

# Analýza metalothioneinu u pacientů se zhoubnými nádory jater

## Analysis of metallothionein in patients with malignant liver tumors

Melich L.<sup>1</sup>, Werle J.<sup>1</sup>, Fořtová M.<sup>1</sup>, Vysloužilová L.<sup>2</sup>, Burešová K.<sup>1</sup>, Kotaška K.<sup>1</sup>, Klapková E.<sup>1</sup>, Štěpánková O.<sup>2</sup>, Čepová J.<sup>1</sup>, Průša R.<sup>1</sup>, Kizek R.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ústav lékařské chemie a klinické biochemie 2. LF UK a FN Motol, Praha

<sup>2</sup>Český institut informatiky, robotiky a kybernetiky, ČVUT v Praze, Praha

### Souhrn

**Východiska:** Zhoubné nádory jater jsou agresivní a mají špatnou prognózu přežití. Metalothionein (MT) je nízkomolekulární intracelulární protein, jehož primární funkcí je udržení homeostázy těžkých kovů v živých organizmech. Molekulární mechanismus exprese MT je velmi málo prostudován. Nedávné výzkumy ukazují na jeho významný vztah ke karcinogenezi, spontánní mutagenezi a účinnosti protinádorových léčiv. Již v předchozích studiích bylo dokázáno, že hladiny MT stoupají u nádorového onemocnění. Cílem naší práce bylo studium MT za účelem zvýšení efektivity diagnostiky zhoubných nádorů jater. **Metody:** V pilotní studii (2022–2023) byla sledována skupina 15 pacientů s hepatocelulárním karcinomem (hepatocellular carcinoma – HCC, diagnóza C220) a skupina 15 pacientů s hepatoblastomem (diagnóza C222). Kontrolní skupina byla vybrána ze zdravých probandů (n = 20). Pro analýzu byla použita námi vyvinutá modifikovaná metoda. Vzorky krevních sér probandů byly tepelně denaturovány (99 °C, 20 min). MT byl stanoven pomocí elektrochemie. Získaná data byla uložena a zpracována v laboratorním informačním systému QINSLAB. **Výsledky:** U vzorků denaturovaných krevních sér byly získány voltametrické křivky MT. Stanovením plochy pod křivkou (area under the curve – AUC) byly vypočteny koncentrace MT. Pro porovnání normální a abnormální hladiny MT byla použita kontrolní séra zdravých probandů (n = 20) se zjištěným průměrným množstvím MT  $2,0 \pm 1,3 \mu\text{g/l}$  a mediánem  $1,9 \mu\text{g/l}$ . U skupiny pacientů s HCC bylo zjištěno průměrné množství MT  $9,1 \pm 6,5 \mu\text{g/l}$  a medián  $9,0 \mu\text{g/l}$ . Tzv. receiver operating characteristic (ROC) analýza ukázala AUC 0,864 (95% CI 0,736–0,992), senzitivitu 0,74 a specifickou 0,75. U pacientů s hepatoblastomem bylo zjištěno průměrné množství MT  $11,5 \pm 7,5 \mu\text{g/l}$  a medián  $10,9 \mu\text{g/l}$ . ROC analýza ukázala AUC 0,868 (95% CI 0,751–0,993), senzitivitu 0,84 a specifickou 0,86. V korelační analýze byla pozorována korelace MT ke karcinoembryonálnímu antigenu (CEA) ( $r = 0,99$ ), kyselině močové ( $r = -0,86$ ) a iontům draslíku ( $r = -0,94$ ). **Závěr:** V této pilotní studii se podařilo sledovat pravděpodobnou asociaci hladiny MT u probandů se zhoubnými nádory jater. Z publikovaných prací je známo, že hladiny MT jsou dlouhodobě zvýšené a předpokládáme, že souvisí se zvýšenou metabolickou aktivitou nádorových buněk. Studie bude dále pokračovat na větším souboru pacientů.

### Klíčová slova

cílená terapie – zhoubné nádory jater – biomarker – Brdičkova reakce – elektrochemie

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare that 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 recommendation for biomedical papers.



prof. Ing. René Kizek, DrSc.  
Ústav lékařské chemie a klinické  
biochemie  
FN Motol  
V Úvalu 84  
150 06 Praha 5  
e-mail: kizek@sci.muni.cz

Obdrženo/Submitted: 15. 1. 2024

Přijato/Accepted: 1. 5. 2024

doi: 10.48095/ccko2024345

## Summary

**Background:** Malignant liver tumors are highly aggressive with a poor prognosis. Metallothionein (MT) is a low-molecular intracellular protein, whose primary function is to regulate the homeostasis of heavy metals in many organisms. There are only few studies focusing on the molecular mechanisms of MT expression. Recent studies show its significant relations to carcinogenesis, spontaneous mutagenesis and efficiency of antitumor medicine. In previous studies, the increase of MT levels in cancer patients was proven. The aim of this work is to study MT as well as to increase the efficiency of malignant liver tumor diagnosis. **Methods:** In our pilot study (2022–2023) we observed a group of 15 patients with hepatocellular carcinoma (diagnosis C220) and a group of 15 patients with hepatoblastoma (diagnosis C222). The control group included 20 healthy probands. We developed our own modified method for the analysis. Blood serum samples of the probands were denaturated (99 °C, 20 min). MT was determined by an electrochemical method. Obtained data were stored and processed in the laboratory information system QINSLAB. **Results:** In denaturated blood serum samples, we obtained voltametric curves of MT. We determined concentrations of MT by evaluating the area under the curve (AUC). To differentiate normal and abnormal concentrations of MT, blood samples of healthy probands were used (N = 20), with the average MT levels of  $2.0 \pm 1.3$  µg/L and median 1.9 µg/L. In patients diagnosed with HCC, the average MT levels were  $9.1 \pm 6.5$  µg/L and median 9.0 µg/L. The receiver operating characteristic (ROC) analysis showed AUC 0.864 (95% CI 0.736–0.992), sensitivity 0.74 and specificity 0.75. In patients diagnosed with hepatoblastoma, the average MT concentrations measured were  $11.5 \pm 7.5$  µg/L and the median was 10.9 µg/L. The ROC analysis displayed AUC 0.868 (95% CI 0.751–0.993), sensitivity 0.84 and specificity 0.86. The correlation analysis showed correlation between MT and carcinoembryonic antigen (CEA) ( $r = 0.99$ ), uric acid ( $r = -0.86$ ) and potassium ions ( $r = -0.94$ ). **Conclusion:** In this pilot study, we observed the association of MT levels in healthy probands and malignant liver tumor patients. Many previous studies show that MT concentrations are increasing as the illness progresses. We assume that this increase is connected to the high metabolic activity of cancer cells. This study will continue with collecting a larger number of samples.

