

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

VYUŽITÍ BRDIČKOVY REAKCE PRO STANOVENÍ METALOTHIONEINU U PACIENTŮ SE ZHOUBNÝMI NÁDORY

VOJTĚCH ADAM^a, ONDŘEJ BLAŠTÍK^a, SOŇA KRÍŽKOVÁ^a, PŘEMYSL LUBAL^b, JIŘÍ KUKAČKA^c, RICHARD PRŮŠA^c a RENÉ KIZEK^a

^a Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, ^b Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno, ^c Ústav klinické biochemie a pathobiochemie, 2. lékařská fakulta, Univerzita Karlova v Praze, V Úvalu 84, 150 06 Praha 5

Došlo 17.7.06, přepracováno 5.2.07, přijato 29.3.07.

Klíčová slova: elektrochemické techniky, leukémie, zhoubný nádor prsu, zhoubný nádor plic, Brdičková reakce, katalytický signál, rakovina, nádorová diagnostika, krevní sérum

Věnováno ke stému výročí narození Rudolfa Brdičky a jeho objevům na poli využití elektrochemie v nádorové diagnostice

Úvod

Podle statistických údajů Světové zdravotnické organizace (WHO) je každým rokem ve vyspělých zemích rozpoznáno kolem 11 milionů nových případů onemocnění zhoubným nádorem a více než šest milionů lidí na tuto nemoc každoročně umírá. V České republice podle Národního onkologického registru žije s maligním nádorem více než 300 tisíc lidí. Dále je z těchto údajů zřejmé, že ve světě připadá asi 360 případů maligních nádorů na 100 000 obyvatel, ale v České republice je to 560 případů. Z těchto důvodů vyhlásilo Ministerstvo zdravotnictví ČR a Česká onkologická společnost program zaměřený na snížení výskytu zhoubných onemocnění v české populaci, který se má, kromě jiného, zaměřit na zlepšení včasné diagnostiky včetně hledání nových markerů.

V několika málo studiích byla ukázána souvislost mezi hladinou metalothioneinu (MT) a progresí zhoubného nádoru^{1–9}. Metalothioneiny jsou charakteristické jak obsahem iontů kovů, tak obsahem síry ve formě thio-

vých (SH) skupin^{10,11}. Savčí formy MT jsou charakteristické molekulovou hmotností v rozmezí 6 až 7 kDa. Většinou se skládají z 60 až 68 aminokyselinových zbytků a ve své centrální části obvykle obsahují dvacet molekul cysteinu, přičemž nejčastěji se opakujícím motivem je cystein (C)-serin (S)-cystein (C)^{10,12,13}. Aromatické aminokyseliny v primární struktuře těchto látek obvykle chybí. Všechny přítomné cysteiny jsou v redukované podobě a koordinované s ionty kovu, přičemž vytvářejí metalothiolátové klastry. Celkově je jedna molekula savčího metalothioneinu schopna vázat jedenáct jednovazných nebo sedm dvou vazných iontů kovu^{14,15}. Všechny MT mají krátký lineární úsek, na který jsou vázány dvě proteinové domény. Domény obsahují klastry s vysokou afinitou k iontům kovů¹². Kovy (Me) jsou vázány do společných tetrahedrálních Me^(II)-Cys jednotek. MT se vyskytují v celé živočišné říši a jsou také známy u vyšších rostlin, eukaryotických mikroorganismů a řady prokaryot¹⁴. U živočichů je jejich výskyt pozorován především v tkáních, jako jsou játra, ledviny, slinivka a střevo¹³. Jsou pozorovány značné rozdíly v koncentraci MT v závislosti na různém druhu, tkáni (odráží se vliv věku, stádium vývoje), potravních zvyklostech a dalších dosud ne zcela známých a identifikovaných faktorech.

Souvislost mezi metalothioneinem a zhoubnými nádory je na samém počátku zkoumání. Nejnovější výzkumy ovšem naznačují, že existuje vztah mezi množstvím metalothioneinu a rychlostí rozvoje zhoubného nádoru^{16,17}. Pro ověření těchto předpokladů je potřebné studovat změny hladiny MT u pacientů se zhoubnými nádory. Analytických metod pro citlivou analýzu MT není v současné době mnoho. Většina z nich vyžaduje velmi složitou přípravu vzorku, náročnou a drahou instrumentaci^{6,18}. Mezi analytické metody vyžadující minimální přípravu vzorku a velmi nízké provozní a pořizovací náklady patří elektrochemické techniky. Cílem této práce bylo využití elektroanalytické techniky (Brdičkovy reakce) pro monitorování sérové hladiny metalothioneinu u pacientů se zhoubnými nádory.

Experimentální část

Chemikálie

MT z králíčích jater (molekulová hmotnost 7143), obsahující 5,9 % Cd a 0,5 % rel. Zn, byl zakoupen u firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, USA); tris(2-karboxyethyl) fosfan (TCEP) u firmy Molecular Probes (Evgen, USA). Ostatní použité chemikálie byly získány v čistotě ACS od společnosti Sigma. Zásobní roztok standardu MT 10 µg ml⁻¹ byl připraven za využití vody ACS (Sigma) a uložen ve tmě při -20 °C. Pracovní roztoky byly denně připravovány ředěním zásobního roztoku.

Klinický materiál

V průběhu roku 2005 byla získána séra od pacientů léčených pro zhoubné nádory ve fakultní nemocnici Motol. Krevní séra byla ihned zmrazena na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do doby jejich dalšího zpracování. Celkem bylo analyzováno 80 sér pacientů (44 mužů, 36 žen): zhoubný nádor tlustého střeva (9, průměrný věk 55 let), melanom (4, 59,5 roku), zhoubný nádor prsu (14, 51,5 roku), zhoubný nádor plic (12, 62 let), zhoubný nádor štítné žlázy (12, 57 let), zhoubný nádor ledviny (7, 31 let), lymfoidní leukémie (18, 19 let) a jícnu (4, 55,5 roku).

