

## STRUČNÝ PŘEHLED METOD PRO STANOVENÍ METALOTHIONEINU

David Potěšil, Vojtěch Adam, René Kizek

### I. ÚVOD

Ve druhé polovině 20. století dochází k prudkému vývoji v oblasti tumorových markerů. V České republice byla tehdy vyvinuta metoda predikce nádorového onemocnění s využitím polarografických metod profesorem Brdičkou (brdicka, 1937a; brdicka 1937b). Ve zkratce šlo o polarografické stanovení proteinů obsahujících thiolovou (SH) skupinu nebo disulfidickou vazbu na základě katalytického vylučování vodíku ze základního elektrolytu. U onkologických pacientů byl tehdy pozorován nižší polarografický signál než v případě kontrolních osob. Již tehdy však Brdička upozornil na fakt, že výsledek stanovení není jednoznačný, a že pozitivní test může být zapříčiněn také jiným onemocněním (např. záněty, žaludečními vředy, infarkty myokardu).

### II. TEORETICKÁ ČÁST

#### 1. Stručný přehled metod pro stanovení metalothioneinu

K možnému sledování hladiny MT u pacientů je nezbytné mít k dispozici vhodné analytické nástroje. Současné metody (některé jsou uvedeny v Tab. 1 spolu s dosahovanými limity detekce) používané pro kvantifikaci celkového množství MT v biologických materiálech můžeme podle principu stanovení rozdělit do několika skupin (Potesil, 2006).

První skupina metod je založena na měření množství iontu kovu vázaného na molekulu MT. Množství vázaného kovu je pak úměrné k množství MT. Bylo prokázáno, že afinita MT k různým iontům kovů se liší  $\text{Hg(II)} > \text{Ag(I)} \sim \text{Cu(I)} > \text{Cd(II)} > \text{Zn(II)}$  (Moffatt a Denizeau, 1997). Mechanismus interakce MT k jednotlivým těžkým kovům není doposud uspokojivě vysvětlen, ale je využitelný pro analýzu obsahu MT. Nejjednodušší metoda pro stanovení kvantifikace MT je Cd-hem metoda. Cd-hem metoda využívá dvou vlastností MT. Jednak jde o tepelně stabilní

protein, který je navíc schopný vázat sedm iontů kadmia Cd(II) místo iontů zinku Zn(II). Ze zjištěné koncentrace Cd např. pomocí atomové absorpční spektroskopie s grafitovou kyvetou (GPC–AAS) se poté usuzuje na koncentraci samotného MT. Podobný princip využívají saturační techniky využívající Ag(I) a Hg(II).

Druhá skupina metod kombinuje první skupinu (stanovení MT na základě obsahu navázaného těžkého kovu) se separačním krokem, což je využitelné např. při studiu jednotlivých izoform MT, pro identifikaci navázaného těžkého kovu a podobně. Pro tyto účely je možné využít např. vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii v kombinaci s AAS (HPLC–AAS). Analýzu jednotlivých iontů kovů vázaných do struktury MT je možné kvantifikovat např. pomocí metody kombinující indukčně vázané plazma, jako iontový zdroj, s hmotnostní detekcí (ICP–MS) opět např. po separačním kroku. Relativně často využívanou kombinací je nízkotlaká kapalinová chromatografie na Sephadexu G-75 v kombinaci s atomovou absorpční spektrometrií (AAS).

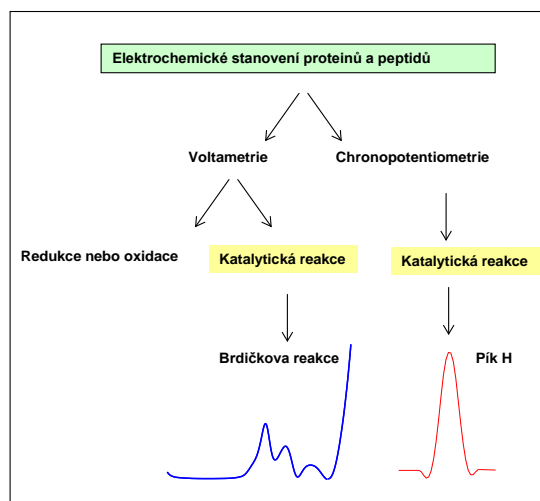
Třetí skupina metod jsou postupy kombinující separaci s detektorem citlivým na přítomnost samotného MT. Jak již bylo uvedeno výše pro separaci MT se často používá gelová permeační chromatografie (GPC) na Sephadexu G-75. Velmi málo je známo o separaci MT pomocí iontové výměnné chromatografie či vysoko účinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi (RP-HPLC). Nedávno byly identifikovány jednotlivé izoformy a sub-izoformy MT pomocí kombinace technik HPLC a hmotnostní spektrometrie (Hathout, a kol., 2002, Chassaigne a Lobinski, 1998). Více pozornosti je věnováno stanovení MT za pomoci kapilární zónové elektroforézy (CZE) (Beattie a Richards, 1994). Velmi často je také využíváno chemické modifikace MT chromoforem případně fluoroforem za účelem zvýšení citlivosti i selektivity stanovení (Potesil, 2006).

Čtvrtá skupina metod využívá protilátek proti MT. Mezi tyto metody se řadí RIA (radioimunoanalýza) a ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). ELISA a RIA metody vykazují vysokou citlivost pro detekci hladiny MT v tkáních. Z tohoto důvodu jsou poměrně často využívány pro studium exprese MT v tkáňových řezech.

Pátá skupina metod je založená na detekci mRNA. Rodina lidského genu MT má 17 sub-genů (13 sub-genů náleží MT-1, dva náleží MT-2, jeden náleží MT-3, a jeden patří MT-4) na

chromozomu 16 (Miles, a kol., 2000). Proč má rodina genů MT tak mnoho sub-genů? Souvisí exprese genu se zvýšenou hladinou proteinu a každé izoformy MT? Jsou nějaké rozdíly ve funkci mezi izoformami? Pro odpověď na tyto otázky je nezbytné studovat expresi každého sub-genu a funkci každé izoformy MT. Hladiny mRNA je možné studovat za využití polymerázové řetězové reakce v kombinaci s reverzní transkriptázou (RT-PCR) (Hathout, a kol., 2002).