## Key words

targeted therapy – cancer – malignant tumor – nanomedicine – Brdicka's reaction

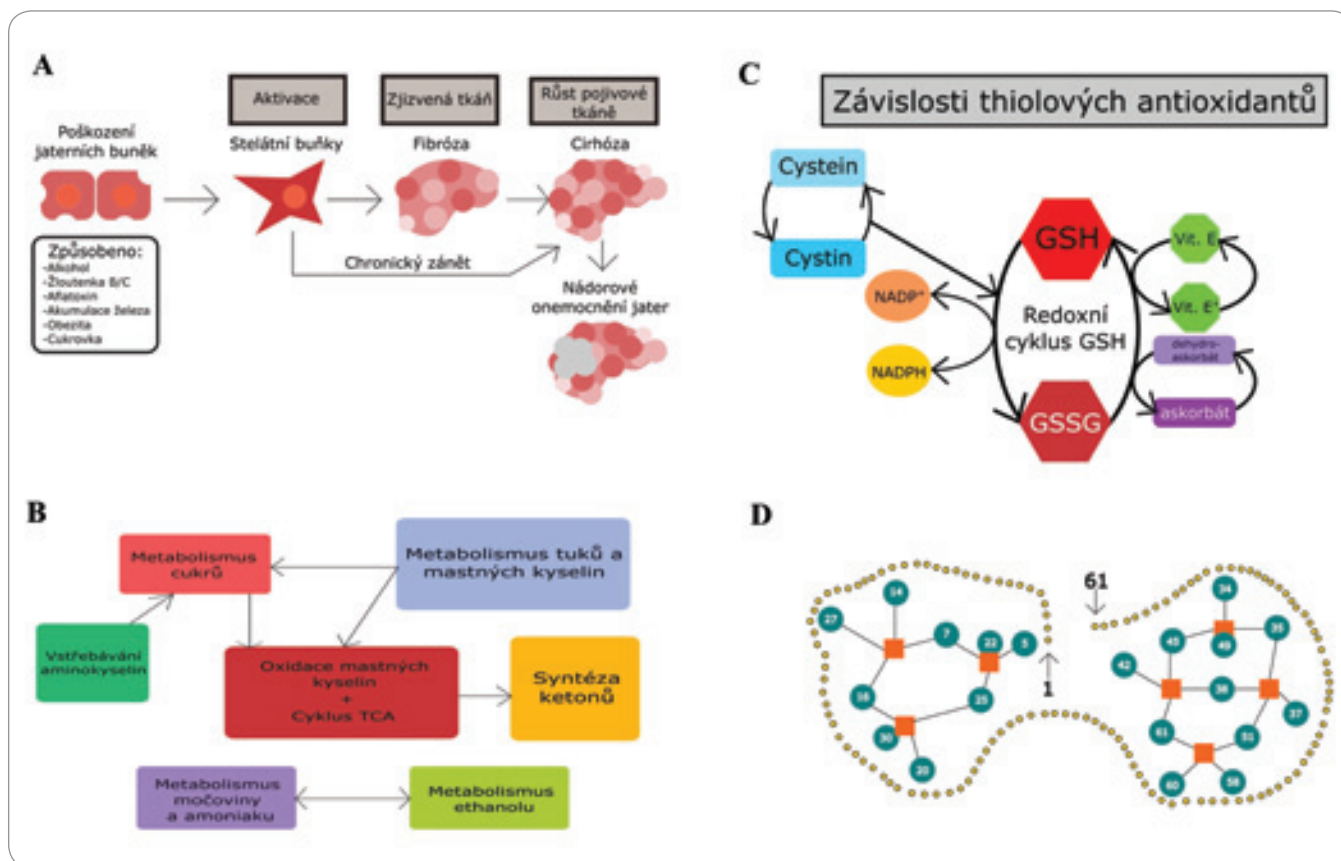
## Úvod

Incidence zhoubných nádorů jater se v Evropě neustále zvyšuje. Zhoubné nádory jater a malignity žlučového stromu se vyznačují rezistencí na léčbu a špatnou prognózou (5leté přežití je < 20 %) [1–4]. Hepatocelulární karcinom (hepatocellular carcinoma – HCC, diagnóza C220) je nejčastější primární variantou maligního nádoru jater [1]. HCC vytváří kulovitá ložiska v obou jaterních lalocích (multinodulární HCC) nebo formuje jeden velký shluk nádorových buněk, který má další satelitní ložiska. Typické pro tento tumor je vytváření metastáz na plicních uzlinách [1]. Hepatoblastom (diagnóza C222) je další varianta vysoce maligního nádoru jater, který se nejčastěji vyskytuje u dětí mladších 15 let [5]. Kromě toho je tento nádor často diagnostikován ihned po narození nebo již v děloze. Rychle roste, poté se rozšiřuje do plic a dále do celého organismu. Předpokládaný mechanismus nádorové transformace u jaterních buněk mohou vyvolávat různé činitele, jako jsou toxický efekt alkoholu, aflatoxinů, zvýšené ukládání železa nebo metabolické procesy spojené s obezitou či cukrovkou. Významný biologický potenciál hraje infekce způsobená virem. Byly prokázány souvislosti mezi infekcí virem hepatitidy B a C (obr. 1A).

Hledání vhodných chemických a molekulových markerů je stále klíčovou otázkou. Pro tyto účely se využívají různé typy molekul. Jsou popsány jak molekuly peptidové nebo proteinové povahy, tak nukleové kyseliny jako malé RNA [6–10]. Byly popsány různé metabolické dráhy, které by mohly mít asociaci k nádorům jater (obr. 1B) [11]. Typickým nádorovým markerem pro HCC a hepatoblastom je alfa-fetoprotein (AFP) [12–15]. Vysoké hladiny AFP po narození přirozeně rychle klesají, nicméně u dětí s nádorovým onemocněním přetrvávají.

V naší práci se dlouhodobě zabýváme asociací thiolových sloučenin (obr. 1C) a metalothioneinů (MT) k nádorovým onemocněním [9,16]. Metalothioneiny jsou malé proteiny o velikosti 6–14 kDa s hlavní biologickou funkcí udržovat homeostázu iontů kovů (obr. 1D) [8]. Díky vysoké afinitě k těžkým kovům je jejich hlavní funkcí homeostatická kontrola a detoxikace těchto těžkých kovů. Molekulárního mechanismu regulace hladiny MT se s nejvyšší pravděpodobností účastní samotný kov. Ionť kovu aktivuje transkripční faktor MTF-1, který se váže na metal responzivní element (MRE). Transkripční faktor MTF-1 po navázání strukturního genu umožní vazbu DNA polymerázy a následnou syntézu MT [8]. V práci autorů Zhang et al. bylo

bioinformatickým přístupem hodnoceno transkriptomické riziko vzniku HCC. Jako potenciální rizikový faktor byla zjištěna upregulovaná exprese MT1M [17]. U kazuistiky hepatocelulárního karcinomu byly v imunohistologickém hodnocení vzorků jaterní tkáně pozorovány zvýšené exprese AFP a difúzně MT [18]. Kromě hladiny MT by mohla být také významná hladina biologicky významných prvků. Ve studiích je ukázána souvislost mezi hladinami mědi a zinku a zhoubnými nádory jater [11,19]. Snížená hladina zinku je často pozorována u pacientů s chronickým onemocněním jater, zejména s cirhózou [19], a navíc úzce souvisí s rozvojem jaterní fibrózy a zvýšeným rizikem karcinogeneze jater [19]. Stanovením hladin MT v dostupných biologických vzorcích, jako je krev, sérum, plazma nebo moč, se příliš mnoho výzkumných skupin nezabývá. V našich experimentálních studiích jsme se této problematice intenzivně věnovali a vypracovali postupy pro analýzu MT a tuto metodu jsme aplikovali u vybraných skupin pacientů séru [9,20,21]. Horáková et al. ve svém přehledu popisuje MT jako potenciální onkomarker [10]. S ohledem na souvislost MT s léčivými je třeba zvažovat i jejich duální roli a příp. uvažovat o možnostech ovlivnění jejich přirozené exprese [22].



