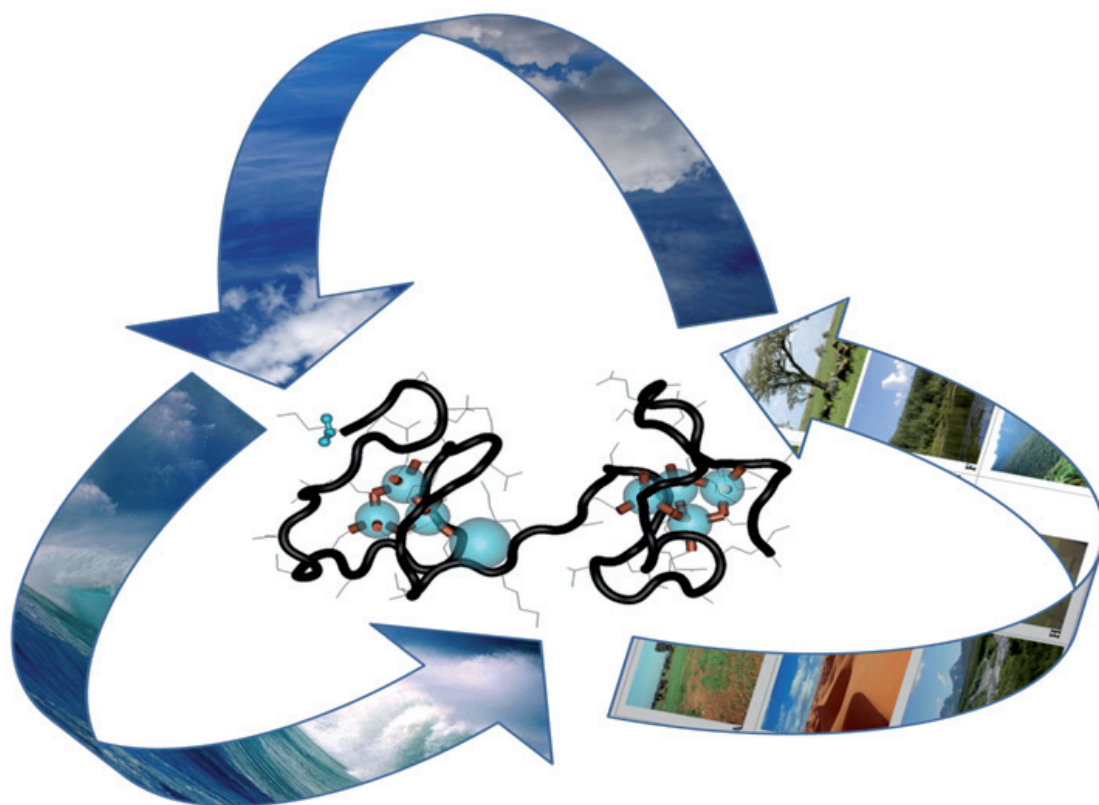


Mendelova univerzita v Brně
Vysoké učení technické v Brně

VYUŽITÍ METALOTHIONEINU JAKO BIOCHEMICKÉHO
INDIKÁTORU ZNEČIŠTĚNÍ ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ
A BUNĚČNÉHO PROLIFERAČNÍHO MARKERU

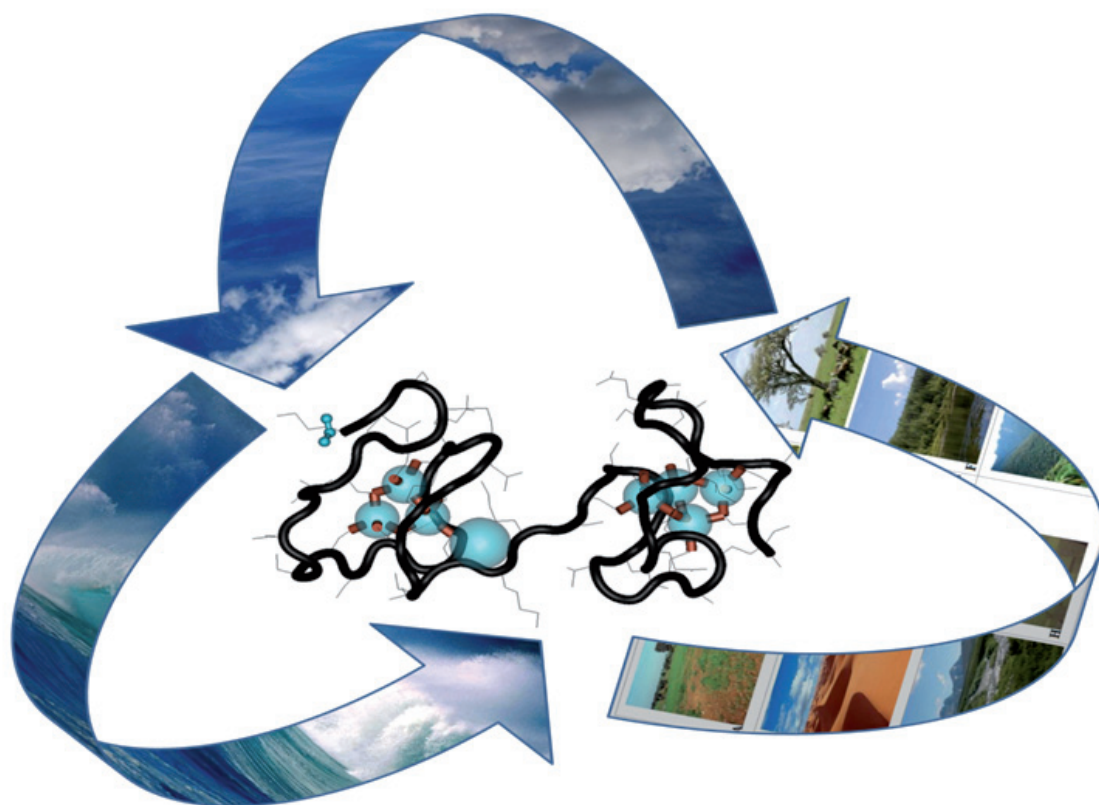
Vojtěch Adam a kolektiv



Mendelova univerzita v Brně
Vysoké učení technické v Brně

VYUŽITÍ METALOTHIONEINU JAKO BIOCHEMICKÉHO
INDIKÁTORU ZNEČIŠTĚNÍ ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ
A BUNĚČNÉHO PROLIFERAČNÍHO MARKERU

Vojtěch Adam a kolektiv



Využití metalothioneinu jako biochemického indikátoru znečištění životního prostředí a buněčného proliferačního markeru

(metodická pomůcka pro zemědělskou a veterinární praxi- certifikovaná metodika)

Lektorovali: Doc. PharmDr. Petr Babula, Ph.D. – Veterinární a farmaceutická univerzita Brno
Ing. Aleš Pavlík, Ph.D. - Ústav morfologie, fyziologie a genetiky zvířat, Mendelova univerzita v Brně



Tato publikace vznikla z výsledků řešení Národního programu výzkumu Nanotechnologie pro společnost NANOSEMED GA AV KAN208130801 a výsledků infrastrukturního projektu CZ.1.05/1.1.00/02.0068 CEITEC - Středoevropský technologický institut, centrum excelentní vědy uděleného Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky. A také za podpory „Lead and Cadmium Initiatives, United Nations Environment Programme“ a řešení grantu QJ1310100 „Vývoj a optimalizace metod stanovení biogenních aminů v návaznosti na zvýšení zdravotní bezpečnosti siláží“ financovaného národní agenturou pro zemědělský výzkum (NAZV QJ1310100).

Doporučená citace:

Adam, V., Hynek, D., Tmejová, K., Cernei, N., Šobrová, P., Křížková, S., Skládanka, J., Havlíček, Z., Zítka, O., Vaculovičová, M., Hubálek, J., Trnková, L., Kizek, R.: *Využití metalothioneinu jako biochemického indikátoru znečištění životního prostředí a buněčného proliferačního markeru.* Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2013, 53 s., ISBN 978-80-7375-701-4

© Vysoké učení technické v Brně (CEITEC) a Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno
2013

ISBN 978-80-7375-701-4



Tato práce vznikla v rámci projektu CEITEC - Středoevropského technologického institutu s pomocí výzkumné infrastruktury financované projektem CZ.1.05/1.1.00/02.0068 z Evropského fondu regionálního rozvoje.



EVROPSKÁ UNIE
EVROPSKÝ FOND PRO REGIONÁLNÍ ROZVOJ
INVESTICE DO VAŠÍ BUDOUCNOSTI



OP Výzkum a vývoj
pro inovace



United Nations Environment Programme
Chemicals

Lead and Cadmium Activities

Tato práce vznikla pro účely programu **UNEP Lead and Cadmium Activities**. Navržená metoda je vhodná pro rychlé a finančně nenáročné monitorování efektu těžkých kovů v životním prostředí.



UNEP

United Nations Environment Programme

Tato práce vznikla v rámci projektu „Nové konstrukce a využití nanobiosenzorů a nanosenzorů v medicíně“ KAN208130801, který je financován Garantovou agenturou Akademie věd ČR z programu Nanotechnologie pro společnost. V projektu metodika přináší vhodný způsob detekce metalothioneinu v biologických vzorcích.



Tato práce vznikla v rámci projektu „Vývoj a optimalizace metod stanovení biogenních aminů v návaznosti na zvýšení zdravotní bezpečnosti siláží“ QJ1310100, který je financován Garantovou agenturou Akademie věd ČR z programu Nanotechnologie pro společnost. V projektu metodika přináší nové postupy pro analýzy reálných vzorků.

Obsah

I.	Úvod.....	11
1.1	Struktura MT	11
1.2	Isoformy MT	11
1.3	Expres MT.....	11
1.4	Metalothionein a metabolismus zinku	12
1.5	Metalothionein a oxidativní stres	12
1.6	Metalothionein a nádorová onemocnění.....	13
II.	Cíl metodiky.....	14
III.	Vlastní popis metodiky.....	14
3.1	Příprava vzorků	14
3.2	Separace a detekce metalothioneinu	14
3.2.1	Chromatografická separace metalothioneinu	14
3.2.2	Kapilární elektroforéza	14
3.2.3	Imunochemické techniky	15
3.2.4	Elektrochemické stanovení MT.....	15
VI.	Praktická část.....	17
4.1	Příprava vzorků	17
4.1.1	Příprava vzorku z plné krve	17
4.1.2	Příprava vzorku z krevní plazmy	17
4.2	Spektrofotometrické stanovení proteinů	18
4.2.1	Stanovení celkových proteinů pomocí pyrogalové červeně (Skalab test).....	18
4.3	Izolace a charakterizace vzorků obsahujících MT	18
4.3.1	Izolace MT pomocí FPLC (fast protein liquid chromatography).....	18
4.3.2	Stanovení zákalu agregační reakce albuminu s hodnocením dle inkubační doby	20
4.4	Imunochemické metody.....	20
4.4.1	ELISA	20
4.4.2	Dot-blot.....	20
4.4.3	Western-blot	21
4.5	Optimalizace automatické elektrochemické detekce.....	21
4.5.1	Měřicí postup	21
4.5.2	Objem nadávkovaného vzorku.....	23
4.5.3	Čas akumulace	23
4.5.4	Vliv teploty na výšku Cat2 píku.....	23
4.5.5	Vyhodnocení naměřených dat	23
4.6	Výsledky pro využití metodiky v životním prostředí	23
4.6.1	Konkrétní přístupy využití metodiky v hodnocení životního prostředí ionty těžkých kovů.....	24

4.6.1.1	Přístup 1: akutní intoxikace olovem u supa	24
4.6.1.2	Přístup 2: akutní intoxikace kadmíem u kapra	24
4.6.1.3	Přístup 2: akutní intoxikace selenitých ionty u divokých kanců	25
4.6.1.4	Přístup 4: akutní intoxikace netopýrů ionty těžkých kovů	25
4.6.1.5	Přístup 5: akutní kontaminace laboratorních potkanů deoxynivalenolem	25
4.7	Stanovení MT jako proliferačního markeru.....	27
4.7.1.1	Přístup 1: studium MT při obohacení stravy selenem na laboratorních potkanech	27
4.7.1.2	Přístup 2: studium MT při obohacení stravy o vitamíny a houby na laboratorních potkanech	27
4.7.1.3	Přístup 3: studium MT při působení cytostatik na králíky	27
4.7.1.4	Přístup 4: monitorování iontů železa jako doplněk k pochopení zhoubného onemocnění .	27
V.	Srovnání novosti postupů	29
VI.	Popis uplatnění metodiky	29
VII.	Ekonomické aspekty.....	29
VIII.	Seznam použité související literatury	30
IX.	Seznam publikací předcházejících metodice	33

SEZNAM ZKRATEK

AdTs.....	adsorptivní přenosová technika
CZE.....	kapilární zónová elektroforéza
EDTA.....	ethylenediamintetraoctová kyselina
ELISA.....	enzymová imunoabsorpční analýza (enzyme-linked immunosorbent assay)
FPLC.....	rychlá proteinová kapalinová chromatografie
GSSG.....	glutathion v oxidované formě
HMDE.....	visící rtuťová kapková elektroda
ICP-AES.....	emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
ICP-MS.....	hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
HPLC.....	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
MALDI.....	ionizace laserem za přítomnosti matrice
MT.....	metallothionein
MT-1, MT-2, MT-3, MT-4.....	isoformy metalothioneinu
MTI.....	inhibitor transkripce metalothioneinu
MTF-1.....	metal regulatory-transcription factor – 1
MRE.....	kov-responsivní element (metal responsive element)
mRNA.....	mediátorová ribonukleová kyselina
RIA.....	radioimunoanalýza
SDS PAGE.....	polyakrylamidová elektroforéza v přítomnosti dodecylsíranu sodného
Sp-1.....	zinkové prsty
TFIIIA.....	transkripční faktor IIIA
ZnT1-4.....	transportní proteiny Zn

Abstrakt

Metalothionein (MT) je nízkomolekulární protein s vysokým obsahem cysteinu, který se vyskytuje ve všech organismech. Tento protein ovlivňuje homeostázi iontů kovů, které se váží do jeho struktury. Navíc je známo, že MT vstupuje do oxidačně-redukční rovnováhy uvnitř buněk, ovlivňuje transport iontů kovů a reguluje exprese řady významných genů. Stanovení množství tohoto proteinu v různých biologických vzorcích je předmětem této metodiky, a to zejména s ohledem na různorodost přípravy vzorků (dle typu tkáně). Elektrochemické stanovení metalothioneinu pomocí Brdičkovy reakce je pro tyto účely velmi vhodné, především z důvodů vysoké citlivosti a reprodukovatelnosti.

Klíčová slova: metalothionein, životní prostředí, marker, oxidativní stres, nádorové onemocnění, elektrochemie, chromatografie, spektrofotometrie, Brdičkova reakce

Abstract

Metallothionein (MT) is a low-molecular mass protein rich in cysteine moieties. This protein is involved in heavy metals homeostasis due to the ability to bind them in MT structure. Moreover, it is common knowledge that MT enters the maintaining intracellular redox homeostasis, controlling metal ions' transport and regulation of gene expression. The subject of this methodic is determination of this protein in various biological samples with respect to variability in samples preparation. Electrochemical determination of metallothionein by Brdicka's reaction is very suitable for this purpose due to its high sensitivity and reproducibility.

Keywords: Metallothionein, Environment, Marker, Oxidative Stress, Tumour Disease, electrochemistry, Chromatography, Spectrometry, Brdicka's reaction

I. Úvod

Metalothionein je nízkomolekulární protein o velikosti 6-10 kDa, který byl izolován v roce 1957 Margoshesem a Valeem z koňské ledviny. Tento protein obsahuje ve své základní struktuře cysteiny a naopak neobsahuje žádné aromatické aminokyseliny. U savců byly nalezeny čtyři hlavní isoformy MT (MT-1 až MT-4) (Miles, Hawksworth et al. 2000). Expresce a lokalizace jednotlivých isoform MT je variabilní jak na intracelulární úrovni (cytosol, buněčné jádro, lysozomy, mitochondrie), tak na úrovni jednotlivých tkání. MT-1 a 2 jsou přítomné zejména v tkáních jater, střev a ledvin. MT-3 se nachází v mozku a MT-4 v kůži (Davis and Cousins 2000). MT-1 a MT-2 zajišťují především ochranu proti působení těžkých kovů, ale účastní se i udržování intracelulární homeostáze zinku (Davis and Cousins 2000), (Sato and Kondoh 2002). Bylo zjištěno, že ztráta ochranných účinků MT vede ke stupňování patogenních procesů (Yu et al. 2001). MT má také antioxidační účinky. Při intoxikaci organismu těžkými kovy (Cd, Hg, Pb) dokáže MT tyto kovy vázat a tím je zneškodnit. K detoxikaci pravděpodobně dochází v ledvinách. Jeho hlavní funkcí v organismu je však zachování oxidačně-redukčních podmínek, transport iontů kovů a regulace exprese. V současné době je také diskutována jeho role při nádorovém onemocnění, resp. při obraně organismu při nádorových onemocněních.

1.1 Struktura MT

Savčí metalothioneiny jsou jedno-řetězcové nízkomolekulární proteiny s počtem aminokyselin pohybujícím se od 61 do 68. Až třetinu aminokyselinových zbytků tvoří cystein, který se vyskytuje v konzervativních sekvencích, a to **cys-x-cys**, **cys-x-y-cys** a **cys-cys**, kde x a y jsou jiné aminokyseliny nežli cystein. K sulfhydrylovým skupinám cysteinů jsou vázány ionty kovů, které v případě divalentních iontů vytvářejí tetraedrické uspořádání thiolátových klastrů (Hamer 1988). Největší afinitou disponuje MT vůči Cu^+ (konstanta stability 10^{19} - 10^{17}), dále pak Cd^{2+} (10^{17} – 10^{15}) a Zn^{2+} (10^{14} – 10^{11}) a není schopen vázat Cu^{2+} . Celkově je známo 18 iontů kovů, které MT dokáže vázat, ale pouze Cu^+ , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} , Ag^+ a Bi^{2+} jsou schopny vytěsnit navázaný Zn^{2+} ze struktury MT. Celkově lze koordinovat až 12 monovalentních nebo 7 divalentních iontů. Jeho terciární struktura je rozdělena na dvě domény, α a β , α -doména (C-terminální) je stabilnější a obsahuje 4 vazebná místa pro divalentní těžké kovy, β -doména (N-terminální) dokáže pojmout 3 divalentní kovové ionty (Nath, Kambadur et al. 1988).