Šestá skupina metod je založená na elektrochemické detekci MT, viz. Obr. 1 (Dabrio, a kol., 2002, Dorèák a Šestáková, 2006, Sestakova a Navratil, 2005). V elektrochemii je možné usuzovat kvantitativní informaci ze dvou skupin elektrochemických signálů: 1) redoxní jsou spojeny s elektrochemickou reakcí analytu; 2) katalytické nejsou spojeny přímo s elektrochemickou přeměnou analytu, ale reakcí dalších látek (např. vodíku), které vznikají za daných specifických podmínek v jeho přítomnosti. Mezi metody sledující právě katalytické signály patří Brdičkova reakce a tzv. pík H (Potesil, 2006, Kizek, a kol., 2001, Trnkova, a kol., 2002).



Obr. 1: Schéma elektroanalytického stanovení proteinů a peptidů

Tab. 1: Porovnání limitů detekce (3 S/N) analytických metod pro stanovení metalothioneinu (Zelená, a kol., 2004)

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

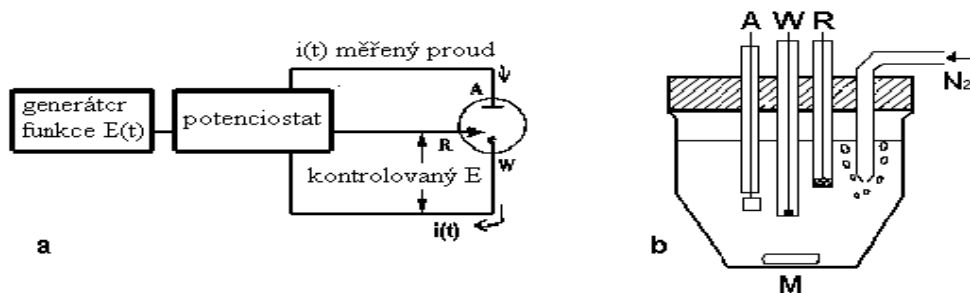
Vysvětlivky: ELISA: enzymová imunoanalýza, CZE: kapilární zónová elektroforéza, HPLC: vysokoúčinná kapalinová chromatografie, GPC: gelová permeační chromatografie, DPP: diferenční pulzní polarografie, AdTS-CPSA: adsorptivní přenosová technika kombinovaná s chronopotenciometrickou rozpouštěcí analýzou za konstantního proudu (Potesil, 2006).

## 2. Elektrochemické metody využitelné pro studium proteinů

Elektrochemické metody jsou vysoce citlivé, rychlé a selektivní pro stanovení jak anorganických tak i organických látek ve složité biologické matrici (Harris, 2003, Heyrovsky a Kùta, 1962, Klouda, 2003). Podstatou elektrochemických metod je studium závislosti elektrochemického chování roztoků na jejich složení a koncentraci. Objektem zkoumání je elektrochemický článek – soustava, v níž je analyzovaný roztok (elektrolyt) v kontaktu s elektrodami. Elektrody zprostředkovávají spojení elektrolytu s měřicím přístrojem, který sleduje některé z elektrických veličin (např. proud I, potenciál E, vodivost G, elektrický náboj Q, kapacitu C, aj.) (Garaj, a kol., 1977, Harris, 2003, Heyrovsky a Kùta, 1962, Markušová, 2000, Potesil, 2006).

## 2.1 Voltametrie a polarografie

Voltametrie a polarografie jsou elektrochemické metody založené na sledování intenzity proudu na velikosti proměnlivého vloženého napětí vkládaného mezi pracovní (polarizovatelnou) a referentní (nepolarizovatelnou) elektrodu – dvouelektrodové zapojení. Z důvodu eliminace rušivých jevů plynoucích z dvouelektrodového zapojení (např. proudového zatížení referentní elektrody) se v dnešní době používá kromě pracovní a referentní i elektroda pomocná – tříelektrodové zapojení (Obr. 2a). Schéma elektrolytické nádoby v tříelektrodovém zapojení je zobrazeno na Obr. 2b. Na pracovní elektrodě probíhá elektrodový proces, který sledujeme. Jako pracovní elektrody se nejčastěji používají rtuťové (DME – kapající rtuťová elektroda, HMDE – visící rtuťová kapková elektroda) anebo pevné (uhlíkové – pastová uhlíková elektroda, elektroda ze skelného uhlíku a elektroda z pyrolytického uhlíku; kovové – zlatá, stříbrná, platinová apod.). Potenciál pracovní elektrody je kontrolován vůči elektrodě referentní s konstantním potenciálem. Vlastní referentní elektroda je od měřeného roztoku oddělena solným můstkem se zatavenou hustou skleněnou fritou. Nejvíce používanou referentní elektrodou v dnešní době je elektroda argentchloridová (Ag/AgCl/3 M KCl). Proud protéká elektrodami pomocnou a pracovní. Pomocná elektroda je převážně z ušlechtilého kovu (Au, Ag, Pt) z důvodu vysokého přepětí vodíku, což umožňuje pracovat při nižších potenciálech. Metody, kde se stále využívá DME, se nazývají polarografické (Heyrovsky a Kùta, 1962, Klouda, 2003, Markušová, 2000).



Obr. 2: (a) Schéma zapojení tříelektrodového systému; (b) Schéma elektrolytické nádoby. Legenda: W – pracovní elektroda, R – referentní elektroda, A – pomocná elektroda, M -

míchadlo, N<sub>2</sub> – přívod inertního plynu. Převzato a upraveno z (Markušová, 2000).

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

- Difúzí, která je řízena koncentračním spádem v těsné blízkosti elektrody. Koncentrační spád je vyvolán úbytkem elektroaktivní látky u povrchu elektrody způsobeným jejím vylučováním na elektrodě.
- Migrací, kterou vyvolává elektrické pole mezi elektrodami svým působením na nabitě částice.
- Konvekcí, kterou je tok částic vyvolaný mícháním.