**Obr. 1. Předpokládaný mechanismus nádorové transformace u jaterních buněk.** Poškození jaterních buněk mohou vyvolávat různí činitelé jako je toxický efekt alkoholu, aflatoxinů, zvýšené ukládání železa, metabolické procesy spojené s obezitou či cukrovkou. Významný biologický potenciál hraje infekce způsobená virem hepatitidy B a C (A). Upraveno podle [5]. Zjednodušené schéma popsaných hlavních biochemických drah v jaterních buňkách (B). Upraveno podle [41]. Význam antioxidantů a thiolových sloučenin jako významných antioxidantů (C). Upraveno podle [42]. Schematická struktura metalothioneinu třídy MT (D).

GSH – glutathion, GSSG – glutathion disulfid, NADP<sup>+</sup> – nikotinamidadeninukleotidfosfát, NADPH – redukována forma NADP<sup>+</sup>

Cílem této práce byla pilotní studie zaměřená na prvotní informace o hladinách MT u pacientů s hepatoblastomem a HCC.

## Materiál a metody

### Použité chemikálie

MT byl zakoupen od společnosti Sigma-Aldrich (USA) a ostatní chemikálie použité pro analýzu byly zakoupeny od společnosti Merck (Darmstadt, Německo) v čistotě p. a. Pro chemicko-biochemickou analýzu byly využity pracovní roztoky od společnosti Siemens (USA).

### Biologické vzorky

Všechna vyšetření jsou v souladu se zásadami Helsinské deklarace. Vzorky séra byly získány ze zbytků séra jako anonymní vzorky před jejich likvidací (Motol Ref. No.: EK-1422/13; Ref. No.: EK-223/24)

a jejich použití je v souladu s vnitřními předpisy FN. Kontrolní skupina probandů byla ve věku od 4–31 let ( $n = 20$ ). Testovaná skupina probandů byla rozdělena do kategorií HCC ( $n = 15$ ; věk 9–77 let) a hepatoblastom ( $n = 15$ ; věk 0–20 let). Rozdělení do jednotlivých věkových kategorií bylo sestaveno podle doporučení WHO.

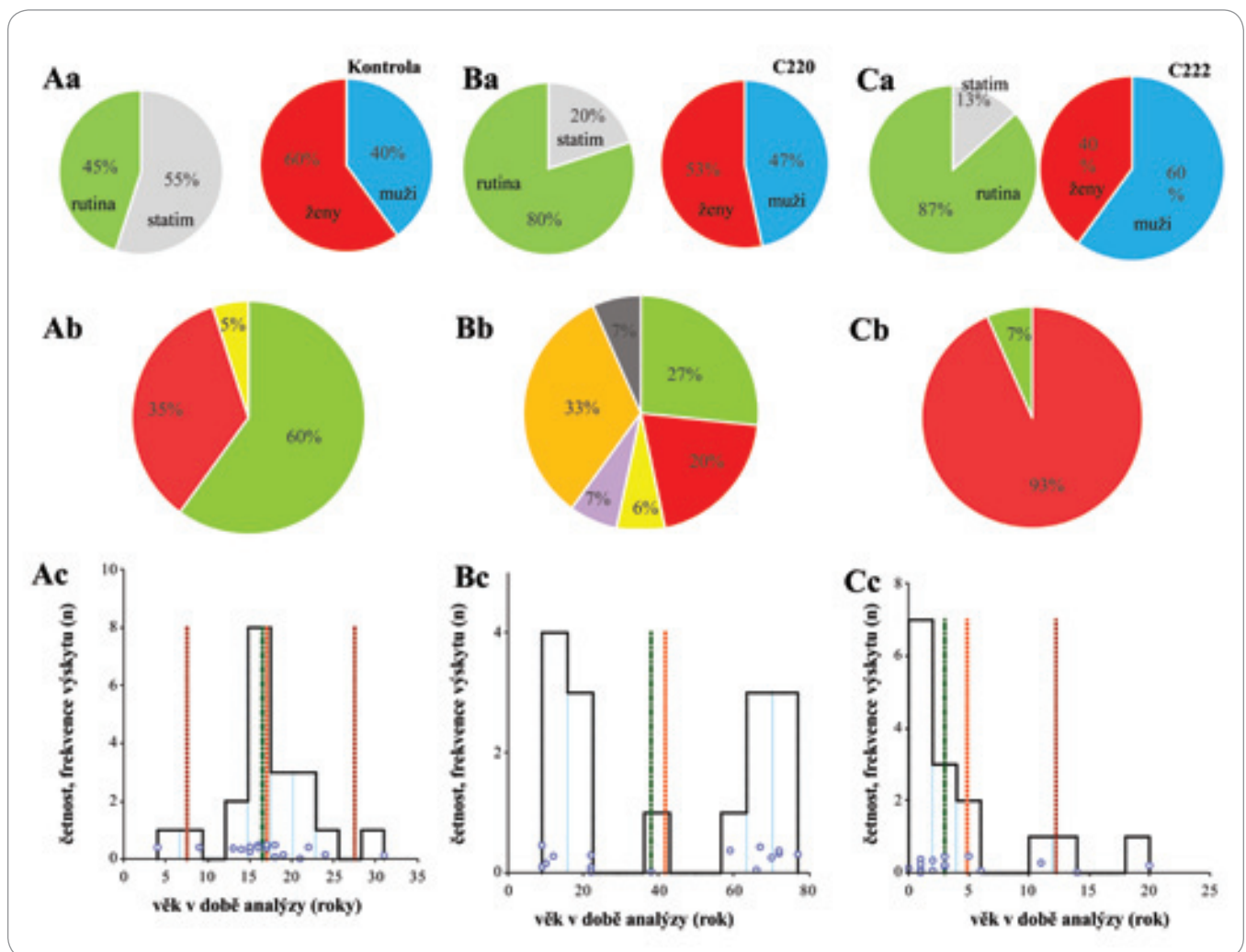
### Příprava roztoků a vzorků

Primární vzorek krve byl odebírán do zkumavek Vacuette s akcelerátorem hemokoagulace. Následnou centrifugací (Avanti J-15R, Beckman Coulter (USA), 1 500 g, 4 °C, 10 min) bylo odděleno krevní sérum pro biochemickou analýzu. Individuální vzorky pro stanovení MT byly ve zkumavkách smíchány s ultračistou vodou (objem min. 500  $\mu$ l; poměr ředění 10 $\times$ ). Následně byl bio-

logický vzorek denaturován (termomixer, 99 °C, 20 min, zkumavka Eppendorf), poté byl centrifugován (14 000 g, 4 °C, 30 min, zkumavka Eppendorf). Pro elektrochemickou analýzu byl použit supernatant [21].

### Chemická analýza

Ultračistá voda byla připravena na zařízení ELGA (Londýn, Spojené království), pH bylo kontrolováno na pH metru (VWR, USA). Pro chemickou fotometrickou analýzu vzorků byl použit analyzátor Atellica Solutions CH 930 (Siemens, USA). Vybrané nádorové markery AFP, CEA, CA 19-9 a CA 125 byly analyzovány na Atellica Solutions IM1600 (Siemens, USA). Pro detekci iontů bylo využito integrované multisenzorové technologie (IMT) na tištěných elektrodách zařízení Atellica Solutions CH 930 (Siemens, USA).