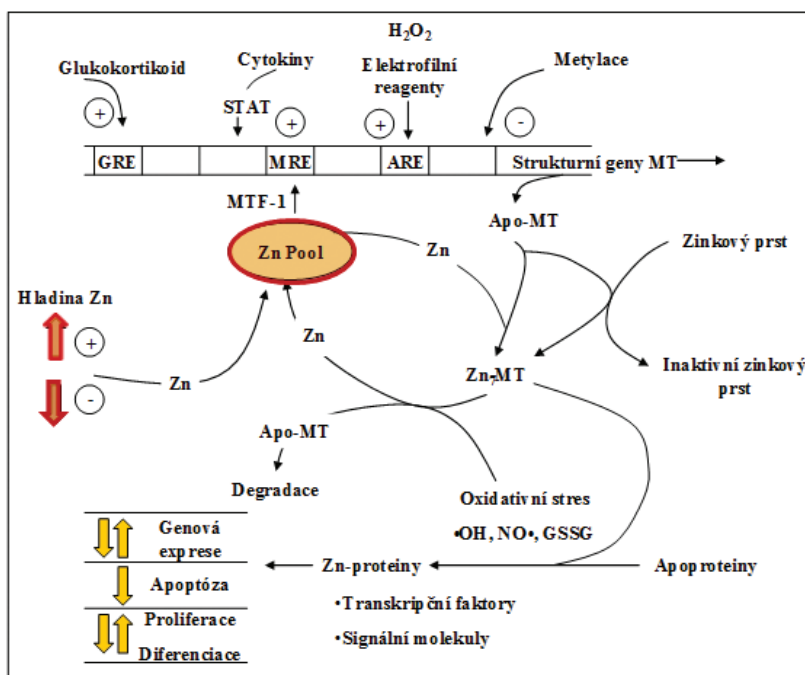
1.2 Isoformy MT

Jsou známy 4 savčí isoformy MT (MT-1 – MT-4), u člověka pak bylo zjištěno dalších 13 metalothioneinu podobných proteinů (Simpkins 2000). Pro isoformu MT-1 existuje 11 genů (MT-1A, B, E, F, G, H, I, J, K, L a X), pro další formy po jednom genu (Ghoshal and Jacob 2001). Odlišnosti jednotlivých isoform vycházejí zejména z posttranslačních úprav, malých změn v primární struktuře, afinitě k jednotlivým těžkým

kovům a rychlosti odbourávání, přestože jsou po fyzikálně chemické stránce tyto formy podobné, plní jiné biologické funkce (Hamer 1988). To je zajištěno jejich odlišnou lokalizací v buněčných kompartmentech a jednotlivých tkáních. MT-1 a MT-2 jsou rozšířené téměř ve všech tkáních (Masters, Quaife et al. 1994); MT-3 je exprimován v mozkové tkáni, v srdeční svalovině, ledvinách a v tkáních reprodukčních orgánů (Moffatt and Seguin 1998). Nejméně prozkoumaná je isoforma MT-4, která byla objevena v epiteliálních buňkách (Quaife, Findley et al. 1994). Forma metalothioneinu bez navázaného iontu kovu (apo-MT) je přítomna v buňkách, které jsou vystaveny nedostatku Zn^{2+} . Bylo pozorováno, že apo-MT může díky vysoké afinitě odebrat Zn^{2+} z transkripčních faktorů (TFIIIA) a ze zinkových prstů (Sp-1) (Zeng, Heuchel et al. 1991), (Zeng, Vallee et al. 1991). Popsaný mechanismus je pravděpodobně jedním z mnoha protiapoptotických a proliferačních nádorových mechanismů (Barnas, MartelPlanche et al. 1997).

1.3 Expresce MT

Geny pro MT jsou seskupeny blízko sebe na chromozomálním lokusu 16q12-22 u člověka a na chromozomu 8 u myši (Karin, Eddy et al. 1984). Expresce jaterního MT je indukována mnoha vlivy (**Obr. 1**) jako cytokininy, ionty kovů, stresovými hormony a širokou škálou chemikálií, které aktivují expresi nepřímo skrze stresovou reakci buňky (Bremner 1991). Mezi kovy indukující expresi MT patří především Cu, Hg, Zn, Au, Cd a Bi. Nicméně při fyziologických dějích takto vystupuje především Zn, ostatní kovy pocházejí většinou z vnějšího prostředí a vyvolávají patologickou odpověď (Cousins 1985). Je zajímavé, že až toxické množství Cu dokáže aktivovat expresi, přestože MT váže Cu nezvykle silnou vazbou (Munger, Germann et al. 1985). K expresi metalothioneinu dochází po vazbě transkripčního faktoru MTF-1 (metal regulatory-transcription factor – 1) na regulační část genu pro MT zvanou MRE (metal responsive element). MTF-1 je protein s velikostí kolem 71-84 kDa s šesti zinkovými prsty, který se v buňce nachází v inaktivovaném stavu s navázaným inhibitorem MTI (Klassen, Crenshaw et al. 2004). Ion kovu se po vstupu do intracelulárního prostoru naváže na inhibitor MTI a tím dojde k uvolnění MTF-1, který je schopen indukovat expresi MT navázáním na sekvenci nukleotidů MRE lokalizovaných na promotoru genu pro MT-1 (Palmiter and Findley 1995). Po transkripci a translaci mají významnou roli také posttranslační úpravy. MTF-1 je důležitý i pro regulaci jiných genů; myši s vyřazeným genem pro MTF-1 umírají již v embryonálním stádiu na selhání jater (Gunes, Heuchel et al. 1998). Přestože transkripci MT přes MRE dokáže zahájit několik iontů kovů (např. Zn, Cd, Bi), pouze Zn dokáže aktivovat MTF-1 (Andrews 2000). MRE dokáže reagovat s mnoha dalšími proteiny, které se tímto způsobem podílejí na regulaci exprese MT (Tang, Westling et al. 1999), (Miles, Hawksworth et al. 2000).



Obrázek. 1: Vlivy indukující expresi jaterního MT.

1.4 Metalothionein a metabolismus zinku

Zinek je po železe nejrozšířenější kov v organismu. Je zřejmé, že velké množství proteinů je zaměřeno na udržování homeostáze tohoto prvku. Dobře popsána je rodina transportních proteinů ZnT1-4, která se stará o příjem/výdej Zn²⁺ přes membrány buněk u savců (Palmiter 1994). Z literatury vyplývá, že ZnT1 a ZnT4 jsou odpovědní za transport nadbytku zinku mimo buňku v kontrastu s ZnT2 a ZnT3, které odpovídají za ukládání iontů Zn do organel v buňkách ledvin, varlat, střeva a neuronů (Cole, Wenzel et al. 1999). Méně je ovšem známo o transportu zinku v intracelulárním prostoru. Hlavním podstatným proteinem je pravděpodobně právě metalothionein. Zvýšená hladina MT byla zjištěna u proliferaujících buněk, což může být způsobeno zvýšenou potřebou zinku (Studer, Vogt et al. 1997). Studium exprese metalothioneinu na úrovni mRNA ukazuje na roli tohoto proteinu při ochraně buňky vůči vysoké koncentraci Zn²⁺ a při odchytu těchto iontů pro potřebu jednotlivých buněčných procesů (Davis and Cousins 2000). MT může korigovat aktivitu zinkových prstů díky kompetici o vazbu zinku. U inaktivovaných transkripčních faktorů p69 a p88 (represory exprese genů *ftz*, *eve* a *en* ve fotoreceptorových buňkách *Drosophily* (Xiong and Montell 1993)) s navázaným Cd²⁺ byla jejich aktivita obnovena pomocí výměny Cd²⁺ za Zn²⁺ zprostředkované MT (Davis and Cousins 2000), (Roesijadi, Bogumil et al. 1998). MT dále slouží jako rezervoár zinku pro zinek-dependentní proteiny a jako zdroj Zn pro nově nesyntetizované apo-MT, či regulátory vlastní exprese. 'Zásobovací' funkci MT dokládají také experimenty sledující kinetiku vazby zinku do struktury zinek-dependentních proteinů (Davis and Cousins 2000). I přes skutečnost, že MT má velkou afinitu k iontům zinku oproti ostatním Zn-dependentním

proteinům, je MT schopen Zn²⁺ uvolnit v závislosti na redoxním potenciálu, koncentraci Zn²⁺ a případně dalších těžkých kovů. Vazbu MT-Zn je také možno narušit pomocí oxidace sulfhydrylových skupin. Za fyziologických podmínek se této oxidace účastní glutathion v oxidované formě (GSSG), jakožto součást oxidačně-redukčních buněčných regulačních mechanismů (Jin, Huang et al. 2004).

1.5 Metalothionein a oxidativní stres

Různé formy kyslíkových radikálů tvořených při intenzivní činnosti mitochondrií, jsou v buňkách likvidovány, aby nedošlo k poškození buněčných struktur. Z tohoto důvodu jsou syntetizovány látky tzv. antioxidanty, které podléhají oxidaci místo významných buněčných komponentů. Obrannou funkci zastávají také thioly, mezi které patří MT a glutathion. Tyto látky vytvářejí oxidačně-redukční prostředí a za určitých podmínek jsou schopny se vzájemně oxidovat či redukovat. Metalothionein se účastní regulace hladiny volných radikálů také nepřímou a to navázáním iontů kovů, které jsou jejich potenciálními producenty (např. měď (Murray, Granner et al. 2003)). Ochota MT reagovat se superoxidovým radikálem je sice relativně nízká, ale metalothionein velmi efektivně likviduje hydroxylové radikály, které jsou pro buňku nebezpečnější (Sato and Bremner 1993). Z tohoto důvodu je exprese MT regulována také působením oxidativních faktorů. Z fyzikálního hlediska se jedná například o rentgenové, UV a radioaktivní záření, což potvrdilo několik studií (Shiraishi, Aono et al. 1983), (Shiraishi, Yamamoto et al. 1986). Na myších byl prováděn pokus, kdy bylo jejich tělo ozařováno rentgenovými paprsky. Na základě působení RTG byla zjištěna zvýšená exprese mRNA MT-1 u myši (Koropatnick, Leibbrandt et al. 1989). Podobné pokusy s UV zářením ukázaly zvýšení mRNA pro MT-1 a 2 (Fornace, Schalch et al. 1988). Předpokládá se, že MT funguje jako zhášec volných radikálů nebo jako donor zinku enzymům, které se účastní

opravných procesů. Byla také prokázána indukce exprese MT chemickými látkami indukujícími kyslíkové radikály. Vliv na započítí transkripce MT mají i různá organická rozpouštědla (ethanol (Waalkes, Hjelle et al. 1984), chloroform (Sas and Bremner 1979), tetrachlormethan (Oh, Deagen et al. 1978)) a alkylační činidla (bromobenzen (Kotsonis and Klaassen 1978)). Cytostatická léčiva (např. bleomycin, adriamycin, cisplatina a její deriváty) jsou také dobrými aktivátory syntézy MT, zřejmě kvůli jejich schopnostem generovat volné radikály (Bachur, Gordon et al. 1978). Bylo zjištěno, že hepatocyty jsou nejnáchylnější k poškození volnými radikály vzniklými působením fyzikálních a chemických induktorů (Bauman, Liu et al. 1991).

1.6 Metalothionein a nádorová onemocnění

Metalothionein byl již v dřívějších pracích asociován s buněčnou proliferací (Nagel and Vallee 1995), kde má zřejmě funkci přenašeče a zásobníku Zn^{2+} . Zvýšená koncentrace MT byla pozorována rovněž u mnoha typů nádorových buněk. Přestože použití MT jako nádorového markeru není doposud díky nejednoznačné interpretaci příliš rozšířeno, je známo, že exprese MT je závislá na stupni diferenciaci nádoru, stádiu onemocnění a dalších charakteristikách nádorových buněk (Theocharis, Margeli et al. 2004).

Je známo, že MT může buď přímo nebo přes vazbu Zn^{2+} (de)aktivovat celou řadu proteinů spojených s nádorovými onemocněními. Jako příklad lze uvést tumor-supresorový protein p53, jehož aktivní konformace je závislá na vazbě Zn^{2+} . Apo-MT je schopen vazby Zn^{2+} ze struktury proteinu p53 a tím jeho inaktivace, což se projeví jako snížení afinity proteinu p53 k DNA a znemožnění spuštění pro-apoptotických signálů (Meplan, Richard et al. 2000). Mimo to, že se MT stará o homeostázi kovů v buňce a udržuje hladinu volných radikálů, chrání buňku také proti cizím potenciálně škodlivým látkám. Tato skutečnost může výrazně snížit efektivitu protinádorové léčby (Perez 1998), (Chu 1994). Vztah MT k nádorovému bujení doposud není zcela objasněn a v současné době je proto téma v centru zájmu mnoha vědeckých skupin (Kremplova, Krejcova et al. 2012), (Sochor, Pohanka et al. 2012), (Vasatkova, Krizova et al. 2009), (Krizkova, Masarik et al. 2010), (Krejcova, Fabrik et al. 2012), (Sochor, Hynek et al. 2012), (Namdarghanbari, Wobig et al. 2011; Takahashi 2012; Zamirska, Matusiak et al. 2012).

II. Cíl metodiky

Cíle certifikované metodiky jsou zaměřeny na určení koncentrace metalothioneinu v biologickém vzorku. Z hodnoty koncentrace MT a průběhu voltamogramu získaného při elektrochemickém stanovení metalothioneinu je možno určit míru kontaminace životního prostředí a proliferační aktivity buněk. Tato práce je zaměřená na výzkum MT jako markeru kontaminace životního prostředí (a) a MT jako ukazatele proliferační aktivity buněk (b).

III. Vlastní popis metodiky

3.1 Příprava vzorků

Před samotnou analýzou MT je potřeba získané vzorky patřičně upravit (buňky nebo tkáně). Zkoumáme-li buňky, které byly kultivovány s ionty kovů, je třeba vzorky promýt roztokem pufru. Tím budou odstraněny zbytky kultivačního média a kovy adsorbované na povrch buněk. Nejčastěji je používán fosfátový pufr ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$, 0,2 M, pH 7) nebo Tris-HCl. Vzorky jsou ředěny pufrům v množství ekvivalentním desetinasobku hmotnosti tkáně. Vzorek by měl být homogenizován sonikací ultrazvukovým přístrojem, u celistvých tkání nebo pletiv je lepší použít mechanického rozrušování pomocí mixeru. K separaci metalothioneinu od ostatních proteinů se využívá jeho termostability a pro tuto operaci stačí denaturace vzorku v termobloku (99 °C, 20 minut). Následnou centrifugací (4 °C, 16400 rpm, 30 min) je docíleno oddělení buněčných kompartmentů od cytoplazmy. Odebraný supernatant může být potom analyzován.

3.2 Separace a detekce metalothioneinu

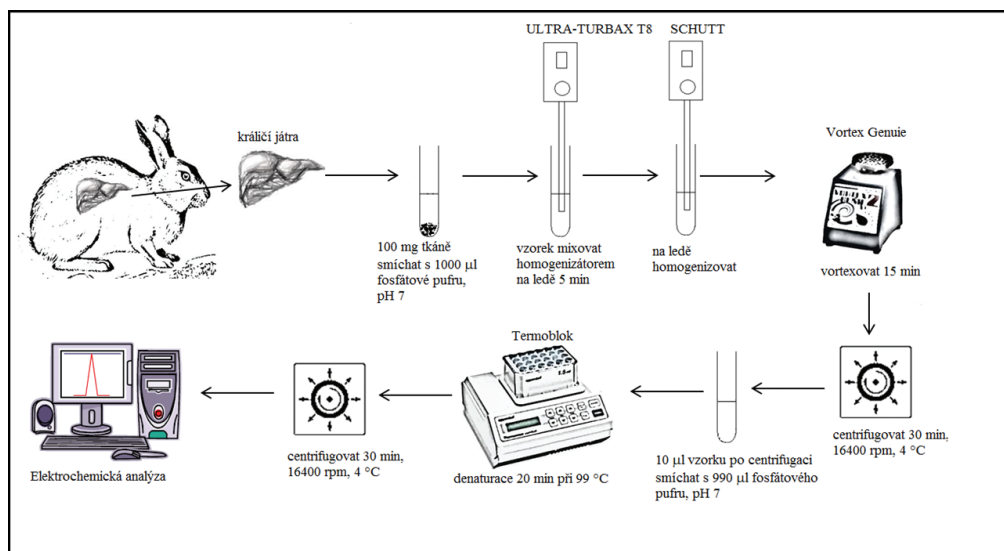
Separace a detekce metalothioneinu je spojena s určitými specifiky, která vyplývají ze skutečnosti, že MT neobsahuje aromatické aminokyseliny a v nativním stavu ani disulfidické vazby. Nicméně ve své struktuře má většinou zakomponovány ionty těžkých kovů či sulfhydrylové skupiny, čehož se využívá pro jeho elektrochemické stanovení.

3.2.1 Chromatografická separace metalothioneinu

Metody separace jsou většinou založeny na chromatografických nebo elektromigračních metodách. Pro separaci MT jsou jako náplň nejčastěji využívány silikáty či organické polymery s póry o velikosti 100 – 1000 Å. Pro mobilní fázi by měla být zvolena voda, či cytosolu podobný pufr, kvůli zachování nativity MT a komplexu MT-kov. K narušení interakcí mezi stacionární fází a MT se využívá zvýšené iontové síly (Lobinski, Chassaingne et al. 1998). Analýza eluentu je nejčastěji prováděna s využitím UV detekce (254 nm) (Ang and Wong 1992), ICP-AES (Wolf, Rosick et al. 2000) nebo ICP-MS (Polec, Garcia-Arribas et al. 2000) (ionty kovů v MT). Velmi často je též využívána HPLC na reverzní fázi. Náplní kolon jsou nejčastěji C_8 a C_{18} uhlovodíky, eluce z hydrofobních řetězců je poté prováděna zvýšením polarity mobilní fáze (methanolem či acetonitrilem).

3.2.2 Kapilární elektroforéza

Jako vhodnější metody pro separaci MT se jeví elektromigrační metody, kde se nejvíce osvědčila kapilární zónová elektroforéza (CZE), která využívá při separaci rozdíly v elektroforetické mobilitě iontů v elektrickém poli. Separace probíhá v tenké kapiláře (50 - 75 μm) při aplikaci vysokého napětí (10 - 30 kV). Výhodou je též nízký objem potřebného vzorku (desítky až stovky nl). Pro CZE byly optimalizovány ideální podmínky separace (složení pufru, vhodné pH, vnitřní povrch kapiláry, přítomnost detergentů). Bylo zjištěno, že borátový pufr o pH 9 je vhodným základním elektrolytem a separace probíhající v nepokryté křemenné kapiláře za použití 15 kV dosahuje dostatečného rozlišení. Pomocí CZE jsou velmi dobře rozlišitelné jednotlivé isoformy MT. Je třeba zdůraznit význam přípravy vzorku, jelikož je CZE analýza proteinů často komplikována jejich interakcemi s povrchem kapiláry, je třeba důkladně tepelně denaturovat ostatní termolabilní proteiny přítomné ve vzorku. Vzorek standardů MT-1 a MT-2 byl tepelně denaturován (99 °C, 20 min) a následně centrifugován pro odstranění případných kontaminací. Byly analyzovány vzorky v rozsahu koncentrací 0,01-1,25 mg/ml. Dávkování probíhalo hydrodynamickým aplikováním 3,4 kPa po dobu



Obrázek 2: Jednotlivé kroky přípravy vzorku pro stanovení MT.

20 s, čímž došlo k nadávkování 1 μ l vzorku. Byla použita spektrometrická detekce s vlnovou délkou 214 nm.

Bylo zjištěno, že každá z isoform poskytuje signál s jiným migračním časem. Majoritní pik MT-1 migruje za výše uvedených podmínek s migračním časem 6,4 minuty a majoritní pik MT-2 s migračním časem 7,2 minuty. Jak je vidět z obrázku 3, lze směs těchto isoform za daných podmínek separovat s dostatečným rozlišením a identifikovat podle jejich migračního času porovnáním se standardem.