Cílem elektrochemické detekce je zjištění koncentrace elektroaktivní látky. Z tohoto důvodu je sledována především difúze, která na ní závisí, a naopak je potlačena migrace elektroaktivní látky. Přidáme-li do zkoumaného roztoku nosný (indiferentní) elektrolyt v koncentraci asi stokrát převyšující koncentraci elektroaktivní látky, převážnou část náboje přenášejí ionty nosného elektrolytu a migrace elektroaktivní látky je zanedbatelně malá. Současně je tím významně snížen elektrický odpor roztoku. Dále je v některých případech nezbytné před samotným měřením odstranit z nosného elektrolytu veškerý kyslík, protože jeho vylučování na povrchu elektrody může znemožnit detekci ostatních elektroaktivních látek přítomných v roztoku, protože se sám

zúčastňuje elektrodové reakce. Odstranění kyslíku se provádí probubláváním roztoku inertním plynem (např. dusík, argon) (Heyrovsky a Kùta, 1962, Sommer, a kol., 2000, Wang, 1994). Dosáhne-li potenciál polarizovatelné (pracovní) elektrody hodnoty rozkladného potenciálu elektroaktivní látky (vzhledem k potenciálu elektrody referentní), začne se vylučovat na povrchu elektrody a její koncentrace v blízkosti elektrody poklesne. Vylučovat se přitom může jen ta látka, která se nachází v těsné blízkosti od povrchu elektrody, kam se dostane difúzí (migraci eliminuje přítomnost nosného elektrolytu). Proto je procházející proud označován jako difúzní. Zvyšuje-li se dále vložené napětí, narůstá vylučování elektroaktivní látky. Tento růst nastává pouze pokud se nezačne vylučovat každá částice elektroaktivní látky, která je k povrchu elektrody difúzí transportována. Tím klesne koncentrace elektroaktivní látky u povrchu elektrody na nulovou hodnotu. Zvyšování napětí již neurychluje její vylučování. Proud dosáhl hodnoty limitního difúzního proudu. Jeho velikost je určena rychlostí difúze elektroaktivní látky k povrchu elektrody, která je závislá na její koncentraci. Elektroda se polarizovala koncentrační polarizací (Bard a Faulkner, 1980, Garaj, a kol., 1977, Harris, 2003, Heyrovsky a Kùta, 1962, Klouda, 2003, Markušová, 2000, Potesil, 2006, Wang, 1994).

Proudová odezva při aplikaci pulsu se skládá ze dvou složek:

- kapacitní proud (IC) – je potřebný k vytvoření elektrické dvojvrstvy na rozhraní povrch pracovní elektrody – roztok. Tento proud nesouvisí s přeměnou elektroaktivní látky. U DME dochází k neustálému obnovování povrchu, a proto se musí každá kapka nabít na daný potenciál a tak vzniká kapacitní proud, který je funkcí vloženého potenciálu, velikosti povrchu kapky a povahy základního elektrolytu. Tento proud snižuje citlivost měření.
- difúzní proud (ID) – má faradaický charakter a je rozhodující pro stanovení koncentrace depolarizátoru. Jeho velikost je dána Cottrellovou rovnicí, která má v případě sférických elektrod tvar (1) (Markušová, 2000):

$$i = n \cdot F \cdot D \cdot A \cdot c \cdot \left( \frac{1}{\pi^{1/2} \cdot D^{1/2} \cdot t^{1/2}} + \frac{1}{r} \right) \quad (1)$$

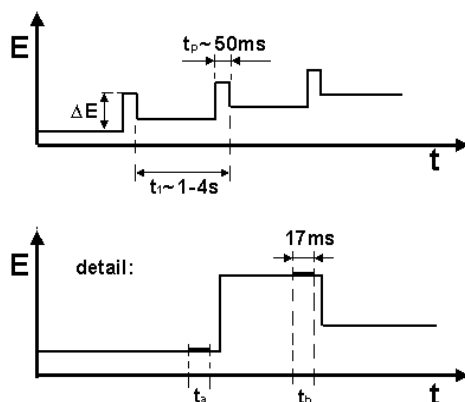




kde  $n$  je počet elektronů účastnících se elektrodové reakce,  $F$  Faradayova konstanta,  $D$  difúzní koeficient,  $A$  plocha elektrody,  $c$  koncentrace depolarizátoru,  $t$  doba pulzu,  $r$  poloměr elektrody.

### 2.1.1 Diferenční pulzní polarografie a voltametrie

Při diferenční pulzní polarografii (DPP) a voltametii (DPV) jsou na postupně rostoucí potenciálovou rampu aplikovány pulsy o délce  $t_p$  s konstantní amplitudou ( $\Delta E$ ). Měřený signál odpovídá rozdílu proudů ( $\Delta I = i_b - i_a$ ), které jsou měřeny před začátkem napěťového pulsu (časový interval  $t_a$ ) a těsně před koncem napěťového pulsu (časový interval  $t_b$ ), viz. Obr. 3. U diferenční pulzní polarografie/voltametrie má závislost proudu na napětí tvar píku. Při DME je doba kapky seřízená na určitý čas kratší než přirozená doba kapky. Délka doby kapky se užívá obvykle 2 až 3 s. Puls je vložen na kapku ve stejnou dobu jejího trvání.



Obr. 8: Průběh potenciálu vloženého na pracovní elektrodu při diferenční pulzní voltametii/polarografii. Na elektrodu je přiváděn potenciál lineárně rostoucí potenciál. Na konci doby časového kroku je přiveden na elektrodu potenciálový puls s konstantní amplitudou. Proud je měřen před vložením potenciálového pulsu a před koncem tohoto pulsu. Převzato a upraveno podle (Markušová, 2000).

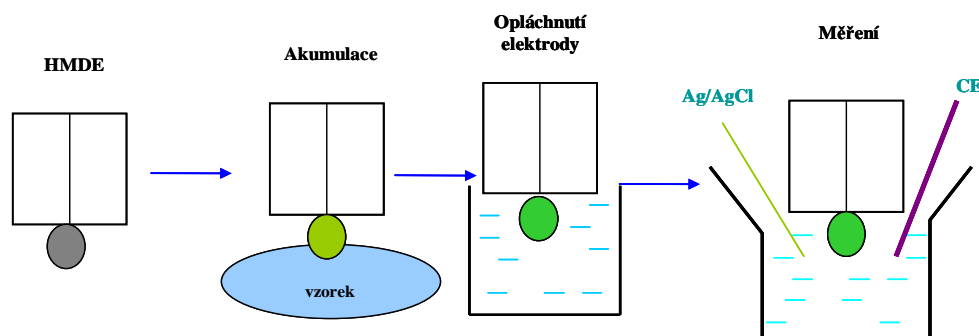
Je nutné použít co nejkratší dobu k měření, aby byla získána co největší proudová odezva, ale současně dostatečně dlouhou dobu, aby kapacitní proud byl nízký. Doba pulsu se využívá řádově desítky ms. Velikost amplitudy se v praxi obvykle používá 5 až 100 mV (Obr. 3). V případě DPV



kapka neodkapává a celé měření probíhá na jedné visící rtuťové kapkové pracovní elektrodě (HMDE) (Bard a Faulkner, 1980, Markušová, 2000).

