

URČENÍ HLADINY TERMOSTABILNÍCH THIOLŮ U PACIENTŮ SE ZHOUBNÝM NÁDOREM

LEVEL OF HEAT-STABLE THIOLS IN PATIENTS WITH A MALIGNANT TUMOR

FABRIK I.¹, ADAM V.¹, KRÍŽKOVÁ S.¹, KUKAČKA J.², PRŮŠA R.², TRNKOVÁ L.³, KIZEK R.^{1*}

¹LABORATOŘ MOLEKULÁRNÍ BIOCHEMIE A BIOELEKTROCHEMIE, ÚSTAV CHEMIE A BIOCHEMIE, MENDELOVA ZEMĚDĚLSKÁ A LESNICKÁ UNIVERZITA V BRNĚ

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

³ÚSTAV CHEMIE, PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA, MASARYKOVA UNIVERZITA, BRNO

Souhrn

Úvod: Metallothionein (MT) je nízkomolekulární protein obsahující větší množství –SH skupin. V organizmu se převážně stará o transport iontů kovů, ale byla potvrzena i jeho funkce jako zhášedce kyslíkových radikálů. V nedávné době byla prokázána jeho spojitost s nádorovým onemocněním, což jej staví do pozice možného nádorového markeru. Jeho stanovení by však nemuselo být tak složité a nákladné, jako je stanovení jiných nádorových markerů. Snažili jsme se optimalizovat elektrochemickou metodu, která by detekovala nejen metallothionein, ale i celkovou hladinu thiolů v krevním séru. **Metody:** Pro analýzu jsme použili vzorky krevních sér pacientů se zhoubným nádorem prsu z FN Motol. Analýza probíhala elektrochemickou metodou založenou na Brdicově reakci. Bylo využito dvou různých postupů, DPV a DPV s využitím adsorptivního přenosu. **Výsledky:** Hladiny metallothioneinu byly u většiny pacientů průměrně $1,78 \pm 0,09 \mu\text{M}$, hladiny thiolů byly několikrát větší než hladiny MT, průměr $(77,92 \pm 3,90) \mu\text{M}$. Ukázalo se, že poměr mezi celkovým množstvím thiolů a hladinou metallothioneinu je relativně stálý, u většiny pacientů byl 37:1 (termostabilní thioły:metalothionein). **Závěr:** Podařilo se nám optimalizovat jak stanovení metallothioneinu, tak stanovení celkové hladiny celkových thiolů. Výsledky ukazují na vztah mezi hladinami MT a thiolů v krevním séru pacientů.

Klíčová slova: elektrochemie, prsy – nádory, proteiny, krev.

Summary

Backgrounds: Metallothionein (MT) is a low molecular protein rich in –SH groups. Transport of metal ions belongs to the main functions of this protein. In addition, MT can be considered a scavenger of reactive oxygen species. Recently an association of MT and malignant tumors was reported, suggesting a possible role of MT as a new potential tumor marker. Its detection could be easier and less expensive in comparison with other tumor markers. We attempted to optimize an electrochemical method detecting not only metallothionein but also the total level of thiols in human blood serum. **Methods:** We analyzed human blood serum samples from patients with malignant breast tumor from FN Motol. An analysis was performed by the electrochemical method based on the Brdicka reaction. Two different procedures were tested, DPV and DPV with AdTS technique. **Results:** The average level of metallothionein in human blood serum of patients with breast neoplasms was $1.78 \pm 0.09 \mu\text{M}$, but the total level of thiols was several times higher ($77.92 \pm 3.90 \mu\text{M}$). Based on the presented results, the obtained ratio between total level of thiols and metallothionein (37:1) is constant in most patients. **Conclusion:** We optimized the detection of both metallothionein and total thiols level in human blood serum. The level of MT was proportional to the total thiols level.

Keywords: Electrochemistry, Breast Neoplasms, Proteins, Blood.

Úvod

Biologický význam thiolových sloučenin není doposud uspokojivě prozkoumán. V této oblasti lze očekávat ještě celou řadu překvapení. Mezi intenzivně studované oblasti výzkumu thiolových sloučenin patří jejich vztah k hladině kyslíkových radikálů, iontů kovů, a regulaci transkripce a translace (1-5). Za možnost vstupu thiolových látek do zmíněných životně důležitých procesů je, kromě jiného, zodpovědná přítomnost thiolové skupiny (–SH) v jejich molekule. Jak je ukázáno na Obr. 1, přítomnost kyslíkových radikálů i narušení homeostázy těžkých kovů může negativně ovlivnit funkci nukleových kyselin. Zdá se ovšem, že mnohem důležitější

jsou pro správnou funkci nukleových kyselin regulační proteiny. A právě narušení regulace a případně struktury proteinů kyslíkovými radikály či těžkými kovy, které jsou schopny reaktivní formy kyslíku produkovat, může vést až ke vzniku zhoubných nádorů.

