

ANALÝZA OBSAHU METALOTHIONEINU U PACIENTŮ SE ZHOUBNÝM NÁDOREM PRSU, TLUSTÉHO STŘEVA A NEBO MALIGNÍM MELANOMEM

DETERMINATION OF METALLOTHIONEIN CONTENT IN PATIENTS WITH BREAST CANCER, COLON CANCER, AND MALIGNANT MELANOMA

PETRLOVÁ J.¹, BLAŠTÍK O.¹, PRŮŠA R.², KUKAČKA J.², MIKELOVÁ R.¹, STIBOROVÁ M.³, VOJTĚŠEK B.⁴, ADAM V.¹, ZÍTKA O.⁶, ECKSCHLAGER T.⁷, KIZEK R.¹

¹ÚSTAV CHEMIE A BIOCHEMIE, LABORATOŘ MOLEKULÁRNÍ BIOCHEMIE

A BIOELEKTROCHEMIE, MENDELOVA ZEMĚDĚLSKÁ A LESNICKÁ UNIVERZITA, BRNO

²ÚSTAV KLINICKÉ BIOCHEMIE A PATOBIOCHEMIE, 2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA UK V PRAZE,

³KATEDRA BIOCHEMIE, PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UK V PRAZE,

⁴ZÁKLADNA EXPERIMENTÁLNÍ ONKOLOGIE, MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV BRNO

⁵KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA MU BRNO

⁶KATEDRA BIOCHEMIE, PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA MU BRNO

⁷KLINIKA DĚTSKÉ HEMATOLOGIE A ONKOLOGIE, 2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA UK PRAHA

Souhrn: Nádorová onemocnění představují velmi závažná onemocnění postihující každého třetího až pátého člověka v populaci. Nedávno bylo zjištěno, že hladiny metalothioneinu (MT) je možné využít jako markeru průběhu nádorových onemocnění. Je známo, že MT je nízkomolekulární intracelulární protein, jehož primární funkcí je udržení homeostázy těžkých kovů v živých organismech. **Metody:** Pro analýzu MT jsme použili (vlastní) námi navržený elektroanalytický postup využívající adsorptivní přenosovou techniku. Elektroanalýza probíhala na přístroji AUTOLAB ve spojení s VA-Stand 663 (Metrohm, Switzerland) v klasickém tříelektroodovém uspořádání v roztoku základního elektrolytu $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ amonného pufru a $1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$. Základní biochemické vyšetření séra bylo provedeno na automatickém analyzátoru Advia 1650 a Centaur. Vzorky krevních sér byly získány od 28 pacientů se zhoubnými nádory prsu, tlustého střeva a nebo melanomem v průběhu roku 2005 na klinikách FN Motol. Před vlastní elektroanalýzou byl každý vzorek tepelně denaturován 15 min. při 99°C a centrifugován při 4°C , $15\,000 \text{ g}$ po dobu 30 min. **Výsledky:** Zjistili jsme, že v krevním séru pacientů s nádory prsu byl průměrný obsah MT $1.6 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, přičemž u 9 pacientů překročila hladina MT $1 \mu\text{M}$ (64 %) a u tří byla hladina MT vyšší než $2 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (21 %). U pacientů se zhoubným nádorem tlustého střeva byla průměrná hladina MT $3,2 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, tedy 2krát vyšší než u nádoru prsu. Obsah MT vyšší než $1 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ byl pozorován u 8 pacientů (88 %) a u 3 byla hladina MT vyšší než $2 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (33 %). V případě pacientů s melanomem byla průměrná hladina MT $1,97 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Vyšší hladina MT byla pozorována u všech pacientů s vyššími hodnotami jaterních enzymů. Velmi zajímavá shoda byla také pozorována mezi hodnotou nádorového markeru CA 15-3 a hladinou MT. **Závěr:** Elektroanalytických technik je možné využít pro analýzu sérových hladin MT u pacientů se zhoubnými nádory. Hladina MT výrazně vzrůstá u většiny pacientů se zhoubnými nádory.

Klíčová slova: metalothionein, MT, diagnostika, melanom, zhoubný nádor prsu, zhoubný nádor tlustého střeva, Brdičkova reakce.