Příprava vzorků pro elektroanalytické stanovení

Ze získaných vzorků krevních sér bylo odebráno 100 μl a umístěno na 15 min při $99\text{ }^{\circ}\text{C}$ do termobloku (Eppendorf 5430, USA). Poté byly vzorky ochlazeny na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a centrifugovány při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 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 adsorpční přenosové techniky (AdTS) s diferenční pulzní voltametrií (DPV). Množství analyzovaného vzorku bylo 5 μl .

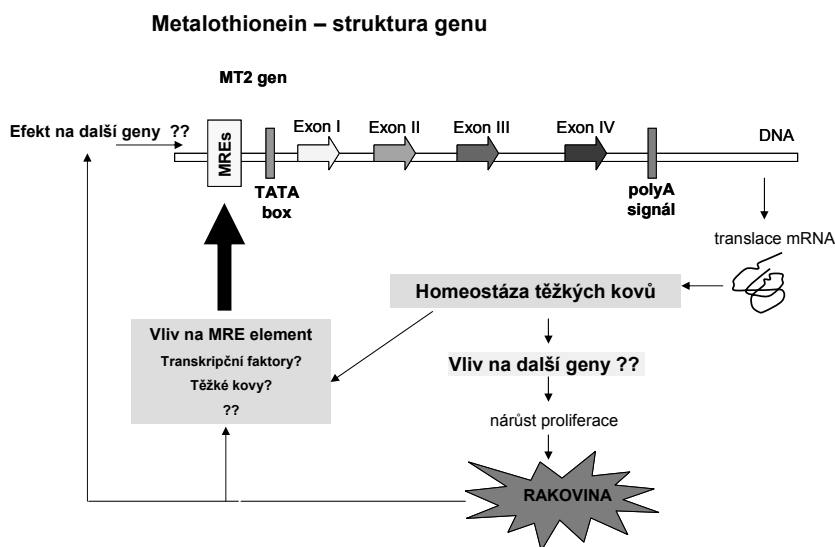
Elektroanalytické stanovení metalothioneinu metodou AdTS DPV s použitím Brdičkovy reakce

Vzorky byly analyzovány na přístroji Autolab Analyser (EcoChemie, Nizozemí) ve spojení s VA-Stand 663

(Metrohm, Švýcarsko) v klasickém tříelektrodeovém uspořádání. Pracovní elektrodou byla visící rtuťová kapková elektroda (HMDE) s plochou kapky 0,4 mm^2 ; referenční elektrodou byla Ag/AgCl/3 M KCl a pomocnou grafitová elektroda. Základní elektrolyt (1 mmol dm^{-3} $\text{Co}[(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ a amonný pufr, $\text{NH}_3\text{-NH}_4\text{Cl}$, pH 9,6) byl po každých pěti analýzách vyměněn. Parametry AdTS DPV: počáteční potenciál $-0,6\text{ V}$, konečný potenciál $-1,6\text{ V}$, modulační čas 0,057 s, časový interval 0,2 s, potenciálový krok 1,05 mV s^{-1} , modulační amplituda 250 mV, $E_{\text{ads}} = 0\text{ V}$, teplota $5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Výsledky a diskuse

Přesně před sto lety (25. února 1906) se narodil jeden z významných žáků Jaroslava Heyrovského Rudolf Brdička¹⁹, který objevil polarografický signál vznikající v přítomnosti proteinů obsahujících síru^{20,21}. Tento jev byl pojmenován Brdičkova reakce. Rudolf Brdička se pokusil metodu využít pro diagnostiku rakoviny a výsledky své práce publikoval v roce 1937 v časopise Nature^{22,23}. Zjistil, že signál krevního séra zdravého člověka a pacienta s nádorovým onemocněním je výrazně odlišný a mohl být proto využit pro rozlišení zdravého a nemocného člověka^{22–25}. Nebylo však zcela zřejmé, které proteiny byly podle vypracované metodiky stanovovány. Později se zjistilo, že jde o skupinu mukoproteinů (MP-1, MP-2 a MP-3)^{26,27}, ale proteinům o nižší molekulové hmotnosti nebyla věnována žádná pozornost. Jak se 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 (obr. 1).



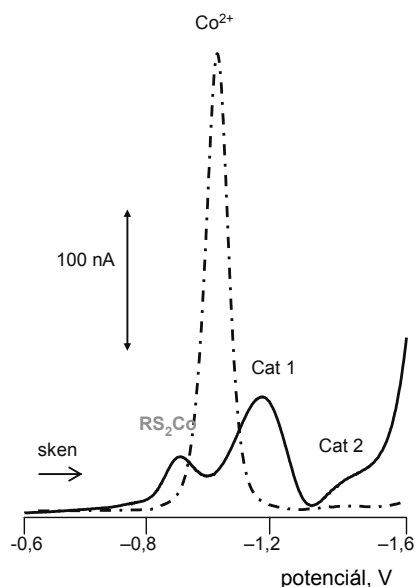
Obr. 1. Schéma uspořádání metalothioneinového genu u člověka na chromosomu 16; MREs – regulační úsek DNA, na který se váže transkripční faktor (MTF-1). TATA box je místo, kam se váže RNA-polymerasa a od něj začíná transkripce genu. Exony jsou úseky DNA, které nesou informaci pro složení výsledného proteinu. PolyA signál ukončuje transkripci genu. V další části jsou navrženy možné mechanismy vztahu MT k dalším genům a zhoubnému onemocnění

