Baloun J., Sotornik I., Adam V., Prusa R., Vajtr D., Babula P., Kizek R.: *Electroanalysis* 21, 650 (2009).
- Nakayama A., Fukuda H., Ebara M., Hamasaki H., Nakajima K., Sakurai H.: *Biol. Pharm. Bull.* 25, 426 (2002).
- Vilanova A., Gutierrez C., Serrat N., Raga X., Paterlain J. L.: *Clin. Biochem.* 30, 235 (1997).
- Milnerowicz H., Jablonowska M., Bizon A.: *Pancreas* 38, 681 (2009).
- Tamai Y., Iwasa M., Eguchi A., Shigefuku R., Sugimoto K., Hasegawa H., Takei Y.: *PLoS One* 15, e0237370 (2020).
- Krejčova L. a 14 spoluautorů: *Int. J. Electrochem. Sci.* 7, 1767 (2012).
- Tariba B., Zivkovic T., Marijic V. F., Erk M., Gamulin M., Pizent A.: *Archiv. Med. Res.* 47, 232 (2016).
- Si M. F., Lang J. H.: *J. Hem. Oncol.* 11, 107 (2018).
- Akintola D. F., Sampson B., Fleck A.: *J. Lab. Clin. Med.* 126, 119 (1995).
- Yadav V. S., Mir R. A., Bhatia A., Yadav R., Shadang M., Chauhan S. S., Dhingra K., Kharbanda O. P., Yadav R., Garg R.: *J. Periodont.* 92, 1329 (2021).
- Milnerowicz H., Nowak P., Wielogorska D., Wochynski Z., Sobiech K. A.: *Biol. Sport* 21, 81 (2004).
- Nordberg G. F., Garvey J. S., Chang C. C.: *Environment. Res.* 28, 179 (1982).
- Swierczek S., Abuknesha R. A., Chivers I., Baranovska I., Cunningham P., Price R. G.: *Biomarkers* 9, 331 (2004).
- Wolf C., Strenziok R., Kyriakopoulos A.: *Anal. Chim. Acta* 631, 218 (2009).
- Sekovanić A., Piasek M., Orct T., Sulimanec Grgec A., Matek Sarić M., Stasenko S., Jurasović J.: *Biomolecules* 10, 821 (2020).
- Nordberg M., Nordberg G. F.: *Met. Ions Life Sci.* 5, 1 (2009).
- Tohyama C., Shaikh Z. A., Ellis K. J., Cohn S. H.: *Toxicology* 22, 181 (1981).
- Tohyama C., Shaikh Z. A., Nogawa K., Kobayashi E., Honda R.: *Toxicology* 20, 289 (1981).
- Tohyama C., Shaikh Z. A., Nogawa K., Kobayashi E., Honda R.: *Arch. Toxicol.* 50, 159 (1982).
- Acharya P. a 10 spoluautorů: *medRxiv* 2022.05.30.22275767 (2022).
- Li X. Y. a 10 spoluautorů: *Front. Endocrinol.* 13, 951093 (2022).
- Milnerowicz H., Chmarek M., Rabczynski J., Milnerowicz S., Nabzdyk S., Knast W.: *Pancreas* 29, 28 (2004).
- Zelena J., Potesil D., Vacek J., Adam V., Hradecky J., Prusa R., Kizek R., Vojtesek B.: *Klin. Onkol.* 17, 190 (2004).
- Petrlova J. a 10 spoluautorů: *Klin. Onkol.* 19, 138 (2006).
- Fabrik I., Adam V., Krizkova S., Kukacka J., Prusa R., Trnkova L., Kizek R.: *Klin. Onkol.* 20, 384 (2007).
- Bizon A., Jedryczko K., Milnerowicz H.: *Postepy Hig. Med. Dosw.* 71, 98 (2017).
- Priante E., Pietropoli E., Piva E., Santovito G., Schumann S., Irato P.: *Int. J. Mol. Sci.* 23, 12001 (2022).
- Sztalmachová M., Gumulec J., Cernei N., Hlavna M., Zítka O., Babula P., Adam V., Kizek R., Masařík M.: *Chem. Listy* 106, 1075 (2012).
- Kizek R., Vacek J., Adam V., Vojtesek B.: *Klin. Biochem. Metab.* 12, 72 (2004).