Introduction: Malignant tumours represent a grave illness affecting three out of every ten people in the world. Recently, it has been published that metallothionein (MT), an intracellular high molecular and cysteine-rich protein, which is able to detoxify heavy metals, could serve as a marker of tumour diseases. **Methods:** An adsorptive transfer stripping technique (AdTS) in connection with differential pulse voltammetry was used for the determination of metallothionein. Electrochemical measurements were performed with AUTOLAB Analyser (EcoChemie, Netherlands) connected to VA-Stand 663 (Metrohm, Switzerland), using a standard cell with three electrodes. The Brdicka supporting electrolyte containing $1 \text{ mM} \text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ and 1 M ammonia buffer ($\text{NH}_3(\text{aq}) + \text{NH}_4\text{Cl}$, $\text{pH} = 9.6$) was used. Basic biochemical analyses were performed with Advia 1650 and Centaur. Human blood serum samples were obtained from 27 patients with breast cancer and malignant melanoma in 2005 at the Department of Clinical Biochemistry and Pathobiochemistry, 2nd Faculty of Medicine Charles University, Czech Republic. Each sample was prepared by heat treatment. Briefly, the sample was kept at 99°C for 15 min., and then cooled to 4°C . The denatured homogenates were centrifuged at 4°C , $15\,000 \text{ g}$ for 30 min. **Results:** We found out that the metallothionein content in human blood serum of patients with breast cancer reached an average of $1.6 \mu\text{M}$. Moreover, the MT content in nine of the patients was higher than $1 \mu\text{M}$ (64%) and in three of them higher than $2 \mu\text{M}$ (21%). The average MT content in human blood serum of patients with colon cancer

was 3.2 μM , thus 2 times higher than in breast cancer patients. Eight patients (88 %) with malignant melanoma had more than 1 μM of MT and 3 of them (33 %) more than 2 μM of MT. As for patients with malignant melanoma, their average content of MT was 1.97 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Higher level of MT was determined in all patients with higher content of liver enzymes. Moreover, we observed that CA 15-3 tumour marker levels corresponds well with the MT content. **Conclusion:** It is evident that it is possible to use the electroanalytical techniques for determination of MT in blood serum samples of patients with tumour diseases. We found out that MT content markedly increases in all studied blood serum samples of the patients with breast cancer, colon cancer, and malignant melanoma.

Keywords: metallothionein, MT, diagnostics, melanoma, breast cancer, colon cancer, Brdicka reaction.

Úvod

Každým rokem je ve světě diagnostikováno asi 11 milionů případů onemocnění maligním nádorem a 6,7 milionu lidí na tuto nemoc umírá. Ze všech úmrtí ve světě připadá 12 % na zhoubné nádory. Nejvíce diagnostikovanými jsou karcinomy plic, prsu, střev, žaludku, prostaty, děložního čípku a jícnu, a letální, z nich jsou nejčastější karcinomy plic, žaludku a jater. Podle údajů, které vypracoval Národní onkologický registr, žije v České republice s maligním nádorem 302 000 osob. Ze statistik je zřejmé, že ve světě průměrně na 100 000 obyvatel připadá asi 360 případů maligních nádorů, ale v ČR je to 560 případů. V ČR byl v roce 2000 celkový počet hlášených onemocnění zhoubnými novotvarami u mužů 27 847 a u žen 26 546. Ve stejném roce zemřelo na toto onemocnění 15 878 mužů a 12 661 žen. Podle údajů z roku 2002 drží Česká republika evropské prvenství v počtu nemocných maligními nádory konečniku a ledvin. Mezi nejčastější nádorová onemocnění však v ČR, obdobně jako jinde v Evropě, patří zhoubné nádory kůže, prsu a plic. V ČR postihne karcinom prsu ročně více než 4 500 žen, během života touto chorobou onemocní každá desátá česká žena a ročně na ni zemře přibližně 2 500 žen. Z těchto důvodů vyhlásilo Ministerstvo zdravotnictví ČR a Česká onkologická společnost program zaměřený na pokles výskytu zhoubných onemocnění v české populaci. Značná pozornost by měla být věnována především (ve smyslu Národního onkologického programu ČR) ; **i**) primární prevenci a výchově k udržení zdraví; **ii**) „screeningovým“ programům využívajícím nových moderních technologií; **iii**) zlepšení časné diagnostiky mezi něž náleží i nové potencionální markery; **iv**) vytvoření sítě specializovaných pracovišť; **v**) podpora výzkumných projektů.