Elektrochemické stanovení metalothioneinu Brdičkovou reakcí

Elektrochemická analýza MT představuje jeden z vhodných analytických nástrojů pro detekci v biologických vzorcích^{28–42}. V současnosti prakticky neexistuje žádná vhodná analytická metoda pro rutinní stanovení MT^{37,43}. Téměř všechny klinické studie jsou založeny na imunohistochemickém stanovení za použití různých protilátek proti MT^{2,3,44,45}, případně detekce hladiny mRNA za využití technik molekulární biologie^{46–49}. Nedávno bylo ukázáno, že pro citlivé stanovení MT Brdičkovou reakcí je výhodné provádět měření za snížené teploty v rozmezí 5–10 °C (cit.²⁸). My jsme v našich experimentech metodou AdTS a DPV tento výsledek potvrdili. Na získaných voltamogramech jsou pozorovatelné signály vzniklého komplexu MT s ionty kobaltu (RS_2Co) a typické katalytické signály Cat1 a Cat2 (obr. 2)⁵⁰. Katalytický signál Cat2 se s klesající koncentrací MT lineárně snižoval ($y_{Cat2} = 0,6616x + 10,211$; $R^2 = 0,9955$).

Analýza MT v krevním séru zdravých lidí

Náš kontrolní soubor tvořili dárce krve (věkový interval 22–35 let; $n=10$). Ze studií, které hodnotily obsah MT u pacientů se zhoubnými nádory, je možno očekávat, že změna hladiny MT by neměla být závislá na věku a pohlaví^{6,18,45,51}. V těchto analyzovaných vzorcích lid-



Obr. 2. AdTS DP voltamogramy; čárkovaná čára je základní elektrolyt, plná čára je záznam 1 μM MT. Počáteční potenciál – 0,35 V, konečný potenciál –1,8 V, modulační čas 0,057 s, časový interval 0,2 s, potenciálový krok 1,05 $mV s^{-1}$, modulační amplituda 250 mV, $E_{ads} = 0$ V, čas akumulace MT byl 120 s, základní elektrolyt 1 mM $Co(NH_3)_6Cl_3$ v amonném pufru (pH 9,6)

ského séra byla zjištěna průměrná koncentrace MT $0,72 \pm 0,09 \mu mol dm^{-3}$.

Analýza MT v krevním séru pacientů se zhoubnými nádory

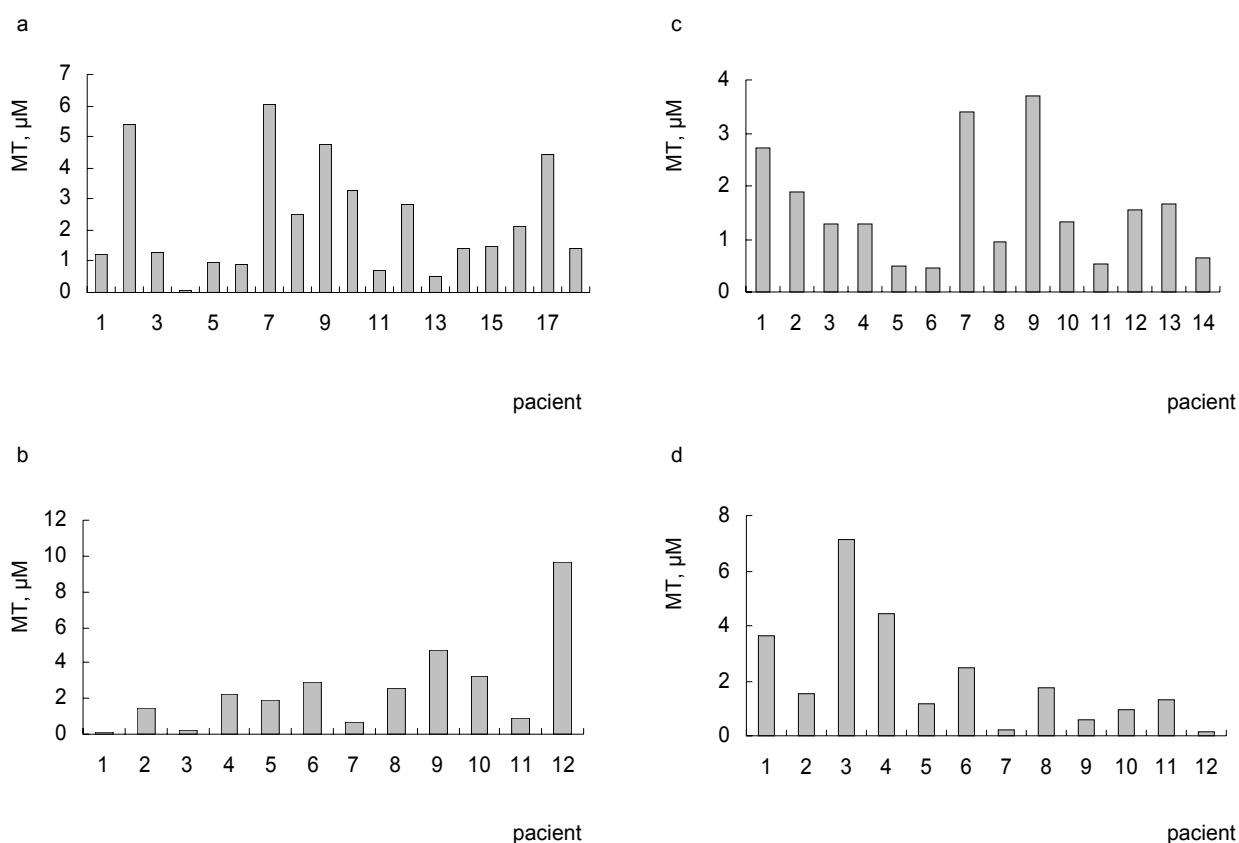
V další části práce nás zajímalo, zda se bude měnit hladina MT u pacientů s různými typy zhoubných nádorů. Sledovali jsme hladiny MT u pacientů s osmi druhy diagnóz zhoubných nádorů hospitalizovaných ve Fakultní nemocnici Motol v průběhu roku 2005. V této práci jsme navázali na práci Brdičky^{22,23} a na naše pilotní studie^{52,53}.