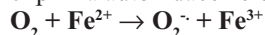
Kyslíkové radikály

V organizmu se mohou vyskytnout volné kyslíkové radikály, které jsou produkovány buňkou samotnou (v dýchacím řetězci), anebo působením řady dalších enzymů jako například NADPH oxidáza: $\text{NADPH} + 2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{O}_2^- + \text{NADP}^+ + \text{H}^+$

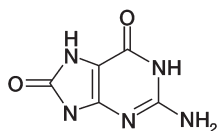
Kyslíkové radikály mohou vznikat i dalšími chemickými reakcemi katalyzovanými např. ionty těžkých kovů. Typickým příkladem vzniku reaktivních kyslíkových radikálů je reakce železnatých iontů s peroxidem vodíku (Fentonova reakce):



či přímá autoxidace železnatých iontů:



Biologická škodlivost kyslíkových radikálů je dána schopností následných oxidací základních složek buňky. Mohou tedy peroxidovat lipidy za vzniku uhlovodíkových radikálů a tak pozměnit strukturu a funkci biomembrán. V případě proteinů dochází k oxidaci aminokyselin, štěpení peptidové vazby a dalším změnám ve struktuře, funkci a protein-protein interakcích. Modifikované báze (purinové i pyrimidinové) mohou být z řetězce DNA odstraněny. Naneštěstí všechny tyto změny mohou vést ke vzniku jednořetězcových i dvouřetězcových zlomů DNA. Bylo prokázáno, že molekulou, která velmi dobře ukazuje na oxidační zatížení DNA, je modifikovaná báze 8-oxoguanin (6-8).



8-oxo guanin

Kyslíkové radikály a jejich vztah ke zdraví

Se zvýšenou hladinou kyslíkových radikálů je spojena celá řada fyziologických a patofyziologických procesů. Mezi významné patří zcela jistě *diabetes mellitus*, ateroskleróza, zánět, apoptóza, stárnutí, ischemické poškození anebo cystická fibróza. Bezpochyby do této skupiny náleží i mnoho dalších procesů, které probíhají jak ve zdraví, tak nemoci. Navíc toxického efektu kyslíkových radikálů je možné využít při terapii zhoubných nádorů. Pravděpodobně se tento efekt uplatňuje při ozařování i aplikaci léčiv. Léčiva vytvářející kyslíkové radikály následně poškozují DNA nádorových buněk (např. bleomycin, adriamycin). Podobně tomu je pokud se pro terapii používá retinová kyselina, která může vést k lipoperoxidaci biologických membrán. Na jedné straně je hledán léčebný efekt, avšak na straně druhé je potřebné chránit buňky zdravých tkání.

Protektivní efekt thiolových sloučenin

Nejznámějším ochranou molekulou ve všech buňkách je glutathion. Glutathion (GSH) byl objeven M. J. de Rey Pailhadem na konci 19. století jako substance nazvaná "hydrogénant le soufre", která byla přejmenována a charakterizována v roce 1921 F.G. Hopkinsem (9). Jeho přítomnost byla dokázána nejen u rostlin či živočichů, ale dokonce i u bakterií a kvasinek. Nejvíce jsou známy jeho antioxidační a detoxikační účinky za účasti enzymu glutathion-S-transferázy (10). Jeho role byla prokázána i při udržování homeostázy těžkých kovů v organismu. V případě ochrany buněk proti kyslíkovým radikálům je GSH oxidován za účasti enzymu glutathionperoxidázy na GSSG (Obr. 2). GSSG je následně redukován v askorbátovém

cyklu zpět na molekulu GSH. I další enzymy a molekuly jako například superoxiddismutáza, glutathionperoxidáza, kataláza, vitamín E, karotenoidy, koenzym Q, transferin či ceruloplazmin jsou schopny regulovat hladinu kyslíkových radikálů. Nicméně v experimentálních pracích bylo zjištěno, že některé další nízkomolekulární thiolové sloučeniny (např. na cystein bohatý protein metalothionein) mohou být velmi vhodnými protektivními látkami před účinkem kyslíkových radikálů (11). Byl studován ochranný efekt metalothioneinu na různých buněčných liniích. Podařilo se prokázat, že exprese a indukce metalothioneinu je asociována s oxidačním stresem a apoptózou buněk (12).