### 2.1.2 Adsorptivní přenosová technika

Adsorptivní přenosová technika je metoda, při níž je stanovovaná látka na pracovní visící rtuťovou kapkovou elektrodu danou dobu akumulována z kapky vzorku, poté je přebytek vzorku omyt a zahájeno měření pomocí vybrané elektrochemické techniky v klasickém třielektrodevém zapojení (Adam, a kol., 2005), viz. Obr. 4. Díky této technice je umožněna elektrochemická analýza z velmi malého objemu vzorku (3 až 10  $\mu\text{l}$ ) (Potesil, 2006).



Obr. 4 Schéma adsorptivní přenosové techniky (Adam, a kol., 2005).

### 2.1.3 Chronopotenciometrická rozpouštěcí analýza

Chronopotenciometrická rozpouštěcí analýza (chronopotentiometric stripping analysis, CPSA) (Andersen, 1997, Garai, a kol., 1992, Honeychurch a Ridd, 1995) byla vyvinuta před zhruba dvaceti lety pro stanovení iontů kovů v roztocích za pomoci rtuťové filmové elektrody (Estela, a kol., 1995). CPSA vznikla kombinací klasické analytické potenciometrie a katodického rozpouštění kovů v materiálu pracovní elektrody (Bixler a Stafford, 1968). Při CPSA se zaznamenává potenciál pracovní elektrody jako funkce času v závislosti na potenciálu po derivaci obvykle  $dt/dE$  křivka (2).

$$\left(\frac{dE}{dt}\right)^{-1} = f(E) \quad (2)$$

Elektrochemický děj na elektrodě přitom probíhá díky oxidaci (případně redukci) analytu chemickým činidlem přítomným v roztoku (kyslík, ionty rtuťnaté, atd.) (Jagner, 1982, Jagner a Aren, 1978, Jagner a Graneli, 1976). CPSA poskytovala od počátku oproti voltametričným metodám některé výhody, zejména při stanovení stopových množství kovů anodickým rozpouštěním. Hlavní výhodou je, že jedním z výstupních signálů je čas, veličina měřitelná přesněji než proud. Další výhody, např. možnost měření bez odstranění kyslíku ze vzorku, jsou využívány jen při některých způsobech užití této metody. Při aplikaci negativních proudů (při CPSA) přítomnost kyslíku ve vzorku za určitých podmínek dokonce zesiluje signál poskytovaný redukcí analytu (Honeychurch a Ridd, 1995). Adsorpce analytu na elektrodě byla využita např. v pracích týkajících se CPSA sloučenin obsahujících adenin a jeho deriváty. Pro studium biopolymerů je CPSA využívána až v posledních několika letech. K analýze peptidů a proteinů na rtuťové elektrodě využil obou technik Honeychurch (Honeychurch a Ridd, 1995). Jeho práce se týkaly jak možnosti stanovení peptidů, proteinů nebo jejich složek (cystein, insulin, BSA apod.), tak i studia mechanismu přenosu náboje v těchto látkách. Nukleové kyseliny byly chronopotenciometricky stanoveny poprvé na uhlíkových elektrodách v roce 1995 (Cai, a kol., 1996). Uhlíkovou pastovou elektrodu modifikovanou DNA v kombinaci s CPSA použil Wang mimo jiné k hybridizačním experimentům a k detekci mnoha látek interagujících s DNA (aromatické aminy, hydraziny, daunomycin) (Wang, a kol., 1996, Wang, a kol., 1996, Wang, a kol., 1996, Wang, a kol., 1998). Nověji bylo CPSA využito pro ultrasenzitivní stanovení thiolových sloučenin, především metalothioneinu (Kizek, a kol., 2001, Potesil, 2006, Strouhal, a kol., 2003, Trnkova, a kol., 2002).

## 2.2 Katalytické vylučování vodíku

Ve třicátých letech byly popsány dva katalytické signály, které poskytují proteiny na rtuťové elektrodě, Heyrovského přenátriová vlna a Brdičkova reakce.

### 2.2.1 Brdičkova reakce

Metodu pro polarografické stanovení proteinů obsahujících –SH skupiny na rtuťové elektrodě publikoval Brdička (Brdicka, 1933, Brdicka, 1933) a dále ji vyvíjeli Paleček a kol. (Paleček a Pechan, 1971). Jedná se o katalytické reakce proteinů v Brdičkově soluci, která se sestává z amoniakálního pufru (NH<sub>4</sub>OH + NH<sub>4</sub>Cl) a komplexu [Co(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub>]Cl<sub>3</sub> (Brdicka, 1936, Brdička, a kol., 1965). Brdičkova procedura byla původně navržena pro analýzu sirmých látek jako jsou organické sloučeniny (2-merkaptopropionová kyselina, 2-diethylaminoethanthiol hydrochlorid), aminokyseliny (cystein, cystin) a proteiny (nejčastěji albuminy) (Kolthoff, a kol., 1975, Kolthoff, a kol., 1975). Za poznámku bezesporu také stojí možnost využití Brdičkou navrženého postupu jako diagnostické metody v klinické medicíně a farmakologii (Bøezina a Zuman, 1952, Bøezina a Zuman, 1958). Možnosti stanovení MT prostřednictvím Brdičkových proudů publikoval Olafson (Olafson a Olsson, 1991). Bylo zjištěno, že za katalytický signál proteinu v Brdičkově soluci jsou odpovědní limitní proudy (Ilim). Autoři popisují ireverzibilní redukci amonného komplexu Co<sup>3+</sup> podle reakce (3):



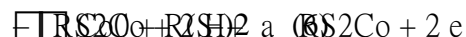
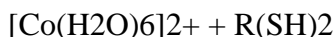
Vzniklý amonný komplex je nestabilní a je hydrolyzován podle reakce (4):



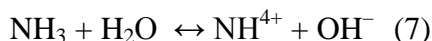
Pravděpodobně po redukci Co<sup>3+</sup> na Co<sup>2+</sup> pokračuje reakční mechanismus zredukováním komplexu [Co(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>]<sup>2+</sup> na Co<sup>0</sup>:



