

254 Studium obsahu metalothioneinu v buňkách zhoubných nádorů.

Fabrik I.^{1,2}, Húska D.¹, Adam V.^{1,2}, Binková H.³, Horáková Z.³, Thotová E.³, Salzman R.³, Eckschlager T.⁴, Kizek R.¹

1) Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně

2) Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno

3) Klinika otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku, Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně, Brno

4) Klinika dětské hematologie a onkologie, 2. lékařská fakulta, Univerzity Karlovy v Praze

Korespondenční autor: René Kizek, Ústav chemie a biochemie MZLU v Brně • e-mail: kizek@sci.muni.cz

Klíčová slova: Metalothionein – Zhoubné nádory v oblasti hlavy a krku – Diferenčně pulzní voltametrie – Brdičkova reakce – Spinocelulární karcinom

Úvod

Metalothionein je malý, termostabilní metaloprotein, o molekulové hmotnosti mezi 6 a 7 kDa, přičemž asi 30% jeho obsahu tvoří cystein. Konkrétně obsahuje 20 molekul cysteinu a v jeho struktuře se nevyskytuje žádná aromatická aminokyselina. Právě cystein propůjčuje metalothioneinu jeho zásadní vlastnosti, totiž vázat ionty těžkých kovů. MT je rozdělen na dvě domény (α , β) přičemž první z nich je schopna vázat 3 ionty těžkého kovu a druhá 4 dvouvalné ionty [1]. Díky tomu může vykonávat v organismu svoji funkci významného přenašeče kovů, zejména zinku [2]. Vysokou afinitu má ale také ke kadmii a rtuti [3], jejichž vyvázáním v případě intoxikace udržuje homeostázu. Předpokládá se, že komplexy MT a těžkých toxických kovů jsou degradovány v ledvinách. Svoji ochrannou úlohu hraje i při oxidativním stresu buněk [4]. Nejen proto je pozorován jeho zvýšený obsah právě v nádorových buňkách, kde chrání jejich buněčný aparát. Metalothionein (MT) se vyskytuje v celé živočišné říši a i vyšší rostliny syntetizují obdobné metaloproteiny [5]. Orgány s největším obsahem MT u živočichů jsou játra, ledviny, slinivka a střevo a jeho množství se může lišit v závislosti na druhu, stáří, stravovacích návycích a mnoha dalších komplexních faktorech. Schopnost vázat těžké kovy se ukazuje jako zásadní při léčbě nádorů cytostatiky, zejména cisplatině [6]. MT dokáže část podaného léku vyvázat a tím snížit jeho účinnost [7].

Materiál a metody

Pro naši studii jsme zvolili vzorky tumorové tkáně z oblasti hlavy a krku od pacientů z ORL kliniky FN sv. Anny v Brně. Jednalo se o převážně o spinocelulární karcinomy laryngu, orofaryngu, hypopharyngu, vedlejších dutin nosních a kůže. Vzorky byly ihned zamrazeny na -20°C až do doby jejich dalšího zpracování. Celkově bylo analyzováno 49 vzorků tumorózních tkání od 41 mužů a 8 žen, konkrétně 21 případů zhoubného nádoru střední části hltanu (průměrný věk 60,9 let), 21 případů zhoubného nádoru hrtanu (průměrný věk 64,3 let), 4 případy zhoubného nádoru dolní části hltanu (průměrný věk 49,5 let), 3 případy zhoubného nádoru vedlejší dutiny nosní (průměrný věk 64,7 let). Rozsah primárního onemocnění, přítomnost lokoregionálních nebo vzdálených metastáz byly stanoveny TNM klasifikací, dále byl sledován stupeň diferenciace nádoru.

Příprava vzorků

Vzorky tumorózní tkáně nejprve byly homogenizovány a zředěny 1 ml fosfátového pufru (pH 7). Následně byly 15 minut denaturovány při 100°C v termobloku (Eppendorf 5430, USA) a centrifugovány při 16 000 ot/min a 4°C celkem 30 minut (Eppendorf 5402, USA). Díky svojí termostabilitě zůstává i po denaturaci metalothionein přítomen v roztoku. Poté byl odebrán supernatant a 1 000x zředěn, opět fosfátovým pufrem (pH 7) a změřeny námi upraveným postupem adsorptivní přenosové techniky (AdTS) s diferenční pulzní voltametrií (DPV). Množství analyzovaného vzorku bylo 5 μl .