Význam metalothioneinu

Regulace hladiny iontů kovů je velmi významná a pravděpodobně klíčovým proteinem by mohl být metalothionein (13,14). Je to nízkomolekulární protein o molekulové hmotnosti 6-7 kDa, složený ze dvou domén (13,15,16). Každá z domén je schopná vázat ionty těžkých kovů. S ohledem na význam iontů kovů v regulaci buněčného dělení je hledána souvislost i mezi tímto proteinem a nádorovým onemocněním (16), jak je ukázáno na Obr. 3. Před patnácti lety byla ve světové databázi Web of Science zveřejněna první informace o vztahu metalothioneinu a zhoubného nádoru prsu (17). Později byla publikována práce na stovce pacientek, kde se autorům podařilo prokázat, že zvýšená hladina MT je asociována se špatnou prognózou onemocnění a naopak nízká hladina MT v nádorové tkáni indikovala dobrý prognostický typ (18). Podobných experimentálních výsledků dosáhli i další autoři (19-24). Zjištěná hladina MT byla v analyzovaných tkáních až třikrát vyšší proti kontrolní skupině. Na molekulární úrovni může být zvýšená exprese metalothioneinu u nádorů prsu spojena s dediferenciací nádorových buněk, jak bylo prokázáno v práci publikované v roce 1996 (25). Navíc byla pozorována vysoká korelace mezi hladinou zinku a metalothioneinu v nádorových tkáních z prsu (21). Kromě imonohistochemické detekce hladiny MT přímo v nádorové tkáni, byly navrhovány postupy využívající analýzy mRNA za použití RT-PCR (26-30). Zde se podařilo prokázat, že zvýšená hladina transkriptu MT je asociována se špatnou prognózou onemocnění a navíc hladina jedné z izoforem MT zvané MT2A ukazuje na rychlý a invazivní růst nádoru (31). Podobně bylo potvrzeno, že MT zvyšuje rezistenci nádorových buněk na protinádorovou léčbu (32-34).

Cílem této práce bylo porovnat hladiny celkových thiolů a metalothioneinu v krevním séru u skupiny pacientů se zhoubným nádorem prsu.

Materiál a metody

Klinický materiál

Byla použita krevní séra od pacientů léčených pro zhoubný nádor prsu ve FN Motol, Praha. Krevní séra byla ihned zmrazena na -20°C do doby jejich dalšího zpracování. Celkem bylo analyzováno 15 sér pacientů se zhoubným nádorem prsu. Průměrný věk pacientů činil 51 let a všichni pacienti podepsali informovaný souhlas.

Příprava vzorků pro elektroanalytické stanovení metalothioneinu

Po rozmrazení byla nejprve krevní séra naředěna ve fosfátovém pufru (pH 6,98). Poté byly vzorky umístěny

na 15 min. při 99 °C do termobloku (Eppendorf 5430, USA), následně ochlazený na 4 °C a centrifugován při 4 °C, 16 400 g po dobu 30 min. (Eppendorf 5402, USA). Takto připravené vzorky byly analyzovány námi upraveným postupem diferenčně pulsní voltametrie (DPV) a diferenčně pulsní voltametrie ve spojení s adsorptivní přenosovou technikou (AdTS).

Elektroanalytické stanovení metalothioneinu pomocí Brdičkovy reakce metodou AdTS DPV

Vzorky byly analyzovány na přístroji AUTOLAB Analyser (EcoChemie, Nizozemí) ve spojení s VA-Stand 663 (Metrohm, Švýcarsko) v klasickém tříelektroodovém uspořádání. Pracovní elektrodou byla visící rtuťová kapková elektroda (HMDE) s plochou kapky 0,4 mm²; referentní elektrodou byla Ag/AgCl/3M KCl a pomocnou elektrodou ze skelného uhlíku. Základní elektrolyt (1 mmol.dm⁻³ Co(NH₃)₆Cl₃ a 1 mol.dm⁻³ a amonný pufr; NH₃(aq) + NH₄Cl, pH = 9,6) byl po každých 5 analýzách vyměněn (35). 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_{ads} = 0 V, teplota 4 °C (14,16).