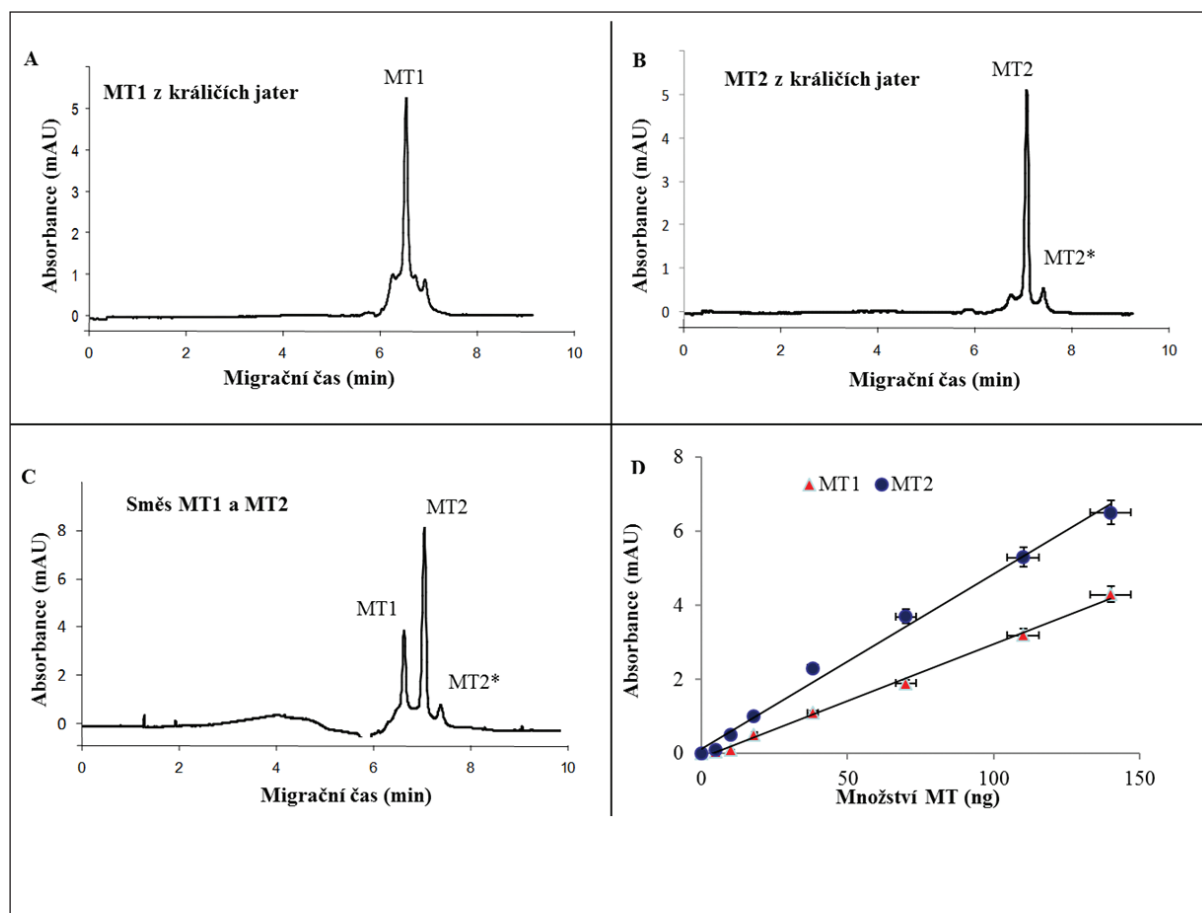
3.2.3 Imunochemické techniky

Druhá skupina detekce MT zahrnuje využití protilátek proti MT. Do této oblasti patří Western blotting, imunofluorescence, imunohistochemické techniky, radioimunoanalýza (RIA) a ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Použití protilátek umožňuje jak kvalitativní tak kvantitativní stanovení MT, a to i na úrovni jednotlivých isoform, případně i jeho vizualizaci ve tkáních či buňkách. Nejčastěji je MT detekován pomocí imunohistochemie, kde jeho vizualizace exprese umožňuje studium variability exprese MT na úrovni tkání či jednotlivých buněk jako odpověď na nejrůznější podněty, např. při detekci MT v ledvinách potkana (Santon, Albergoni

et al. 2004), nebo v mozkové tkáni myši (Beltrami, Zambenedetti et al. 2004). Variabilita exprese v nádorové tkáni umožnila subklasifikaci Hodgkinova lymfomu (Penkowa, Srensen et al. 2009). Dalšími často používanými technikami jsou western-blotting (Hirauchi, Okabe et al. 1999) a ELISA, které umožňují kvantitativní, případně semikvantitativní stanovení MT ve vzorcích nejrůznějšího původu, ELISA pro detekci MT-1 isoformy v plazmě a v moči (Akintola, Sampson et al. 1995).

3.2.4 Elektrochemické stanovení MT

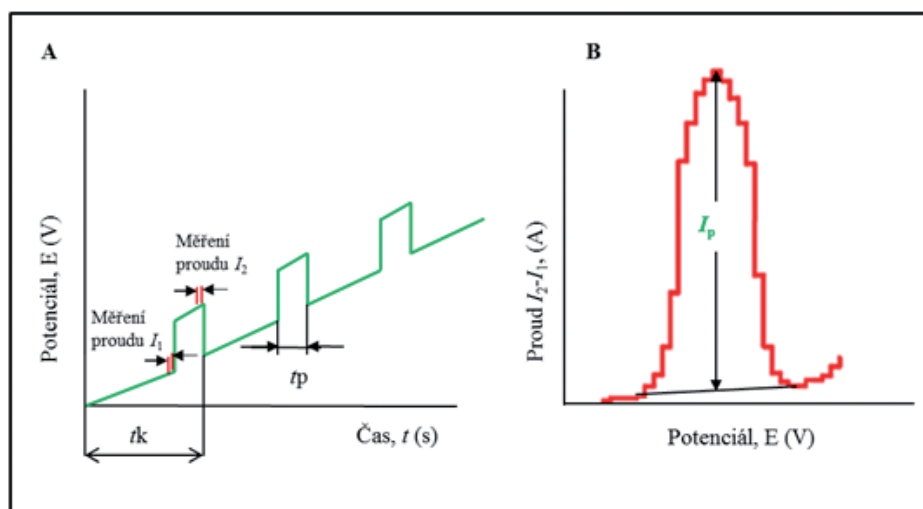
Elektrochemie je analytickým nástrojem, který je velmi vhodným pro stanovení thiolových látek. Tato metoda dovoluje kromě thiolových látek také stanovení thiolových skupin ve složitých molekulách. Díky vysokému obsahu thiolových skupin v molekule metalothioneinu jsou elektrochemické metody obzvláště vhodné pro jeho stanovení. Pro zvýšení citlivosti elektrochemických metod je často využívána přenosová adsorptivní technika (AdTs), kdy je MT akumulován na povrchu visící rtuťové kapkové elektrody (HMDE) a takto modifikovaná elektroda je vložena do měřicí nádoby s Brdicovým elektrolytem.



Obrázek 3: Typické elektroferogramy (A) MT-1 0,12 mg/ml; 13 ng/injektáž a (B) MT-2 0,12 mg/ml; 13 ng/injektáž. (C) Typický elektroferogram směsi MT-1 a MT-2 (0,15 mg/ml; 16 ng/injektáž). (D) Kalibrační křivky MT-1 a MT-2 v rozsahu 4,2 ng – 135,9 ng MT a 1 μ l injektovaného vzorku. Experimentální podmínky – základní elektrolyt: 20 mM borát, pH = 9,5, napětí: + 15 kV, kapilára: 50/57 cm, 75 mm, UV/VIS detekce: 254 nm.

3.2.4.1 Diferenční pulsní voltametrie

Jde o elektroanalytickou metodu, při níž se studuje závislost elektrického proudu tekoucího pracovní elektrodou ponořenou v analyzovaném roztoku na jejím potenciálu, který se s časem mění. Při této metodě (Obr. 4) je potenciál lineárně s časem se měnící překládán napěťovým pulsem o amplitudě 10 až 100 mV a době trvání řádově desítek ms. Napěťový puls je aplikován ke konci doby života kapky, přičemž celková doba kapky je řízena elektronicky klepátkem. Registruje se rozdíl proudů změřených těsně před vložení pulsu a na jeho konci. Závislost rozdílu proudů na potenciálu prochází maximem, má tvar píku. Poloha píku na potenciálové ose je dána kvalitou analytu, jeho výška závisí na koncentraci (Barek 2005).



Obrázek 4: Charakter vkládaného potenciálu (A) a registrovaná polarizační křivka při diferenční pulsní voltametrii (B). t_k je doba kapky, I_p doba trvání pulsu, t_p limitní proud. Převzato a upraveno z (Barek 2005).

3.2.4.2 Brdičkova reakce

Jedná se o katalytickou reakci v Brdičkově roztoku. Zmíněný roztok je složen z amonného pufru (chlorid amonný a amoniak) a kobaltitého komplexu (chlorid hexaamminokobaltitý komplex). Dlouhou dobu průběh reakcí nebyl znám. Dnes můžeme alespoň navrhnout přijatelné teorie, nicméně u katalytických jevů v elektrochemii je ještě řada nejasností. Chemické jevy popsané níže se zakládají na interakci $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ s -SH skupinou proteinu. Jako elektrolyt je použit již zmíněný amonný pufr s vysokým pH. Nejprve dochází redukci Co^{3+} na Co^{2+} za vzniku $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]^{2+}$ (Obr. 5A). Protože kobaltitý ion je zařazen mezi tzv. tvrdé kationty a amino skupina mezi tzv. tvrdé anionty, je vzniklý komplex stabilní. Po redukci vzniká kobaltnatý ion, který je již větší, má menší povrchovou hustotu náboje a je tudíž měkký. Stabilita komplexu měkkých a tvrdých kyselin a bází je nízká a produkt redukce (hexaamminokobaltnatý ion) je hydrolyzován podle následující reakce:



Vzniklý amoniak zvyšuje pH a tím vytváří podmínky pro katalytickou reakci, která by mohla proběhnout později s využitím NH_4^+ kationtu. První redukce kobaltu z oxidačního čísla III na II vytvoří polarografickou vlnu v potenciálu přibližně $E_p = -0,3 \text{ V}$. Následná redukce nepříliš stabilního hexaakobaltnatého na čistý kobalt probíhá při potenciálu $-1,2 \text{ V}$. Jako výsledek redukce $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ v amonném pufru tedy vzniknou dvě polarografické vlny v potenciálu přibližně $E_p = -0,3 \text{ V}$ ($\text{Co}^{3+} \rightarrow \text{Co}^{2+}$) a $E_p = -1,2 \text{ V}$ ($\text{Co}^{2+} \rightarrow \text{Co}^0$) (Obr. 5B).

Pokud by ale přidaná látka obsahovala sulfhydriové skupiny, následné reakce by po první redukci probíhaly následovně. První signál je opět signál redukce kobaltitého komplexu na kobaltnatý. Ale protože -SH skupiny (potažmo -S-) jsou měkké báze (díky velikosti a hustotě ná-

boje), vzniká stabilní komplex RS_2Co (Obr. 5) podle rovnice:



Druhý signál není tedy redukcí $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$, ale Co^{2+} navázaného v komplexu thiolových skupin. Průběh redukce by se dal popsat následovně:

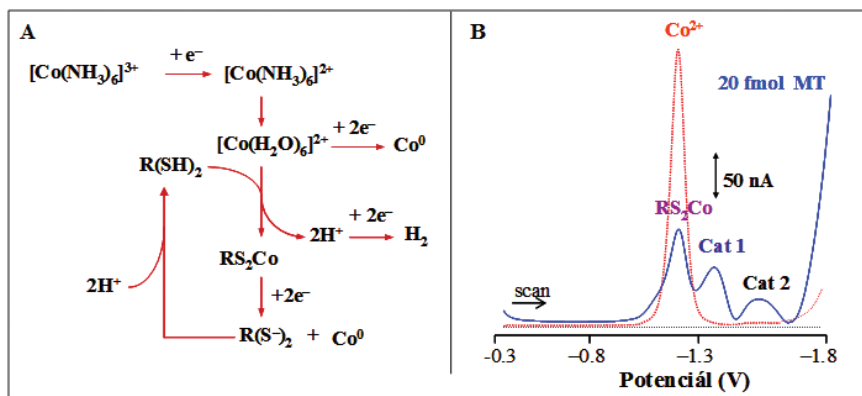


Při vyšších koncentracích thiolových chelátů může být pozorován i pík Co1, který odpovídá redukci $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ a který se nalézá v kladnějším potenciálu než pík redukce RS_2Co . Vodíkové ionty, vzniklé záměnou ligandů vody za sulfhydriové skupiny, jsou absorbovány molekulami amoniaku za vzniku amonných iontů.

Po redukci Co^{2+} na Co^0 je skupina $\text{R}(\text{S})_2$ okamžitě protonována NH_4^+ skupinou a sloučenina je obnovena a schopna vázat další hexaakobaltnaté ionty. Poslední dva signály (Cat1 - $E_p = -1,35 \text{ V}$ a Cat2 - $E_p = -1,48 \text{ V}$) jsou po přidání sloučeniny s -SH skupinami katalytické povahy. Cat2 je zřejmě výsledkem redukce H^+ iontů vzniklých z reakce mezi $\text{R}(\text{SH})_2$ a $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$. Jedná se o katalytický jev, protože po zvýšení teploty byl pozorován úbytek signálu, což nasvědčuje závislosti na povrchové reakci. Reakce $\text{R}(\text{SH})_2$ s $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$

probíhá na povrchu elektrody a $R(SH)_2$ je katalyzátorem vývoje vodíku z elektrolytu (Fabrik 2008).

Bylo zjištěno, že při použití Brdičkovy reakce je analyzována hladina MT, a výška posledního signálu (-1,48 V) na voltamogramu Brdičkovy reakce s reálným vzorkem je závislá na jeho koncentraci (Raspor 2001).



Obrázek 5: (A) Pravděpodobné schéma katalytického vylučování vodíku při Brdičkově reakci. Upraveno podle (Raspor, Paic et al. 2001). (B) Voltamogram MT pro koncentraci MT 20 fmol s výše popsanými píky (upraveno a převzato (Petrova, Potesil et al. 2006)).

VI. Praktická část

4.1 Příprava vzorků

Příprava vzorků pro stanovení MT je závislá na složení matrice, ve které chceme tento protein stanovit. V následujícím textu jsou uvedeny přípravy různých typů vzorků pro elektrochemické stanovení metalothioneinu.

4.1.1 Příprava vzorku z plné krve

Pro elektrochemické stanovení MT byl použit následující postup: 0,1 g vzorku bylo smícháno s 500 μ l fosfátového pufru (0,2 M, pH 7,0), dále rozmělněno ultrazvukem v ledové lázni 3 min při 16400 rpm. Vzorky byly homogenizovány v temomixéru při 99 $^{\circ}C$, 15 min, za stálého míchání. Denaturovaná směs byla dále centrifugována při 16400 rpm, 30 min. na 4 $^{\circ}C$. Pro stanovení MT byla použita směs 10 μ l supernatantu a 990 μ l fosfátového pufru o pH 7,0. Popsané kroky byly provedeny na EP Motionu 5075, automatické pipetovací stanici (Obr.6), (Hynek, Krejcova et al. 2012), (Pohanka, Sochor et al. 2012), (Huska, Adam et al. 2011), (Huska, Adam et al. 2010), (Adam, Fabrik et al. 2010).

Na reálných vzorcích byl výše popsaný postup realizován z krve supů, supu mrchožravého (*Neophron percnopterus*) a supu hnědého (*Aegypius monachus*) náhodně otrávených olovem pocházejícím z barevného nátěru. U těchto vzorků byla elektrochemicky proměřena hladina Pb^{2+} , Cd^{2+} a MT (Hynek, Prasek et al. 2011). Pro stanovení Pb^{2+} ve vzorcích byl postup následující: 10 μ l krve bylo dáno do skleněné lahvičky a bylo

k ní přidáno 700 μ l kyseliny dusičné (65%, w/w) a 300 μ l peroxidu vodíku (30%, w/w). Lahvičky byly zaplombovány a dány do mikrovlnné trouby k mineralizaci mikrovlnným rozkladem. Podmínky rozkladu byly následující: výkon – 50, 100, 150 a/nebo 200 W, doba mineralizace: 15 min. Maximum teploty bylo 80 $^{\circ}C$. 100 μ l mineralizátu bylo přepipetováno k 900 μ l acetátového pufru (pH 5). Kontrolní vzorek byl vždy připraven za stejných podmínek.

Dalším postupem pro stanovení MT u erytrocytů byl experiment na erytrocytech z prasat s melanomem (*Sus domesticus*, rakovinová linie MeLiM), kde bylo elektrochemicky stanoveno kromě MT také železo. Periferní krev byla odebrána u 8 prasat s melanomem a 8 kontrolních jedinců. Vzorek krve (4 ml periferní krve) byl dán do testovacích zkumavek společně s ethylenediamintetraoctovou kyselinou (EDTA), dále centrifugo-

váno z důvodu získání krevní plazmy a erytrocytů. Erytrocyty byly dvakrát promyty fyziologickým roztokem a okamžitě zmrazeny (Kremplova, Krejcova et al. 2012). Takto nachystané vzorky byly následně po rozmrazení opět centrifugovány 10 min při 2000 rpm. Krevní plazma, která ještě ve vzorku zůstala, byla následně odebrána. 0,1 g erytrocytů bylo přendáno do Eppendorf zkumavek. Poté byly vzorky zmrazeny tekutým dusíkem po dobu 5 min pro porušení buněk. Následně bylo přidáno 500 μ l 1mM HCl a vzorky byly sonikovány 2 min při 40 W. Homogenizace byla prováděna vortexováním 10 min při 400 rpm a následně centrifugována 30 min při 16400 rpm před další analýzou. Získaný supernatant (100 μ l) byl přepipetován do nových Eppendorf zkumavek se 100 μ l trifluorocetové kyseliny (20% TFA). Nařaděné vzorky byly opět centrifugovány 10 min při 16400 rpm a supernatant (20 μ l) byl použit k elektrochemické detekci.

4.1.2 Příprava vzorku z krevní plazmy

Vzorek krevní plazmy byl centrifugován na 16400 rpm 10 min, při 20 $^{\circ}C$. Další kroky pro přípravu vzorků na stanovení metalothioneinu byly prováděny na automatické pipetovací stanici. 10 μ l vzorku bylo napipetováno společně s 990 μ l fosfátového pufru pH 6,9 při teplotě 4 $^{\circ}C$ a takto připravený vzorek byl denaturován při 99 $^{\circ}C$ po dobu 20 min. Podrobnější popis nastavení jednotlivých kroků na EP Motionu je následující: 1) Metalothionein serum serie A[pozice 1-24]; 2) Počet vzorků: Variabilní maximum -24; 3) Teplota: TEMP3 stabilní +4 $^{\circ}C$; 4) Přenos čidla pomocí TS_1000 990 μ l multidisp, Tubs 1 to dwp 96; 5) Přenos vzorku pomocí TS_50 10,0 μ l pipetování do Tube 3 to dwp 96 1; 6) Teplota TEMP1 stabilní + 99 $^{\circ}C$; 7) Čekání TEMP1 15min 00sec; 8) Pipetování vzorku TS_1000 1000 μ l se pipetuje do dwp96 1 Tube 1; 9) Konec metody. Vlastní uspořádání pracovní plochy automatické pipetovací stanice ukazuje obrázek 6.

MT byl také elektrochemicky stanovován v krevní plazmě králíků, do jejichž pravého oka byla při anestezii zvířete aplikována karboplatina (0,05 mg v celkovém objemu 0,1 ml) (Krizkova, Fabrik et al. 2010). Levé oko sloužilo jako kontrolní. Krev byla odebrána z periferní ušní žilky v 0, 6, 24, 48 h, 7 a 14 dnech po aplikaci karboplatiny. Odebraná krev byla smíchána s heparinátem amonným, centrifugována 10 min při 3000 rpm pro odstranění krevní plazmy. Zkoumána byla hodnota, resp. změna hodnoty MT v závislosti na působení cisplatiny.