Hladiny metalothioneinu u lymfoidní leukémie

V dřívějších studiích byla sledována hladina MT u dětí s akutní lymfoblastickou leukémií (ALL), kde se imunohistochemickými technikami podařilo rozlišit skupinu exprimující a neexprimující MT. Ze získaných experimentálních dat bylo možné odvodit, že pacienti s detegovanou hladinou MT mají lepší prognózu, a to jak v primárním záchytu, tak při znovuzvplanutí onemocnění¹. Byly získány vzorky krevního séra od jednoho pacienta s akutní myeloidní leukémií (zhoubné bujení postihuje složky imunitního systému; obsah MT byl $1,5 \mu mol dm^{-3}$) a devět pacientů s akutní lymfoblastickou leukémií (postíženy bílé krvinky; obsah MT $3,2 \mu mol dm^{-3}$). Navíc byly vyhodnoceny vzorky od tří pacientů, kteří zemřeli v průběhu hospitalizace (obsah MT $1,0 \mu mol dm^{-3}$) a dále pak pět vzorků od pacientů nezařazených ani do jedné skupiny. V našem souboru pacientů trpících lymfoidní leukémií byl průměrný obsah MT $2,29 \mu mol dm^{-3}$, u třinácti byl obsah MT vyšší než $1 \mu mol dm^{-3}$ (72 %), u osmi pacientů přesáhla hladina MT $2 \mu mol dm^{-3}$ (44 %) a u čtyř pacientů dokonce překročil obsah MT $4 \mu mol dm^{-3}$ (22 %). U lymfoidní leukémie bylo pět pacientů v první remisi (= přechodné vymizení nemoci), tři v druhé a jeden v třetí. Jak je z našich dat zřejmé, pacienti v první remisi měli hladinu MT nejvyšší ve srovnání s druhou a třetí remisí. Dále bylo možné usoudit, že u pacientů s nízkou hladinou MT je prognóza onemocnění velmi špatná a v průběhu studie tyto pacienti zemřeli (obr. 3).

Hladiny metalothioneinu u zhoubného nádoru prsu

Zhoubné nádory mléčné žlázy jsou nejčastějším nádorovým onemocněním ženské části populace ve vyspělých zemích. Ze studií, které byly provedeny, vyplývá možná korelace mezi nízkou hladinou MT a dobrou prognózou onemocnění^{18,51,54–56}. Dále bylo prokázáno, že ve zhoubném nádoru prsu je hladina MT v porovnání s okolní zdravou tkání vždy vyšší^{57,58}. V naší práci jsme zjistili, že u pacientů s nádory prsu byl průměrný obsah MT nízký $1,56 \mu mol dm^{-3}$ (nárůst hladiny MT pouze o 216 % v porovnání se zdravými dobrovolníky). Dále u devíti pa-



Obr. 3. Koncentrace MT u pacientů s (a) lymfoidní leukémií ($n=18$); (b) zhoubným nádorem prsu ($n=14$); (c) zhoubným nádorem plic ($n=12$); (d) zhoubným nádorem štítné žlázy ($n=12$); hladina MT byla určena v 1000x ředěném vzorku pomocí AdTS DPV

pacientů překročila hladina MT $1 \mu\text{mol dm}^{-3}$ (64 %) a pouze u tří byla hladina MT vyšší než $2 \mu\text{mol dm}^{-3}$ (21 %, obr. 3). U zhoubných nádorů prsu hraje velmi významnou roli hormonální regulace (přítomnost steroidních receptorů). Je velmi pravděpodobné, že právě tento fakt ovlivňuje hladinu MT u těchto zhoubných nádorů.