Elektroanalytické stanovení celkového obsahu termostabilních thiolů pomocí Brdičkovy reakce metodou DPV

Vzorky byly analyzovány na přístroji 747 VA Stand ve spojení s 746 VA Trace Analyzer a 695 Autosampler (Metrohm, Švýcarsko) v klasickém tříelektroodovém uspořádání. Pracovní elektrodou byla visící rtuťová kapková elektroda (HMDE) s plochou kapky 0,4 mm²; referentní elektrodou byla Ag/AgCl/3M KCl a pomocnou platinová elektroda. Základní elektrolyt (1 mmol.dm⁻³ Co(NH₃)₆Cl₃ a 1 mol.dm⁻³ a amonný pufr; NH₃(aq) + NH₄Cl, pH = 9,6) byl po každých 5 analýzách vyměněn (35). DPV parametry byly následující: počáteční potenciál -0,7 V, konečný potenciál -1,75 V, modulační čas 0,057 s, časový interval 0,2 s, potenciálový krok 2 mV/s, modulační amplituda -250 mV, E_{ads} = 0 V, teplota základního elektrolytu 4 °C.

Výsledky a diskuse

Zhoubné nádory prsu jsou nejvíce rozšířeným zhoubným onemocněním u žen. V České republice je diagnostikováno více než 40 případů na 100 000 žen ročně (36,37). Tumorové markery obecně nejsou diagnostickou pomůckou, i když mohou poskytnout informaci, která může k diagnostickému postupu přispět. O výběru a nasazení tumorových markerů před terapií a v průběhu léčby se zpravidla rozhoduje na základě klinického a histologického nálezu. Avšak pro screening a diagnostiku onemocnění v časném stadiu je tento způsob obtížně aplikovatelný. Z tohoto důvodu jsou hledány jednoduché molekulární markery stanovitelné v snadno dostupných tělních tekutinách jako je krev, krevní sérum, moč apod. (38-41). Je tu však i jiný aspekt studia tumorových markerů a to sledování změn jejich hladin v průběhu terapie a po jejím skončení, kdy nám mohou poskytnout velmi časnou informaci o relapsu nádorového onemocnění mnohdy i měsíce před objevením klinických příznaků.

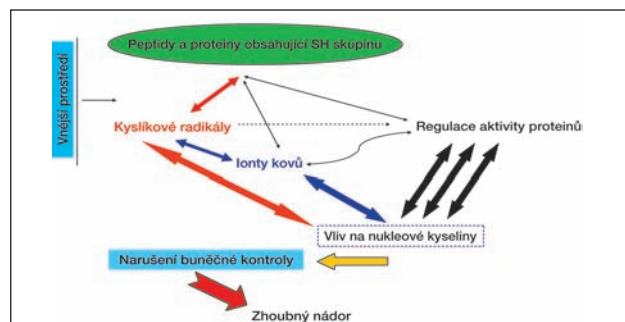
Význam thiolů

Thiolové sloučeniny hrají pravděpodobně významnou roli v regulaci buněčného dělení, i přestože je doposud o přesných mechanismech známo velmi málo. Avšak bylo prokázáno, že hladina metalothioneinu je zvýšená u pacientů s řadou nádorových onemocnění a studovat jeho hladinu má u pacientů se zhoubnými nádory význam. Doposud všechny metody pro určení množství metalothioneinu ve tkáních byly založeny na imunohistochemickém stanovení tohoto proteinu v nádorové tkáni. Takový způsob určení vyžaduje bioptické odebrání tkáně a poměrně náročné zpracování vzorku. Navíc není možné získaných výsledků využívat pro monitorování hladiny proteinu. Nedávno jsme navrhli unikátní postup umožňující analýzu metalothioneinu přímo v krevním séru (16). Metoda je založena na denaturaci interferujících proteinů a interakci termostabilního metalothioneinu přímo s detekčním zařízením (elektrodou).