4.1.3 Příprava vzorků živočišných tkání

100 mg tkáně bylo smícháno s 1000 μ l fosfátového pufru o pH 7. Vzorek byl rozmixován pomocí mechanického homogenizátoru ULTRA – TURBAX T8 (IKA – WERKE) po dobu 5 min. a dále homogenizován pomocí mechanického homogenizátoru SCHUTT (na ledu). Směs byla následně vortexována po dobu 15 min. Vzorky se uchovávaly po celou dobu homogenizace na ledu. Následně byl vzorek centrifugován 20 minut při 4 °C, 16400 rpm. Po centrifugaci bylo odebráno 10 μ l vzorku, ke kterému bylo přidáno 990 μ l fosfátového pufru a následovala 20 min denaturace pomocí termobloku na 99 °C. Po denuraci byl vzorek opět centrifugován 20 minut při 4 °C, 16400 rpm. Pro elektrochemické stanovení MT byl odebrán supernatant.

Výše popsany postup byl aplikován při stanovení MT v tkáni živorodek (*Poecilia reticulata*). V tomto experimentu byly živorodky vystaveny působení Ag^+ v podobě 50 mM $AgNO_3$ (Trnkova, Fabrik et al. 2011). Živorodky byly po 4 dnech usmrceny, umyty destilovanou vodou a 0,5 M EDTA a nakonec byl vzorek tkáně (cca 0,2 g) zamražen tekutým dusíkem.

Dalším experimentem, který využil výše popsaného postupu přípravy (modifikovaného) vzorku, byl pokus, ve kterém byl zkoumán efekt selenu na antioxidační status spermatu kanců (*Sus scrofa*). 28 kanců bylo rozdělených do 4 experimentálních skupin po 7 v každé skupině. Zvířata v každé skupině přijímaly v potravě jednu z forem/dávek selenu. Sperma bylo zamrazeno. 0,5 ml rozmraženého spermatu bylo doplněno do 2 ml tekutým dusíkem a bylo přidáno 0,5 ml fosfátového pufru. Směs byla sonikována ultrazvukem 2 min při 3000 rpm. Po homogenizaci byl přidán 1 ml fosfátového pufru. Takto připravené vzorky byly dále homogenizovány vortexem při 2000 rpm po dobu 15 min. Poté byly vzorky centrifugovány (16400 rpm při 4 °C, 20 min.) a použity pro elektrochemické stanovení MT. Při analýze byla také definovaná aktivita glutathion peroxidázy, glutathion reduktázy, antioxidační kapacita, poměr mezi redukovanou a oxidovanou formou glutathionu, obsah metalothioneinu a koncentrace zinku a selenu (Horky 2012).

4.2 Spektrofotometrické stanovení proteinů

Na stanovení množství proteinů ve vzorku pomocí pyrogalové červeně byl použit automatický spektrofotometr BS-400 (Mindray, China), který se skládá z kyvetového prostoru (tem-

perovaný na $37 \pm 0,1$ °C), reagenčního prostoru s karuselem pro reagentie a přípravu vzorků (temperovaný na 4 ± 1 °C) a optického detektoru. Zdrojem světla je halogeno-wolframová žárovka. Přenos vzorků a reagentů zabezpečuje robotické rameno s dávkovací jehlou. Obsah kyvet je promíchán automatickým míchadlem ihned po přidání činidla nebo vzorku o objemu 2 - 45 μ l. Kontaminace je minimalizována díky proplachování jak dávkovací jehly, tak míchadla MilliQ vodou. Pro detekci bylo možné využít vlnových délek: 340, 380, 412, 450, 505, 546, 570, 605, 660, 700, 740, 800 nm. Zařízení je plně kontrolováno softwarem BS400 (Mindray, China).

4.2.1 Stanovení celkových proteinů pomocí pyrogalové červeně (Skalab test)

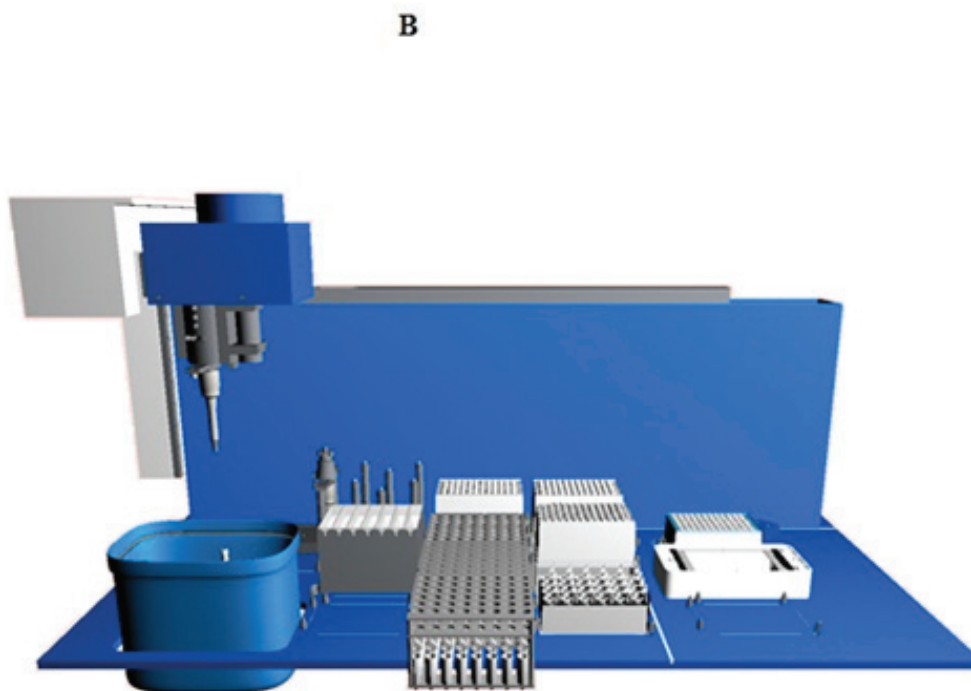
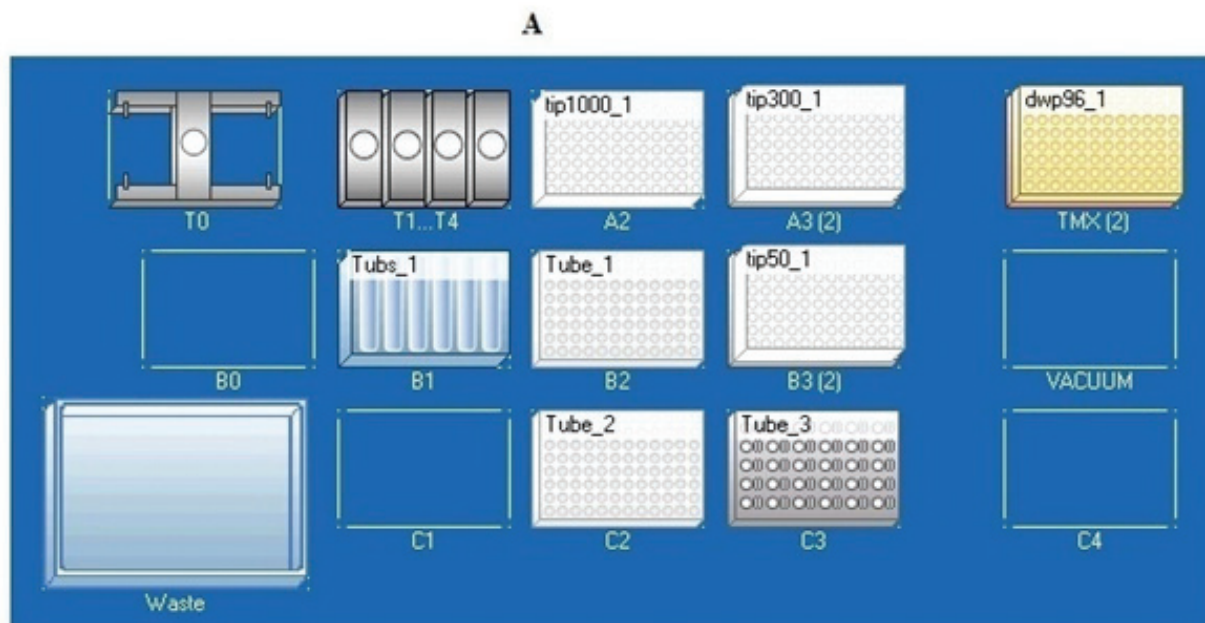
Stanovení celkového množství proteinu probíhá při vazbě komplexu pyrogallové červeně s molybdenem sodným na makromolekuly bílkovin v prostředí jantarového pufru (100 mmol/l kyselina jantarová, 6,94 mmol/l benzoan sodný, 0,12 mmol/l molybdenan sodný a 2,09 mmol/l štavelan sodný) o pH 2,5, přičemž dochází k posunu absorpčního maxima z vlnové délky 460 nm (činidlo) na vlnovou délku 600 nm (komplex činidla s bílkovinou).

Prakticky stanovení celkového množství proteinu probíhá následujícím způsobem: do plastových kyvet bylo pipetováno 150 μ l směsi reagentů R1+R2 v poměru 1:1 (50 mM kyselina jantarová, 3,47 mM benzoan sodný, 0,06 mM molybdenan sodný, 1,05 mM štavelan sodný a 0,07 mM pyrogalová červeně) pro stanovení bílkovin pomocí pyrogalové červeně. Následně bylo přidáno 8 μ l měřeného vzorku. Po 10 min inkubace při 37 °C byla změřena absorbance při vlnové délce $\lambda = 605$ nm. Pro výpočet bylo použito hodnoty absorbance samotné reagentie a hodnoty absorbance po 10 minutové inkubaci se vzorkem.

4.3 Izolace a charakterizace vzorků obsahujících MT

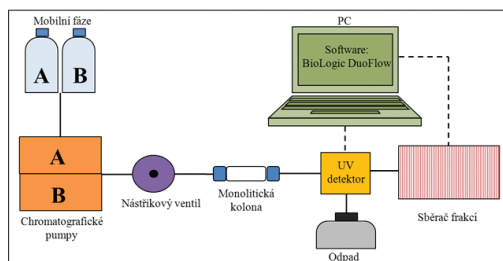
4.3.1 Izolace MT pomocí FPLC (fast protein liquid chromatography)

Systém kapalinového chromatografu Biologic DuoFlow (Biorad, USA) byl složen ze dvou chromatografických pump pro dopravu elučních pufrů, gelové filtrační kolony (HiLoad 26/60, GE Healthcare, Upsala Sweden), dávkovacího ventilu s 2 ml dávkovací smyčkou, UV- VIS detektoru a automatického sběrače frakcí (schéma viz obrázek 7). Jako mobilní fáze pro separaci MT isokratickou elucí bylo použito 150 mM NaCl v 10 mM Tris-HCl pufru (pH 8,6). Průtok mobilní fáze byl 4 ml/min. Před zahájením separace byla kolona po dobu 60 min promývána mobilní fází. Pro ověření správné funkčnosti systému byl analyzován standard proteinu BSA v koncentraci 1 mg/ml. UV detekce probíhala při 254 nm. Frakce byly odebírány od 50 min v objemu 15 ml na jednu frakci a ty byly dále analyzovány na obsah MT elektrochemicky.

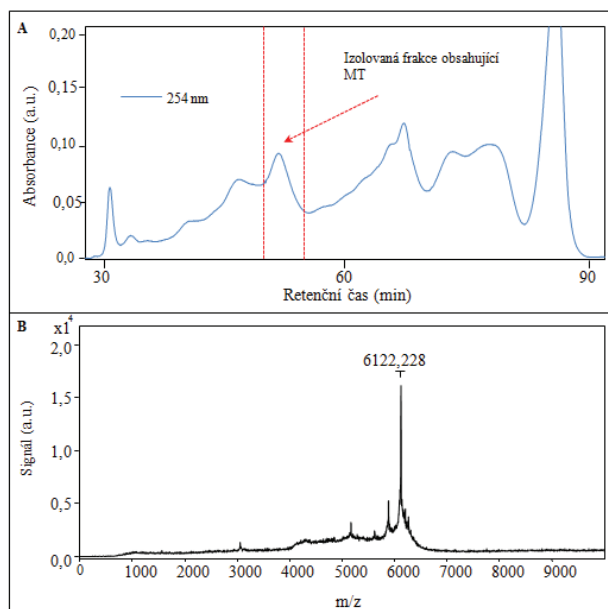


Obrázek 6: Schéma automatické pipetovací stanice: (A) Schéma worktable EP Motion 5075. Popis pozic: T0 -Chapadlo (nosnost ≤ 1200 g), T1...T4 - Dávkovací stroje: TS 1000, TS 300, TS 300/8, TS 50, tip1000_1 - epTIPS Motion 1000 μ l, tip300_1 - epTIPS Motion 300 μ l, tip50_1 - epTIPS Motion 50 μ l, Tubs_1 - Držák Eppendorf nádrží s 7 x 30 ml zásobníky (maximální objem: 30ml, pracovní objem: 25 ml, limit detekce optického sensoru: 3000 μ l), Tube_1 + Tube_2 - Stojan Eppendorf pro 96 Test Tubes (diametr 10,9 mm and max. 75 mm délka, bez regulace teploty). (B) Simulace pracovní plochy EP Motion 5075.

Celková doba analýzy byla 120 min. Na **obrázku 8A** je chromatografický záznam extrahovaného vzorku jater králíka z FPLC a na **obrázku 8B** je záznam MT detekovaného hmotnostním spektrometrem MALDI.



Obrázek 7: Schéma uspořádání instrumentace pro iontové výměnnou kapalinovou chromatografii využívající monolitickou CIM kolonu.



Obrázek 8: A) Chromatografický záznam z FPLC z extrahovaného vzorku jater králíka, který byl krmen Cd^{2+} . Separace probíhala při průtoku 4 ml/min v 10 mM Tris (pH 8,6). Vlnová délka pro detekci metalothioneinu byla nastavena na 254 nm. Metalothionein byl z kolony eluován v 50 – 55 min. Koncentrace kadmia (80 μM) byla analyzována diferenční pulsní voltametrií. B) Záznam z hmotnostního spektrometru MALDI - koncentrace izolovaného MT 11,5 μM . Jako matrice byla použita kyselina kyano-4-hydroxycinnamová (HCCA).

4.3.2 Stanovení zákalu agregační reakce albuminu s hodnocením dle inkubační doby

Bylo odebráno 19 μl krevní plazmy, ke které bylo přidáno 500 μl citrátového pufru (25,010 g kyseliny citronové (monohydrát) p.a. a 23,808 g citrananu sodného (dihydrát) p.a. /11 $\text{ACS H}_2\text{O}$). Poté bylo ke směsi přidáno 63 μl měďnatého

činidla (5,2 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ p.a. byl rozpuštěn v citratovém pufru na objem 100 ml). Směs se zahřívala na termobloku při 37 °C po dobu 20 minut. Následně byl vzorek zkontrolován, hodnocení bylo provedeno podle doby inkubace (plazma zdravých lidí vytvoří sediment do 50 minut, plazma těžce nemocných lidí vytvoří sediment až po 100 a více minutách, u nejtěžších patologických případů se objeví jen zákal). Zákal byl měřen pomocí denzitometru DEN-1 McFarland Denzitometer. Denzitometr DEN-1 je určen pro měření zákalu v rozsahu 0,3 – 5,0 McFarland (100×10^6 – 150×10^7 buňky/ml). Princip je založen na měření optické hustoty s digitálním zobrazením McFarland jednotky. Praktický postup měření denzitometrem je následující: nejprve je nutné změřit v přístroji při konstantní vlnové délce procházejícího záření ($\lambda = 565$ nm) pouze skleněnou zkumavkou, v které budou následně měřeny vzorky. Poté v dané zkumavce budou proměřeny všechny vzorky. Získáme tím hodnotu absorbance prošlého světla. Jako hodnota zákalu se udává hodnota rozdílu absorbance prošlého světla bez a se vzorkem. Jednotka zákalu je AU (absorbance unit).

4.4 Imunochemické metody

4.4.1 ELISA

100 μl standard MT nebo vzorku 1000 \times naředěného v 0,05 M uhličitánovém pufru (0,032 M Na_2CO_3 a 0,068 M NaHCO_3 , pH 9,6) bylo adsorbováno na povrch 96 jamkové polystyrenové mikrotitrační destičky (Schoeller, Česká republika) po dobu 1 h při 37 °C. Po ulynutí této doby byly jamky v destičce 5-krát promyty po dobu 5 min PBS puftrem s přidávkem 0,05% (v/v) detergentu Tween-20 (PBS-T). Volný povrch jamek byl následně blokován 1% (m/v) BSA v PBS po dobu 30 min při 37 °C. Po opakovaném pětinasobném promytí jamek pomocí PBS-T bylo do jamek přidáno 100 μl primární slepičí protilátky v ředění 1:500 v 0,1% BSA-PBS a destička byla inkubována po dobu 2 hod při 37 °C. Po promytí PBS-T bylo do jamek přidáno 100 μl králíčí protilátky proti slepičím imunoglobulinům konjugované s křenovou peroxidázou (Sigma Aldrich, USA) v ředění 1:30 000 v 0,1% BSA-PBS a destička byla inkubována po dobu 1 hod při 37 °C. Před aplikací chromogenního substrátu byly jamky v destičce promyty a inkubovány 15 min s PBS. Následně byl PBS odstraněn a do jamek bylo napipetováno 100 μl substrátového roztoku obsahujícího 0,001% (w/v) 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (TMB), 10 μl H_2O_2 (30%, v/v), 0,5 ml of 2M citrát - acetátového pufru o pH 5,8 a 10 ml deionizované vody). Po dostatečném vybarvení jamek (30 min při 37 °C) byla reakce zastavena přidávkem 50 μl 0,5 M H_2SO_4 . Absorbance byla měřena po uplynutí 20 min při 450 nm na readeru TECAN Sunrise (Švýcarsko). Měření vzorků bylo provedeno ve třech paralelách a na každé destičce byla zahrnuta kalibrační křivka standardu MT v uhličitánovém pufru a referenční jamky obsahující pouze uhličitánový pufr.

4.4.2 Dot-blot

Pro tečkovací imunovazebnou analýzu byla použita PVDF membrána (Bio-Rad, USA). 1 μl vzorku byl napipetován na membránu. Po usušení byla membrána blokována v 1% roz-

toku bovinního sérového albuminu (BSA) v PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,4 mM NaH_2PO_4 , 4,3 mM Na_2HPO_4 , pH 7,4) po dobu 30 min na třepačce. Inkubace s primární slepičí protilátkou naředěné 1:500 v 0,1% BSA v PBS trvala 1 hod při 37 °C na třepačce. Následně byla membrána 3-krát 5 min promyta v PBS-T a inkubována 1 hod úpři 37 °C na třepačce v roztoku králičí sekundární protilátky proti slepičím imunoglobulinům konjugované s křenovou peroxidázou (Sigma Aldrich, USA). Po ukončení inkubace byla membrána 3×5 min promyta v PBS-T a přenesena do roztoku chromogenního substrátu (0,4 mg/ml AEC (3-aminoethyl-9-carbazol) rozpuštěného v 0,5 M acetátovém pufru o pH 5,5 s přísávkem 0,1% H_2O_2). Po vybarvení teček (cca 10 min) byla reakce zastavena opláchnutím membrány destilovanou vodou.