Nedávno Theocharis a spolupracovníci publikovali, že množství metallothioneinu (MT) se mění u řady zhoubných nádorů (nádory prsu, kůže a pankreatu a další). Metallothioneiny (MT) patří do skupiny intracelulárních, nízkomolekulárních na cystein velmi bohatých proteinů (obsah Cys až 30 % v molekule proteinu) o molekulové hmotnosti od 6 - 10 kDa. Je pravděpodobné, že změny v expresi MT mohou být prognostickým markerem u celé řady zhoubných nádorových onemocnění. Z tohoto důvodu je potřebné studovat změny MT u pacientů se zhoubnými nádory pomocí jednoduchých a rychlých analytických postupů. Cílem této práce bylo studovat sérovou hladinu metallothioneinu u pacientů se zhoubnými nádory prsu, tlustého střeva a kůže pomocí elektroanalytických technik.

Materiál a metody

Klinický materiál

V průběhu prvního pololetí roku 2005 byly získána séra od pacientů léčených pro zhoubný nádor prsu, tlustého střeva a melanom na různých odděleních FN Motol (Radioterapeutické oddělení dospělí, Kožní oddělení a III. chirurgická klinika 1. LF UK). Pokud to bylo možné byly sledovány základní biochemické ukazatele (ALP, AST, ALT, GMT, nádorový marker CA 15-3). Krevní séra byla ihned zmrazena na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do

doby jejich dalšího zpracování. Celkem bylo analyzováno 28 sér pacientů; z toho pro zhoubný nádor tlustého střeva $n = 9$ s průměrným věkem 56,4 roku; melanom $n = 4$ s průměrným věkem 59,5 roku; a pro nádor prsu $n = 15$ s průměrným věkem 51,5 roku.

Biochemická analýza

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

Příprava vzorků pro elektroanalytické stanovení metallothioneinu

Ze získaných vzorků krevních sér bylo odebráno 100 μl a umístěno na 15 min. při $99\text{ }^{\circ}\text{C}$ do termobloku (Eppendorf 5430, USA). Poté byly vzorky ochlazeny na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a centrifugovány při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 000 g po dobu 30 min. (Eppendorf 5402, USA). Metallothioneiny patří k termostabilním proteinům, které zůstávají přítomné v roztoku i po jeho tepelné denaturaci. Takto připravené vzorky byly analyzovány námi upraveným postupem adsorptivní přenosové techniky (AdTS) s diferenční pulsní voltametří (DPV). Množství analyzovaného vzorku bylo 5 μl .

Elektroanalytické stanovení metallothioneinu pomocí Brdičkovy reakce metodou AdTS DPV

Vzorky byly analyzovány na přístroji AUTOLAB Analyser (EcoChemie, Netherlands) ve spojení s VA-Stand 663 (Metrohm, Switzerland) v klasickém tříelektrodovém uspořádání. Pracovní elektrodou byla visící rtuťová kapková elektroda (HMDE) s plochou kapky 0,4 mm^2 ; referenční elektrodou byla Ag/AgCl/3M KCl a pomocnou grafitová elektroda. Základní elektrolyt (1 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ $\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ a 1 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ aamoný puř; $\text{NH}_3(\text{aq}) + \text{NH}_4\text{Cl}$, $\text{pH} = 9,6$) byl po každých 5 analýzách vyměněn. AdTS DPV parametry byly následující: počáteční potenciál -0,6 V, konečný potenciál -1,6 V, modulační čas 0,057 s, časový interval 0,2 s, potenciálový krok 1,05 mV/s, modulační amplituda 250 mV, $E_{\text{ads}} = 0\text{ V}$, teplota $0\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Výsledky a diskuse