Samotné stanovení MT se obvykle realizuje při negativních potenciálech a měření se většinou provádí v potenciálovém rozsahu od 0 do –1,6 V. První redukce komplexu CoI probíhá kolem –0,2 V a druhý redukční pík Co(II) je zaznamenán při přibližně –1,0 V. Celý redukční proces na povrchu rtuťové elektrody je katalyzován vylučováním vodíku. V případě samotné redukce komplexů kobaltu se předpokládá difúzně řízený proces (Raspor, a kol., 2001). Reakční mechanismus je ovlivněn přítomností –SH skupin proteinu a nestabilní [Co(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>]<sup>2+</sup> komplex je zapojen do reakce typu (6):

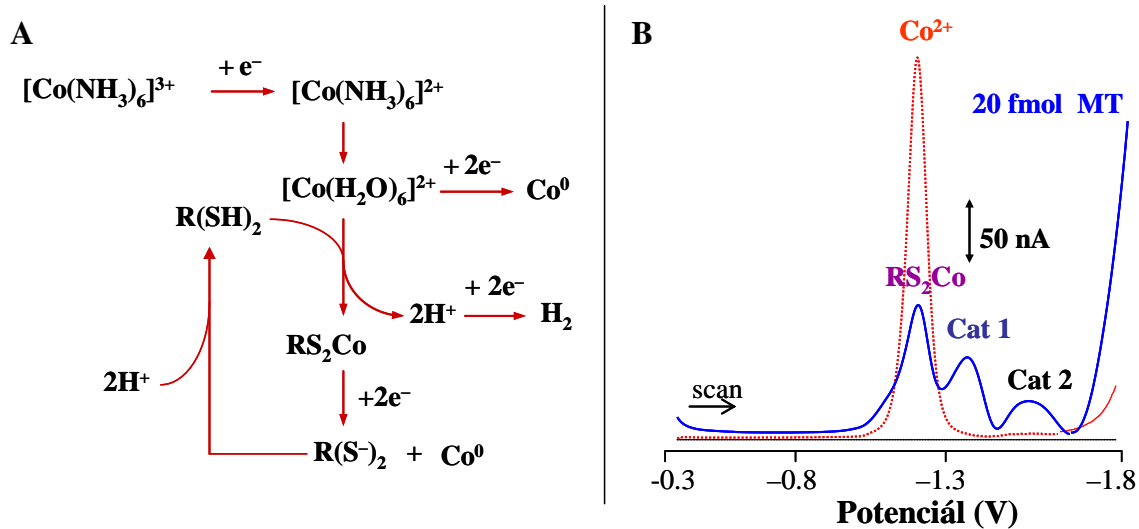


V prostředí Brdičkovy roztoku stanovené bílkoviny a peptidy způsobují potlačení proudového maxima komplexu Co(II) (díky povrchové aktivitě stanovených bílkovin nebo peptidů) a vznik jedné nebo dvou polarografických vln (nebo voltametrických píků) proteinu v oblasti potenciálů  $-1,2$  až  $-1,5$  V. Bylo prokázáno, že tuto reakci způsobují sulfidické skupiny (proteinů, peptidů i jednodušších látek) ve spojení s komplexy iontů kobaltu (Brdička, a kol., 1965). Jak popisuje reakce preferuje komplex  $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$  vazbu s  $-\text{SH}$  skupinou. Za první katalytický signál je odpovědná redukce komplexu  $\text{R}(\text{SH})_2$  s Co(II) ( $\text{RS}_2\text{Co}$ ) a probíhá kolem  $E_p -1,35$  V. Proudová odezva se mění v závislosti na teplotě, proto se předpokládá, že se jedná o difúzně řízený proces. Výška prvního katalytického signálu odpovídá za koncentraci MT v analytu. Koncentrace  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$  musí být dostatečná vůči analyzovanému MT, aby signál redukováného komplexu  $\text{RS}_2\text{Co}$  mohl narůstat proporcionálně s koncentrací proteinu. Další pík je závislý na katalytickém vylučování vodíku. Pokles tohoto píku s rostoucí teplotou indikuje povrchovou reakci (Mairanovskii, 1968). Rasporová a kol. uvádí, že reakce Brdičkovy roztoku s MT a povrchem elektrody je protonizována přítomností amonného pufru podle reakce (Raspor, a kol., 2001):



Mechanismus elektrodového procesu Brdičkovy reakce není dodnes detailně znám, předpokládá se, že v katalytickém procesu hraje významnou roli komplex Co(II) s proteinem. Reakční schéma MT na rtuťové elektrodě v Brdičkově roztoku je ilustrováno na Obr. 5A. Při stanovení MT procedurou Brdičkovy reakce se nejčastěji využívá metody DPP a DPV (příklad DPV záznamu je ukázán na Obr. 5B). Brdičkova reakce byla použita ke studiu fyziologických koncentrací MT u celé řady organismů (Bebiano a Machado, 1997). Široké uplatnění našla Brdičkova reakce pro stanovení MT u řady mořských a sladkovodních živočichů (Olafson, 1988, Olafson a Olsson, 1991). Bylo zjištěno, že stanovení izolovaných MT z biologického materiálu je závislé na množství kovů v doménách proteinu (Olafson a Sim, 1979). Experimentální podmínky detekce

MT Brdičkovou reakcí byly modifikovány, autoři se liší především v koncentračním zastoupení složek roztoku. Rasporová a spol. použili k přípravě roztoku  $2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NH}_4\text{Cl} + \text{NH}_4\text{OH}$ , s  $1,2 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3} [\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$  a redukci prováděli v rozsahu potenciálů od  $-0,9$  do  $-1,9 \text{ V}$  (Raspor, a kol., 2001). Olafson a další navrhuje použít pro stanovení MT roztok o složení  $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NH}_4\text{Cl} + \text{NH}_4\text{OH}$ , s  $0,6 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3} [\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$  (Olafson a Olsson, 1991). Postup stanovení proteinů pomocí Brdičkovy reakce má široké spektrum použití, např. nedávno byla publikována práce pojednávající o stanovení čistoty separovaného supresorového proteinu p53 (Brazdová, a kol., 2002). Byly vypracovány metody stanovení proteinů nejen na rtuťových, ale i pevných elektrodách. Např. Tomschik a kol. se zabývali rozpouštěcí chronopotenciometrií vazopresinu a angiotenzinu za konstantního proudu na uhlíkové pastové elektrodě (CPE) (Potesil, 2006, Tomschik, a kol., 1998).