4.4.3 Western-blot

Po elektroforetické separaci (SDS-PAGE, redukující podmínky, 15% gel) byly proteiny přeneseny na PVDF membránu za použití přístroje Biometra Fastblot (Biometra, Německo). Před blotováním byla PVDF membrána aktivována methanolem (30 s) a ekvilibrována 5 min v blotovacím pufru (12,5 mM Tris-báze, 75 mM glycin a 15 % (v/v) methanol). Blotovací sendvič byl sestaven ze tří vrstev filtračního papíru nasáknutého blotovacím pufrem, membrány, gelu a dalších tří vrstev filtračního papíru. Blotování probíhalo při laboratorní teplotě po dobu 45 min při konstantním proudu 0,9 mA na 1 cm² membrány. Po přenosu byla membrána blokována pomocí 1% BSA v PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,4 mM NaH_2PO_4 , a 4,3 mM Na_2HPO_4 , pH 7,4) po dobu 30 min. Inkubace s primární slepičí protilátkou ředěnou 1:1000 v 0,1% BSA v PBS probíhala po dobu 12 hod při 4°C na třepačce. Poté byla membrána 3×5 min opláchnuta v PBS-T a inkubována 1 hod s králičí protilátkou proti slepičím imunoglobulinům konjugovanou s křenovou peroxidázou ředěnou 1:6000 v 0,1% BSA v PBS. Po trojnásobném promytí v PBS-T byla membrána inkubována v substrátovém roztoku (0,4 mg/ml AEC - 3-aminoethyl-9-carbazol v 0,5 M acetátovém pufru s přísávkem 0,1% H_2O_2 , pH 5,5), dokud nedošlo k vybarvení bandů (cca 10 min), reakce byla poté ukončena opláchnutím membrány destilovanou vodou.

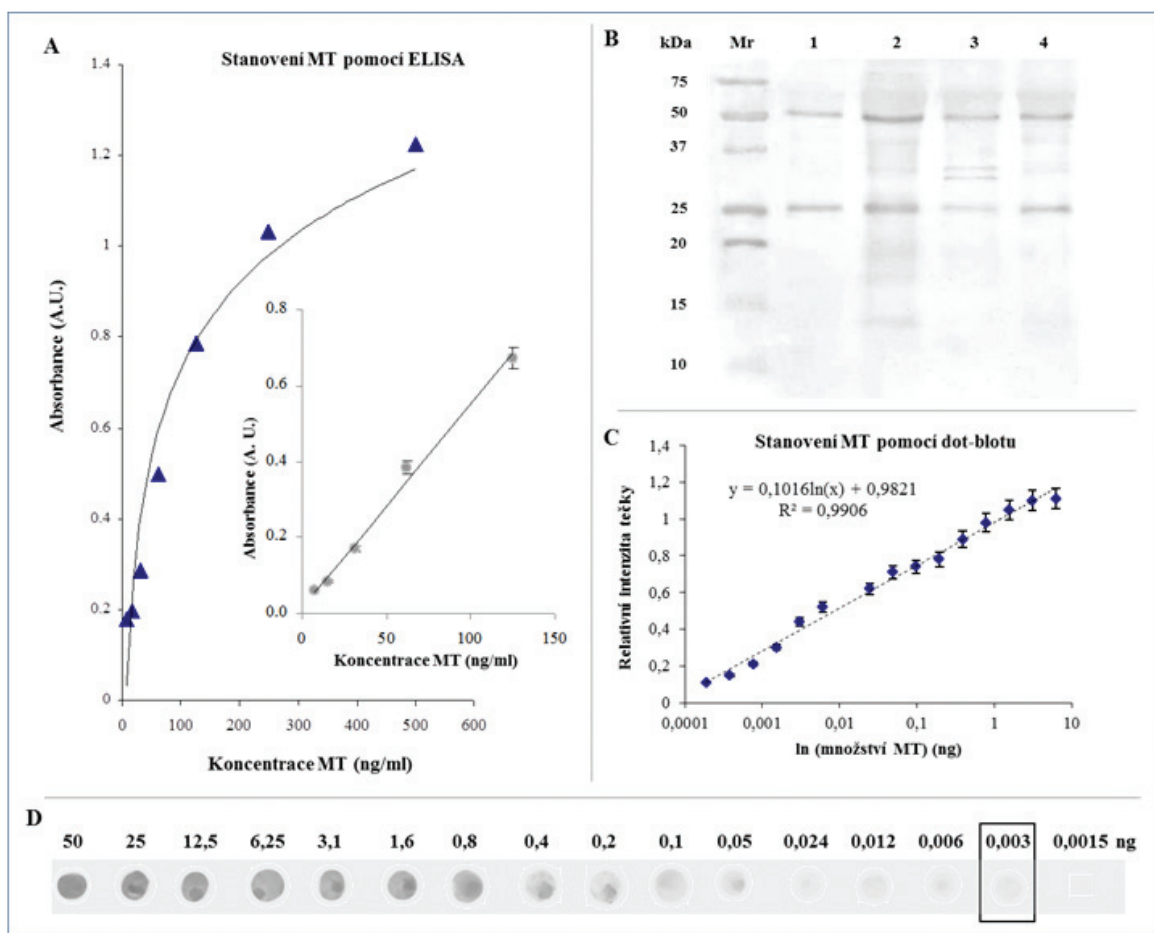
4.5 Optimalizace automatické elektrochemické detekce

Měření probíhalo na automatizovaném elektrochemickém analyzátoru skládajícího se ze tří modulů: z Autosampleru 695, 747 VA Standu a 693 VA Trace Analyzeru (Metrohm, Švýcarsko). 747 VA Stand je polarograf s vestavěným potenciostatem/galvanostatem se standardním tříelektrodoým zapojením. Odeslaná data vyhodnocuje 693 VA Trace Analyzer, který je schopen plně automatické analýzy výsledků (od vyhodnocení kalibrační křivky až po odečtení koncentrací ze vzorků). Výsledky mohou být přeposlány i do PC. 695 Autosampler se stará o automatické nadávkování vzorku do měřící nádoby 747 VA Stand s elektrolytem. Přístroj je jako jeden z mála schopen nabírat velmi malé objemy vzorku (řádově jednotky μl). O přesné dávkování se starají dávkovací smyčky o maximálním objemu 100 μl pro větší množství vzorku a

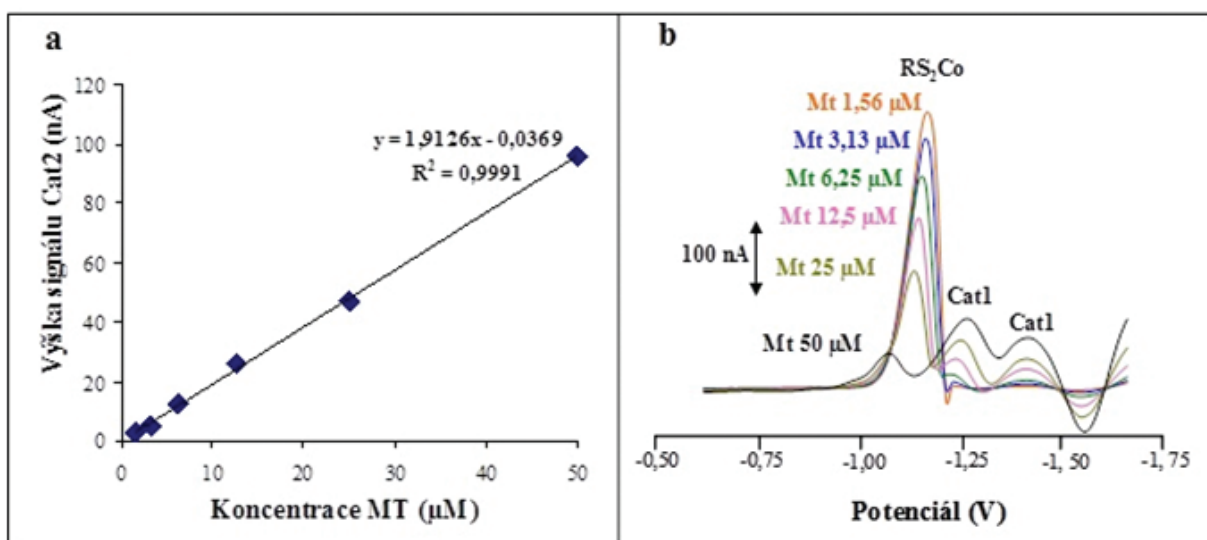
dávkovací smyčky s maximálním objemem 10 μl pro precizní odběry malých objemů. Kapilára určená k odběru vzorku je řízena vzduchovou pumpou, která jí dovoluje rozpoznat hladinu kapaliny a brání tak zbytečnému opotřebení přístroje. Mikrozkumavky se vzorky jsou umístěny v zásobníku na vzorky naší konstrukce, který je vybaven chladicím zařízením a udržuje vzorky při konstantní teplotě (4 °C), čímž chrání vzorky před tepelným znehodnocením. Na chlazení zásobníku na vzorky je též napojeno chlazení elektrolytu v měřící nádobce a zásobníku pro elektrolyt (JULABO Labortechnik, Německo). Čerpání elektrolytu a oplachové vody (Mili Q voda, Millipore Corp., USA, 18 M Ω) či následně jejich odvod je zajištěn automatickými byretami Dosino 300 (Metrohm, Švýcarsko) o objemech 20 ml (elektrolyt) a 2 x 50 ml (oplachová voda a sběr odpadu).

4.5.1 Měřící postup

Po vynulování nastavení všech automatických byret je napuštěn do měřící nádoby elektrolyt (1mM $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ a 1mM amonný pufr NH_3 (aq) + NH_4Cl , V = 1,995 μl). Následuje odběr vzorku pomocí 695 Autosampleru; objem vzorku je standardně 5 μl , ale lze pipetovat i objemy větší. Nejprve je kapilára omyta vodou, poté je odebrán určený objem vzorku ze zásobníku. Po dalším omytí je vzorek nadávkován do měřící nádoby. Samotné měření je započato vnesením proudu argonu do elektrolytu (20 s) pro dostatečné promíchání vzorku v základním elektrolytu. Následuje vytvoření pracovní elektrody (HMDE) a akumulace vzorku na povrchu pracovní elektrody (E = 0 V, 120 s). Začátek záznamu je nastaven na počáteční potenciál -0,7 V, konečný potenciál je -1,75 V, modulační čas 0,057 s, časový interval 0,2 s, potenciálový krok 2 mV, modulační amplituda -250 mV, Eads = 0 V a objem vstřikovaného vzorku 5 μl . Objem Brdičkova roztoku použitého pro stanovení jednoho vzorku je 1995 μl . Tento měřící cyklus je opakován pětkrát, po pátém proměření vzorku je objem měřící nádoby odsát odpadovou byretou a nádobka promyta Mili Q vodou (3 x 25 ml), čímž je elektrochemická cela připravena k dalšímu měření. Naměřená data byla exportována do softwaru VA Database 2.2 (Metrohm, Švýcarsko) a vyhodnocena v programu Matlab. Kalibrační křivka metody je na **Obr. 10**. Pro stanovení koncentrace MT ve vzorku se vyhodnocuje výška píku Cat2, který má své maximum při potenciálu -1,4 V.



Obrázek 9: Kalibrační křivka stanovení MT pomocí ELISA (A). Detekce MT pomocí western-blotu (B), Kalibrační křivka stanovení MT pomocí dot-blotu (C). Dot-blot detekce MT (D).



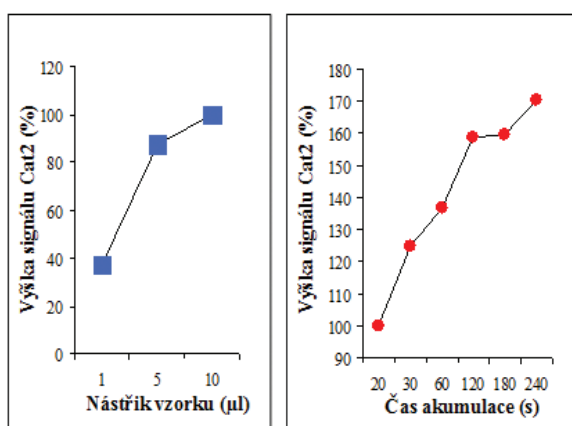
Obrázek 10: (A) Kalibrační křivka měřená DPV, jako elektrolyt byl využit Brdičkův roztok. (B) Voltamogram standardů MT získaných při měření kalibrační křivky.

4.5.2 Objem nadávkovaného vzorku

Optimální objem vzorku vloženého do měřicí nádoby s elektrolytem je omezen na jedné straně chybou v dávkování přístroje, na druhé straně pak snahou o co nejmenší objem odebraného vzorku. Nástřik 5 μl byl zvolen jako kompromis všech požadavků na objem dávkovaného vzorku (dobrá odezva signálu s co nejmenším objemem použitého vzorku) (Obr. 11). Chyba stanovení je u dávkovaného objemu 5 μl 4,3%.

4.5.3 Čas akumulace

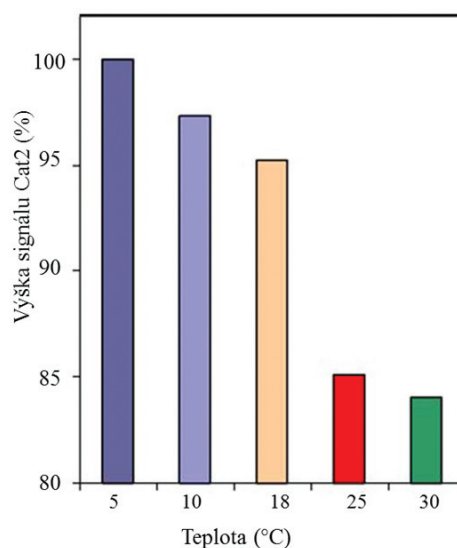
Při optimalizaci akumulace na HMDE při nulovém potenciálu byl kladen důraz na velikost signálu. Při pětinašobném opakování měření ve stejném elektrolytu při zachování dlouhé akumulace dochází k nadměrnému úniku NH_3 a zeslabování signálu pozdějších měření téhož vzorku. Zvolená délka akumulace, $t = 120$ s, je tedy kompromisem mezi intenzitou signálu a co nejkratší dobou potřebnou ke změření vzorku v elektrolytu (Obr. 12).



Obrázek. 11, 12: Závislost výšky píku signálu Cat2 na dávkovaném objemu (modrá závislost). Závislost výšky signálu Cat2 na čase akumulace (100 % odpovídá 20 s akumulace, červená závislost).

4.5.4 Vliv teploty na výšku Cat2 píku

Protože výška signálu Cat2, která odpovídá koncentraci MT, je závislá na teplotě, byl studován také vliv teploty. MT (40 fmol) byl adsorbován 120 s na povrchu HMDE, elektroda byla následně omyta a elektrochemické stanovení bylo provedeno za přítomnosti Brdičkovy roztoku při různých teplotách (5, 10, 18, 25 a 30°C). Bylo pozorováno snížení Cat2 signálu o 0,6% na jednotku stupně Celsia (Obr. 13). Z tohoto důvodu byla zvolena teplota 4 °C jako nejvhodnější teplota pro stanovení MT Brdičkovou reakcí (Petrlova, Potesil et al. 2006).



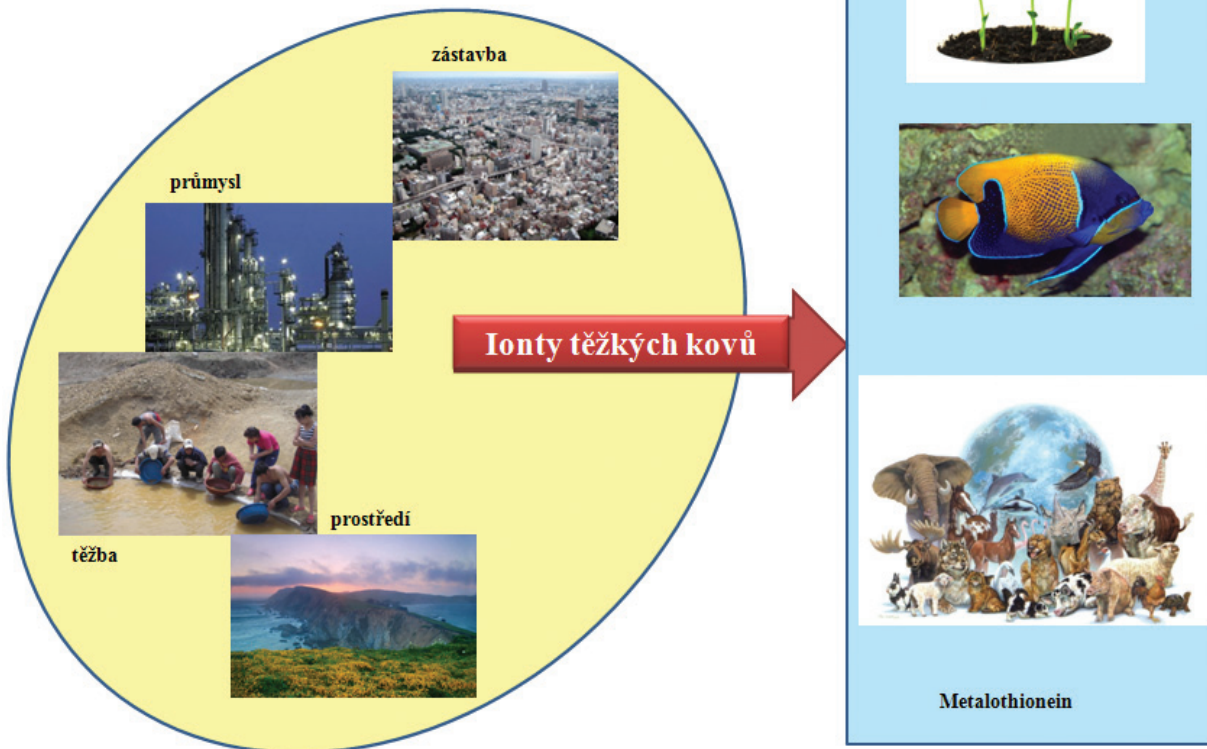
Obrázek 13: Závislost výšky signálu Cat2 na teplotě; koncentrace MT byla 40 fmol (Petrlova, Potesil et al. 2006).

4.5.5 Vyhodnocení naměřených dat

Koncentrace MT byla kvantifikována pomocí kalibrační křivky standardu MT. MT při elektrochemickém stanovení v Brdičkově roztoku poskytuje čtyři píky při různých potenciálech. Ke stanovení koncentrace MT byl zvolen jako nejvíce vypovídající pik Cat2 při potenciálu -1,4 V. Výška tohoto píku se mění lineárně s koncentrací MT (Obr. 10A) a proto podle výšky tohoto píku je stanovována koncentrace MT v neznámém vzorku.

4.6 Výsledky pro využití metodiky v životním prostředí

Metalothionein je velmi často spojován s působením stresových faktorů na organismus. Mezi tyto stresory patří velmi často také těžké kovy. Stejně jako je různá distribuce MT v organismu, tak je různá i distribuce MT, včetně jeho isoform. Stanovení MT se proto různí dle zvoleného zdroje vzorku: játra, ledviny, mozek, krev, krevní sérum, kosti, atd. Následující členění kapitol zohledňuje právě zdroj vzorku pro analýzu MT.



Obrázek 14: Schéma zatížení oblastí životního prostředí s vazbou na MT.

4.6.1 Konkrétní přístupy využití metodiky v hodnocení životního prostředí ionty těžkých kovů

Jako modelové organismy pro studium znečištění životního prostředí byly zvoleny supi, kapři a netopýři.