Před více než sedmdesátí lety objevil Rudolf Brdička katalytické vylučování vodíku ze základního elektrolytu v přítomnosti proteinů. Elektroanalytická metoda byla dále vylepšena a využita pro analýzu proteinů krevních sér pacientů s rakovinou. Získaná experimentální data přinesla zajímavé výsledky ukazující na možnost využívat tzv. Brdičkovu reakci pro studium prognózy zhoubných onemocnění. Nebylo však zcela zřejmé, které proteiny byly podle vypracované metody stanovovány. Později se podařilo objevit skupinu mukoproteinů (MP-1, MP-2 a MP-3), ale proteinům o nižší molekule

lové hmotnosti nebyla věnována žádná pozornost. Jak se však v poslední době ukazuje, nízkomolekulární proteiny (jako je metalothionein) a peptidy (jako je glutathion), hrají významnou roli v řadě biologických procesů včetně regulace buněčného dělení.

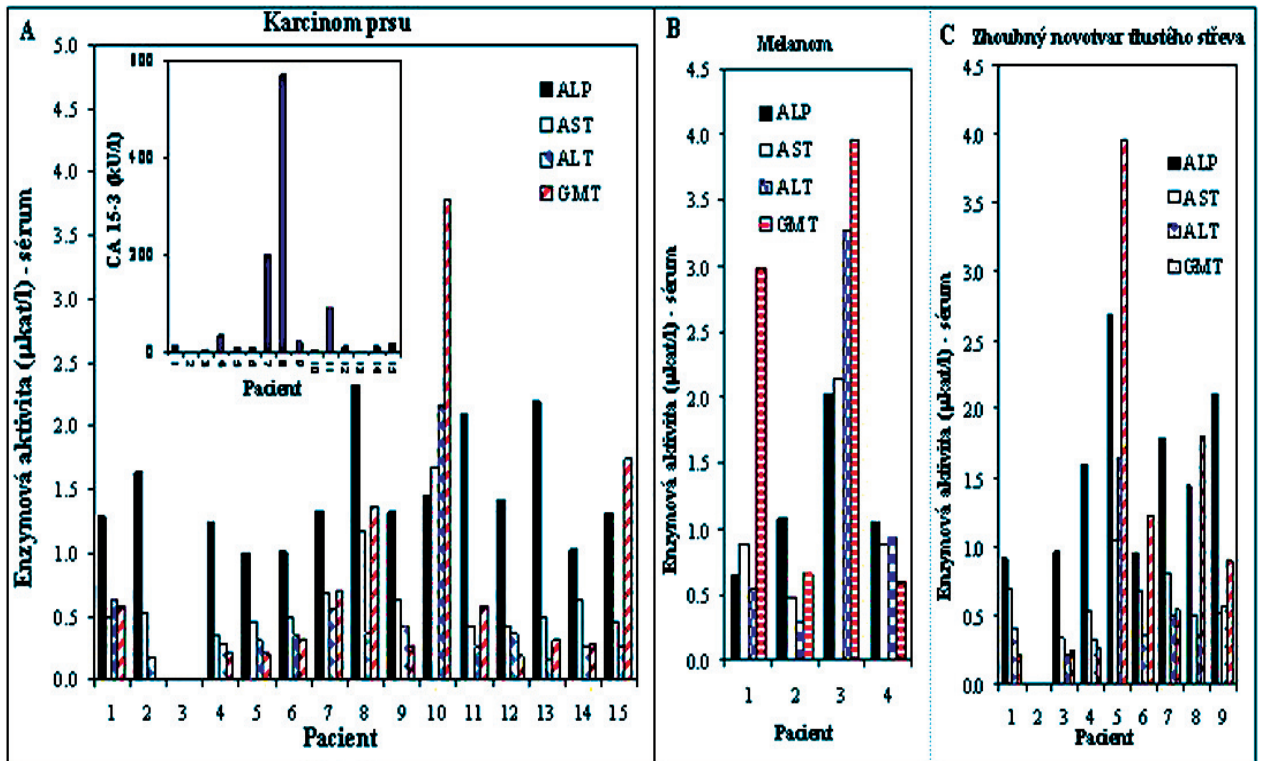
V této naší práci jsou popsány prvotní experimentální výsledky stanovení obsahu metalothioneinu u 28 pacientů se zhoubnými nádory prsu, tlustého střeva a kůže s průměrným věkem 55 let (v různém stadiu a fázi onemocnění a léčby). Vzorky krevních sér byly odebrány v průběhu prvního pololetí roku 2005, a pokud to bylo možné, byly charakterizovány z hlediska základních biochemických ukazatelů (aktivita jaterních enzymů, případně nádorového markeru CA 15-3); viz. (Obr. 1A,B,C). U většiny pacientů nebyl pozorován výrazný vzestup hladiny jaterních enzymů (ALP, AST, ALT a GMT). Ten nebyl zvýšen ani u většiny pacientek s karcinomem prsu. Analýza MT byla provedena námi modifikovaným elektroanalytickým postupem (diferenční pulzní voltametrie v kombinaci s adsorptivní přenosovou voltametrií). Studovaný vzorek (připravený podle postupu uvedeného v sekci Materiál a metody) je adsorbován z 5 μ l kapky na povrch pracovní elektrody, poté je přebytečný roztok z povrchu elektrody omyt a modifikovaná elektroda je umístěna do měřicí nádoby (Obr. 2A). V případě, že místo vzorku (obsahujícího proteiny) použijeme vodu, získáme záznam redukce iontů kobaltu (Co^{2+}) bez pozorovaných katalytických signálů (Obr. 2B, čárkovaná křivka). Adsorbovaný metalothionein (po dobu 120 s) o koncentraci 10 nM poskytuje tři výrazné katalytické signály (RS_2Co , Cat_1 a Cat_2), jak je ukázáno na Obr. 2B. Při další analýze MT byl vyhodnocován katalytický signál Cat_2 . Závislost výšky pozorovaného signálu na koncentraci adsorbovaného MT na povrch pracovní elektrody byla lineární ($y = 5,5233x + 0,7177$; $R^2 = 0,9918$, Obr. 2C). Vzorky krevních sér pacientů se zhoubnými nádory prsu, tlustého střeva a kůže byly analyzovány pomocí uvedeného postupu. Získané voltamogramy jsou ukázány na Obr. 2D. Pro naše účely byl opět vyhodnocován katalytický signál Cat_2 . Na získaných voltamogramech byl