Hladiny metalothioneinu u zhoubného nádoru plic

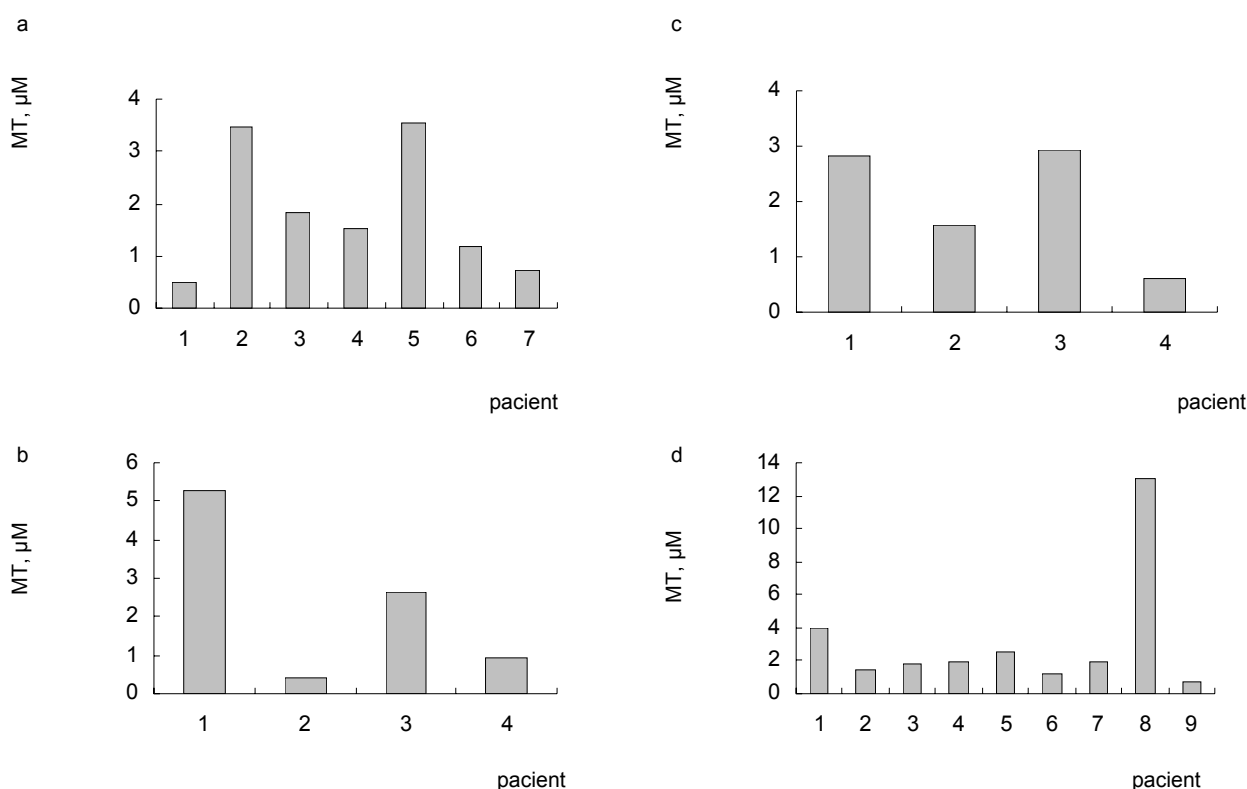
V České republice zaujímá zhoubný nádor plic první místo mezi zhoubnými nádory u mužů a je na prvním místě v příčinách úmrtí na zhoubné nádory. O vztahu těchto zhoubných nádorů k hladině MT není prakticky nic známo⁵⁹. U pacientů se zhoubným nádorem plic byl průměrný obsah MT $2,54 \mu\text{mol dm}^{-3}$, u osmi z nich byl obsah MT vyšší než $1 \mu\text{mol dm}^{-3}$ (66 %), u šesti přesáhla hladina MT $2 \mu\text{mol dm}^{-3}$ (50 %) a u dvou pacientů byl obsah MT vyšší než $4 \mu\text{mol dm}^{-3}$ (16 %). Pozorovaná značná variabilita může souviset právě s histologickou různorodostí tohoto zhoubného nádoru (obr. 3).

Hladiny metalothioneinu u zhoubného nádoru štítné žlázy

Maligní onemocnění štítné žlázy tvoří heterogenní skupinu nádorů, která se vyskytují v každém věku, ale nejzávažnější průběh mají u starších pacientů. Byly provedeny analýzy obsahu MT v nádorech štítné žlázy, které ukázaly na velmi nízkou hladinu MT v těchto tkáních^{2,3}. Naší analýzou bylo možné v krevním séru pacientů detekovat průměrný obsah MT $2,11 \mu\text{mol dm}^{-3}$, přičemž u osmi přesáhla hladina MT $1 \mu\text{mol dm}^{-3}$ (66 %), u čtyř byla vyšší než $2 \mu\text{mol dm}^{-3}$ (33 %) a u dvou překročila $4 \mu\text{mol dm}^{-3}$ (16 %). Také u tohoto zhoubného nádoru jsme pozorovali velmi značnou variabilitu v hladině MT, která je pravděpodobně způsobena heterogenitou primárního ložiska zhoubného nádoru (obr. 3).

Hladiny metalothioneinu u zhoubného nádoru ledviny

Tento nádor představuje vzácnější onemocnění, které tvoří asi 3 % ze všech malignit. Postihuje častěji muže než



Obr. 4. Koncentrace MT u pacientů s (a) zhoubným nádorem ledvin ($n=7$); (b) maligním melanomem kůže ($n=4$); (c) zhoubným nádorem jícnu ($n=4$); (d) zhoubným nádorem tlustého střeva ($n=9$); hladina MT byla určena v 1000x ředěném vzorku pomocí AdTS DPV

ženy v poměru 2 : 1 a vyskytuje se převážně u osob nad 60 let věku nebo u dětí. Studium obsahu MT v ledvinách je věnována větší pozornost (MT byl objeven v ledvinách) především pro výzkum vylučování těžkých kovů z organismu^{60–64}. V naší skupině byla průměrná hladina sérového MT pacientů se zhoubným nádorem ledvin $1,82 \mu\text{mol dm}^{-3}$, u pěti pacientů přesáhl obsah MT $1 \mu\text{mol dm}^{-3}$ (71 %) a u dvou byl vyšší než $2 \mu\text{mol dm}^{-3}$ (28 %, obr. 4).

Hladiny metalothioneinu u maligního melanomu kůže

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. Byly provedeny dvě poměrně rozsáhlé studie hodnotící hladinu MT a progresi tohoto onemocnění^{4–6}. Byl prokázán vztah mezi zvýšenou hladinou MT a výrazně horší prognózou (zkrácení doby dožití)^{7,8}. Naše skupina pacientů s melanomem nebyla příliš rozsáhlá, ale hladina MT byla u všech zvýšená. Prů-

měrná hladina MT byla $1,97 \mu\text{mol dm}^{-3}$, u tří pacientů byl obsah MT vyšší než $1 \mu\text{mol dm}^{-3}$ (75 %) a u dvou přesáhl $2 \mu\text{mol dm}^{-3}$ (50 %, obr. 4).