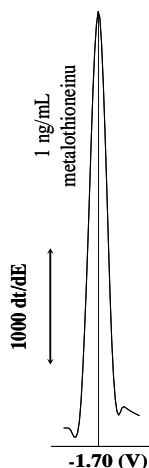
Obr. 5: (A) pravděpodobné schéma katalytického vylučování vodíku při Brdičkově reakci. Upraveno dle (Raspor, 2001); (B) DPV voltamogramy čistého elektrolytu  $1 \text{ mmol} [\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$  v  $1 \text{ mol}$  amonném pufru (červená) a elektrolytu s přidávkou proteinu (modrá) (Petrlova, a kol., 2006).

### 2.2.2 H pík (Heyrovského prenátriová vlna)

Prenátriová (někdy také presodiová) vlna je katodická odezva proteinů zaznamenaná na rtuťové elektrodě při negativních potenciálech předcházejících redukci sodných iontů základního elektrolytu. Typ tohoto signálu byl poprvé pozorován Heyrovským a Babičkou (Heyrovsky a Babicka, 1930). Měření bílkovin v přítomnosti amonných iontů ukázalo, že katodické proudy odpovídající za prenátriovou vlnu souvisí s vylučováním vodíku. Celý elektroodový proces je katalyzován proteiny a bylo navrženo, že by tento signál mohl sloužit k jejich kvantitativní analýze. Později se také ukázalo, že původně použitý chlorid sodný nebo amonný pufr, který se mimo jiné zúčastňuje protonizace elektroodového procesu, může být zaměněn za jiný základní elektrolyt s podobnou aciditou. Prenátriovou vlnu lze pozorovat přibližně o 100 až 250 mV pozitivněji od potenciálu vylučování základního elektrolytu. Za katalytickou reakci jsou pravděpodobně odpovědné –SH a –NH<sub>2</sub> skupiny proteinu. Původní pokusy byly prováděny s proteiny krevního séra a později i s mnoha dalšími látkami jako jsou alkaloidy, pyrimidiny (Heyrovsky a Kùta, 1962) a jiné. Prenátriové vlny bylo Tomschikem a spolupracovníky využito pro stanovení vazopresinu a angiotenzinu (Tomschik, 1995). K měření byla použita derivační chronopotenciometrie s konstantním proudem (Chronopotentiometric Stripping Analysis – CPSA). Chronopotenciometrický signál, ekvivalentní polarografické prenátriové vlně byl autory pracovně označen jako „pík H“ (Tomschik, a kol., 1998). Píku H bylo použito pro stanovení MT izolovaného z králičích jater v prostředí borátového pufru (pH 8), který je pravděpodobně protonizován podle reakce (8) (Trnkova, a kol., 2002):



Redukce je iniciována při 0 V a ukončena při potenciálu –1,9 V. Pík H metalothioneinu byl pozorován v oblasti negativních potenciálů kolem –1,7 V (Obr. 6).



Obr. 6: Elektrochemický signál katalytického vylučování vodíku ve velmi negativních potenciálech (pík H)

Metodou CPSA v kombinaci s adsorptivní přenosovou rozpouštěcí technikou (Adsorptive Transfer Stripping Technique – AdTS) je možné detekovat až femtomolární množství MT ve velmi malých (5  $\mu$ l) objemech vzorku (Kizek, a kol., 2001). Dále bylo zjištěno, že jak výška tak potenciál píku H je závislý na pH základního elektrolytu, což má pravděpodobně souvislost s izoelektrickou pohyblivostí danou pI proteinu, a že katalytický proces MT je značně ovlivněn koncentrací kyslíku v základním elektrolytu (Trnkova, a kol., 2002). Ukázalo se, že nepřítomnost kyslíku dramaticky snižuje výšku píku H a naopak přítomnost kyslíku je pro katalytický proces příznivá (Trnkova, a kol., 2002). Metoda AdTS CPSA byla použita pro studium produkce metalothioneinu u buněk kvasinky *Yarrowia lipolytica*, které byly vystaveny různým koncentracím iontů těžkých kovů (Zn, Co, Ni a Cd). Předběžné výsledky ukazují, že AdTS CPSA by mohla nalézt uplatnění i pro stanovení fytochelatinů (Vacek, a kol., 2002).

Elektrodové procesy, které odpovídají za pík H nebyly doposud detailně objasněny i přesto, že vylučování vodíku je jedním z nejdéle studovaných elektrochemických dějů. Proces vylučování vodíku na rtuťové elektrodě je charakteristický a je popsán Heyrovského reakcí:





Dále Tafelovou empirickou rovnicí ( $2 \text{H(ads)} \leftrightarrow \text{H}_2$ ) a rovnicí adsorbovaného vodíkového atomu podle Volmera ( $\text{H}_3\text{O}^+ + e \leftrightarrow \text{H(ads)} + \text{H}_2\text{O}$ ) (Dvořák, a kol., 1975). Vzhledem ke složitosti katalytického procesu, který zasahuje do vylučování vodíku je kromě katalyzujícího proteinu velmi důležitá koncentrace, složení, pH a teplota roztoku základního elektrolytu. Nové poznatky dosažené v derivační chronopotenciometrii s konstantním proudem naznačují možnost jejího širšího využití, s tím že se jedná o nejsenzitivnější elektrochemickou metodu pro stanovení proteinů (Kizek, a kol., 2001, Potesil, 2006).