- Goncharova E. I., Rossman T. G.: *Cancer Res.* 54, 5310 (1994).
- Kelly S. L., Basu A., Teicher B. A., Hacker M. P., Hamer D. H., Lazo J. S.: *Science* 241, 1813 (1988).
- Weinlich G., Bitterlich W., Mayr V., Fritsch P. O., Zelger B.: *Brith. J. Dermatol.* 149, 535 (2003).
- Bier B., Douglas-Jones A. G., Totsh M., Dockhorn-Dworniczak B., Böcker W., Jasani B., Schmid K. W.: *Breast Cancer Res. Treat.* 30, 213 (1994).
- Zelger B., Sidoroff A., Hopfl R., Ofner D., Jasani B., Schmid K. W.: *Appl. Immunohistochem.* 2, 254 (1993).
- Huang G. W., Yang L. Y.: *World J. Gastroenterol.* 8, 650 (2002).
- Ohsio G., Imamura T., Okada N., Wang Z. H., Yamaki K., Kyogoku T., Suwa H., Yamabe H., Imamura M.: *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 122, 351 (1996).
- Vodičková H., Pacáková V., Šestáková I., Mader P.: *Chem. Listy* 95, 477 (2001).
- Brdicka R.: *Nature* 139, 1020 (1937).

47. Brdicka R.: *Nature* 139, 330 (1937).
48. Heyrovsky J.: *Nature* 142, 317 (1938).
49. Kizek R., Vacek J., Trnkova L., Klejdus B., Havel L.: *Chem. Listy* 98, 166 (2004).
50. Olafson R. W.: *Bioelectrochem. Bioenerg.* 19, 111 (1988).
51. Olafson R. W., Olsson P. E.: *Methods Enzymol.* 205, 205 (1991).
52. Olafson R. W., Sim R. G.: *Anal. Biochem.* 100, 343 (1979).
53. Sestakova I., Navratil T.: *Bioinorg. Chem. Appl.* 3, 43 (2005).
54. Thompson J. A. J., Cosson R. P.: *Marine Environ. Res.* 11, 137 (1984).
55. Dabrio M., Rodríguez A. R., Bordin G., Bebianno M. J., De Ley M., Šestáková I., Vašák M., Nordberg M.: *J. Inorg. Biochem.* 88, 123 (2002).
56. Gunn A. P., McLean C. A., Crouch P. J., Roberts B. R.: *Anal. Biochem.* 630, 114326 (2021).
57. Trnkova L., Kizek R., Vacek J.: *Bioelectrochemistry* 56, 57 (2002).
58. Kizek R., Trnkova L., Palecek E.: *Anal. Chem.* 73, 4801 (2001).
59. Prusa R., Kizek R., Vacek J., Trnkova L., Zehnalek J.: *Clin. Chem.* 50, A28 (2004).
60. Jasani B., Elmes M. E.: *Methods Enzymol.* 205, 95 (1993).
61. Docekalova M. a 11 spoluautorů: *8th International Conference on Nanomaterials - Research and Application (NANOCON)*, str. 429, 2016.
62. Li X. J., Wang Y. S., Yang S. Y., Tang X., Liu L., Zhou B., Wang X. F., Zhu Y. F., Huang Y. Q., He S. Z.: *Microchim. Acta* 183, 2123 (2016).
63. Zhang Y., Hao J. X., Xu X. J., Chen X. W., Wang J. H.: *Anal. Chem.* 92, 2080 (2020).
64. Petrlova J., Potesil D., Mikelova R., Blastik O., Adam V., Trnkova L., Jelen F., Prusa R., Kukacka J., Kizek R.: *Electrochim. Acta* 51, 5112 (2006).
65. Skotak V., Sehnal K., Banas D., Stankova M., Hosnedlova B., Ruttkay-Nedecky B., Kepinska M., Parak T., Kizek R.: *Czech. Chem. Soc. Symp. Ser. (72. sjezd chemických společností)* 18, 131 (2020).