pozorován rozdílný průběh záznamu u pacientů s nádory prsu, tlustého střeva a melanomem. U pacientů s melanomem byl většinou pozorovatelný signál Cat_2 bez signálu Cat_1 . V sérech pacientů s nádory prsu však bylo možné kromě katalytického signálu Cat_2 , téměř vždy pozorovat katalytický signál Cat_1 . Nejvýraznější katalytické signály byly pozorovány u pacientů se zhoubným nádorem tlustého střeva. V naší předešlé práci jsme se pokusili určit průměrnou hladinu MT u zdravých lidí, která kolísá okolo $0,6 \pm 0,3 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Zjistili jsme, že u pacientů s nádory prsu byl průměrný obsah MT $1,6 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, přičemž u devíti pacientů překročila hladina MT $1 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (64 %) a u tří byla hladina MT vyšší než $2 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (21 %), jak je ukázáno na obrázku 3A. V případě pacientů s melanomem byla průměrná hladina MT $1,97 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a u 3 pacientů byl obsah MT vyšší než $1 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, viz. Obr. 3B. U pacientů se zhoubným nádorem tlustého střeva byla průměrná hladina MT $3,2 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, tedy 2krát vyšší než u pacientů s nádorem prsu (Obr. 3C). Obsah MT vyšší než $1 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ byl pozorován u 8 pacientů (88 %) a u 3 byla hladina MT vyšší než $2 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (33 %). Vyšší hladina MT byla pozorována u všech pacientů s vyššími hodnotami jaterních enzymů. Velmi zajímavá shoda byla také pozorována mezi hodnotou nádorového markeru CA 15-3 a hladinou MT. Vztahu nádorového markeru CA 15-3 a hladiny MT se bude věnovat naše další práce.