**Obr. 2. Základní popis studovaného souboru.** Relativní zastoupení podle provedených vyšetření u kontrolní skupiny (Aa), skupiny s hepatocelulárním karcinomem (Ba), u skupiny s hepatoblastomem (Ca) a podle věku. Rozdělení do věkových kategorií u kontrolní skupiny (Ab), skupiny s hepatocelulárním karcinomem (Bb) a skupiny s hepatoblastomem (Cb) je následující: dětský věk (do 18 let, zelená); mladá dospělost (18–30 let, červená); dospělost (31–45 let, žlutá); střední věk (45–60, oranžová); stáří (61–75 let, fialová); vysoké stáří ( $\geq 76$  let, šedá). Frekvenční histogramy studované skupiny podle věku jsou popsány u kontrolní skupiny (Ac), skupiny s hepatocelulárním karcinomem (Bc) a skupiny s hepatoblastomem (Cc). Zelená čára vyznačuje medián, červená průměr. Na Ac tmavě červená čára zobrazuje dolní a horní vnitřní hradbou, Cc je zobrazena horní vnitřní hradbou. Sběr vzorků krevních sér byl proveden v období leden 2022 až září 2023.

### Imunologická analýza virů hepatitidy B (HBV) a hepatitidy C (HCV)

Detekce přítomnosti virových antigenů anti-HBV a anti-HCV byla provedena na analyzátoru ARCHITECT 4000 (Abbott, USA).

### Stanovení hladiny MT

Elektrochemická analýza byla provedena na AUTOLAB Analyser (Metrohm, Herisau, Switzerland) ve spojení s VA-Stand 663 (Metrohm, Herisau, Switzerland). Vzorky byly měřeny diferenční pulzní voltometrií (DPV). Parametry DPV byly následující: počáteční poten-

ciál byl  $-0,6$  V a konečný potenciál byl  $-1,9$  V, modulační čas byl  $0,057$  s a interval  $0,2$  s, step potenciál byl  $1$  mV/s, modulační amplituda  $250$  mV a akumulační čas  $240$  s. Základní elektrolyt (Brdičkův roztok)  $1$  mmol/l  $\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ ,  $1$  mol/l  $\text{NH}_3$  (aq) a  $1$  mol/l  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , pH =  $9,6$ . Další podrobnosti k metodě jsou popsány v našich pracích [16,21,23,24].

### Statistické a matematické vyhodnocení

Veškerá analyzovaná data byla převedena do laboratorní databáze QINSLAB a statisticky vyhodnocena. Všechny elek-

trochemické analýzy byly provedeny minimálně v pěti opakováních. Analytické parametry mez detekce (limit of detection – LOD) a mez stanovitelnosti (limit of quantification – LOQ) byly vypočítány podle práce autorů Hubaux a Vos [25].

### Výsledky

#### Popis sledované skupiny pacientů

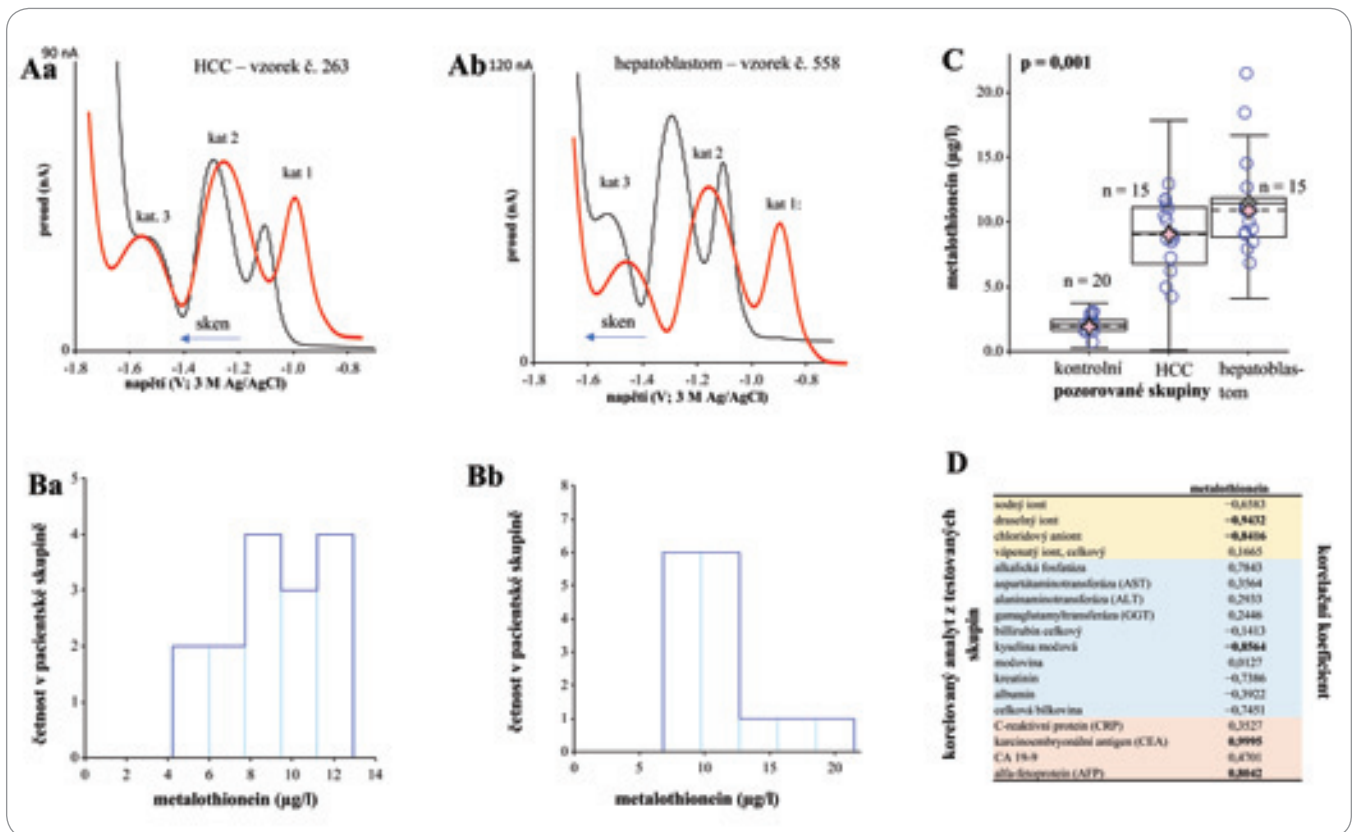
V naší pilotní studii se podařilo v období leden 2022 až září 2023 identifikovat více než 10 pacientů s hepatoblastomem podle diagnózy dostupné v laboratorním informačním systému [26]. U více než 80 % identifikovaných pacientů se

Tab. 1. Imunochemická detekce protilátek virových hepatitid u sledovaných skupin pacientů\*.