Hladiny metalothioneinu u zhoubného nádoru jícnu

Zhoubný nádor jícnu představuje 4 % nádorů trávicího traktu. Jako možné příčiny onemocnění se udává častá konzumace horkých nápojů a kancerogenů v potravě. O vztahu MT u nádorů jícnu také není prakticky nic známo. Jsou zveřejněny prvotní náznaky, že by mohla být souvislost mezi MT a apoptózou případně rezistencí na protinádorovou léčbu^{65–67}. V naší zkoumané skupině pacientů s touto diagnózou byla průměrná hladina MT $2,32 \mu\text{mol dm}^{-3}$, přičemž u dvou pacientů překročila $1 \mu\text{mol dm}^{-3}$ (50 %), u dvou pacientů byla vyšší než $2 \mu\text{mol dm}^{-3}$ (50 %) a u jednoho pacienta přesáhla hladina $4 \mu\text{mol dm}^{-3}$ (25 %). Bohužel náš zkoumaný soubor byl také velmi malý, ale i zde je pozorovatelná výrazná variabilita, která má pravděpodobně souvislost s různou buněčnou formou vzniklého zhoubného nádoru (obr. 4).

Tabulka I

Koncentrace metalothioneinu ($\mu\text{mol dm}^{-3}$) v krevním séru pacientů s různou diagnózou zhoubného nádoru

Diagnóza	n_C	\bar{x} (MT)	$n>1$ [n , (%)]	$n>2$ [n , (%)]	$n>4$ [n , (%)]	Koncentrace	
						max.	min.
Maligní melanom kůže	4	1,97	3 (75)	2 (50)	0 (0)	2,9	0,6
Zhoubný nádor prsu	14	1,57	9 (64)	3 (21)	0 (0)	3,7	0,5
Zhoubný nádor tlustého střeva	9	3,20	8 (88)	3 (33)	2 (22)	13,1	0,7
Zhoubný nádor plic	12	2,54	8 (66)	6 (50)	2 (16)	9,7	0,2
Zhoubný nádor štítné žlázy	12	2,11	8 (66)	4 (33)	2 (16)	7,2	0,2
Zhoubný nádor ledvin	7	1,82	5 (71)	2 (28)	0 (0)	3,5	0,5
Zhoubný nádor jícnu	4	2,32	2 (50)	2 (50)	0 (0)	5,2	0,4
Lymfoidní leukémie	18	2,29	13 (72)	8 (44)	4 (22)	6,0	0,1

n_C – počet pacientů s určitou diagnózou, \bar{x} (MT) – průměrné zjištěné koncentrace, $n>1$ – počet případů s koncentrací vyšší než $1 \mu\text{mol dm}^{-3}$, $n>2$ – počet případů s koncentrací vyšší než $2 \mu\text{mol dm}^{-3}$, $n>4$ – počet případů s koncentrací vyšší než $4 \mu\text{mol dm}^{-3}$ (v závorkách jsou uvedena procenta z n_C)

Hladiny metalothioneinu u zhoubného nádoru tlustého střeva

Až v 99 % jsou zhoubné nádory tlustého střeva tvořeny karcinomem, kterého v poslední době neustále přibývá. V České republice patří zhoubný nádor tlustého střeva k nejzávažnějším malignitám; v incidenci jej předčí jen karcinom prsu u žen a karcinom plic u mužů. Onemocnění je velmi intenzivně sledované a pro jeho včasnou detekci byla navržena celá řada vyšetřovacích postupů včetně markerů^{68–70}. Avšak o vztahu MT a nádoru tlustého střeva není také mnoho známo⁹. U pacientů se zhoubným nádorem tlustého střeva byla průměrná hladina MT $3,2 \mu\text{mol dm}^{-3}$. Obsah MT vyšší než $1 \mu\text{mol dm}^{-3}$ byl pozorován u osmi pacientů (88 %), u tří byl vyšší než $2 \mu\text{mol dm}^{-3}$ (33 %) a u dvou (22 %) se pohyboval nad hodnotou $4 \mu\text{mol dm}^{-3}$ (obr. 4).

Závěr

Zjistili jsme, že průměrné hladiny metalothioneinu v krevním séru pacientů s různými druhy zhoubných nádorů kolísají od $1,5$ do $3,5 \mu\text{mol dm}^{-3}$. Navíc je zřejmé, že hladina MT je u všech studovaných nádorových onemocnění zvýšena proti námi zjištěné průměrné hladině v krevním séru zdravých lidí. Nejnížší hladiny MT byly pozorovány u zhoubných nádorů prsu a ledviny, výrazně vyšší hodnoty byly pozorovány u ZN plic a lymfoidní leukémie (výsledky shrnuje tabulce I). Získaná data jsou unikátní a přináší první údaje o obsahu MT v krevním séru lidí. Studium množství MT v biologických vzorcích, jak ukážeme v této práci, je potřebné a slibné.

Část těchto výsledků byla prezentována na soutěži O cenu firmy Merck 2006 za nejlepší studentskou vědec-

kou práci v oboru analytické chemie. Práce na tomto příspěvku byla financována grantem: LPR 2006 a Běh Terryho foxe 2007.