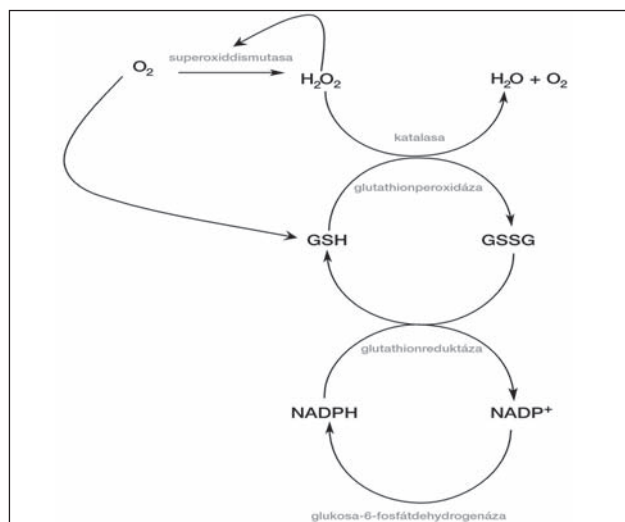
Pro tento účel bylo v naší laboratoři vyvinuto stanovení metalothioneinu pomocí techniky adsorptivního přenosu. Technika umožňuje provádět analýzu obsahu metalothioneinu ve vzorku velmi rychle a spolehlivě (14,16). Nevýhodou je však nezbytnost kvalifikované obsluhy a zatím obtížná automatizace celého postupu. Aby bylo možné provádět sériové analýzy velkého počtu vzorků byl hledán vhodný způsob takové detekce thiolových sloučenin, který umožňuje nepřetržitý automatický provoz. Pro tento účel se zdá být velmi vhodný automatický podavač vzorků s možností nabírání malého množství vzorku (Obr. 4). Přístroj je složen ze tří částí; 747 VA Stand, elektrochemická měrná jednotka se standardním tříelektroodovým zapojením ve spojení s potenciostatem; 746 VA Trace Analyzer, sloužící jako sekce na zpracování informací odeslaných z 747 VA Stand a 695 Autosampler, obstarávající dávkování vzorku. Dalšími součástmi zařízení jsou nádoby s promývací vodou a elektrolytem. Vzorek je umístěn na termostátovaném zásobníku vzorků (při teplotě 5 °C). Za pomoci tří mikroprocesorem řízených pístových pump je možné provést automatické promytí pracovní nádoby destilovanou vodou (v našem případě promytí probíhá 3 × 25 ml MiliQ vody). Po odsátí veškeré tekutiny je do nádoby automaticky pipetován roztok základního elektrolytu o objemu 1,920 ml při teplotě přibližně 4 °C. Poté je díky ramenu s dávkovacím zařízením odebrán vzorek (o požadovaném objemu). Dávkovací zařízení je následně omyto a vzorek přenesen do měřicí nádoby. Samotné měření je složeno z několika po sobě jdoucích dějů. První dvě minuty probíhá akumulace vzorku z elektrolytu na visící rtuťovou kapku při otevřeném okruhu potenciálu. Po uplynutí doby určené k akumulaci se již při měnícím se napětí začínou odečítat proudové hodnoty a ty jsou poté zpracovány 746 VA Trace Analyzerem, který výsledné křivky může odeslat do stolního počítače. Samotné vyhodnocování křivek je prováděno na příslušném softwaru, v našem případě GPES 4.9. Po ukončení měření je obsah nádoby odsán a celý cyklus se opakuje znovu. Veškeré měření probíhá plně automaticky pod kontrolou mikroprocesoru a měření jednoho vzorku proběhne do 5 minut. Opakovatelnost stanovení se pohybuje okolo 10 %. Voltametrické záznamy standardu MT a elektrolytu jsou ukázány na Obr. 5a. Z křivek je jasně viditelný rozdíl v průběhu elektrochemické analýzy.

Pro kvantifikaci je využíván signál Cat2. Získaná kalibrační křivka je zobrazena na Obr. 5b. Závislost výšky studovaného signálu MT byla v rozmezí 0 – 5 μM lineární. Technika byla dále použita pro analýzu krevních sér pacientů s nádory prsu. Získané voltmetrické křivky jsou zobrazeny na Obr. 5. V případě, že je provedena výše popsaná DPV analýza vzorku krevních sér, jsou kromě metalothioneinu stanoveny další termostabilní thiolu přítomné ve vzorku. Proto nás zajímalo, jakým způsobem se budou lišit výsledky elektrochemické detekce metalothioneinu a celkových termostabilních thiolů ve stejných vzorcích.

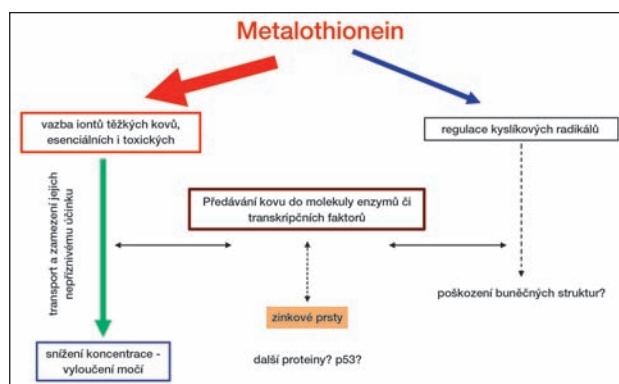
Průměrné hodnoty hladiny metalothioneinu v krevních sérech pacientů s nádorem prsu naměřené metodou DPV s využitím techniky adsorptivního přenosu byly $1,78 \pm 0,09 \mu\text{M}$ (Obr. 6a). Zjištěné koncentrace thiolů byly podle očekávání několikrát vyšší než hladina metalothioneinu. Průměrná koncentrace termostabilních thiolů byla $77,92 \pm 3,90 \mu\text{M}$ a jednotlivé hodnoty relativně dobře kopírují koncentrace metalothioneinu naměřené AdTS DPV technikou (Obr. 6b). Koncentrační poměr thiolů ku metalothioneinu byl stabilní, průměrná hodnota činila 37:1 (termostabilní thiolu:metalothionein) u dvanácti pacientů z patnácti (Obr. 6c). U tří pacientů byl tento poměr několikrát zvýšený a byl roven 197:1. Lze očekávat, že změna poměru mezi hladinou metalothioneinu a hladinou celkových thiolů se mění v období prováděné terapie a bylo by velmi zajímavé ji v dalších studiích sledovat.



