

255 Hladina metalothioneinu v melanomech.

Šobrová P.¹, Adam V.^{1,2}, Fabrik I.^{1,3}, Křížková S.¹, Kukačka J.⁴, Průša R.⁴, Strnádel J.^{5,6}, Horák V.⁵, Kizek R.^{1,*}

1) Ústav chemie a biochemie

2) Ústav výživy zvířat a pícninářství, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně

3) Katedra biochemie, Masarykova univerzita, Brno

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

5) Laboratoř biologie nádorů, Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, Liběchov

6) Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Česká zemědělská univerzita v Praze

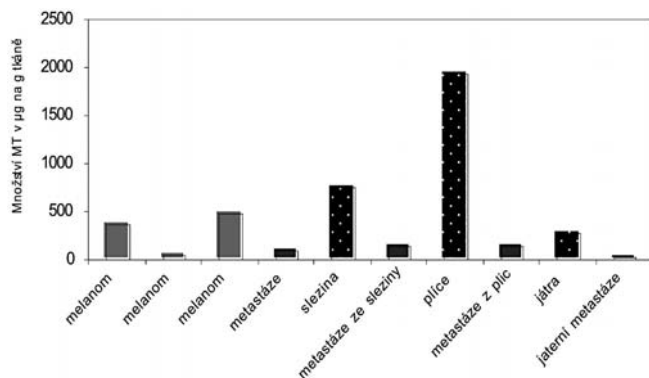
*) Korespondenční autor: kizek@sci.muni.cz

Klíčová slova:

Metalothionein – melanom – metastáza – krevní sérum a plasma – adsorptivní přenosová technika – diferenční pulzní voltametrie

Úvod

Maligní melanom vzniká maligní přeměnou melanocytů, buněk neuroektodermálního původu, které se vyskytují především v kůži, v duhovce a spojivce, méně ve sliznicích. Tyto melanocyty jsou uloženy ve spodní vrstvě pokožky a vytvářejí hnědé barvivo zvané melanin. Melanin je odpovědný za barvu kůže. Mateřská znaménka jsou příkladem seskupení mnoha melanocytů dohromady. Nejčastěji se vyskytují kožní formy melanomu. Slizniční melanomy jsou vzácné. Rizikovým faktorem pro vznik maligního melanomu vznikajícího nejčastěji z plošného pigmentového névu je expozice UV záření, zejména jeho UVB složce. Nárazové intenzivní opalování (především v dětství) vedoucí k popálení kůže a solární dermatitidě tak zvyšuje pravděpodobnost výskytu melanomu. I když maligní melanom vzniká z mateřských znamének jen někdy, vzrůstá při jejich vyšším počtu úměrně i riziko vzniku tohoto nádoru. Familiární výskyt melanomu (u zhruba 10% pacientů) ukazuje rovněž na vliv genetických faktorů při vzniku tohoto nádorového onemocnění.



Obr. 1

Množství MT v melanomech a metastázách u miniaturních prasat linie MeLiM

Melanom metastazuje lymfogenně i hematogenně, ve většině případů se však metastázy objeví nejprve v regionálních uzlinách nebo lymfatických ve směru k regionální uzlinové oblasti. Značnou afinitu má melanom ke kůži a podkoží. I vzdálený rozsev je často po dlouhou dobu omezen pouze na výskyt kožních a podkožních metastáz, jichž může být i několik desítek až stovek, bez viscerální diseminace.

Zlom při progresi onemocnění se dostaví až při rozvoji plicních, jaterních nebo mozkových metastáz. Základní a jedinou vskutku účinnou léčbou je chirurgický výkon, jehož kurativní možnosti jsou však omezeny pouze na časně a lokalizované fáze

onemocnění. Radioterapie je s ohledem na radiorezistenci melanomu používána zřídka a jen jako paliativní zákrok. Chemoterapie vykazuje velmi malou účinnost s příznivým efektem trvajícím jen několik měsíců [2,10].