Skupina	Počet provedených analýz		Signál (protilátky) RFU		Pozitivita (%)	
	HBV	HCV	HBV	HCV	HBV	HCV
kontroly**	6 (30 %)	6 (30 %)	0,1 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0	0
C220**	10 (66 %)	10 (66 %)	128 ± 225***	0,08 ± 0,04	50	0
C222**	8 (53 %)	8 (53 %)	204 ± 304***	0,04 ± 0,01	50	0

\*imunochemická detekce Architect, \*\*dohledatelná data podle požadavků zdravotního systému, \*\*\*značná variabilita výsledků souvisejících s onemocněním. Vypočtené hodnoty průměru a směrodatných odchylek upozorňují na to, že průběh měření neodpovídá normálnímu rozložení

C220 – hepatocelulární karcinom, C222 – hepatoblastom, HBV – virus hepatitidy B, HCV – virus hepatitidy C, RFU – relativní fluorescenční jednotka

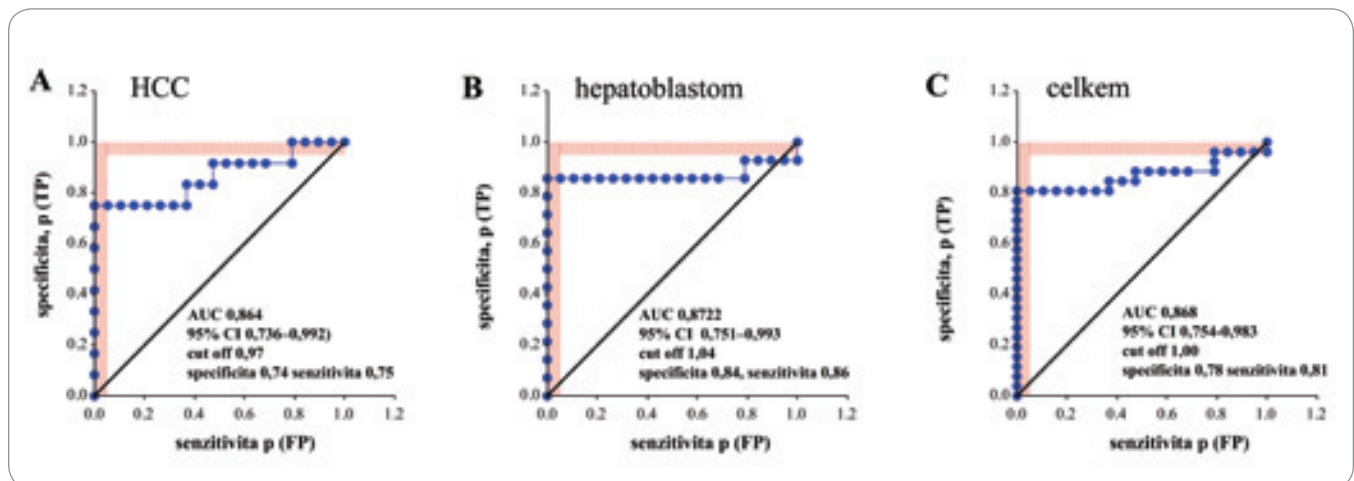


**Obr. 3. Elektrochemická analýza metalothioneinu (MT) u sledované skupiny pacientů s hepatocelulárním karcinomem (HCC) a hepatoblastomem.** Typické voltamogramy pacientů s hepatoblastomem (vzorek č. 558) a HCC (vzorek č. 263) (A). Distribuční diagram četností jednotlivých koncentrací MT u testovaných pacientů (B). Změny hladiny MT v séru pacientů s hepatoblastomem (n = 15) a s HCC (n = 15) jsou vyjádřeny jako boxploty. Modré body představují jednotlivá měření pacientů; červený čtvereček je průměrná hodnota, šedý ukazuje medián, velikost určuje počet analyzovaných případů (C). Korelační matice koncentrací sledovaných analytů a metalothioneinu (D). Ostatní podrobnosti ke studovanému souboru jsou uvedeny v sekci Materiál a metody.

pak podařilo zachytit vzorek krevního séra pro další laboratorní testování. Pro účel této studie byla vytvořena kontrolní skupina co nejvíce se přibližující zkoumanému souboru probandů s nádory. V kontrolní skupině byli zastoupeni zdraví pro-

bandi ve věku 5–30 let, 60 % žen a 40 % mužů. Šedesát procent probandů bylo ve věku do 18 let (obr. 2A). Ve skupině probandů s HCC (n = 15) bylo 53 % žen a 47 % mužů. Věkové zastoupení je ukázáno na obr. 2Ba. V souboru vidíme klastr

ve věkové skupině 10–20 let a klastr ve věkové skupině 60–80 let. Ve skupině probandů s hepatoblastomem (n = 15) bylo 40 % žen a 60 % mužů s 93% zastoupením osob v mladé dospělosti (obr. 2Ca). Většina probandů byla ve věku 1–6 let,



**Obr. 4.** ROC křivka použitá pro hodnocení binárního klasifikačního systému mezi skupinou pacientů a kontrolní skupinou. Skupina s hepatoblastomem ( $n = 15$ ) (A); skupina s hepatocelulárním karcinomem ( $n = 15$ ) (B); hodnocení všech sledovaných pacientů ( $n = 30$ ) (C). Pro hodnocení byla použita funkce  $IU = \min(f(Se*Sp))$ . Další experimentální podrobnosti jsou uvedeny na obr. 3. Ostatní podrobnosti ke studovanému souboru jsou uvedeny v sekci Materiál a metody.

AUC – plocha pod křivkou, CI – interval spolehlivosti, FP – falešná pozitivita, ROC – receiver operating characteristic TP – skutečná pozitivita

jak je pro tuto skupinu nádorů typické. U 30 % probandů z kontrolní skupiny, 66 % probandů s HCC a 53 % s hepatoblastomem byly dostupné údaje k vyšetření hladiny protilátek proti viru hepatitidy A (HAV) a dále protilátek proti HBV a HCV. Protilátky jsme zahrnuli z důvodu podání kompletních informací o potenciálních virových infekcích. Byla prokázána 50% pozitivita HBV jak ve skupině probandů s HCC, tak ve skupině s hepatoblastomem. Ostatní hepatitidy nebyly potvrzeny (tab. 1).

#### Hladiny MT ve sledovaných skupinách pacientů

Dlouhodobě je pro kvantitativní stanovení MT využíváno Brdičkovy reakce [27–29]. V naší nejnovější studii autorů Melich et al. je popsáno využití tohoto postupu u biologických vzorků pacientů se zhoubnými nádory [21]. Na obr. 3A jsou ukázány typické voltamogramy studovaných sér pacientů s HCC a hepatoblastomem. Na obr. 3B jsou distribuční histogramy MT v sledovaných souborech. U HCC můžeme sledovat vyšší četnost hladiny MT  $< 10 \mu\text{g/l}$  (obr. 3Ba). U skupiny probandů s hepatoblastomem byly pozorované koncentrace posunuty k vyšším hodnotám. Většina analyzovaných vzorků vykazovala hladiny MT  $> 10 \mu\text{g/l}$  (obr. 3Bb). Na obr. 3C jsou krabicové grafy porovnávající kont-

rolní skupinu probandů s testovanou skupinou probandů s HCC a hepatoblastomem. Kontrolní skupina probandů měla průměrné množství MT  $2,0 \pm 1,3 \mu\text{g/l}$  s mediánem  $1,9 \mu\text{g/l}$ . U skupiny probandů s diagnózou HCC bylo zjištěno průměrné množství MT  $9,1 \pm 6,5 \mu\text{g/l}$  s mediánem  $9,0 \mu\text{g/l}$ . U probandů s hepatoblastomem bylo zjištěno průměrné množství MT  $11,5 \pm 7,5 \mu\text{g/l}$  s mediánem  $10,9 \mu\text{g/l}$ . Skupina probandů s HCC a skupina s hepatoblastomem byla statisticky vysoce významně rozdílná v porovnání s kontrolní skupinou ( $p < 0,001$ ). Na obr. 3D je korelační analýza průměrných hodnot analyzovaných chemických a biochemických parametrů k hladinám MT. V korelační analýze byla pozorována pozitivní korelace MT k CEA ( $r = 0,99$ ), negativní korelace k hladině kyseliny močové ( $r = -0,86$ ) a iontům draslíku ( $r = -0,94$ ).