LITERATURA

1. Sauerbrey A., Zintl F., Volm M.: *Ann. Hematol.* 69, 111 (1994).
2. Suzuki K., Kawashima K., Nakajima K., Otaki N., Kimura M., Oyama T., Takatama M.: *Acta Histochem. Cytochem.* 29, 39 (1996).
3. Nartey N., Cherian M. G., Banerjee D.: *Am. J. Pathol.* 129, 177 (1987).
4. Weinlich G., Eisendle K., Hassler E., Baltaci M., Fritsch P. O., Zelger B.: *Br. J. Cancer* 94, 835 (2006).
5. Weinlich G., Bitterlich W., Mayr V., Fritsch P. O., Zelger B.: *Br. J. Dermatol.* 149, 535 (2003).
6. Sugita K., Yamamoto O., Asahi M.: *Am. J. Dermatopathol.* 23, 29 (2001).
7. Breazeale R. I., Fishburn J., Buchanan T., Stone J.: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37, 2877 (1996).
8. Zelger B., Hittmair A., Schir M., Ofner C., Ofner D., Fritsch P. O., Bocker W., Jasani B., Schmid K. W.: *Histopathology* 23, 257 (1993).
9. Hishikawa Y., Kohno H., Ueda S., Kimoto T., Dhar D. K., Kubota H., Tachibana M., Koji T., Nagasue N.: *Oncology* 61, 162 (2001).
10. Kagi J. H. R., Schaffer A.: *Biochemistry* 27, 8509 (1988).
11. Margoshes M., Vallee B. L. A.: *J. Am. Chem. Soc.* 79, 4813 (1957).
12. Palmiter R. D.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 1219 (1994).
13. Kagi J. H. R.: *Methods Enzymol.* 205, 613 (1993).
14. Cobbett C. S., Goldsbrough P. B.: *Annu. Rev. Plant Biol.* 53, 159 (2002).
15. Studnickova M., Turanek J., Zabrsova H., Krejci M.,

- Kysel M.: *J. Electroanal. Chem.* 421, 25 (1997).
16. Sutherland G. R., Baker E., Callen D. F., Garson O. M., West A. K.: *Genomics* 6, 144 (1990).
 17. Goasguen J. E., Lamy T., Bergeron C., Sunnam B. L., Mordelet E., Gorre G., Dossot J. M., LeGall E., Grosbois B., LePrise P. Y., Fauchet R.: *Blood* 88, 3319 (1996).
 18. Oyama T., Takei H., Hikino T., Iino Y., Nakajima T.: *Oncology* 53, 112 (1996).
 19. Kalous V.: *Chem. Listy* 100, 78 (2006).
 20. Brdicka R.: *Coll. Czech. Chem. Commun.* 5, 148 (1933).
 21. Brdicka R.: *Coll. Czech. Chem. Commun.* 5, 112 (1933).
 22. Brdicka R.: *Nature* 139, 1020 (1937).
 23. Brdicka R.: *Nature* 139, 330 (1937).
 24. Brdicka R.: *Klinische Wochenschrift* 18, 305 (1938).
 25. Heyrovsky J.: *Nature* 142, 317 (1938).
 26. Kalous V.: *Chem. Listy* 100, 57 (2006).
 27. Kalous V.: *Chem. Listy* 94, 1087 (2000).
 28. Raspor B., Paic M., Erk M.: *Talanta* 55, 109 (2001).
 29. Kizek R., Vacek J., Trnková L., Klejduš B., Havel L.: *Chem. Listy* 98, 166 (2004).
 30. Kizek R., Trnkova L., Palecek E.: *Anal. Chem.* 73, 4801 (2001).
 31. Olafson R. W., Olsson P. E.: *Methods Enzymol.* 205, 205 (1991).
 32. Olafson R. W., Sim R. G.: *Anal. Biochem.* 100, 343 (1979).
 33. Sestakova I., Kopanica M., Havran L., Palecek E.: *Electroanalysis* 12, 100 (2000).
 34. Sestakova I., Vodickova H., Mader P.: *Electroanalysis* 10, 764 (1998).
 35. Sestakova I., Mader P.: *Cell. Mol. Biol.* 46, 257 (2000).
 36. Sestakova I., Navratil T.: *Bioinorg. Chem. Appl.* 3, 43 (2005).
 37. 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).
 38. El Hourch M., Dudoit A., Amiard J. C.: *Electrochim. Acta* 48, 4083 (2003).
 39. Trnkova L., Kizek R., Vacek J.: *Bioelectrochemistry* 56, 57 (2002).
 40. Strouhal M., Kizek R., Vacek J., Trnkova L., Nemeč M.: *Bioelectrochemistry* 60, 29 (2003).
 41. Prusa R., Kizek R., Vacek J., Trnkova L., Zehnalek J.: *Clin. Chem.* 50, A28 (2004).
 42. Prusa R., Blastik O., Potesil D., Trnkova L., Zehnalek J., Adam V., Petrlova J., Jelen F., Kizek R.: *Clin. Chem.* 51, A56 (2005).
 43. Szpunar J.: *Analyst* 130, 442 (2005).
 44. Marikar F., Sun Q. M., Hua Z. C.: *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 38, 305 (2006).
 45. Reid B. J., Levine D. S., Longton G., Blount P. L., Rabinovitch P. S.: *Am. J. Gastroenterol.* 95, 1669 (2000).
 46. Rebelo M. F., Pfeiffer W. C., da Silva H., Moraes M. O.: *Aquat. Toxicol.* 64, 359 (2003).
 47. Kim E. H., Kim T. S., Sun W., Kim D. S., Chung H. S., Kim D. K., Park S. H., Kim F.: *Mol. Cells* 18, 326 (2004).
 48. Nury D., Chabanon H., Levadoux-Martin M., Hesketh J.: *Biochem. J.* 387, 419 (2005).
 49. Laurie A. D.: *N. Z. J. Mar. Freshw. Res.* 38, 869 (2004).
 50. 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).
 51. Reid A., Pereira H., Galea M., Bell J. A., Elston C. W., Jasani B., Schmitt K., Kay J., Cryer A., Blamey R. W., Ellis I. O.: *J. Pathol.* 168, A100 (1992).
 52. Petrlova J., Blastik O., Prusa R., Kukacka J., Potesil D., Mikelova R., Adam V., Zehnalek J., Kizek R.: *Biomed. Papers* 149, 485 (2005).
 53. Petrlova J., Blastik O., Prusa R., Kukacka J., Mikelova R., Stiborova M., Adam V., Zitka O., Eckschlager T., Kizek R.: *Klinicka Onkologie* 19, 138 (2006).
 54. Surowiak P., Paluchowski P., Dziegiel P., Wysocka T., Wojnar A., Spaczynski M., Zabel M.: *Med. Sci. Monitor* 10, BR300 (2004).
 55. Goulding H., Jasani B., Pereira H., Reid A., Galea M., Bell J. A., Elston C. W., Robertson J. F., Blamey R. W., Nicholson R. A., Schmid K. W., Ellis I. O.: *Br. J. Cancer* 72, 968 (1995).
 56. Nadji M., Fresno M., Herrera A., Morales A.: *Lab. Invest.* 70, A19 (1994).
 57. Florianczyk B., Grzybowska L.: *Acta Oncol.* 39, 141 (2000).
 58. Florianczyk B., Grzybowska L.: *J. Tumor Marker Oncol.* 14, 23 (1999).
 59. Kasahara K., Fujiwara Y., Nishio K., Ohmori T., Sugimoto Y., Komiya K., Matsuda T., Saijo N.: *Cancer Res.* 51, 3237 (1991).
 60. Bobillier-Chaumont S., Maupoil V., Berthelot A.: *J. Appl. Toxicol.* 26, 47 (2006).
 61. Filipovic V., Raspor B.: *Water Res.* 37, 3253 (2003).
 62. Campana O., Sarasquete C., Blasco J.: *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 55, 116 (2003).
 63. Saito S., Hiyamuta S., Kurasaki M., Saito T., Hosokawa T., Fujita H., Yoshida K.: *Chem.-Biol. Interact.* 140, 265 (2002).
 64. Brambila E., Liu J., Morgan D. L., Beliles R. P., Walalkes M. P.: *J. Toxicol. Environ. Health Pt A* 65, 1273 (2002).
 65. Li Y., Wo J. M., Cai L., Zhou Z. X., Rosenbaum D., Mendez C., Ray M. B., Jones W. F., Kang Y. J.: *Exp. Biol. Med.* 228, 286 (2003).
 66. Li Y., Wo J. M., Zhou Z. X., Rosenbaum D. H., Jones W., Ray M., Kang Y. J.: *Gastroenterology* 120, A444 (2001).
 67. Yamamoto M., Shiozaki H., Tamura S., Inoue M., Monden M.: *Gastroenterology* 110, A616 (1996).
 68. Telang N. T., Li G., Katdare M.: *Int. J. Oncol.* 28, 1523 (2006).
 69. Gwak J., Park S., Cho M. J., Song T., Cha S. H., Kim