V několika studiích byla ukázána souvislost mezi hladinou metalothioneinu (MT) a progresí zhoubného nádoru [3,4]. Naše experimentální práce se zabývá studiem MT v lidském a prasečím melanomu, v lidském krevním séru a ve stabilních buněčných liniích derivovaných z lidských melanomů. Jak nejnovější výzkum naznačuje, hladina MT může souviset s průběhem nádorového onemocnění. Objev MT je datován rokem 1957, kdy Margoshes a Valee izolovali MT z koňských ledvin [5]. MT patří do skupiny intracelulárních, nízkomolekulárních na cystein velmi bohatých proteinů (obsah cysteinu až 30% v molekule proteinu) o molekulové hmotnosti 6-10 kDa [6,7]. Metalothioneiny se skládají ze dvou vazebných domén α a β , které jsou složeny z cysteinových klastrů. N-terminální část peptidu je označena jako β -doména, má tři vazebná místa pro dvojmocné ionty; C-terminální část peptidu (α -doména) má schopnost vyvázat čtyři dvojmocné ionty kovů. V případě jednomocných iontů kovů je MT schopna vázat celkem 12 atomů [8].

Materiál a metody

Biologické vzorky

Melanomové nádorové linie byly získány z Masarykova onkologického ústavu v Brně. Konkrétně se jednalo o linie primárního melanomu wM4, wM9 a metastatické melanomové linie wM12, wM15. Tyto linie jsou považovány z hlediska jejich chování *in vitro* za stabilní. Melanomy byly získány z miniaturních prasat linie MeLiM (Ústav živočišné fyziologie AV ČR, v.v.i. v Liběchově). Pro naše analýzy byly použity vzorky melanomů z kůže a z orgánů postižených metastázami (jater, sleziny a plic).

Byla získána séra od pacientů léčených pro melanom ve FN Motol. Krevní séra byla ihned zmrazena na -20°C do doby jejich dalšího zpracování.

Příprava vzorků pro elektroanalytické stanovení

Ze získaných vzorků bylo odebráno 100 μl a denaturováno 15 min. při 99°C v termobloku. Zde bylo využito termostability metalothioneinu, který zůstal zachován v nativní formě ve vzorku. Po centrifugami byl oddělen supernatant od sedimentu a vzorky byly 1000x zředěny fosfátovým pufrům o $\text{pH}=7$ a analyzovány námi upraveným postupem adsorptivní přenosové techniky (AdTS) s diferenční pulzní voltametrií (DPV). Množství analyzovaného vzorku bylo 5 μl .

Vzorky z melanomů, metastáz a buněčných linií byly ještě předem mechanicky zhomogenizovány po zmrazení kapalným dusíkem a pro jejich převedení do roztoku byl přidán 1 ml fosfátového pufru o $\text{pH} = 7$. Vzorky se pak denaturovaly, centrifugovaly a dále analyzovaly stejným postupem jako v případě vzorků krve a krevního séra.

Elektroanalytické stanovení metalothioneinu pomocí Brdičkovy reakce metodou adsorptivní přenosové rozpouštěcí techniky ve spojení s diferenční pulzní voltametrií

Vzorky byly analyzovány na přístroji AUTOLAB Analyser (EcoChemie, Nizozemí) ve spojení s VA-Stand 663 (Metrohm, Švýcarsko) v klasickém tříelektrodovém uspořádání. Pracovní elektrodou byla visící rtuťová kapková elektroda (HMDE) s plochou kapky 0,4 mm^2 ; referentní elektrodou byla Ag/AgCl/3M KCl a pomocnou grafitová elektroda. Základní elektrolyt (1 mmol/dm^3 amonný pufr; $\text{NH}_3(\text{aq}) + \text{NH}_4\text{Cl}$ (Sigma Aldrich, ACS), $\text{pH} = 9,6$) byl po každých 5 analýzách vyměněn. Parametry adsorptivní přenosové rozpouštěcí techniky ve spojení s diferenční pulzní voltametrií (AdTS DPV) byly následující: čas akumulace 120 s, 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, Eads = 0 V, teplota 4°C .