4.6.1.1 Přístup 1: akutní intoxikace olovem u supa

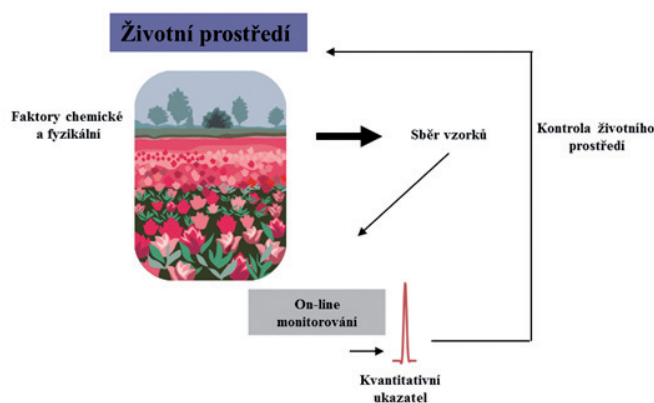
Analýza krve: Pro stanovení olovnatých a kadmnatých iontů a MT v krvi a vejcích supů (sup mrchožravý (*Neophron percnopterus*), sup hnědý (*Aegypius monachus*)) náhodně otrávených barevnými nátěry lze využít elektrochemickou metodu a pro stanovení Ca, Mg, Fe, Zn a Cu spektrometrickou (Hynek, Prasek et al. 2011). V případě popsaného experimentu byly jako kontrolní sada použity vzorky z neotrávených supů (*Aegypius monachus*). Na základě získaných výsledků vyplývá, že hladina iontů olova (Pb^{2+}) se u otrávených supů pohybovala v rozmezí 1-5 $\mu\text{g/ml}$ krve. Dále bylo elektrochemicky stanoveno Cd a spektrometricky Ca, Mg, Fe, Zn a Cu. Bylo potvrzeno, že metalothionein souvisí s ochrannou organismů proti kovovým iontům. Výsledný obsah MT byl $1,82 \pm 0,31 \mu\text{g/mg}$ proteinů u otrávených supů ve srovnání s kontrolní skupinou ($0,71 \pm 0,19 \mu\text{g/mg}$ proteinů), což znamená, že hladina MT byla zvýšená o více než 250 %.

Analýza orgánů: Pro stanovení olovnato-indukovaných komplexů (Pb^{2+}) lze použít embrya supů, z nichž jako vhodné orgány pro další analýzu se jeví játra, ledviny, kosti, žloutek a bílek z vajec a mozek embrya. Jako kontrolní vzorky byla použita slepičí vejce. Kontrolní vzorek byl vždy připraven za stejných podmínek (Hynek, Krejčova et al. 2012). Nejvyšší obsah olovnatých iontů byl pozorován v játrech a ledvinách (cca 5 $\mu\text{g/g}$ tkáň). Nejvyšší obsah MT byl stanoven v bílku (více než 12 $\mu\text{g/g}$), dále v žloutku a ledvinách, nejnižší pak v játrech. Tyto velmi zajímavé výsledky ukazují na vysoce aktivní obranu embrya proti Pb^{2+} .

4.6.1.2 Přístup 2: akutní intoxikace kadmíem u kapra

Analýza orgánů: Pro analýzu vlivu kadmia (v podobě CdCl_2 přidávaného do vody) na hladinu metalothioneinu u kaprů (*Cyprinus carpio*) lze využít postup publikovaný v článku (Kovarova, Kizek et al. 2009). Kapři byli vystaveni působení CdCl_2 v koncentracích 0; 2,5; 5; 7,5; 10 a 12,5 mg/l po dobu 24, 48, 72 a 96 h. V obrázku 16 jsou prezentovány naměřené koncentrace metalothioneinu v játrech těchto kaprů. Z výsledků vyplývá, že kovy mohou indukovat syntézu MT, což zvyšuje vazebnou kapacitu kovu a detoxikační schopnost organismu. Výše popsané závisí na mnoha faktorech jako na druhu a stáří ryb, podmínkách expozice, časovém období a na zdroji kadmia. Bylo potvrzeno, že koncentrace buněčných stresových proteinů (včetně MT) je dobrým ukazatelem znečištění vody. Výsledky ukazují postupné zvyšování kadmia ve svalech s dobou jeho působení. Hladina MT dosáhla vysoké hodnoty (nad 130 ng/g) při působení 2,5; 5 a 7,5 mg/l a nízké hladiny

(50 ng/g) při působení 10 a 12,5 mg/l CdCl₂. Toto zjištění potvrzuje, že syntéza MT a vazebná kapacita tohoto proteinu je omezena. Z obrázku 16 je zřejmé, že hladina MT je nejvyšší ve skupině vystavené 5 mg/l a 2,5 mg/l kadmia po dobu 48 h, 7,5 mg/l kadmia po dobu 72 h. Nejnížší hodnoty byly zjištěny u kontrolních skupin a skupin vystavených 12,5 mg/l Cd. Signifikantní rozdíly byly zjištěny mezi kontrolní skupinou a skupinou vystavenou 5 mg/l Cd, mezi skupinou vystavenou 5 mg/l a 12,5 mg/l Cd po dobu 24 h, dále mezi kontrolní skupinou a skupinou s 2,5 a 5 mg/l Cd (působení 48 h), mezi 5 mg/l a 7,5 mg/l, mezi 7,5 mg/l a 12,5 mg/l (72h) a mezi kontrolní sadou a 5 mg/l Cd při působení 96 h.



Obrázek 15: Schéma výskytu MT v životním prostředí.

4.6.1.3 Přístup 2: akutní intoxikace selenitých ionty u divokých kanců

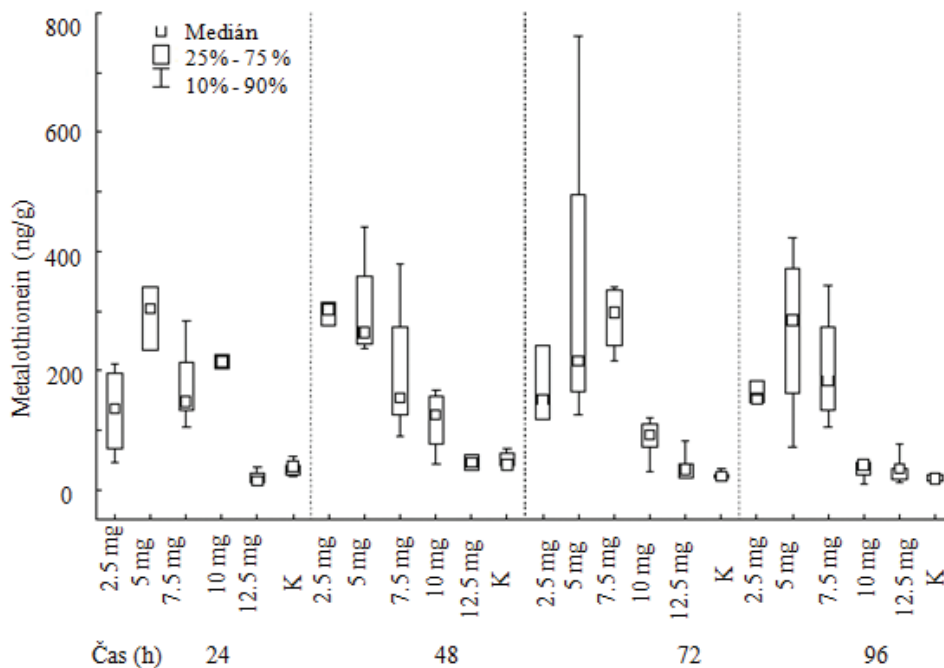
Analýza sperma: Efekt selenu na antioxidační status kanců (*Sus scrofa*) lze zkoumat elektrochemickým stanovením MT, Se a Zn. V dané sadě bylo 28 kanců rozděleno do 4 experimentálních skupin. Zvířata v každé skupině přijímala v potravě jednu z forem/dávek selenu. Použité varianty byly následující: organická forma selenu (0,3 a 0,6 mg Se/kg potravy) a anorganická (0,3 a 0,6 mg Se/kg potravy). Od každého kance byly v daném časovém úseku odebrány 3 vzorky spermatu. Kontrolní odběr byl odebrán před zahájením podávání Se v krmivu. Ve vzorcích byl sledován obsah metalothioneinu a koncentrace zinku a selenu (Horky 2012). Získané výsledky jsou prezentovány na **obrázku 17**. Zde je prezentován efekt selenu na množství zinku a MT ve spermatu kanců: skupina 1 – 0,3 mg Se/kg potravy (organická forma); skupina 2 – 0,3 mg Se/kg (anorganická forma); skupina 3 – 0,6 mg Se/kg (anorganická forma). Závěrem lze říci, že skupina kanců, jejichž krmivo bylo obohaceno o 0,3 mg Se/kg krmiva v anorganické formě, prokazuje snížení produkce spermií. Zvířata, jež měla krmivo obohaceno o 0,6 mg Se/kg krmiva organické formě, mají vyšší úroveň Se v ejakulátu. Nebyla zjištěna žádná korelace mezi MT a Zn.

4.6.1.4 Přístup 4: akutní intoxikace netopýrů ionty těžkých kovů

Analýza orgánů: Účelem této studie (Pikula, Zukal et al. 2010) bylo kvantifikovat koncentrace těžkých kovů (Pb a Cd) v ledvinách, játrech a prsních svalech ve vztahu k MT v krvi. Bylo zkoumáno celkem 106 netopýrů z 11 evropských druhů (tj., *Myotis myotis*, *Myotis daubentonii*, *Myotis brandtii*, *Myotis nattereri*, *Myotis emarginatus*, *Myotis mystacinus*, *Pipistrellus pipistrellus*, *Pipistrellus nathusii*, *Pipistrellus pygmaeus*, *Nyctalus noctulla*, *Eptesicus serotinus*). Nejvyšší hladiny MT byly nalezeny v *Pipistrellus pipistrellus*. Vysoké hladiny MT byly také zjištěny u juvenilních netopýrů a netopýrů, kteří se žijí vodním hmyzem. Kadmium bylo zjištěno pouze v játrech a ledvinách *Myotis myotis*, s výjimkou jednoho nálezu *Pipistrellus pipistrellus*. Mláďata *Myotis myotis* měla signifikantně vyšší hladinu Zn v játrech a ledvinách než dospělí. Zajímavé je, že koncentrace Pb v játrech byla přibližně dvakrát vyšší u samic než u samců druhu *Myotis myotis*. Stejný rozdíl mezi pohlavími byl nalezen v případě koncentrace Zn v ledvinách *Pipistrellus pipistrellus*. Tato studie potvrzuje expozici netopýrů toxickými těžkými kovy (Pb, Cd) v České republice a poskytuje údaje o obsahu MT v tkáních netopýrů.

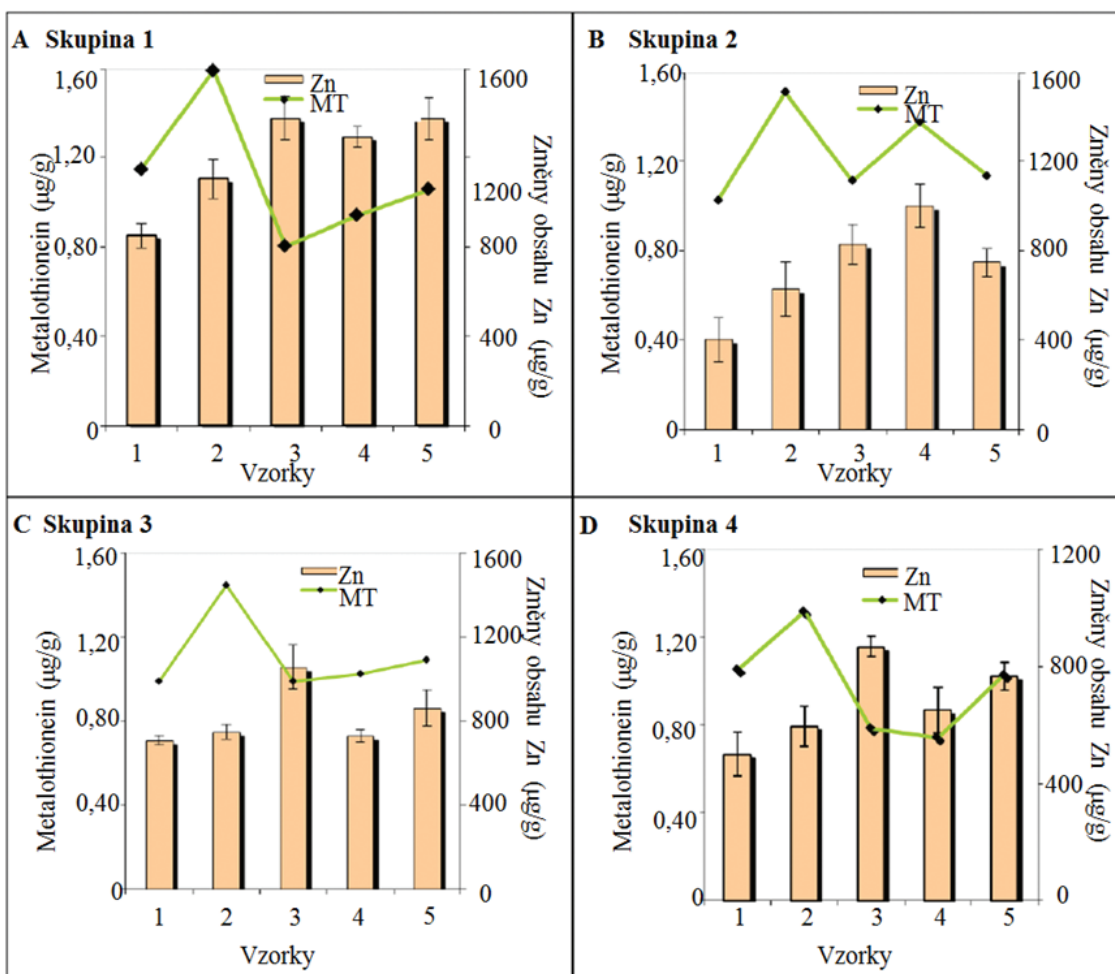
4.6.1.5 Přístup 5: akutní kontaminace laboratorních potkanů deoxynivalenolem

Analýza orgánů: Cílem této studie (Sobrova, Vasatkova et al. 2012) bylo zjistit vliv deoxynivalenolu (DON, lidského mykotoxinu) kontaminujícího zaplíněné obilí na zdravotní stav potkanů a jejich schopnost odolávat oxidačnímu stresu. Potkani byli krmeni krmivem obsahujícím DON spolu s organickou a anorganickou formou Zn²⁺ a vitamíny po dobu 28 dní. Studie se zaměřuje zejména na zkoumání ochranných mechanismů před nepříznivými účinky xenobiotik, úroveň redukováného glutathionu a MT. Nejvyšší množství bylo obsaženo v játrech (6,7 µg/l) a ledvinách (6,1 µg/ml) jakožto orgánech zabezpečující detoxifikaci xenobiotik. Jejich množství bylo až dvojnásobné oproti ostatním orgánům. Zvýšenou hladinu taktéž vykazovala plazma (4,9 µg/ml) a slezina (4,2 µg/ml). Podobná hladina je nejspíše dána funkcí sleziny jako rezervoáru krve. Slezina se téže podílí na imunitní obraně organismu, a v ní detekovaná zvýšená hladina MT může být odezvou na imunosupresivní vlastnosti DONu. Hladiny MT obsaženy ve zbývajících orgánech se už příliš nelišily a pohybovaly se v rozmezí 3,0 ± 0,1 µg/ml. Koncentrace MT v mozku se pohybovala okolo 3,1 µg/ml. Tato hladina odpovídá pouze isoformě MT-3, která se jediná vyskytuje v mozku. Hodnota MT srdečního svalu (bez krve) je blízká hodnotě MT ve svalu z důvodů jejich podobné fyziologické funkce činnosti svalové tkáně. Dalším testovaným parametrem byl vliv zinečnatých iontů na množství MT. Skupiny, jejichž krmná dávka byla obohacena zinkem, měly vyšší hladinu MT u zinku podávaného v organické formě oproti formě anorganické. Je známo, že zinek indukuje tvorbu MT, avšak u skupin, u nichž byl podáván DON, se toto množství snižovalo. To může být následkem možné interakce mezi zinkem a DONem, případně interakcemi mezi zinkem a biomolekulami, které chrání buňku před toxickým působením mykotoxinu. Závěrem



Obrázek 16 (nahore): Závislost zjištěné koncentrace MT v játrech kaprů na množství podávaného chloridu kadmianého a délce působení kadmia na kapry.

Obrázek 17 (dole): Závislost koncentrace MT a Zn na podávaném množství Se v krmivu kanců. (A) Skupina 1 -0,3 mg Se/kg v organické formě; (B) Skupina 2 -0,3 mg Se/kg v anorganické formě; (C) Skupina 3 -0,6 mg Se/kg v organické formě; (D) Skupina 4 -0,6 mg Se/kg v organické formě.



lze říci, že MT hraje důležitou roli při detoxikaci mykotoxinů. I když jeho role není zcela známa, MT je rozhodující pro přerozdělení iontů důležitých pro transkripční faktory a jejich interakce s volnými kyslíkovými radikály, tvořenými působením mykotoxinů.

4.7 Stanovení MT jako proliferačního markeru

Metalothionein je studován jako nádorový marker. Jeho hodnota se odvíjí od stádia rakovinového bujení a velikosti nádoru. Stanovit MT lze opět mimo krev i z dalších orgánů jako např. z mozku, kosti, jater, atd. Následující členění kapitol zohledňuje právě zdroj vzorku pro analýzu MT.

4.7.1 Konkrétní přístupy využití metodiky v hodnocení MT jako proliferačního markeru

Jako modelové organismy pro studium MT jako proliferačního markeru byli použiti potkani kmene Wistar Albino, myši a prasata linie MeLiM.