Eletroanalytické stanovení metalothioneinu metodou AdTS DPV s použitím Brdičkovy reakce

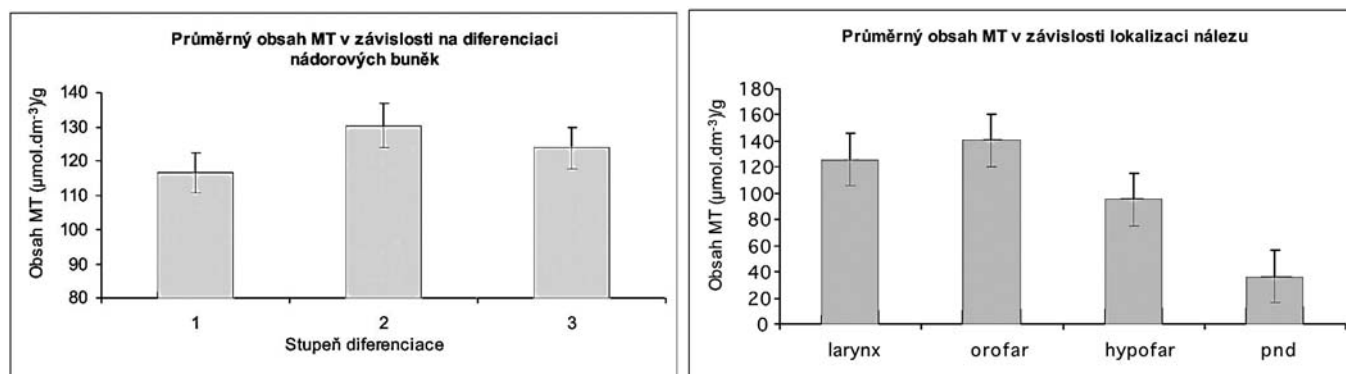
Analýza probíhala na přístroji Autolab Analyser (EcoChemie, Nizozemí) ve spojení s VA – Stand 663 (Metrohm, Švýcarsko) v klasickém tříelektrodovém uspořádání. Jako pracovní elektroda byla použita visící kapková elektroda (HMDE) s plochou kapky 0,4 mm²; referentní elektrodou byla Ag/AgCl/3M KCl a pomocná grafitová elektroda. Základní elektrolyt (1 mmol.dm⁻³ [Co(NH₃)₆]Cl₃ a amonný pufr; NH₃(aq) a NH₄Cl o pH 9,6) byl měněn každých 5 měření. AdTS DPV byly následující: čas akumulace 120 s, počáteční potenciál $-0,6\text{ V}$, konečný potenciál $-1,6\text{ V}$, modulační čas 0,057 s, časový interval 0,2 s, potenciálový krok 1,05 mV/s, modulační amplituda 250 mV, $E_{\text{ads}} = 0\text{ V}$, teplota elektrolytu 4°C .

Výsledky a diskuse

Rizikové faktory pro vznik nádorů v oblasti hlavy a krku jsou dnes již dobře známy. Jsou to zejména kouření a pití alkoholických nápojů, zvláště destilátů. Léčba pacienta postiženého rakovinou v oblasti hlavy a krku se odvíjí od stádia nádoru. Časná stádia jsou léčena chirurgicky nebo radioterapií, případně obojím. U pokročilejších stadií se jako další modalita využívá chemoterapie. Zde figurují preparáty, které právě MT váže a snižuje tak zasažení nádorových buněk a celkově účinnost léčby.

Analýza MT

Elektrochemická analýza MT představuje jeden z vhodných analytických nástrojů pro detekci v biologických vzorcích [9]. V současnosti prakticky neexistuje žádná vhodná analytická metoda pro rutinní stanovení MT. Téměř všechny klinické studie jsou založeny na imunohistochemickém stanovení za použití různých protilátek proti MT, případně detekce hladiny mRNA za využití technik molekulární biologie. Nedávno bylo ukázáno, že pro citlivé stanovení MT Brdičkovou reakcí je výhodné provádět měření za snížené teploty v rozmezí 5-10°C. My jsme v našich experimentech metodou AdTS a DPV tento výsledek potvrdili [10]. Na získaných voltamogramech jsou pozorovatelné signály vzniklého komplexu MT s ionty kobaltu (RS_2Co) a typické katalytické signály Cat1 a Cat2 [11]. Katalytický signál Cat2 se s klesající koncentrací MT lineárně snižoval ($y_{Cat2} = 0,6616x + 10,211$; $R^2 = 0,9955$).