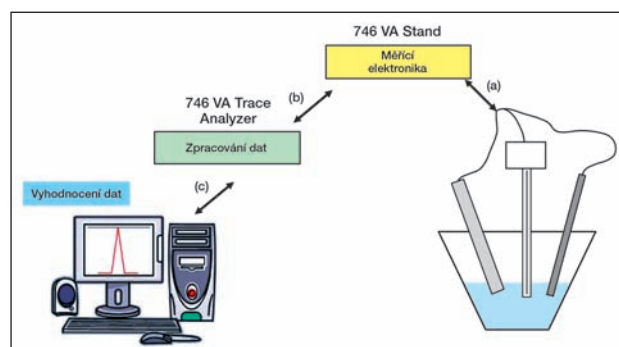
Obr. 1: Schéma významu thiolových sloučenin v regulaci hladiny iontů těžkých kovů a kyslíkových radikálů.



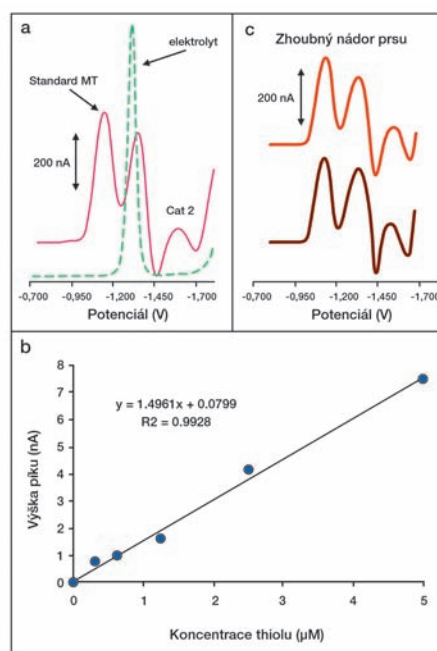
Obr. 2: Využití glutathionu v oxidačních dějích vedoucích k zneškodnění kyslíkových radikálů.



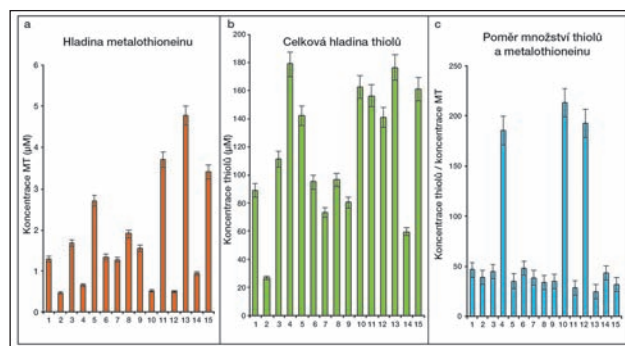
Obr. 3: Funkce metalothioneinu v organismu. Protein je ve většině případech využit dvěma způsoby – jako přenašeč těžkých kovů nebo jako antioxidant.



Obr. 4: Schéma analýzy thiolových sloučenin za využití elektrochemie. Na měřicí jednotku s potenciostatem jsou připojeny elektrody (a). Naměřené hodnoty jsou odeslány do další jednotky, kde jsou zpracovány (b). Nakonec mohou být data vyhodnocena stolním PC, které je propojeno s měřicím zařízením (c).



Obr. 5: Diferenční pulzní voltamogramy thiolových sloučenin (a) zelená čerchovaná čára je signál základního elektrolytu, červená plná čára metalothionein (100 nM). (c) Závislost výšky signálu Cat2 metalothioneinu na jeho koncentraci. (b) voltamogramy krevních sér pacientů s nádorem prsu.