Výsledky a diskuse

V práci jsou popsány experimentální výsledky stanovení obsahu MT v jednotlivých biologických vzorcích. Stanovili jsme množství MT v suspenzích z lidských melanomových buněčných linií, dále jsme sledovali MT u zvířat a následně jsme provedli stanovení MT v lidském séru a plazmě pacientů s nádorem v oblasti hlavy a krku.

Detekce metalothioneinu v melanomových nádorových liniích

Byly porovnávány buněčné linie primárního melanomu a též metastatické melanomové linie. Jako použité vzorky sloužily stabilní buněčné linie kultivované v Masarykově onkologickém ústavu v Brně. Tyto vzorky byly připraveny pro analytické stanovení a naředěny na počty buněk 600 000, 100 000, 10 000 a 500 buněk v 1 ml. Bylo pozorováno, že největší odezvu signálů dává počet buněk 100 000 s limitem detekce 500 buněk/ml. Vyšší počty buněk při stanovování vykazovaly již známky vysoké saturace elektrody. Pomocí elektrochemické analýzy bylo detekováno množství metalothioneinu u jednotlivých linií. Stanovené množství se u jednotlivých linií lišilo koncentrací, která byla v rozmezí od 6,16 – 11,2 $\mu\text{mol}/\text{l}$. Nejnižší množství bylo stanoveno u metastatické melanomové linie wM12 a to 4,16 $\mu\text{mol}/\text{l}$ a nejvyšší u linie melanomů wM4, kde byla koncentrace 11,2 $\mu\text{mol}/\text{l}$.

Detekce metalothioneinu v melanomech u zvířat

Při stanovování množství metalothioneinu v živočišných tkáních byly použity primární kožní melanomy a vzorky z vnitřních orgánů (játra, plíce, slezina) s metastázami odebrané od miniaturních prasat linie MeLiM. U vzorků z vnitřních orgánů bylo porovnáváno množství MT přímo v metastázách a rovněž v okolní zdravé tkáni. Bylo zjištěno, že hladina metalothioneinu v melano-

mu se pohybovala převážně v hodnotách 400 – 500 $\mu\text{g/g}$ tkáně. Při porovnávání hladiny metalothioneinu v metastázách a v okolní zdravé tkáni bylo zjištěno, že hladina v metastázách je až 12 x nižší. Pravděpodobně v metastatických buňkách došlo k výrazným biochemickým změnám, které souvisejí se syntézou MT. Toto snížení je i znát mezi poměrem zdravé tkáně a velmi rozsáhlého melanomu, kdy je tento rozdíl zhruba pětinašobný. Nejvyšší množství metalothioneinu bylo stanoveno v plicích, kde se hodnota pohybovala okolo 1950 $\mu\text{g/g}$, dále ve slezině 756.1 $\mu\text{g/g}$ a v játrech 281.0 $\mu\text{g/g}$.

Detekce metalothioneinu v lidské plné krvi a krevním séru

Pro naše účely jsme získaly vzorek plné krve a krevního séra odebrané ze stejného jedince a ve stejném čase. Vzorky byly připraveny podle postupu uvedeného v sekci „Materiál a metody“. Nejdříve jsme studovali změny elektrochemických signálů MT v závislosti na teplotě základního elektrolytu. Pozorovaný analytický signál se zvyšuje v závislosti na snižující teplotě (asi o 3% výšky píku na $^{\circ}\text{C}$), navíc je reprodukovatelnost měření velmi dobrá a chyba stanovení klesá pod 5%. Z těchto důvodů je velmi výhodné provádět analýzy MT při teplotách v rozmezí 5-10 $^{\circ}\text{C}$. Významným ukazatelem detekce MT je také doba akumulace na povrch pracovní elektrody. V našich experimentech jsme potvrdili, že doba akumulace 120 s je nejvhodnější pro analýzu krevních vzorků, pravděpodobně pro výhodné pokrytí povrchu pracovní elektrody. Z řady našich experimentálních výsledků jsme zjistili, že správné ředění biologického vzorku výrazně ovlivňuje stanovení MT. V našem experimentu jsme provedli ředění lidského krevního séra i plné krve (10, 100, 1 000 a 10 000 x fosfátovým pufrům). V případě obou námi testovaných vzorků jsme zjistili, že nejvhodnější je ředění krevních vzorků 1000 x. Zde byl nalezen velmi dobře vyvinutý signál použitelný pro běžné analýzy. Dále byl pozorovatelný rozdíl v obsahu MT v krevním séru a plné krvi. Ten je způsoben přítomností MT v erythrocytech, kde se účastní ochrany buněk před oxidačním stresem a také udržování iontové rovnováhy.