4.7.1.1 Přístup 1: studium MT při obohacení stravy selenem na laboratorních potkanech

Analýza orgánů: Studium selenu a jeho dopad na metabolické procesy a vybrané antioxidanty lze zkoumat na laboratorních potkanech. Zkoumaná skupina byla tvořena 80 samci bezpatočenného chovu kmene Wistar Albino, kteří byli rozděleni po 16 do 5 skupin. První skupina byla kontrolní, nebylo jí podáváno krmivo se selenem. Testované skupině nazvané „anorganický 50%“ bylo podáváno krmivo se Se v podobě selenitu sodného (0,078 mg Se na kg krmiva). Další skupině, označené „organický 50%“ byl do krmiva přidáván Se v podobě selenomethioninu. Čtvrtou skupinou jsou potkani, kteří byly krmeny krmivem obsahujícím selenit sodný – 1,5 mg na kg krmiva, označené jako „anorganický 1000%“. Krmení v poslední skupině bylo obohaceno 1,5 mg selenomethioninu na kg krmiva – „organický 1000%“. Z každé skupiny byla dvě zvířata usmrcena po 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19 a 22 dni krmení daným krmivem. Byly odebrány a dále zkoumány tyto části z potkaních těl: stehenní sval, játra, mozek a ledviny. Supernatant připravený podle postupu popsaného v kapitole 4.1.3 byl použit pro elektrochemické stanovení MT pomocí Brdičkova roztoku (Sochor, Pohanka et al. 2012). Na obrázku 19 jsou prezentovány závislosti obsahu metalothioneinu na formě podávaného selenu. Z obrázku vyplývají následující závěry: MT klesá s délkou působení Se v játrech, ledvinách a svalcích. Hladina MT klesne ve srovnání s hodnotami na počátku experimentu o 20 %. MT v mozku klesl ve srovnání s ostatními orgány pouze v první části experimentu. U zvířat, jejichž strava byla obohacena o anorganickou i organickou formu Se – 50 % a anorganickou formu Se -1000 %, byla hodnota MT ke konci pokusu na stejné hodnotě jako na začátku pokusu. Oproti tomu v případě Se -1000 % v organické formě hodnota MT klesla o 30% při měření MT v mozku. Oproti tomu v ostatních orgánech hladina MT s průběhem experimentu klesla a to pro všechny zkoumané varianty Se. Výsledky uve-

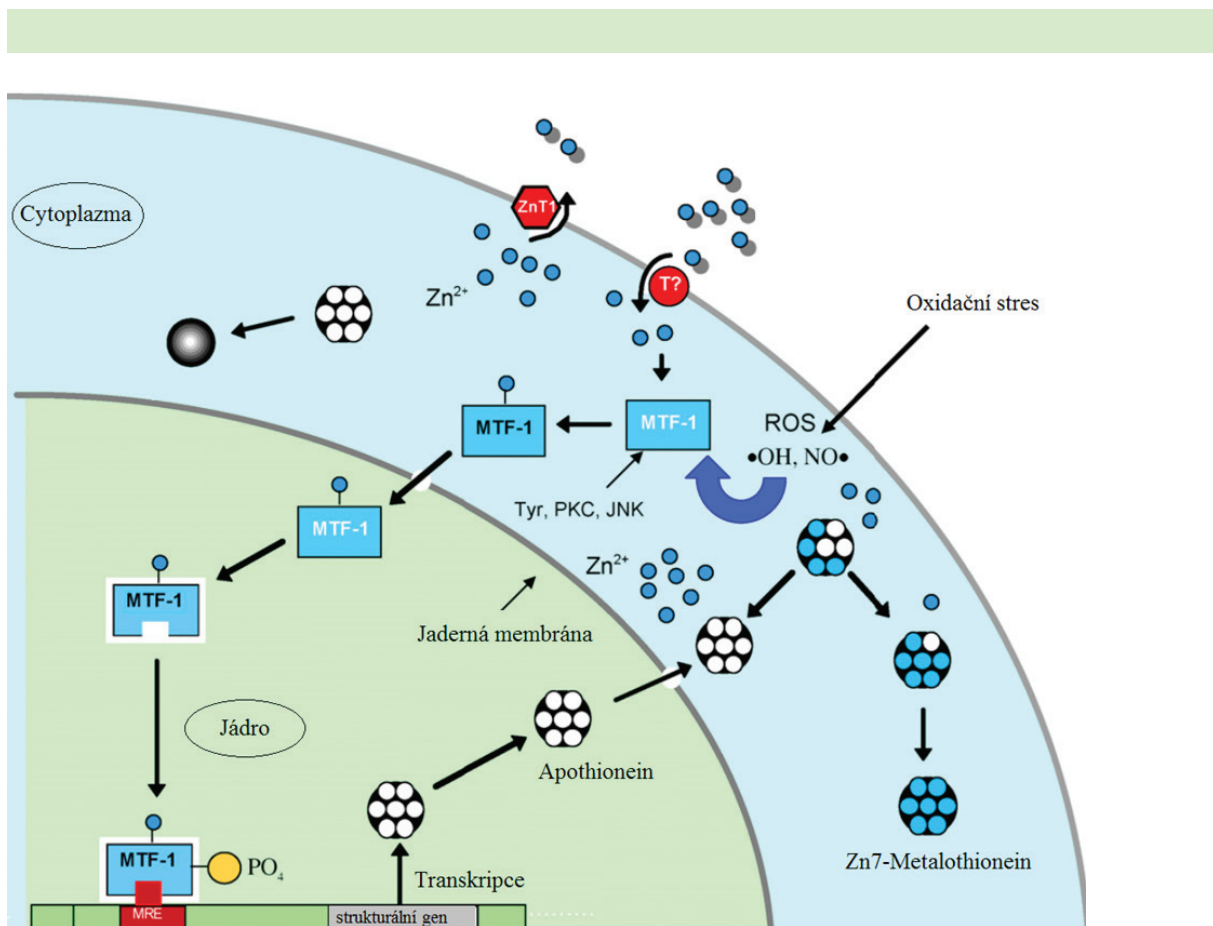
dené v článku potvrzují předpoklad, že se snižující se hodnotou MT je redukován oxidační stres vyvolaný působením Se.

4.7.1.2 Přístup 2: studium MT při obohacení stravy o vitamíny a houby na laboratorních potkanech

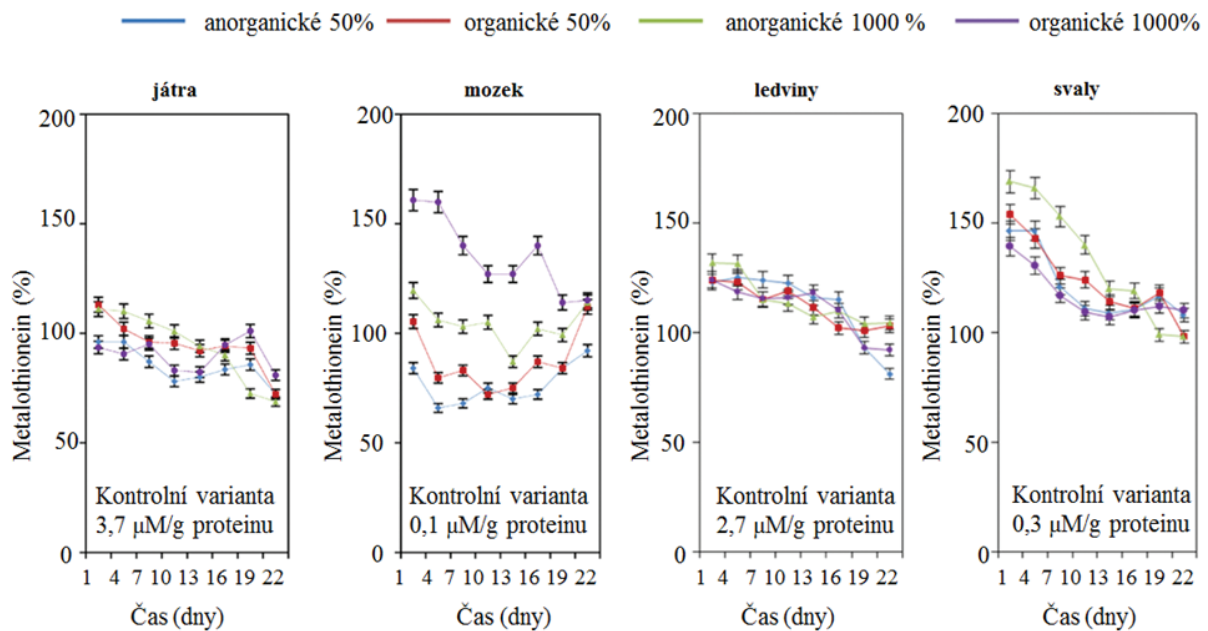
Analýza orgánů: Metalothionein byl stanoven v mozkové tkáni 28 denních laboratorních potkanů Wistar albino (samců), kteří byli 28 dní živeni krmivem obohaceným o různé obsahy vitamínů, přirozeně plesnivou moukou nebo plísněmi. Tkáň z mozku potkanů byla odebrána na analýzu pomocí diferenční pulsní voltametrie a Brdičkova elektrolytu byl elektrochemicky stanoven MT (Vasatkova, Krizova et al. 2009). Bylo zjištěno, že hladina MT v mozku potkanů byla vyšší při podávání standardní krmné směsi než směsi doplněné vitamíny. Dále byl studován vliv přirozeně plesnivé pšenice. Byla v ní detekována přítomnost následujících druhů plísní: *Mucor* spp, *Absidia* spp, *Penicillium* spp. Navíc byly také identifikovány a kvantifikovány následující mykotoxiny: deoxynivalenol, zearalenon, T2-toxin a aflatoxiny. Úroveň MT stanovená na potkanech krmených 33% nebo 66% plesnivé pšenice byla výrazně nižší ve srovnání s kontrolami. Na druhé straně u potkanů krmených 100% plesnivou pšenicí byla hladina MT nižší. U potkanů, kteří byli živeni plesnivou pšenicí obohacenou o vitamíny, byl zjištěn nepříznivý efekt ve srovnání s potkany živenými jen plesnivou pšenicí bez vitamínů. Mykotoxiny a vitamíny mají významný vliv na hladinu MT v mozkové tkáni.

4.7.1.3. Přístup 3: studium MT při působení cytostatik na králíky

Analýza orgánů: Vliv cytostatik lze zkoumat přímo na živočiších, jak je popsáno ve studii autorů (Krizkova, Fabrik et al. 2010), kde byla u králíků provedena jednostranná intravitreální aplikace cisplatinu (0,05 mg v celkovém objemu 0,1 ml). Zkoumána byla hodnota, resp. změna hodnoty MT v závislosti na působení cisplatinu. Byl studován vliv délky působení karboplatinu na hodnotu MT. MT (0,4 mg/ml) byl využit pro studium interakce s cisplatinou a karboplatinou. Ze získaných výsledků vyplývá, že katalytický signál Cat2 klesá s rostoucí interakcí času. Po 20 minutách signál Cat2 poklesl o více než 60% v případě obou cytostatik. U obou léčiv byly získány podobné výsledky, ale pokles signálu byl rychlejší u cisplatinu, kde po 15 min interakce nebylo pozorováno žádné další snížení signálu. Pro karboplatinu pokles signálu byl pomalejší a snížení signálu byl kompletní po 20 minutové interakci. Byly zjištěny tyto skutečnosti: na začátku byla úroveň MT asi 3,5 μ M u zdravých králíků, po aplikaci cisplatinu došlo k výraznému zvýšení hladiny MT u všech pokusných zvířat a to na hodnotu vyšší než 5 μ M. Zvýšená hladina MT byla zaregistrována následujících 7 dní u všech pokusných zvířat. Mírný pokles v úrovni MT byl pozorován po 14 dnech od aplikace cisplatinu. Tímto experimentem byla potvrzena hypotéza, že se hladina MT výrazně zvýší po aplikaci Pt-cytostatik, což naznačuje možnou roli MT v odpovědi na terapii platinovými cytostatiky.



Obrázek 18: Výskyt MT a jeho signální dráha v organismu.



Obrázek 19: Hladina MT ve zkoumaných orgánech: Hladina byla porovnána vůči kontrole. Chybové úsečky označují směrodatnou odchylku ze tří měření. Metallothionein byl stanoven pomocí diferenční pulsní voltametrie v Brdičkově roztoku. Výsledky MT byly vztaženy ke kontrolní skupině a přepočteny v procentech. Kontrolní skupina měla hodnotu 100 % z hodnot získaných pro 3,7 μM – játra, 0,1 μM – mozek, 2,7 μM – ledviny, 0,3 μM – svaly.

4.7.1.4 Přístup 4: monitorování iontů železa jako doplněk k pochopení zhoubného onemocnění

Analýza krve: U erytrocytů z prasat s melanomem (rakovinová linie MeLiM) bylo elektrochemicky stanoveno železo. Periferní krev byla odebrána u 8 prasat s melanomem a 8 kontrolních. (Kremplova, Krejčova et al. 2012). Daný experiment byl prováděn na stacionárním elektrochemickém analyzátoru. Obecně tyto analyzátory mají spoustu výhod, například v podobě nízkých nákladů, vysoké citlivosti a opakovatelnosti. Na druhé straně neautomatizované vstříkávání vzorků patří mezi hlavní nevýhody elektrochemických technik. Vzhledem k této skutečnosti jsme se zaměřili na testování nového elektrochemického systému, což nám umožnilo aplikovat jednotky vzorku v μl a při tom chladit vzorek v zásobníku. Pro otestování navrženého systému byla měřena koncentrace železa v krevních vzorcích prasat MeLiM. Nejprve byl optimalizován vhodný elektrolyt (0,1 M KBrO_3 + 0,3 M NaOH + 0,01 M TEA, pH 11) a depoziční potenciál 0 V. Také příprava erytrocytů byla optimalizována. Byly zkoumány změny v obsahu železa u kontrolní skupiny (10 $\mu\text{g Fe/ml}$) a skupiny zvířat trpících melanomem (3,5 $\mu\text{g Fe/l}$) a jejich vzájemný vztah s MT. Obsah MT vzrostl u skupiny s melanomem o 43,4 % oproti kontrolní skupině. Touto studií byl potvrzen vztah mezi ionty železa a rakovinovým markerem. Lze říci, že monitorování iontů železa představuje doplňující informaci pro pochopení zhoubného onemocnění.

4.8 Stanovení MT jako proliferačního markeru u lidských pacientů

Na MT se lze dívat také jako na proliferační marker u lidských pacientů. Tato oblast je podrobně studována a první publikace ukazují na souvislost mezi nádorovým onemocněním a hodnotou MT. (Krizkova, Masarik et al. 2010) **studovali krevní vzorky dětských pacientů a potvrdili vhodnost MT jako nádorového markeru pro včasnou diagnostiku a nastavení nejvhodnější léčby.** (Krejčova, Fabrik et al. 2012) **prováděli výzkum na pacientech s nádorovými onemocněními hlavy a krku. V této studii byla zjištěna souvislost mezi hodnotou MT a lokalizací nádoru.** (Sochor, Hynek et al. 2012) pokračovali ve studiu hladiny MT u pacientů s nádorem krku a hlavy. Zjistili, že hodnota MT souvisí s velikostí/rozsahem nádoru.

V. Srovnání novosti postupů

Postupy popsané v této metodice vedoucí ke stanovení metalothioneinu jako biochemického indikátoru znečištěného životního prostředí a buněčného proliferačního markeru jsou originální a nelze je jako celek srovnávat s žádnou jinou metodikou, protože podobná metodika nebyla dosud vydána u nás ani v zahraničí. Představovaná metodika přináší přehled metod pro separaci a detekci metalothioneinu jako chromatografická separace, kapilární elektroforéza, imunologické techniky a elektrochemické stanovení MT. Podrobně je také popsána příprava vzorků z různých biologických materiálů na stanovení MT elektrochemickými metodami a dále detailně

popsán postup měření MT diferenční pulzní metodou. Data naměřená na veterinárních vzorcích byla v této metodice okomentována a průběžně publikována.

VI. Popis uplatnění metodiky

Navržená metodika je určena pro zemědělské podniky, chovatele hospodářských zvířat a veterináře. Stanovení metalothioneinu je možné použít při ekotoxikologickém monitoringu životního prostředí. Zvýšená hladina MT je jedním z markerů diagnostiky akutní intoxikace zvířat a proliferace buněk u nádorových onemocnění. Metodiku také využijí odborní poradci, kteří jsou zaměřeni na chov hospodářských zvířat či se věnují oblasti veterinárního lékařství.

VII. Ekonomické aspekty

Monitoring zdravotního stavu hospodářských zvířat je nedílnou součástí činnosti každého chovatele. Získané informace mohou výrazně zlepšit efektivitu práce a tím samozřejmě i finanční efektivitu takového podnikání. Možnost získání základní informace o zdravotním stavu jednotlivých zvířat pomocí stanovení jednoho parametru je tak velmi přínosným nástrojem. Ukázalo se, že metalothionein, jehož stanovením se tato metodika zabývá, je pro tyto účely velmi vhodný. Tento protein souvisí s akutní intoxikací organismu ionty těžkých kovů a popřípadě s proliferační aktivitou buněk v organismu. Poskytuje tak cennou primární informaci o stavu chovaných zvířat, kdy namísto stanovení mnoha parametrů je možné stanovit pouze hladinu MT (což přináší výrazný ekonomický efekt). Samotné stanovení hladiny MT není, díky možné automatizaci a poměrně jednoduchému principu elektrochemické detekce, nijak finančně náročné. K tomuto závěru přispívá i to, že izolace MT ze vzorku krve (ale i jiných) je poměrně jednoduchá díky termostabilitě tohoto proteinu. Zavedení postupů popsanych v metodice je možné v rámci spotřebního materiálu vyčíslit sumou 50 tis. Kč. V této sumě není zahrnuta cena vlastní instrumentace. Náklady na analýzu jednoho vzorku (včetně přípravy) byly vypočteny na 500 Kč. Získané výsledky mohou přispět ke zvýšení efektivity chovu hospodářských zvířat a zlepšit tak nákladovou stránku takového podnikání. V případě pravidelného monitorování zdravotního stavu zvířat z hlediska intoxikace těžkými kovy se náklady na ošetření zvířat (při 100 kusech) pohybují kolem 25 tis./rok. S ohledem na hodnocení celkového zdravotního stavu a zásobením esenciálními prvky lze náklady spojené s úhynem zvířat, případně léčebnými nároky kalkulovat v řádech 100 tis./rok. Při monitorování životního prostředí využitím bioindikátorových organismů lze v krátké době zhodnotit zátěž prostředí a v průběhu procesu ušetřit náklady na nákladně rekultivační a další analýzy ve stovkách tis. Kč.

VIII. Seznam použité související literatury

- Adam, V., I. Fabrik, et al. (2010). „Automated Electrochemical Analyzer as a New Tool for Detection of Thiols.“ International Journal of Electrochemical Science 5(4): 429-447.
- Akintola, D. F., B. Sampson, et al. (1995). “Development of an Enzyme-Linked-Immunesorbent-Assay for Human Metallothionein-I in Plasma and Urine.” Journal of Laboratory and Clinical Medicine 126(2): 119-127.
- Andrews, G. K. (2000). “Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions.” Biochemical Pharmacology 59(1): 95-104.
- Ang, S. G. and V. W. T. Wong (1992). “Chromatographic Analysis of Low-Molecular-Mass Copper-Binding Ligands from the Crab Species *Scylla-Serrata* and *Portunus-Pelagicus*.” Journal of Chromatography 599(1-2): 21-24.
- Bachur, N. R., S. L. Gordon, et al. (1978). “General Mechanism for Microsomal Activation of Quinone Anti-Cancer Agents to Free-Radicals.” Cancer Research 38(6): 1745-1750.
- Barek, J., Opekar, F., Štulík, K (2005). “Elektroanalytická chemie.” 188.
- Barnas, C., G. MartelPlanche, et al. (1997). “Inactivation of the p53 protein in cell lines derived from human esophageal cancers.” International Journal of Cancer 71(1): 79-87.
- Bauman, J. W., J. Liu, et al. (1991). “Increase in Metallothionein Produced by Chemicals That Induce Oxidative Stress.” Toxicology and Applied Pharmacology 110(2): 347-354.
- Beltramini, M., P. Zambenedetti, et al. (2004). “Effects of steroid hormones on the Zn, Cu and MTI/II levels in the mouse brain.” Brain Research 1013(1): 134-141.
- Bremner, I. (1991). “Nutritional and Physiological Significance of Metallothionein.” Methods in Enzymology 205: 25-35.
- Cole, T. B., H. J. Wenzel, et al. (1999). “Elimination of zinc from synaptic vesicles in the intact mouse brain by disruption of the ZnT3 gene.” Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96(4): 1716-1721.
- Cousins, R. J. (1985). “Absorption, Transport, and Hepatic-Metabolism of Copper and Zinc - Special Reference to Metallothionein and Ceruloplasmin.” Physiological Reviews 65(2): 238-309.
- Davis, S. R. and R. J. Cousins (2000). “Metallothionein expression in animals: A physiological perspective on function.” Journal of Nutrition 130(5): 1085-1088.
- Fabrik, I. (2008). “Využití metallothionenu jako potenciálního nádorového markeru.” bakalářská práce: 60.
- Fornace, A. J., H. Schalch, et al. (1988). “Coordinate Induction of Metallothionein-I and Metallothionein-II in Rodent Cells by Uv Irradiation.” Molecular and Cellular Biology 8(11): 4716-4720.
- Ghoshal, K. and S. T. Jacob (2001). Regulation of metallothionein gene expression. Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, Vol 66. San Diego, Academic Press Inc. 66: 357-384.
- Gunes, C., R. Heuchel, et al. (1998). “Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the metal-responsive transcriptional activator MTF-1.” Embo Journal 17(10): 2846-2854.
- Hamer, D. H. (1988). “Metallothionein - an Overview.” Marine Environmental Research 24(1-4): 171-171.
- Hirauchi, T., M. Okabe, et al. (1999). “Metallothionein quantitation in biological materials by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using a commercial monoclonal antibody.” Trace Elements and Electrolytes 16(4): 177-182.
- Horky, P., Jancikova, P., Sochor, J., Hynek, D., Chavis, G. J., Ruttkay-Nedecky, B., Cernei, N., Zitka, O., Zeman, L., Adam, V., Kizek, R. (2012). “Effect of Organic and Inorganic Form of Selenium on Antioxidant Status of Breeding Boars Ejaculate Revealed by Electrochemistry.” International Journal of Electrochemical Science 7: 9643-9657.
- Huska, D., V. Adam, et al. (2011). “Microfluidic robotic device coupled with electrochemical sensor field for handling of paramagnetic micro-particles as a tool for determination of plant mRNA.” Microchimica Acta 173(1-2): 189-197.
- Huska, D., V. Adam, et al. (2010). “Off-line coupling of automated pipetting system with square wave voltammetry as a tool for study of drug-DNA interaction.” Chemica Oggi-Chemistry Today 28(5): 18-20.
- Hynek, D., L. Krejcova, et al. (2012). “Metallomics Study of Lead-Protein Interactions in Albumen by Electrochemical and Electrophoretic Methods.” International Journal of Electrochemical Science 7(2): 943-964.
- Hynek, D., L. Krejcova, et al. (2012). “Study of Interactions between Cysteine and Cadmium(II) Ions using Automatic Pipetting System off-line Coupled with Electrochemical Analyser Dedicated United Nation Environment Program: Lead and Cadmium Initiatives.” International Journal of Electrochemical Science 7(3): 1802-1819.
- Hynek, D., J. Prasek, et al. (2011). “Electrochemical Analysis of Lead Toxicosis in Vultures.” International Journal of Electrochemical Science 6(12): 5980-6010.