Obr. 6: Naměřené hladiny thiolů a metalothioneinu v krevních sérech pacientů se zhoubným nádorem prsu. (a) hladina metalothioneinu, (b) celková hladina thiolů, (c) výsledný poměr hodnot hladin thiolů a metalothioneinu. Každá analýza byla provedena 3×.

Závěr

Naše analýzy ukázaly, že nejen hladina metalothioneinu je závislá na nádorovém onemocnění. S koncentrací metalothioneinu narůstá i koncentrace thiolů obsažených v krevním séru pacientů s nádorovým onemocněním prsu. Navíc poměr těchto hodnot je relativně konstantní. Těmito výsledky jsme ověřili, že elektrochemická detekce je vhodnou alternativou k běžnému způsobu stanovení metalothioneinu, a že jsme schopni snadno a rychle určit hodnotu thiolů v krevním séru.

Poděkování

Práce na tomto projektu byla podpořena projektem Liga proti rakovině Praha 2006 a Během Terryho Foxe 2007.

Literatura

- Kowaltowski A J, Vercesi A E. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 1999;26(3-4):463-471.
- Squadrito G L, Pryor W A. Oxidative chemistry of nitric oxide: The roles of superoxide, peroxynitrite, and carbon dioxide. *Free Radic. Biol. Med.* 1998;25(4-5):392-403.
- Sen C K, Packer L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *Faseb J.* 1996;10(7):709-720.
- Gilbert H F. Molecular and Cellular Aspects of Thiol Disulfide Exchange. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 1990;63:69-172.
- Barron E S G. Thiol Groups of Biological Importance. *Adv. Enzymol. Relat. Subjects Biochem.* 1951;11(201-266).
- Helbock H J, Beckman K B, Shigenaga M K, et al. DNA oxidation matters: The HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1998;95(1):288-293.
- Michaels M L, Cruz C, Grollman A P, et al. Evidence That Muty and Mutm Combine to Prevent Mutations by an Oxidatively Damaged Form of Guanine in DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1992;89(15):7022-7025.
- Tchou J, Kasai H, Shibutani S, et al. 8-Oxoguanine (8-Hydroxyguanine) DNA Glycosylase and Its Substrate-Specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1991;88(11):4690-4694.
- Hopkins F G. On an autoxidisable constituent of the cell. *Biochem. J.* 1921;15(2):286-305.
- Meister A, Anderson M E. Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* 1983;52:711-760.
- Hurnanen D, Chan H M, Kubow S. The protective effect of metallothionein against lipid peroxidation caused by retinoic acid in human breast cancer cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1997;283(3):1520-1528.
- Fan L Z, Cherian M G. Potential role of p53 on metallothionein induction in human epithelial breast cancer cells. *Br. J. Cancer* 2002;87(9):1019-1026.
- Zelena J, Potesil D, Vacek J, et al. Metallothionein jako prognostický marker nádorového onemocnění. *Klinická Onkologie* 2004;17(6):190-195.
- Petrlova J, Blastik O, Prusa R, et al. Analýza obsahu metalothioneinu u pacientů se zhoubným nádorem prsu, tlustého střeva a nebo melanomem. *Klinická Onkologie* 2006;19(2):138-142.
- Kukacka J, Vajtr D, Huska D, et al. Blood metallothionein, neuron specific enolase, and protein S100B in patients with traumatic brain injury. *Neuroendocrinol. Lett.* 2006;27(Suppl. 2):116-120.
- Petrlova J, Potesil D, Mikelova R, et al. Attomole voltammetric determination of metallothionein. *Electrochim. Acta* 2006;51(24):5112-5119.
- Reid A, Pereira H, Galea M, et al. Metallothionein Expression in Human Breast-Cancer. *J. Pathol.* 1992;168(Suppl. S):A100-A100.
- Goulding H, Jasani B, Pereira H, et al. Metallothionein Expression in Human Breast-Cancer. *Br. J. Cancer* 1995;72(4):968-972.
- Nadji M, Fresno M, Herrera A, et al. Metallothionein Is a Predictor of Tumor Aggressiveness in Node-Negative Breast-Cancer. *Lab. Invest.* 1994;70(1):A19-A19.
- Ioachim E, Kamina S, Demou A, et al. Immunohistochemical localization of metallothionein in human breast cancer in comparison with cathepsin D, stromelysin-1, CD44, extracellular matrix components, p53, Rb, C-erbB-2, EGFR, steroid receptor content and proliferation. *Anticancer Res.* 1999;19(3A):2133-2139.
- Florianczyk B, Grzybowska L. Metallothionein and zinc level in breast cancer. *J. Tumor Marker Oncol.* 1999;14(4):23-27.
- Ioachim E, Tsanou E, Briasoulis E, et al. Clinicopathological study of the expression of hsp27, pS2, cathepsin D and metallothionein in primary invasive breast cancer. *Breast* 2003;12(2):111-119.
- Bay B H, Jin R X, Huang J X, et al. Metallothionein as a prognostic biomarker in breast cancer. *Exp. Biol. Med.* 2006;231(9):1516-1521.
- Popiela T J, Rudnicka-Sosin L, Dutsch-Wicherek M, et al. The metallothionein and RCAS1 expression analysis in breast cancer and adjacent tissue regarding the immune cells presence and their activity. *Neuroendocrinol. Lett.* 2006;27(6):786-794.
- Oyama T, Takei H, Hikino T, et al. Immunohistochemical expression of metallothionein in invasive breast cancer in relation to proliferative activity, histology and prognosis. *Oncology* 1996;53(2):112-117.
- Jin R, Bay B H, Chow V T K, et al. Metallothionein 1E mRNA is highly expressed in oestrogen receptor-negative human invasive ductal breast cancer. *Br. J. Cancer* 2000;83(3):319-323.
- Barnes N L, Ackland M L, Cornish E J. Metallothionein isoform expression by breast cancer cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2000;32(8):895-903.
- Sens M A, Beall C L, Sens D A. Metallothionein isoform 3 (MT-3) expression in breast cancer. *Mod. Pathol.* 2001;14(1):36A-36A.
- Sens M A, Beall C L, Sens D A. Metallothionein isoform 3 (MT-3) expression in breast cancer. *Lab. Invest.* 2001;81(1):36A-36A.
- Tai S K, Tan O J K, Chow V T K, et al. Differential expression of metallothionein 1 and 2 isoforms in breast cancer lines with different invasive potential - Identification of a novel nonsilent metallothionein-1H mutant variant. *Am. J. Pathol.* 2003;163(5):2009-2019.
- Jin R X, Chow V T K, Tan P H, et al. Metallothionein 2A expression is associated with cell proliferation in breast cancer. *Carcinogenesis* 2002;23(1):81-86.
- Sens M A, Gurel V, Somji S, et al. Metallothionein isoform 3 (MT-3) inhibits growth and increases chemotherapeutic drug resistance of breast cancer cells. *Mod. Pathol.* 2002;15(1):51A-51A.
- Sens M A, Gurel V, Somji S, et al. Metallothionein isoform 3 (MT-3) inhibits growth and increases chemotherapeutic drug resistance of breast cancer cells. *Lab. Invest.* 2002;82(1):51A-51A.