## Literatura

- ADAM, V.; PETRLOVÁ, J.; POTIŠIL, D.; ZEHNÁLEK, J.; SURES, B.; TRNKOVÁ, L.; JELEN, F.; KIZEK, R. Study of metallothionein modified electrode surface behaviour in the presence of heavy metal ions - biosensor. *Electroanalysis*, 2005, roč. 17. č. 18, s. 1649-1657. ělánek IF 1.811
- ANDERSEN, J. E. T. Analysis of lead and zinc by mercury-free potentiometric stripping analysis. *Anal. Lett.*, 1997, roč. 30. č. 5, s. 1001-1012.
- BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. *Electrochemical Methods. Fundamentals and Applications*. New York: John Willey & Sons, 1980.
- BEATTIE, J. H.; RICHARDS, M. P. Separation of Metallothionein Isoforms by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography. *J. Chrom. A*, 1994, roč. 664. č. 1, s. 129-134.
- BEBIANNO, M. J.; MACHADO, L. M. Concentrations of metals and metallothioneins in *Mytilus galloprovincialis* along the south coast of Portugal. *Marine Poll. Bull.*, 1997, roč. 34. č., s. 666-671.
- BIXLER, J. W.; STAFFORD, W. F. Chemical stripping of copper with cerium(IV). *Anal. Chem.*, 1968, roč. 40. č. 2, s. 425-427.
- BREZINA, M.; ZUMAN, P. *Polarografie v lékařství, biochemii a farmacii*. Praha: SZN, 1952.
- BREZINA, M.; ZUMAN, P. *Polarography in Medicine, Biochemistry and Pharmacy*. New York: Interscience Publ., 1958.
- BRAZDOVÁ, M.; KIZEK, R.; HAVRAN, L.; PALEÈEK, E. Determination of glutathione-S-transferase traces in preparations of p53 C-terminal domain (aa320-393). *Bioelectrochemistry*, 2002, roč. 55. č. 1-2, s. 115-118.
- BRDICKA, R. Polarographic Studies with the Dropping Mercury Kathode. -Part XXXI. - A New Test for Proteins in The presence of Cobalt Salts in Ammoniacal Solutions of Ammonium Chloride. *Coll. Czech. Chem. Commun.*, 1933, roč. 5. č., s. 112-128.
- BRDICKA, R. Polarographic Studies with the Dropping Mercury Kathode. -Part XXXII. - Activation of Hydrogen in Sulphydryl Group of Some Thio-Acids in Cobalt Salts Solutions. *Coll. Czech. Chem. Commun.*, 1933, roč. 5. č., s. 148-164.
- BRDICKA, R. Polarographic Studies with the Dropping Mercury Kathode. -Part LXI. - The Effect of buffer Solutions on the Reaction of Proteins. *Coll. Czech. Chem. Commun.*, 1936, roč. 8. č., s. 366-376.
- BRDICKA, R.; BØEZINA, M.; KALOUS, V. Polarography of proteins and its analytical aspects. *Talanta*, 1965, roč. 12. č., s. 1149-1162.
- CAI, X. H.; RIVAS, G.; FARIAS, P. A. M.; SHIRAISHI, H.; WANG, J.; FOJTA, M.; PALEÈEK, E. Trace measurements of plasmid DNAs by adsorptive stripping potentiometry at carbon paste electrodes. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 1996, roč. 40. č. 1, s. 41-47. 0302-4598.
- DABRIO, M.; RODRÍGUEZ, A. R.; BORDIN, G.; BEBIANNO, M. J.; DE LEY, M.; ŠESTÁKOVÁ, I.; VAŠÁK, M.; NORDBERG, M. Recent developments in

- quantification methods for metallothionein. *J. Inorg. Biochem.*, 2002, roč. 88. č., s. 123–134.
- DVORAK, V.; ŠESTÁKOVÁ, I. Electrochemical behavior of phytochelatins and related peptides at the hanging mercury drop electrode in the presence of cobalt(II) ions. *Bioelectrochemistry*, 2006, roč. 68. č. 1, s. 14–21.
- DVORAK, J.; KORYTA, J.; BOHÁÈKOVÁ, V. *Elektrochemie*. Praha: Academia, 1975.
- ESTELA, J. M.; TOMÁS, C.; CLADERA, A.; CERDÁ, V. Potentiometric Stripping Analysis: A Review. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 1995, roč. 25. č. 2, s. 91–141.
- GARAI, T.; NAGY, Z.; MÉSZÁROS, L.; BARTALITS, L.; LOCATELLI, C.; FAGIOLI, F. Theory of Derivative and Differential Potentiometric Stripping Analysis and Stripping Chronopotentiometry. *Electroanalysis*, 1992, roč. 4. č., s. 899–904.
- GARAJ, J.; BERÈIK, J.; BUSTIN, D.; ÈERÒÁK, J.; ŠTEFANEC, J.; TRAITER, M. *Fyzikálnochemické analytické metódy*. Bratislava: Vydavateľstvo technickej a ekonomickej literatúry, 1977.
- HARRIS, D. C. *Quantitative chemical analysis*. New York: W. H. Freeman and Company, 2003.
- HATHOUT, Y.; REYNOLDS, K. J.; SZILAGYI, Z.; FENSELAU, C. Metallothionein dimers studied by nano-spray mass spectrometry. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2002, roč. 88. č. 2, s. 119–122.
- HEYROVSKY, J.; BABICKA, J. Polarographic Studies with the Dropping Mercury cathode. Part XIII - The Effect of Albumins. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 1930, roč. 2. č., s. 370–379.
- HEYROVSKY, J.; KÛTA, J. *Základy polarografie*. Praha: Nakladatelství Èeskoslovenské akademie vïd, 1962.
- HONEYCHURCH, M. J.; RIDD, M. J. The Effect of Nonadsorbing Electroactive Species on the Transition Time in Derivative Adsorptive Chronopotentiometric Stripping Analysis. *Electroanalysis*, 1995, roč. 11. č., s. 1041–1047.
- CHASSAIGNE, H.; LOBINSKI, R. Polymorphism and identification of metallothionein isoforms by reversed-phase HPLC with on-line ion spray mass spectrometric detection. *Anal. Chem.*, 1998, roč. 1998. č. 70, s. 2536–2543.
- JAGNER, D. Potentiometric Stripping Analysis A review. *Analyst*, 1982, roč. 107. č., s. 593–599.
- JAGNER, D.; AREN, K. Derivative potentiometric stripping analysis with a thin film of mercury on a glassy carbon electrode. *Anal. Chim. Acta*, 1978, roč. 100. č., s. 375–388.
- JAGNER, D.; GRANALI. Potentiometric stripping analysis. *Anal. Chim. Acta*, 1976, roč. 83. č., s. 19–26.
- KIZEK, R.; TRNKOVÁ, L.; PALEÈEK, E. Determination of metallothionein at the femtomole level by constant current stripping chronopotentiometry. *Anal. Chem.*, 2001, roč. 73. č. 20, s. 4801–4807.
- KLOUDA, P. *Moderní analytická chemie*. Ostrava: Pavel Klouda, 2003.
- KOLTHOFF, I. M.; YAMASHITA, K.; HIE, T. B. Brdicka currents observed with bovine serum albumin and completely reduced bovine serum albumin in the presence of urea. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1975, roč. 72. č. 6, s. 2044–2048.