Detekce metalothioneinu v krevním séru u pacientů s melanomem

Nejčastěji se vyskytují kožní formy melanomu. Slizniční melanomy jsou vzácné. Incidence melanomu celosvětově u bělošské populace v posledních desetiletích trvale stoupá u mužů i u žen. Proto je této malignitě věnována značná pozornost. Byl studován vztah mezi zvýšenou hladinou MT a výrazně horší prognózou. V naší studii jsme při stanovování hladiny metalothioneinu a porovnávání výsledků zjistili, že hladina MT byla u všech pacientů s melanomem zvýšená v porovnání s kontrolní skupinou (0.6 $\mu\text{mol/l}$). Průměrná hladina MT u pacientů s nádorem je 1.97 $\mu\text{mol/l}$. U tří pacientů byl obsah MT vyšší než 1 $\mu\text{mol/l}$ a u dvou pacientů přesáhla hladina MT 2 $\mu\text{mol/l}$.

Závěr

Získané experimentální výsledky naznačují, že studium hladiny metalothioneinu je nejen zajímavé z hlediska obecného poznání jeho vztahu k malignímu melanomu, ale přináší i nové poznatky pro pochopení léčebné odpovědi u tohoto typu nádorového onemocnění.

Poděkování

Příspěvek vznikl za podpory grantů Liga proti rakovině Praha 2006 a Běh Terryho Foxe 2007.

Literatura

1. Lauerova L, Dusek L, Simickova M, Kocak I, Vagundova M, Zaloudik J, et al. Malignant melanoma associates with Th1/Th2 imbalance that coincides with disease progression and immunotherapy response. *Neoplasma*. 2002;49(3):159-66.
2. Kavanagh D, Hill ADK, Dijkstra B, Kennelly R, McDermott EMW, O'Higgins NJ. Adjuvant therapies in the treatment of stage II and III malignant melanoma. *Surg J R Coll Surg Edinb Irel*. 2005 Aug;3(4):245-56.
3. Sauerbrey A, Zintl F, Volm M. Expression of metallothionein in initial and relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Ann Haematol*. 1994;69:111-5.
4. Weinlich G, Bitterlich W, Mayr V, Fritsch PO, Zelger B. Metallothionein-overexpression as a prognostic factor for progression and survival in melanoma. A prospective study on 520 patients. *Brith J of Dermatol*. 2003;149:535-41.
5. Margoshes M, Vallee BLA. A cadmium protein from equine kidney cortex. *J Am Chem Soc*. 1957;79:4813-4.
6. Kasahara K, Fujiwara Y, Nishio K, Ohmori T, Sugimoto Y, Komiya K, et al. Metallothionein content correlates with the sensitivity of human small cell lung cancer lines to cisplatin. *Cancer Res*. 1991;51(12):3237-42.
7. 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):166-73.
8. Kagi JHR, Schaffer A. Biochemistry of Metallothionein. *Biochemistry*. 1988;27(23):8509-15.
9. Zelger BWH, Sidoroff A, Stanzl U. Deep penetrating dermatofibroma vs. dermatofibrosarcoma protruberans - a clinicopathologic comparison. *Am J Surg Pathol*. 1994;18:677-86.
10. Klener P.: Klinická onkologie. Galén a Karolinum, 2002, 519-528