původní práce

34. Surowiak P, Paluchowski P, Dziegiel P, et al. Lack of relationship between metallothionein (MT) expression and proliferation exponents in cells of primary ductal breast cancer of G2 grade of differentiation. Med. Sci. Monitor 2004;10(8):BR300-BR305.
35. Brazdova M, Kizek R, Havran L, et al. Determination of glutathione-S-transferase traces in preparations of p53 C-terminal domain (aa320-393). Bioelectrochemistry 2002;55(1-2):115-118.
36. Geryk E, Kolcova V, V. M. Vývoj epidemiologických ukazatelů zhoubného nádory prsu. Klinická Onkologie 1994;7(1):14-22.
37. Skovajsova M, H. B, Danes J. Screening nádorů prsu v České republice. Klinická Onkologie 2004;17(2):46-48.
38. Janku F, Srovnal J, Korinkova G, et al. Detekce minimální residuální choroby v kostní dřeni pacientek s časným karcinomem prsu technikou kvantitativní RT-PCR v reálném čase pro carcinoembryonální antigen. Klinická Onkologie 2006;19(1):15-18.
39. Simickova M, Petrakova K, Pecan L, et al. Prediktivní význam sérového HER-2/neu u nemocných s karcinomem prsu léčených Herceptinem. Klinická Onkologie 2005;18(1):23-26.
40. Vaclavikova R, Hubackova M, Kubala E, et al. Expres genu mnohočetné lékové rezistence 1 (mdr1) a její význam v rozvoji a terapii karcinomu prsu. Klinická Onkologie 2007;20(3):253-259.
41. Sopkova B. Prognostické faktory karcinomu prsu. Klinická Onkologie 1988;1(3):92-94.

Korespondenční adresa:

PhDr. Rene Kizek, Ústav chemie a biochemie Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemedelska 1, 613 00 Brno,
e-mail: kizek@sci.muni.cz,

Došlo / Submitted: 21. 6. 2007

Přijato / Accepted: 31. 7. 2007

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.
The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.
The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.