- D. E., Jeon Y. J., Shin J. G., Oh S.: *Int. J. Mol. Med.* 17, 1005 (2006).
70. Collins P. D., Mpofo C., Watson A. J., Rhodes J. M.: *Cochrane Database Syst Rev.*, Iss. 2, CD000279 (2006).

V. Adam^a, O. Blašík^a, S. Křížková^a, P. Lubal^b, J. Kukačka^c, R. Průša^c, and R. Kizek^a (^a *Department of Chemistry and Biochemistry, Mendel University of Agriculture and Forestry, Brno*, ^b *Department of Analytical Chemistry, Masaryk University, Brno*, ^c *Department of Clinical Biochemistry and*

Pathobiochemistry, Charles University, Prague): **Application of the Brdička Reaction in Determination of Metallothionein in Patients with Tumours**

The connection between the metallothionein (MT) content and the presence of tumor was studied by adsorptive stripping technique and differential pulse voltammetry (Brdička reaction). The average content of MT in the blood serum of tumour patients was higher than in controls ($0.72 \pm 0.09 \mu\text{mol dm}^{-3}$). In leukemia and lung cancer, the MT content was more than five times higher in comparison with control.

POLYSACHARIDY 2007 – DODATKY

INSOLUBLE FIBER-RICH FRACTIONS OF GRAPE SEED

**EBRU FIRATLIGIL-DURMUS
and OZGUL EVRANUZ**

Istanbul Technical University, Food Engineering Department, Maslak – Istanbul, Turkey

VYUŽITÍ ŠKROBU PRO PŘÍPRAVU BIODEGRADOVATELNÝCH OBALŮ

**SANDRA CIRMACIOVÁ, MIROSLAV MAREK,
HANA SMÍTKOVÁ a JAROSLAV DOBIÁŠ**

Ústav konzervace potravin a technologie masa, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6

PREVENTION OF CANCER WITH DIET SUPPLEMENTATION WITH MUSHROOMS

A. KARMALI^a and T. H. FERNANDES^b

^a *ISEL, Rua Emilio Navarro, Lisboa*, ^b *CIISA-FMV-UTL, Rua Prof. Cid dos Santos, Portugal*

HYDROLÝZA OXIDOVANÉ CELULOSY

**TOMÁŠ JEŘÁBEK^a, TOMÁŠ LUBAS^a, LUKÁŠ
KREJČÍK^a, GORDON K. GOMBA^a, ALLA
SYNYTSYA^b**

^a *Ústav chemie a technologie sacharidů*, ^b *Ústav chemie a analýzy potravin, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6*

Práce byla podpořena grantem MPO 2A-1TO1/041.

Oprava složení autorského kolektivu:

METHYLAČNÍ ANALÝZA β -GLUKANŮ

**JANA ČOPÍKOVÁ, BARBORA KASÍKOVÁ,
RADKA HAASOVÁ, ANDRIY SYNYTSYA
a MIROSLAV NOVÁK**

Ústav chemie a technologie sacharidů, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6