Na obr. 4 je ukázána prahová operační charakteristika, tzv. receiver operating characteristics (ROC). Z dostupných dat byla regresním modelem vypočtena ROC křivka mezi skupinami probandů s HCC, hepatoblastomem a kontrolní skupinou. ROC analýza ukázala u probandů s HCC hodnotu AUC 0,864 (kvalita testu: dobrá, 95% CI 0,736–0,992), senzitivitu 0,74 a specifitu 0,75. U probandů s hepatoblastomem ROC analýza ukázala AUC 0,868 (kvalita testu: dobrá, 95% CI 0,751–0,993), senzitivitu 0,84 a specifitu 0,86. Při hodnocení

kontrolní skupiny a skupin se zhoubnými nádory jater byla AUC 0,868 (kvalita testu: dobrá, 95% CI 0,754–0,983), specifita 0,78 a senzitivita 0,81. Hodnota cut-off se pohybovala na 95% hladině spolehlivosti – kolem  $1 \mu\text{g/l}$  MT.

#### Hladiny biochemických parametrů ve sledovaných skupinách pacientů

Ve sledovaných velmi heterogenních skupinách byly analyzovány hladiny iontů, jaterní enzymy a další chemické parametry se vztahem k jaterním funkcím. Jak je ukázáno v tab. 2, ve skupině probandů se zhoubnými nádory byly hladiny jaterních enzymů v porovnání s kontrolní skupinou zvýšené (aspartátaminotransferáza (AST)  $> 0,8 \mu\text{kat/l}$ , alaninaminotransferáza (ALT)  $> 0,6 \mu\text{kat/l}$ , gamaglutamyltransferáza (GGT)  $> 0,7 \mu\text{kat/l}$  a alkalická fosfatáza (ALP)  $> 4,6 \mu\text{kat/l}$ ). Dále byly stanoveny další základní biochemické parametry, jak je ukázáno v tab. 3. Podle očekávání byly ve skupinách probandů pozorovány rozdíly. Významné změny byly v hladinách celkového bilirubinu, přičemž u skupiny s HCC byla hladina kolem  $28 \mu\text{mol/l}$  a u skupiny s hepatoblastomem kolem  $8 \mu\text{mol/l}$ . U skupiny s hepatoblastomem byly pozorovány změny hladin u kyseliny močové, močoviny a kreatininu. Vysvětlení těchto pozorovaných rozdílů s ohledem na pilotní studii (malá skupina probandů) a výraz-

Tab. 2. Chemická analýza hladiny iontů a jaterních enzymů\*.

Skupina	Na <sup>1</sup> (ISE) mmol/l	K <sup>1</sup> (ISE) mmol/l	Cl <sup>1</sup> (ISE) mmol/l	Ca <sup>2</sup> (545/658 nm) mmol/l	ALP <sup>3</sup> (410/478 nm) μkat/l	AST <sup>4</sup> (340/410 nm) μkat/l	ALT <sup>5</sup> (340/410 nm) μkat/l	GGT <sup>6</sup> (410/478 nm) μkat/l
kontroly	137 ± 4	4,3 ± 0,3	107 ± 2	2,4 ± 0,1	1,9 ± 1,6	0,4 ± 0,3	0,4 ± 0,4**	0,3 ± 0,1
C220	139 ± 3	4,3 ± 0,5	106 ± 3	2,3 ± 0,4	5,6 ± 6,4**	1,8 ± 2,0**	1,3 ± 2,0**	3,2 ± 4,3**
C222	135 ± 7	4,2 ± 0,2	106 ± 1	2,5 ± 0,1	4,6 ± 4,0**	0,8 ± 0,5**	0,6 ± 0,3	0,7 ± 0,8**

\*spektrofotometrická a elektrochemická detekce Atellica CH, \*\*značná variabilita výsledků souvisejících s onemocněním. Vypočtené hodnoty průměru a směrodatných odchylek upozorňují na to, že průběh měření neodpovídá normálnímu rozložení.

<sup>1</sup>potenciometrie, tištěná elektroda, <sup>2</sup>o-kresolftalein komplex, <sup>3</sup>paranitrofenylfosfát, <sup>4</sup>pyridoxal-5-fosfát, <sup>5</sup>α-ketoglutarát,

<sup>6</sup>L-γ-glutamyl-3-karboxy-4-nitroanilid

ALP – alkalická fosfatáza, ALT – alaninaminotransferáza, AST – aspartátaminotransferáza, C220 – hepatocelulární karcinom, C222 – hepatoblastom, ISE – iontově selektivní elektroda, GGT – gamaglutamyltransferáza

Tab. 3. Chemická analýza analytů se vztahem k jaterním funkcím\*.

Skupina	Bilirubin <sup>1</sup> (546 nm) μmol/l	Kyselina močová <sup>2</sup> (545/694 nm) mmol/l	Močovina <sup>3</sup> (340/410 nm) mmol/l	Kreatinin <sup>4</sup> (596/694 nm) μmol/l	Albumin <sup>5</sup> (596/694 nm) g/l	Bílkovina <sup>6</sup> (545 nm) g/l	CRP <sup>7</sup> (571 nm) mg/l
kontroly	13,3 ± 7,5	312,3 ± 74,9	4,2 ± 1,0	66,0 ± 17,3	45,3 ± 3,9	68,3 ± 5,6	2,0 ± 3,3
C220	27,9 ± 49,3**	305,0 ± 114,2	6,8 ± 8,8**	70,4 ± 31,6	39,5 ± 6,6	68,8 ± 7,9	23,4 ± 26,6**
C222	8,1 ± 3,8	244,4 ± 54,1	3,9 ± 1,0	30,3 ± 17,8	43,6 ± 3,6	63,3 ± 6,2	7,5 ± 19,1**

\*spektrofotometrická detekce Atellica CH, \*\*značná variabilita výsledků souvisejících s onemocněním. Vypočtené hodnoty průměru a směrodatných odchylek upozorňují na to, že průběh měření neodpovídá normálnímu rozložení. <sup>1</sup>diazoniová sůl kyseliny sulfanilové, <sup>2</sup>urikáza/peroxidáza, <sup>3</sup>ureáza s glutamátdehydrogenázou, <sup>4</sup>sarkosin oxidáza/kreatináza, <sup>5</sup>bromkresolová zeleň, <sup>6</sup>biuret, <sup>7</sup>imunoturbidimetrický test obohacený PEG, protilátka proti CRP

C220 – hepatocelulární karcinom, C222 – hepatoblastom, CRP – karcinoembryonální antigen

nou různorodost (stadium onemocnění, průběh léčby atd.) je velmi obtížné a vyžaduje další podrobné studium. U námi sledované skupiny pacientů se podařilo analyzovat širší spektrum nádorových markerů (CEA, CA 19-9, CA 125 a AFP), jak je ukázáno v tab. 4. Ze získaných dat zkoumaných skupin probandů byla provedena ROC regresní analýza u hladin jaterních enzymů GMT, ALT, AST, ALP a C-reaktivního proteinu (CRP) u nádorových markerů CEA, CA 19-9, CA125, AFP. Pro vyhodnocení byla kontrolní skupina označena jako negativní a skupiny probandů s HCC a hepatoblastomem jako pozitivní (tab. 5).

## Diskuze

MT zasahuje do celé řady buněčných procesů vlivem jeho regulační role v udržování homeostázy iontů kovů [30,31].