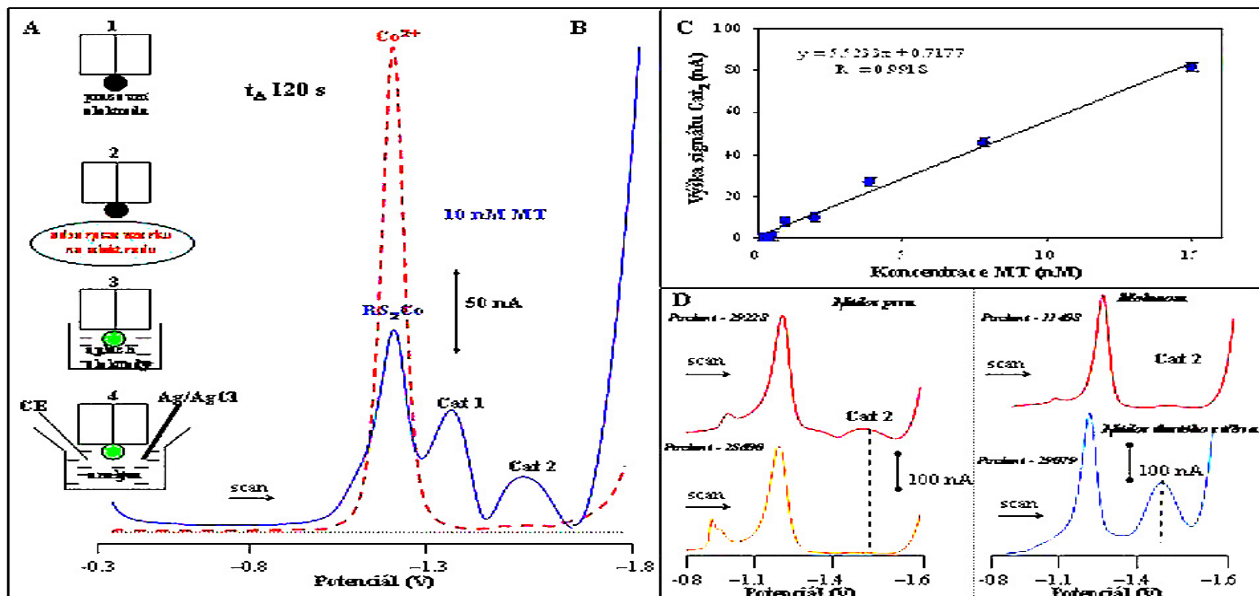
Závěr

Jak je ukázáno v naší práci, elektroanalytických technik je možné využít pro analýzu významných biologicky aktivních proteinů u pacientů se zhoubnými nádory. Z námi získaných experimentálních výsledků je zřejmé, že hladina sérového MT výrazně stoupá u většiny pacientů se zhoubnými nádory. Navíc u pacientů se zhoubným nádorem tlustého střeva a melanomem byl nárůst hladiny MT výrazně vyšší ve srovnání s pacienty se zhoubným nádorem prsu.

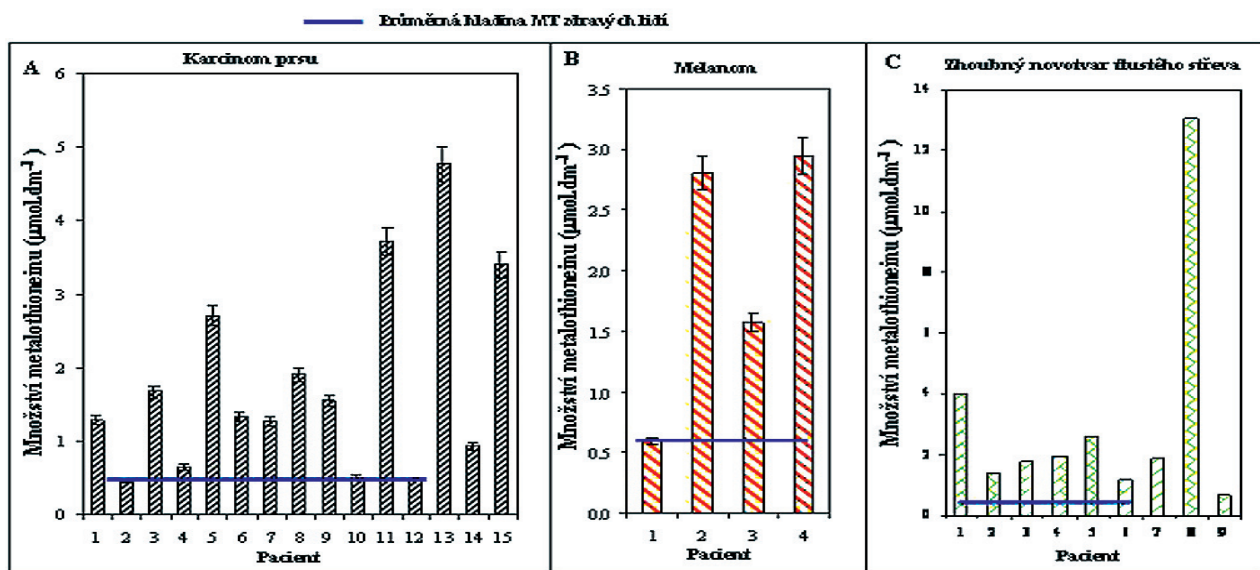
Poděkování. Práce na tomto příspěvku byla financována grantem: RASO 8/2005 a GAČR 525/04/P132.