- KOLTHOFF, I. M.; YAMASHITA, K.; HIE, T. B.; KANBE, A. Brdička Currents Observed with Bovine Serum Albumin in Tris and Borate Buffers. *J. Electroanal. Chem.*, 1975, roč. 58. č., s. 375-386.
- MAIRANOVISKII, S. G. Catalytic and kinetic waves in polarography. New York: Plenum Press, 1968.
- MARKUŠOVÁ, K. Elektrochemické metody. Košice: Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, 2000 (vol 1).
- MILES, A. T.; HAWKSWORTH, G. M.; BEATTIE, J. H.; RODILLA, V. Induction, regulation, degradation, and biological significance of mammalian metallothioneins. *Crit. Rev. Biochem. Mol.*, 2000, roč. 35. č. 1, s. 35-70.
- MOFFATT, P.; DENIZEAU, F. Metallothionein in physiological and physiopathological processes. *Drug Metab. Rev.*, 1997, roč. 29. č. 1-2, s. 261-307.
- OLAFSON, R. W. Electrochemical characterization of metallothionein metal mercaptide complexes - Application of cyclic voltammetry to investigation of metalloproteins. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 1988, roč. 19. č. 1, s. 111-125.
- OLAFSON, R. W.; OLSSON, P. E. Electrochemical detection of metallothionein. *Meth. Enzymol.*, 1991, roč. 205. č., s. 205-283.
- OLAFSON, R. W.; SIM, R. G. An electrochemical approach to quantification and characterization of metallothionein. *Anal. Biochem.*, 1979, roč. 100. č., s. 343-351.
- PALECEK, E.; PECHAN, Z. Estimation of nanogram quantities of proteins by pulse polarographic techniques. *Anal. Biochem.*, 1971, roč. 42. č., s. 59-71.
- PETRLOVA, J.; BLASTIK, O.; PRUSA, R.; KUKACKA, J.; MIKELOVA, R.; STIBOROVA, M.; VOJTESEK, B.; ADAM, V.; ZITKA, O.; ECKSCHLAGER, T.; KIZEK, R. Analýza obsahu metallothioneinu u pacientů se zhoubným nádorem prsu, tlustého stěva a nebo melanomem. *Klin. Onkol.*, 2006, roč. 19. č. 2, s. in press.
- POTESIL, D. Využití elektroanalytických metod v diagnostice nádorových onemocnění, Katedra analytické chemie, Brno: Masarykova Univerzita Brno, 2006.
- RASPOR, B. Elucidation of the mechanism of the Brdička reaction. *J. Electroanal. Chem.*, 2001, roč. 503. č., s. 159-162.
- RASPOR, B.; PAIÈ, M.; ERK, M. Analysis of metallothionein by the modified Brdicka procedure. *Talanta*, 2001, roč. 55. č., s. 109-115.
- SESTAKOVA, I.; NAVRATIL, T. Voltammetric methods in metallothionein research. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2005, roč. 3. č. 1-2, s. 43-53.
- SOMMER, L.; ŠIMEK, Z.; VOZNICA, P. Analytická chemie II. Brno: Vutium, 2000.
- STROUHAL, M.; KIZEK, R.; VACEK, J.; TRNKOVÁ, L.; NĚMEC, M. Electrochemical study of heavy metals and metallothionein in yeast *Yarrowia lipolytica*. *Bioelectrochemistry*, 2003, roč. 60. č. 1-2, s. 29-36.
- TOMSCHIK, M. Thesis Faculty of Science. Brno: Masaryk University, 1995.
- TOMSCHIK, M.; HAVRAN, L.; FOJTA, M.; PALECEK, E. Constant current chronopotentiometric stripping analysis of bioactive peptides at mercury and carbon electrodes. *Electroanalysis*, 1998, roč. 10. č., s. 403-409.

- TRNKOVA, L.; KIZEK, R.; VACEK, J. Catalytic signal of rabbit liver metallothionein on a mercury electrode: a combination of derivative chronopotentiometry with adsorptive transfer stripping. *Bioelectrochemistry*, 2002, roč. 56. č. 1-2, s. 57-61.
- VACEK, J.; PETØEK, J.; HAVEL, L.; KOUTNÁ, D.; ADAM, V.; TRNKOVÁ, L.; KIZEK, R. Stanovení olova a rostlinných metalothioneinů v explantátových kulturách smrku ztepilého (*Picea abies* L.). In: VI. Pracovní setkání biochemiků a molekulárních biologů, 2002, roč. Brno. č., s.
- WANG, J. *Analytical Chemistry*. New York: VCH Publishing, 1994.
- WANG, J.; CAI, X.; JONSSON, C.; BALAKRISHNAN, M. Adsorptive Stripping Potentiometry of DNA at Electrochemically Pretreated Carbon Paste Electrodes. *Electroanalysis*, 1996, roč. 8. č. 1, s. 20-24.
- WANG, J.; CAI, X.; RIVAS, G.; SHIRAIISHI, H. Stripping potentiometric transduction of DNA hybridization processes. *Anal. Chim. Acta*, 1996, roč. 326. č., s. 141 - 147. E - 257
- WANG, J.; CAI, X.; RIVAS, G.; SHIRAIISHI, H.; FARIAS, P. A. M.; DONTA, N. DNA Electrochemical biosensor for the Detection of Short DNA Sequences Related to the Human Immunodeficiency Virus. *Anal. Chem.*, 1996, roč. 68. č., s. 2629 - 2634. E - 265
- WANG, J.; OZSOZ, M.; CAI, X. H.; RIVAS, G.; SHIRAIISHI, H.; GRANT, D. H.; CHICHARRO, M.; FERNANDES, J.; PALEÈEK, E. Interactions of antitumor drug daunomycin with DNA in solution and at the surface. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 1998, roč. 45. č. 1, s. 33-40.
- ZELENA, J.; POTEŠIL, D.; VACEK, J.; ADAM, V.; HRADECKÝ, J.; PRŮŠA, R.; KIZEK, R.; VOJTÍŠEK, B. Metallothionein jako prognostický marker nádorového onemocnění. *Klin. Onkol.*, 2004, roč. 17. č. 6, s. 190-195.