**Obr. 1**

Průměrné koncentrace MT v závislosti na diferenciaci buněk a v závislosti na lokalizaci nálezu. Měřeno AdTS DPV metodou, Brdičkovou reakcí, doba akumulace 120 s, další podrobnosti jsou uvedené v sekci Metody a materiál.

Obsah MT ve zhoubných nádorech

Námi zjištěný průměrný obsah MT v nádorových tkáních byl v rozmezí 30-180 $\mu\text{mol.dm}^{-3}$ na 1 g zhoubného nádoru. V závislosti na stupni diferenciace byl nejvyšší obsah MT zjištěn u pacientů s G2, nejnižší obsah u pacientů s G1 (Obr. 1). Ověřili jsme, že obsah MT je závislý i na postižené oblasti konkrétně nejvyšší koncentrace byly zjištěny v tumorových tkáních pacientů s nádorovým onemocněním oropharyngu (140-160 $\mu\text{mol.dm}^{-3}$ na 1 g vzorku) a nejnižší v tkáních pacientů s nádorem vedlejší dutiny nosní (30-50 $\mu\text{mol.dm}^{-3}$ na 1 g vzorku) (Obr. 1). Hladina MT kolísala také v závislosti na stádiu nádorového onemocnění. Nejvyšší koncentrace byly zjištěny ve stádiu I nádoru (130-150 $\mu\text{mol.dm}^{-3}$ na 1 g vzorku) a předběžné výsledky ukazují na klesající tendenci u pozdějších stádií nemoci.

Závěr

Zjištěné výsledky potvrzují, že je výhodné dále se zabývat vztahem MT ke zhoubným nádorům a pokračovat ve snahách o objasnění jeho funkce v metabolismu nádorových buněk.

Poděkování

Práce byla podporována výzkumnými projekty Ligy proti rakovině Praha 2006 a Během Terryho Foxe 2007.

Literatura

1. Kizek R, Vacek J, Adam V, Vojtesek B. Vztah metalothioneinu k rakovině a protinádorové léčbě. *Klin. Biochem. Metab.* 2004;12:72-78.
2. Strouhal M, Kizek R, Veccek J, Trnkova L, Nemec M. Electrochemical study of heavy metals and metallothionein in yeast *Yarrowia lipolytica*. *Bioelectrochemistry* 2003;60(1-2):29-36.
3. Adam V, Petrlova J, Potesil D, et al. Study of metallothionein modified electrode surface behavior in the presence of heavy metal ions-biosensor. *Electroanalysis* 2005;17(18):1649-1657.
4. Potesil D, Petrlova J, Adam V, et al. Simultaneous femtomole determination of cysteine, reduced and oxidized glutathione, and phytochelatin in maize (*Zea mays* L.) kernels using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography A* 2005;1084(1-2):134-144.
5. Adam V, Zehnalek J, Petrlova J, et al. Phytochelatin modified electrode surface as a sensitive heavy-metal ion biosensor. *Sensors* 2005;5(1-2):70-84.
6. Blastik O, Petrlova J, Adam V, et al. Interakce metalothioneinu s těžkými kovy a protinádorovými léčivy založených na bazi platiny. XXIX. Brněnské onkologické dny 2005, Brno, Česká republika: 108-110.

VARIA

7. Prusa R, Svoboda M, Blastik O, et al. Increase in content of metallothionein as marker of resistance to cisplatin treatment. *Clinical Chemistry* 2006;52(6):A174-A175.
8. Petrlova J, Potesil D, Zehnalek J, et al. Cisplatin electrochemical biosensor. *Electrochimica Acta* 2006;51(24):5169-5173.
9. Petrlova J, Blastik O, Adam V, et al. Detekce zeptomolárních hladin metallothioneinu chronopotenciometrickou rozpouštěcí analýzou na rtuťové elektrodě. XXIX. Brněnské onkologické dny 2005, Brno, Česká republika: 111-113.
10. Blastik O, Svoboda M, Prusa R, et al. Overení senzitivity elektrochemického stanovení metallothioneinu jako potenciálního markeru nádorových onemocnění. Dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie 2005, Olomouc, Czech republic: 35-36.
11. Kizek R, Vacek J, Trnkova L, Klejdus B, Havel L. Application of catalytic reactions on a mercury electrode for electrochemical detection of metallothioneins. *Chem. Listy* 2004;98(4):166-173.