Obr. 1.: Enzymová aktivita jaterních enzymů (ALP, AST, ALT a GMT) u pacientů s (A) nádory prsu, (B) melanomem (C) zhoubným nádorem tlustého střeva. Ve vloženém obrázku je ukázána hladina nádorového markeru CA 15-3.



Obr. 2.: Elektroanalytické stanovení metalothioneinu. (A) Schéma adsorptivní přenosové techniky (1) vytvořená pracovní elektroda; (2) adsorpce vzorku na povrch elektrody; (3) oplach elektrody, odstranění nadbytečného množství vzorku; (4) analýza. (B) Diferenční pulzní voltamogram základního elektrolytu (- - -) a $10 \text{ nmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ MT po 120 s akumulace na povrch pracovní elektrody. (C) Závislost výšky signálu Cat_2 na koncentraci. (D) Typické voltamogramy pacientů s nádory prsu, tlustého střeva a melanomem. AdTS DPV parametry byly následující: počáteční potenciál $-0,6 \text{ V}$, konečný potenciál $-1,6 \text{ V}$, modulační čas $0,057 \text{ s}$, časový interval $0,2 \text{ s}$, potenciálový krok $1,05 \text{ mV/s}$, modulační amplituda 250 mV , $E_{ads} = 0 \text{ V}$, teplota $0 \text{ }^\circ\text{C}$. Další podrobnosti jsou uvedeny v sekci Materiál a metody.



Obr. 3.: Množství MT u pacientů s (A) nádory prsu a (B) melanomem (C) zhoubným nádorem tlustého střeva.