Analýza sérových koncentrací MT byla velmi dlouhou dobu opomíjena [10,32]. Důvodem je značná obtížnost analytické detekce MT [33]. Ve 30. letech 20. století Rudolf Brdička naznačil potenciál využití elektrochemie v nádorové diagnostice [27,28]. V práci Petrlová et al. jsme ukázali a popsali metodický postup pro analýzu MT v komplikované biologické matrici, jakou je krevní sérum [23]. Optimalizovaná metodika nám umožnila detailnější studium získaných voltametrových křivek ve spojitosti s analyzovaným biologickým vzorkem [34]. Zjistili jsme, že tyto průběhy je možné matematicky popsat a vyhodnocovat [35]. Předpokládáme, že takto získaný průběh křivky může být využit pro jednoznačnou identifikaci (tzv.

fingerprint) hledané biologické vlastnosti [34]. Vyhodnocování takových záznamů společně s prvky umělé inteligence by mělo zlepšit diagnostiku těchto nádorových onemocnění. Díky našemu snažení v této oblasti analýzy MT se dané problematice věnuje více výzkumných skupin [36]. Z histochemických a molekulárně-biologických studií víme, že MT má asociaci s nádorovým onemocněním [30]. Navíc lze pozorovat i asociaci MT se závažností onemocnění. O dynamice sérových hladin MT v závislosti na věku neexistují prakticky žádné studie. V této studii byla prokázána zvýšená hladina MT (> 5 μg/l) s extrémními hodnotami kolem 10–20 μg/l. K podobným závěrům jsme dospěli v dalších studiích [9,16,37,38]. Samozřejmě byly zjištěny asociace mezi hladinou MT

Tab. 4. Analýza hladin CEA, CA 19-9, CA 125 a AFP sledovaných skupin pacientů\*.

Skupina	Počet provedených analýz				Analyzovaná koncentrace			
	CEA	CA 19-9	CA 125	AFP	CEA <sup>1</sup>	CA 19-9 <sup>2</sup>	CA 125 <sup>3</sup>	AFP <sup>4</sup>
	n				ng/l			
C220	14 (93 %)	6 (40 %)	2 (13 %)	15 (100 %)	1,6 ± 2,1**	80,1 ± 132,7**	6,4 ± 8,2**	214,1 ± 312,4**
C222	11 (73 %)	9 (60 %)	1 (6 %)	13 (87 %)	2,7 ± 5,9**	23,2 ± 39,0**	11,9	7,3 ± 11,4**

\*imunochemiluminiscenční detekce Atellica IM, \*\*značná variabilita výsledků souvisejících s onemocněním. Vypočtené hodnoty průměru a směrodatných odchylek upozorňují na to, že u nich průběh měření neodpovídá normálnímu rozložení. <sup>1</sup> magnetické částice, myší monoklonální CEA; sekundární polyklonální králičí akridium ester, <sup>2</sup> magnetické částice, monoklonální 1116-NS-19-9; sekundární monoklonální 1116-NS-19-9 akridium ester, <sup>3</sup> magnetické částice, myší monoklonální na fluorescein; sekundární 1 myší monoklonální k M11 značená akridinium esterem, sekundární 2 myší monoklonální značená fluoresceinem k OC125, <sup>4</sup> magnetické částice, myší monoklonální AFP; sekundární polyklonální králičí akridium ester  
AFP – alfa-fetoprotein, CA 19-9 – antigen karcinomu 19-9, CA 125 – glykoprotein podobný mucinu, CEA – karcinoembryonální antigen

Tab. 5. ROC analýza vybraných biochemických ukazatelů u probandů s nádorovým onemocněním.

	GGT	ALT	AST	ALP	CRP	CEA	CA 19-9	AFP
AUC*	0,777 (0,639– 0,915)**	0,77 (0,631– 0,909)**	0,775 (0,634– 0,913)**	0,781 (0,639– 0,915)**	0,698 (0,545– 0,851)**	0,869 (0,753– 0,985)**	0,907 (0,785–1,03)**	0,871 (0,705–1,04)**
specifická*	0,95	0,6	0,95	0,75	0,9	1	1	1
senzitivita*	0,47	0,95	0,63	0,83	0,4	0,68	0,8	0,35
cut-off*	0,54	0,37	0,59	1,99	5,3	0,61	3,47	1

\*vypočteno v programu LADYS na 95% hladině významnosti, 95% interval spolehlivosti, kontrolní skupina – n = 20; probandi se zhoubnými nádory jater – n = 30

AFP – alfa-fetoprotein, ALP – alkalická fosfatáza, ALT – alaninaminotransferáza, AST – aspartátaminotransferáza, AUC – plocha pod křivkou, CA 19-9 – antigen karcinomu 19-9, CEA – karcinoembryonální antigen, CRP – C-reaktivní protein, GGT – gama-glutamyl-transferáza, ROC – receiver operating characteristic

a molekulami spojenými s jaterním metabolismem [39]. Jak je známo, HCC se více vyskytuje u dospělých a hepatoblastom u dětí. V naší studii však mezi skupinami nebyly pozorovány významné rozdíly (průměrné hladiny a mediány byly velmi podobné). Lze jen obecně předpokládat, že hladiny MT budou asociované s buněčnou metabolickou aktivitou [31]. Získané závěry ROC analýzy naznačují, že výzkum v této oblasti by mohl přinést slibné výsledky. Zcela nezbytné však bude pozorovanou skupinu pacientů rozšířit. Vzhledem k tomu, že hladiny MT jsou asociované s celou řadou přirozených biologických procesů, je využitelnost v běžné klinické praxi obtížně realizovatelná (jak je u řady nádorových markerů známo) [40].

V případě, že budeme sledovat více ukazatelů a využijeme nejmodernější přístupy ve vyhodnocování dat, lze očekávat mnohem více vypovídající informace o průběhu onemocnění.

### Závěr

V naší pilotní studii na vzorku 30 probandů byly studovány hladiny MT s případnou asociací se zhoubnými nádory jater. Zjistili jsme, že hladiny MT byly u sledovaných skupin v porovnání s kontrolní skupinou zvýšené. Započatá studie bude dále pokračovat na větším souboru pacientů s přihlédnutím ke klasifikaci nemoci a léčebným zákrokům.

### Poděkování

Práce je součástí pracovních aktivit v projektu COST CA22125/ENS-CCA a je podporována projektem Liga proti rakovině Praha 2399011548. Naše speciální poděkování patří panu RNDr. Josefu Růžičkovi za rozvoj laboratorního informačního systému.

### Literatura

- Cossiga V, Guarino M, Capasso M et al. Relevance of bile acids in cholangiocarcinoma pathogenesis: critical revision and future directions. *Cells* 2023; 12(12): 1576. doi: 10.3390/cells12121576.
- Ilyas SI, Affo S, Goyal L et al. Cholangiocarcinoma – novel biological insights and therapeutic strategies. *Nat Rev Clin Oncol* 2023; 20(7): 470–486. doi: 10.1038/s41571-023-00770-1.
- Calvisi DF, Boulter L, Vaquero J et al. Criteria for preclinical models of cholangiocarcinoma: scientific and medical relevance. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2023; 20(7): 462–480. doi: 10.1038/s41575-022-00739-y.
- Banales JM, Marin JGG, Lamarca A et al. Cholangiocarcinoma 2020: the next horizon in mechanisms and man-