- Chu, G. (1994). "Cellular-Responses to Cisplatin - the Roles of DNA-Binding Proteins and DNA-Repair." Journal of Biological Chemistry **269**(2): 787-790.
- Jin, R. X., J. X. Huang, et al. (2004). "Clinicopathological significance of metallothioneins in breast cancer." Pathology & Oncology Research **10**(2): 74-79.
- Karin, M., R. L. Eddy, et al. (1984). "Human Metallothionein Genes Are Clustered on Chromosome-16." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences **81**(17): 5494-5498.
- Klassen, R. B., K. Crenshaw, et al. (2004). "Megalin mediates renal uptake of heavy metal metallothionein complexes." American Journal of Physiology-Renal Physiology **287**(3): F393-F403.
- Koropatnick, J., M. Leibbrandt, et al. (1989). "Organ-Specific Metallothionein Induction in Mice by X-Irradiation." Radiation Research **119**(2): 356-365.
- Kotsonis, F. N. and C. D. Klaassen (1978). "Increase in Metal-Binding by Hepatic Metallothionein after Treatment with Alkylating-Agents." Toxicology and Applied Pharmacology **45**(1): 304-305.
- Kovarova, J., R. Kizek, et al. (2009). "Effect of Cadmium Chloride on Metallothionein Levels in Carp." Sensors **9**(6): 4789-4803.
- Krejcová, L., I. Fabrik, et al. (2012). "Metallothionein Electrochemically Determined using Brdicka Reaction as a Promising Blood Marker of Head and Neck Malignant Tumours." International Journal of Electrochemical Science **7**(3): 1767-1784.
- Kremplová, M., L. Krejcová, et al. (2012). "Automated Electrochemical Detection of Iron Ions in Erythrocytes from MeLiM Minipigs Suffering from Melanoma." International Journal of Electrochemical Science **7**(7): 5893-5909.
- Krizkova, S., I. Fabrik, et al. (2010). "An Adsorptive Transfer Technique Coupled with Brdicka Reaction to Reveal the Importance of Metallothionein in Chemotherapy with Platinum Based Cytostatics." International Journal of Molecular Sciences **11**(12): 4826-4842.
- Krizkova, S., M. Masarik, et al. (2010). "Serum metallothionein in newly diagnosed patients with childhood solid tumours." Acta Biochimica Polonica **57**(4): 561-566.
- Lobinski, R., H. Chassaingne, et al. (1998). "Analysis for metallothioneins using coupled techniques." Talanta **46**(2): 271-289.
- Masters, B. A., C. J. Quaipe, et al. (1994). "Metallothionein-Iii Is Expressed in Neurons That Sequester Zinc in Synaptic Vesicles." Journal of Neuroscience **14**(10): 5844-5857.
- Meplan, C., M. J. Richard, et al. (2000). "Metalloregulation of the tumor suppressor protein p53: zinc mediates the re-naturation of p53 after exposure to metal chelators in vitro and in intact cells." Oncogene **19**(46): 5227-5236.
- Miles, A. T., G. M. Hawksworth, et al. (2000). "Induction, regulation, degradation, and biological significance of mammalian metallothioneins." Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology **35**(1): 35-70.
- Moffatt, P. and C. Seguin (1998). "Expression of the gene encoding metallothionein-3 in organs of the reproductive system." DNA and Cell Biology **17**(6): 501-510.
- Munger, K., U. A. Germann, et al. (1985). "(Cu,Zn)-Metallothioneins from Fetal Bovine Liver - Chemical and Spectroscopic Properties." Journal of Biological Chemistry **260**(18): 32-38.
- Murray, R. K., D. K. Granner, et al. (2003). Harper's Illustrated Biochemistry. New York, Lange Medical Books/McGraw-Hill Medical Publishing Division.
- Nagel, W. W. and B. L. Vallee (1995). "Cell-Cycle Regulation of Metallothionein in Human Colonic-Cancer Cells." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **92**(2): 579-583.
- Namdarghanbari, M., W. Wobig, et al. (2011). "Mammalian metallothionein in toxicology, cancer, and cancer chemotherapy." Journal of Biological Inorganic Chemistry **16**(7): 1087-1101.
- Nath, R., R. Kambadur, et al. (1988). "Molecular Aspects, Physiological-Function, and Clinical-Significance of Metallothioneins." Crc Critical Reviews in Food Science and Nutrition **27**(1): 41-85.
- Oh, S. H., J. T. Deagen, et al. (1978). "Biological Function of Metallothionein .5. Its Induction in Rats by Various Stresses." American Journal of Physiology **234**(3): E282-E285.
- Palmiter, R. D. (1994). "Regulation of Metallothionein Genes by Heavy-Metals Appears to Be Mediated by a Zinc-Sensitive Inhibitor That Interacts with a Constitutively Active Transcription Factor, Mtf-1." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **91**(4): 1219-1223.
- Palmiter, R. D. and S. D. Findley (1995). "Cloning and Functional-Characterization of a Mammalian Zinc Transporter That Confers Resistance to Zinc." Embo Journal **14**(4): 639-649.
- Penkowa, M., B. L. Srensen, et al. (2009). "Metallothionein as a useful marker in Hodgkin lymphoma subclassification." Leukemia & Lymphoma **50**(2): 200-210.

- Perez, R. P. (1998). "Cellular and molecular determinants of cisplatin resistance." European Journal of Cancer **34**(10): 1535-1542.
- Petrova, J., D. Potesil, et al. (2006). "Attomole voltammetric determination of metallothionein." Electrochimica Acta **51**(24): 5112-5119.
- Pikula, J., J. Zukal, et al. (2010). "Heavy Metals and Metallothionein in Vespertilionid Bats Foraging over Aquatic Habitats in the Czech Republic." Environmental Toxicology and Chemistry **29**(3): 501-506.
- Pohanka, M., J. Sochor, et al. (2012). "Automated assay of the potency of natural antioxidants using pipetting robot and spectrophotometry." Journal of Applied Biomedicine **10**(3): 155-167.
- Polec, K., O. Garcia-Arribas, et al. (2000). "Identification of cadmium-bioinduced ligands in rat liver using parallel HPLC-ICP-MS and HPLC-electrospray MS." Journal of Analytical Atomic Spectrometry **15**(10): 1363-1368.
- Quaife, C. J., S. D. Findley, et al. (1994). "Induction of a New Metallothionein Isoform (Mt-Iv) Occurs During Differentiation of Stratified Squamous Epithelia." Biochemistry **33**(23): 7250-7259.
- Raspor, B. (2001). "Elucidation of the mechanism of the Brdicka reaction." Journal of Electroanalytical Chemistry **503**(1-2): 159-162.
- Raspor, B., M. Paic, et al. (2001). "Analysis of metallothioneins by the modified Brdicka procedure." Talanta **55**(1): 109-115.
- Roesijadi, G., R. Bogumil, et al. (1998). "Modulation of DNA binding of a tramtrack zinc finger peptide by the metallothionein-thionein conjugate pair." Journal of Biological Chemistry **273**(28): 17425-17432.
- Santon, A., V. Albergoni, et al. (2004). "Evaluation of MT expression and detection of apoptotic cells in LEC rat kidneys." Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease **1688**(3): 223-231.
- Sas, B. and I. Bremner (1979). "Effect of Acute Stress on the Absorption and Distribution of Zinc and on Zn-Metallothionein Production in the Liver of the Chick." Journal of Inorganic Biochemistry **11**(1): 67-76.
- Sato, M. and I. Bremner (1993). "Oxygen Free-Radicals and Metallothionein." Free Radical Biology and Medicine **14**(3): 325-337.
- Sato, M. and M. Kondoh (2002). "Recent studies on metallothionein: Protection against toxicity of heavy metals and oxygen free radicals." Tohoku Journal of Experimental Medicine **196**(1): 9-22.
- Shiraishi, N., K. Aono, et al. (1983). "Increased Metallothionein Content in Rat-Liver Induced by X-Irradiation and Exposure to High Oxygen-Tension." Radiation Research **95**(2): 298-302.
- Shiraishi, N., H. Yamamoto, et al. (1986). "Increased Metallothionein Content in Rat-Liver and Kidney Following X-Irradiation." Toxicology and Applied Pharmacology **85**(2): 128-134.
- Simpkins, C. O. (2000). "Metallothionein in human disease." Cellular and Molecular Biology **46**(2): 465-488.
- Sochor, J., D. Hynek, et al. (2012). "Study of Metallothionein Role in Spinocellular Carcinoma Tissues of Head and Neck Tumours using Brdicka Reaction." International Journal of Electrochemical Science **7**(3): 2136-2152.
- Sochor, J., M. Pohanka, et al. (2012). "Effect of selenium in organic and inorganic form on liver, kidney, brain and muscle of Wistar rats." Central European Journal of Chemistry **10**(5): 1442-1451.
- Studer, R., C. P. Vogt, et al. (1997). "Metallothionein accretion in human hepatic cells is linked to cellular proliferation." Biochemical Journal **328**: 63-67.
- Takahashi, S. (2012). "Molecular functions of metallothionein and its role in hematological malignancies." Journal of Hematology & Oncology **5**.
- Tang, C. M., J. Westling, et al. (1999). "trans repression of the human metallothionein IIA gene promoter by PZ120, a novel 120-kilodalton zinc finger protein." Molecular and Cellular Biology **19**(1): 680-689.
- Theocharis, S. E., A. P. Margeli, et al. (2004). "Metallothionein expression in human neoplasia." Histopathology **45**(2): 103-118.
- Trnkova, L., I. Fabrik, et al. (2011). "Paramagnetic antibody-modified microparticles coupled with voltammetry as a tool for isolation and detection of metallothionein as a bioindicator of metal pollution." Journal of Environmental Monitoring **13**(10): 2763-2769.
- Vasatkova, A., S. Krizova, et al. (2009). "Effect of naturally mouldy wheat or fungi administration on metallothioneins level in brain tissues of rats." Neuroendocrinology Letters **30**: 163-168.
- Waalkes, M. P., J. J. Hjelle, et al. (1984). "Transient Induction of Hepatic Metallothionein Following Oral Ethanol Administration." Toxicology and Applied Pharmacology **74**(2): 230-236.
- Wolf, C., U. Rosick, et al. (2000). "Quantification of the metal distribution in metallothioneins of the human liver by HPLC coupled with ICP-AES." Fresenius Journal of Analytical Chemistry **368**(8): 839-843.

Xiong, W. C. and C. Montell (1993). "Tramtrack Is a Transcriptional Repressor Required for Cell Fate Determination in the Drosophila Eye." Genes & Development 7(6): 1085-1096.

Zamirska, A., L. Matusiak, et al. (2012). "Expression of Metallothioneins in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma and Actinic Keratosis." Pathology & Oncology Research 18(4): 849-855.

Zeng, J., R. Heuchel, et al. (1991). "Thionein (Apometallothionein) Can Modulate DNA-Binding and Transcription Activation by Zinc Finger Containing Factor-Sp1." Febs Letters 279(2): 310-312.

Zeng, J., B. L. Vallee, et al. (1991). "Zinc Transfer from Transcription Factor-Iiia Fingers to Thionein Clusters." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 88(22): 9984-9988.

IX. Seznam publikací předcházejících metodice

Výsledky pro využití metodiky v životním prostředí:

Adam, V., J. Petrlova, et al. (2005). „Study of metallothionein modified electrode surface behavior in the presence of heavy metal ions-biosensor.“ Electroanalysis 17(18): 1649-1657.

Adam, V., S. Krizkova, et al. (2007). "Determination of apo-metallothionein using adsorptive transfer stripping technique in connection with differential pulse voltammetry." Electroanalysis 19(2-3): 339-347.

Fabrik, I., Z. Svobodova, et al. (2008). "Metallothionein levels in sperm of various fish species." Journal of Applied Ichthyology 24(4): 522-525.

Fabrik, I., Z. Ruferova, et al. (2008). "A determination of metallothionein in larvae of freshwater midges (Chironomus riparius) using Brdicka reaction." Sensors 8(7): 4081-4094.

Horky, P., Jancikova, P., Sochor, J., Hynek, D., Chavis, G. J., Ruttikay-Nedecky, B., Cernei, N., Zitka, O., Zeman, L., Adam, V., Kizek, R. (2012). "Effect of Organic and Inorganic Form of Selenium on Antioxidant Status of Breeding Boars Ejaculate Revealed by Electrochemistry." International Journal of Electrochemical Science 7: 9643-9657.

Hynek, D., J. Prasek, et al. (2011). "Electrochemical Analysis of Lead Toxicosis in Vultures." International Journal of Electrochemical Science 6(12): 5980-6010.

Hynek, D., L. Krejcova, et al. (2012). "Study of Interactions between Cysteine and Cadmium(II) Ions using Automatic Pipetting System off-line Coupled with Electrochemical

Analyser Dedicated United Nation Environment Program: Lead and Cadmium Initiatives." International Journal of Electrochemical Science 7(3): 1802-1819.

Kovarova, J., R. Kizek, et al. (2009). "Effect of Cadmium Chloride on Metallothionein Levels in Carp." Sensors 9(6): 4789-4803.

Krizkova, S., O. Zitka, et al. (2007). "Possibilities of electrochemical techniques in metallothionein and lead detection in fish tissues." Czech Journal of Animal Science 52(5): 143-148.

Pikula, J., J. Zukal, et al. (2010). "Heavy Metals and Metallothionein in Vespertilionid Bats Foraging over Aquatic Habitats in the Czech Republic." Environmental Toxicology and Chemistry 29(3): 501-506.

Sobrova, P., A. Vasatkova, et al. (2012). "Study of deoxyribose effect on metallothionein and glutathione levels, antioxidant capacity, and glutathione-S-transferase and liver enzymes activity in rats." Chemical Papers 66(12): 1092-1102.

Trnkova, L., I. Fabrik, et al. (2011). "Paramagnetic antibody-modified microparticles coupled with voltammetry as a tool for isolation and detection of metallothionein as a bioindicator of metal pollution." Journal of Environmental Monitoring 13(10): 2763-2769.

Stanovení MT jako proliferačního markeru:

Adam, V., M. Beklova, et al. (2007). „Shapes of differential pulse voltammograms and level of metallothionein at different animal species.“ Sensors 7(10): 2419-2429.

Huska, D., I. Fabrik, et al. (2009). "Study of Interactions between Metallothionein and Cisplatin by using Differential Pulse Voltammetry Brdicka's reaction and Quartz Crystal Microbalance." Sensors 9(3): 1355-1369.

Kremplova, M., L. Krejcova, et al. (2012). "Automated Electrochemical Detection of Iron Ions in Erythrocytes from MeLiM Minipigs Suffering from Melanoma." International Journal of Electrochemical Science 7(7): 5893-5909.

Krizkova, S., I. Fabrik, et al. (2010). "An Adsorptive Transfer Technique Coupled with Brdicka Reaction to Reveal the Importance of Metallothionein in Chemotherapy with Platinum Based Cytostatics." International Journal of Molecular Sciences 11(12): 4826-4842.

Sochor, J., M. Pohanka, et al. (2012). "Effect of selenium in organic and inorganic form on liver, kidney, brain and muscle of Wistar rats." Central European Journal of Chemistry 10(5): 1442-1451.

Vasatkova, A., S. Krizova, et al. (2009). "Effect of naturally mouldy wheat or fungi administration on metallothioneins level in brain tissues of rats." Neuroendocrinology Letters 30: 163-168.

X. Poděkování

Tato publikace vznikla z výsledků řešení Národního programu výzkumu Nanotechnologie pro společnost NANOSEMED GA AV KAN208130801 a výsledků infrastrukturního projektu CZ.1.05/1.1.00/02.0068 CEITEC - Středoevropský technologický institut, centrum excelentní vědy“ uděleného Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky. A také za podpory „Lead and Cadmium Initiatives, United Nations Environment Programme“ a řešení grantu QJ1310100 „Vývoj a optimalizace metod stanovení biogenních aminů v návaznosti na zvýšení zdravotní bezpečnosti siláží“ financovaného národní agenturou pro zemědělský výzkum (NAZV).



Využití metalothioneinu jako biochemického indikátoru znečištění životního prostředí a buněčného proliferačního markeru

Autoři:

Doc. RNDr. Vojtěch Adam, Ph.D.^{1,4}, Ing. et Ing. David Hynek, Ph.D.^{1,4},
Ing. Kateřina Tmejová, Ph.D.^{1,4}, Mgr. Natalia Cernei¹, Ing. Pavlína Šobrová^{1,4},
Ing. Soňa Křížková Ph.D.^{1,4}, Mgr. Ondřej Zítka, Ph.D.^{1,4}, doc. Ing. Jiří Skládanka, Ph.D.²,
Dr. Ing. Zdeněk Havlíček³, Mgr. Markéta Vaculovičová, Ph.D.^{1,4}, Doc. Ing. Jaromír Hubálek,
Ph.D.^{1,4}, Doc. RNDr. Libuše Trnková, CSc.⁴, Prof. Ing. René Kizek, Ph.D.^{1,4}

Adresy: ¹Ústav chemie a biochemie, ²Ústav výživy zvířat a pícninářství, ³Ústav morfologie, fyziologie a genetiky zvířat, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, CZ-613 00 Brno, Česká republika
⁴CEITEC- Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické v Brně, Technická 3058/10, CZ-613 00 Brno, Česká republika

Vydavatel: Mendelova univerzita v Brně

Jazyková korektura: Ing. Kateřina Tmejová, Ph.D., Ing. Pavlína Šobrová

Vydání: první 2013

Počet stran: 34

Náklad: 300 ks

ISBN: 978-80-7375-701-4