Literatura

1. Abrhamova, J.: Národní onkologický registr. <http://www.uzis.cz/nor/norindx.htm> 2005.
2. Plesko, I., Obsitnikova A., Cuninkova M.: Epidemiological aspects of in situ female breast cancer in Slovakia. *Klinická Onkologie* 2003, 16, 227-230.
3. NOP: Czech National cancer control program. *Klinická Onkologie* 2004, 17, 36-36.
4. Aschermannova, A.: Úvodník. *The Lancet Oncology - Czech* 2005, 4, 81-81.
5. Skovajsova, M., Bartonkova H., Danes J.: Breast cancer screening in the Czech Republic. *Klinická Onkologie* 2004, 17, 46-48.
6. Zaloudik, J.: National oncological program - anachronism or future view? *Klinická Onkologie* 2004, 17, 72-74.
7. Theocharis, S. E., Margeli A. P., Klijanienko J. T., Kouraklis G. P.: Metallothionein expression in human neoplasia. *Histopathology* 2004, 45, 103-118.
8. Kizek, R., Vacek J., Adam V., Vojtesek B.: Metallothionein - Cisplatin and anticancer therapy. *Klin. Biochem. Metab.* 2004, 12, 72-78.
9. Kizek, R., Vacek J., Trnková L., Klejduš B., Havel L.: Application of catalytic reactions on a mercury electrode for metallothionein electrochemical detection. *Chem. Listy* 2004, 98, 160-167.
10. Kasahara, K., Fujiwara Y., Nishio K., Ohmori T., Sugimoto Y., Komiya K., Matsuda T., Saijo N.: Metallothionein content correlates with the sensitivity of human small cell lung cancer lines to cisplatin. *Cancer Res.* 1991, 51, 3237-3242.
11. Zelena, J., Potesil D., Vacek J., Adam V., Hradecký J., Prusa R., Kizek R., Vojtesek B.: Metallothionein as a prognostic marker of tumor disease. *Klinická Onkologie* 2004, 17, 190-195.
12. Kizek, R., Trnkova L., Palecek E.: Determination of metallothionein at the femtomole level by constant current stripping chronopotentiometry. *Anal. Chem.* 2001, 73, 4801-4807.
13. 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, 56, 57-61.
14. Strouhal, M., Kizek R., Vacek J., Trnkova L., Nemeč M.: Electrochemical study of heavy metals and metallothionein in yeast *Yarrowia lipolytica*. *Bioelectrochemistry* 2003, 60, 29-36.
15. Olafson, R. W., Olsson P. E.: Electrochemical detection of metallothionein. *Methods in Enzymol.* 1991, 205, 205-213.
16. Brazdova, M., Kizek R., Havran L., Paleček E.: Determination of glutathione-S-transferase traces in preparations of p53 C-terminal domain (aa320-393). *Bioelectrochemistry* 2002, 55, 115-118.
17. Petřlova, J., Potesil D., Mikelova R., Blastik O., Adam V., Trnkova L., Jelen F., Prusa R., Kukacka J., Kizek R.: Attomole voltammetric determination of metallothionein. *Electrochim. Acta* 2005, submitted.
18. Brdicka, R.: Polarographic studies with the dropping mercury cathode. -Part XXXI. - A new test for proteins in the presence of cobalt salts in ammoniacal solutions of ammonium chloride. *Coll. Czech. Chem. Commun.* 1933, 5, 112-128.
19. Heyrovsky, M.: Rudolf Brdicka a fyzikální chemie. Od polarografie po hmotnostní spektrometrii. *Vesmír* 2005, 84, 257-259.
20. Brdicka, R.: Polarographic investigation in serological cancer diagnosis. *Nature* 1937, 139, 1020-1021.
21. Brdicka, R.: Application of the polarographic effect of proteins in cancer diagnosis. *Nature* 1937, 139, 330-330.
22. Brdicka, R.: Zur frage nach der natur der polarographisch feststellbaren serumveränderungen bei Krebs. *Klinische Wochenschrift* 1938, 18, 305-308.
23. Heyrovsky, J.: Polarographic research on cancer. *Nature* 1938, 142, 317-319.
24. Kalous, V.: 70 let od objevu Brdickovy polarografické reakce bílkovin. *Klin. Biochem. Metab.* 2004, 12, 265-267.
25. Prusa, R., Blastik O., Potesil D., Trnkova L., Zehnalek J., Adam V., Petřlova J., Jelen F., Kizek R.: Metallothioneins as a marker of tumor diseases. *Clin. Chem.* 2005, 51, A56-A56.
26. Prusa, R., Kizek R., Vacek J., Trnkova L., Zehnalek J.: Study of relationship between metallothionein and heavy metals by CPSA method. *Clin. Chem.* 2004, 50, A28-A29.
27. Prusa, R., Potesil D., Masarik M., Adam V., Kizek R., Jelen F.: Fast and sensitive electrochemical detection of native, denatured, and aggregated forms of tumor suppressor protein p53. *Mol. Bio. Cell* 2004, 15, 249A-249A.
28. Petřlova, J., Blastik O., Prusa R., Kukacka J., Potesil D., Mikelova R., Adam V., Zehnalek J., Kizek R.: Using of electrochemical methods for studying of metallothionein content in the human blood serum of a patient poisoned by lead and treated by platinum. *Biomedical Papers* 2005, 149, in press.
29. Petřlova, J., Blastik O., Zitka O., Adam V., Potesil D., Mikelova R., Prusa R., Stiborova M., Trnkova L., Zehnalek J., Kizek R.: An electrochemical study of metallothionein as a potential tumour disease marker. *Annals the Polish Chemical Society* 2005, in press.

Došlo: 20. 8. 2005
Přijato: 13. 1. 2006