- agement. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2020; 17(9): 557–588. doi: 10.1038/s41575-020-0310-z.
5. Befeler AS, Di Bisceglie AM. Hepatocellular carcinoma: diagnosis and treatment. *Gastroenterology* 2002; 122(6): 1609–1619. doi: 10.1053/gast.2002.33411.
  6. Wei LY, Zhai YZ, Feng GH. New advances in the use of serum prealbumin as an index of liver function. *World Chin J Digest* 2013; 21(15): 1387–1393. doi: 10.1017/S0007114518002854.
  7. Zavadil J, Juráček J, Čechová B et al. Dynamic changes in circulating microRNA levels in liver cancer patients undergoing thermal ablation and transarterial chemoembolization. *Klin Onkol* 2019; 32 (Suppl 1): S164–S166.
  8. Zelená J, Potěšil D, Vacek J et al. Metallothionein as a prognostic marker of tumor disease. *Klin Onkol* 2004; 17(6): 190–195.
  9. Fabrik I, Adam V, Křížková S et al. Level of heat-stable thiols in patients with a malignant tumor. *Klin Onkol* 2007; 20(6): 384–389.
  10. Horakova Z, Starek I. Serum metallothionein – a potential oncomarker? *Bratisl Lek Listy* 2021; 122(8): 577–581. doi: 10.4149/BLL\_2021\_092.
  11. Miaoou E, Tissot FLH. Copper isotope ratios in serum do not track cancerous tumor evolution, but organ failure. *Metallomics* 2023; 15(11): mfad060. doi: 10.1093/mtomcs/mfad060.
  12. Abelev G. Alpha-fetoprotein in ontogenesis and its association with malignant tumors. *Adv Cancer Res* 1971; 14: 295–358. doi: 10.1016/s0065-230x(08)60523-0.
  13. Kithier K, Houstek J, Masopust J et al. Occurrence of a specific foetal protein in a primary liver carcinoma. *Nature* 1966; 212(5060): 414. doi: 10.1038/212414a0.
  14. Zizkovsky V, Masopust J, Kordac V et al. Alpha1-fetoprotein in carcinoid. *New England Journal of Medicine* 1972; 287(21): 1102–1103.
  15. Masopust J, Kithier K, Radl J et al. Occurrence of fetoprotein in patients with neoplasms and non-neoplastic diseases. *Int J Cancer* 1968; 3(3): 364–373. doi: 10.1002/ijc.2910030306.
  16. Fabrik I, Krizkova S, Huska D et al. Employment of electrochemical techniques for metallothionein determination in tumor cell lines and patients with a tumor disease. *Electroanalysis* 2008; 20(14): 1521–1532.
  17. Zhang XS, Ma YX, Liu KJ et al. Risk prediction for dermatomyositis-associated hepatocellular carcinoma. [online]. Available from: <https://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12859-023-05353-6>BMC.
  18. Vij M, Menon J, Subbiah K et al. Pathologic and immunophenotypic characterization of syncytial giant cell variant of pediatric hepatocellular carcinoma. A distinct subtype. *Fetal Ped Pathol* 2023 Jul; 42(4): 709–718. doi: 10.1080/15513815.2023.2201318.
  19. Nishikawa H, Asai A, Fukunishi S. The significance of zinc in patients with chronic liver disease. *Nutrients* 2022; 14(22): 4855. doi: 10.3390/nu14224855.
  20. Petřlová J, Blaštík O, Průša R et al. Determination of metallothionein content in patients with breast cancer, colon cancer, and malignant melanoma. *Klin Onkol* 2006; 19(2): 138–142.
  21. Melich L, Fortova M, Hosnedlova B et al. Studium hladiny metalothionieniu v séru pacientů se zhoubným nádorem. *Chem Listy* 2023; 117(9): 573–580.
  22. Wang XL, Schnoor M, Yin LM. Metallothionein-2: an emerging target in inflammatory diseases and cancers. *Pharmacol Therap* 2023; 244: 108374.
  23. Petřlova J, Potesil D, Mikelova R et al. Atomole voltametric determination of metallothionein. *Electrochim Acta* 2006; 51(24): 5112–5119.
  24. Skotak V, Sehnal K, Banas D et al. Využití Brdičkovy reakce pro detekci metalothioneinu v moči. *Prakt Lék* 2023; 103(6): 299–303.
  25. Hubaux A, Vos G. Decision and detection limits for linear calibration curves. *Anal Chem* 1970; 42(8): 849–851.
  26. Melich L, Fortova M, Vyslouzilova L et al. Analýza metalothioneinu u pacientů se zhoubnými nádory jater. *Klin Onkol* 2023; 36 (Suppl 1): S74–S74.
  27. Brdicka R. Polarographic investigation in serological cancer diagnosis. *Nature* 1937; 139: 1020–1021.
  28. Brdicka R. Application of the polarographic effect of proteins in cancer diagnosis. *Nature* 1937; 139: 330–330.
  29. Dabrio M, Rodríguez AR, Bordin G et al. Recent developments in quantification methods for metallothionein. *J Inorg Biochem* 2002; 88(2): 123–134. doi: 10.1016/s0162-0134(01)00374-9.
  30. Babula P, Masarik M, Adam V et al. Mammalian metallothioneins: properties and functions. *Metallomics* 2012; 4(8): 739–750. doi: 10.1039/c2mt20081c.
  31. Eckschlager T, Adam V, Hrabeta J et al. Metallothioneins and cancer. *Current Prot Pept Sci* 2009; 10(4): 360–375. doi: 10.2174/138920309788922243.
  32. Krizkova S, Fabrik I, Adam V et al. Metallothionein – a promising tool for cancer diagnostics. *Bratisl Lek Listy* 2009; 110(2): 93–97.
  33. Adam V, Fabrik I, Eckschlager T et al. Vertebrate metallothioneins as target molecules for analytical techniques. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2010; 29(5): 409–418.
  34. Vyslouzilova L, Adam V, Szaboova A et al. Brdicka curve – a new source of biomarkers. *IEEE International Conference on Bioinformatics and Biomedicine Workshops (BIBMW)*; 2011 Nov 12–15; Atlanta, GA.
  35. Vyslouzilova L, Krizkova S, Anyz J et al. Use of brightness wavelet transformation for automated analysis of serum metallothioneins- and zinc-containing proteins by Western blots to subclassify childhood solid tumours. *Electrophoresis* 2013; 34(11): 1637–1648. doi: 10.1002/elps.201200561.
  36. Tamai Y, Iwasa M, Eguchi A et al. Serum copper, zinc and metallothionein serve as potential biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Plos One* 2020; 15(8): e0237370. doi: 10.1371/journal.pone.0237370.
  37. Kruseova J, Hynek D, Adam V et al. Serum metallothioneins in childhood tumours – a potential prognostic marker. *Int J Mol Sci* 2013; 14(6): 12170–12185. doi: 10.3390/ijms140612170.
  38. Krizkova S, Masarik M, Majzlik P et al. Serum metallothionein in newly diagnosed patients with childhood solid tumours. *Acta Biochim Pol* 2010; 57(4): 561–566.
  39. Tomášek J, Prášek J, Kiss I et al. Liver function assessment in oncology practice. *Klin Onkol* 2012; 25(6): 427–433.
  40. Sawyers CL. The cancer biomarker problem. *Nature* 2008; 452(7187): 548–552. doi: 10.1038/nature06913.
  41. Berndt N, Bulik S, Wallach I et al. Hepatokin1 is a biochemistry-based model of liver metabolism for applications in medicine and pharmacology. *Nat Commun* 201; 9(1): 2386. doi: 10.1038/s41467-018-04720-9.
  42. Sharon A. Antioxidants in liver disease: a focus on thiol supplementation. [online]. Available from: <https://www.vin.com/apputil/content/defaultadv1.aspx?pld=11223&meta=generic&catId=31461&id=3859034&ind=148&objTypeID=17>.