66. Hubaux A., Vos G.: *Anal. Chem.* 42, 849 (1970).
67. Kolthoff I. M., Yamashita K., Hie T. B., Kanbe A.: *J. Electroanal. Chem.* 58, 375 (1975).
68. Kolthoff I. M., Yamashita K., Hie T. B.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72, 2044 (1975).
69. Kolthoff I. M., Stricks W., Tanaka N.: *J. Am. Chem. Soc.* 77, 4739 (1955).
70. Banica F. G., Spataru N., Spataru T.: *Electroanalysis* 9, 1341 (1997).
71. Banica F. G., Fogg A. G., Moreira J. C.: *Analyst* 119, 2343 (1994).
72. El Hourch M., Dudoit A., Amiard J. C.: *Electrochim. Acta* 48, 4083 (2003).
73. Prusa R., Blastik O., Potesil D., Trnkova L., Zehnalek J., Adam V., Petrlova J., Jelen F., Kizek R.: *Clin. Chem.* 51, A (2005).
74. Skotak V., Hosnedlova B., Ruttkay-Nedecky B., Parak T., Kizek R.: *Spring Electrochemical Meeting*, organised by the Czechoslovak Student Chapter of the Electrochemical Society, 20. 5. 2021, str. 1.
75. Skotak V., Hosnedlova B., Kepinska M., Jakubek M., Parak T., Kizek R.: *XL. Moderní elektrochemické metody*, Sborník přednášek, Jeřichovice, 8.-12. listopadu 2021, str. 218.
76. Douglas-Jones A. G., Schmid, K. W. S., Bier B., Horgan K., Lyons K., Dallimore N. D., Moneypenny I. J., Jasani B.: *Hum. Pathol.* 26, 217 (1995).
77. Joseph M. G., Banerjee D., Kocha W., Feld R., Stitt L. W., Cherian M. G.: *Cancer* 92, 836 (2001).

**L. Melich<sup>a</sup>, M. Fořtová<sup>a</sup>, B. Hosnedlová<sup>b</sup>, J. Podhajský<sup>a</sup>, O. Rychlý<sup>a</sup>, J. Werle<sup>a</sup>, K. Burešová<sup>a</sup>, L. Vysloužilová<sup>c</sup>, K. Dunovská<sup>a</sup>, E. Klapková<sup>a</sup>, K. Kotaška<sup>a</sup>, J. Čepová<sup>a</sup>, B. Jedličková<sup>a</sup>, O. Štěpánková<sup>c</sup>, R. Průša<sup>a</sup>, and R. Kizek<sup>a</sup>** (<sup>a</sup> Department of Medical Chemistry and Clinical Biochemistry, Second Faculty of Medicine, Charles University in Prague and Motol University Hospital, Prague, <sup>b</sup> BIOCEV, First Faculty of Medicine, Charles University, Vestec, <sup>c</sup> Department of Biomedical Engineering and Assistive Technology, Czech Institute of Informatics, Robotics and Cybernetics, Czech Technical University, Prague, Czech Republic): **Study of Metallothionein Levels in the Serum of Patients with Malignant Tumour**

Metallothionein (MT) is a low molecular weight intracellular protein, the primary function of which is to maintain the homeostasis of heavy metals in living organisms. Only a few research has been carried on the topic molecular mechanism of MT. Recent research points to its significant relationship to carcinogenesis, spontaneous mutagenesis, and the effectiveness of antitumor drugs. Increased level of MT is studied as a potential indicator of increased metabolic activity in cancer. Electrochemical methods are a suitable analytical tool for MT detection. Temperature-denatured blood serum samples of patients diagnosed with cancer were studied using electrochemical analysis (Brdicka's reaction). The obtained voltammograms were evaluated as the area under the curve (AUC response). To compare normal and abnormal MT levels, control serum of healthy probands ( $n = 38$ ) with an average MT amount of  $2.2 \mu\text{g L}^{-1}$ , median  $2.1 \mu\text{g L}^{-1}$  was used. In all evaluated blood serum samples of cancer patients ( $n = 228$ ), the average amount of MT was  $22.7 \mu\text{g L}^{-1}$ , and the median was  $18.1 \mu\text{g L}^{-1}$ . The difference (10-fold) between groups was highly statistically significant. The data obtained from the pilot experiment suggest that the levels of thiol compounds such as MT may have clinical potential in cancer patients.

**Keywords:** metallomics, cancer of the liver, pancreas, gall bladder, diagnosis, prognostic marker, electrochemical analysis, Brdicka's reaction