

Univerzita Karlova v Praze

2. lékařská fakulta

Studijní program v biomedicině

Obor preventivní medicína



MUDr. Jarmila Kruseová

Metalothioneiny a další biomarkery v terapeutickém rozhodování u dětských onkologických pacientů.

Metallothioneins and other biomarkers in the treatment decision in pediatric cancer patients.

Dizertační práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel:
Prof. MUDr. Tomáš Eckschlager, CSc.

Praha, 2014

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 28.2.2014

MUDr. Jarmila KRUSEOVÁ

.....

Poděkování

Mému školiteli Tomášovi Eckschlagerovi bych chtěla poděkovat za vedení, které pro mě bylo velmi obohacující po odborné i po osobní stránce. Janu Starému na Klinice dětské hematologie a onkologie za zajištění kvalitního pracovního zázemí. Jana Jašinská, Ludmila Moravcová a Alena Soudská z Laboratoře biologie solidních nádorů zaslouží velký dík za pomoc a mnoho poskytnutých rad při přípravě experimentálních vzorků. René Kízkovi a všem dalším kolegům z Oddělení chemie a biochemie Zemědělské fakulty Mendelovy Univerzity v Brně za pomoc při stanovování hladin metalothioneinů. Marii Hladíkové za statistické analýzy všech získaných výsledků. Za velkou podporu děkuji také celé své rodině.

Obsah

1. Úvod	6
1.1 Chemická struktura metalothioneinů	6
1.2 Metody stanovení metalothioneinů v biologickém materiálu	9
1.3 Funkce metalothioneinů v organismu	14
1.4 Metalothioneiny a karcinogeneze	17
1.5 Metalothionein - prognostický marker u zhoubných nádorů	19
1.6 Metalothioneiny a chemorezistence	22
1.7 Metalothioneiny a oxidativní stres	24
1.8 Metalothioneiny u dětí	26
2. Cíle	29
3. Metody a soubor pacientů	31
4. Výsledky	35
4.1 Metalothioneiny a nádorové diagnózy	35
4.2 Metalothioneiny a aktivita nádorového onemocnění	36
4.3 Metalothioneiny a chemoterapie	37
4.4 Metalothioneiny a vztah k dalším biochemickým parametrům	38
5. Diskuze	40
6. Závěry	50
7. Seznam zkratk	51
8. Literatura	54

Příloha 1

Kruseova J, Hynek D, Adam V, Kizek R, Prusa R, Hrabeta J, Eckschlager T. Serum metallothioneins in childhood tumours-a potential prognostic marker. *Int J Mol Sci.* 2013 Jun 6;14(6):12170-85.

Příloha 2

Cernei N, Zitka O, Skalickova S, Gumulec J, Sztalmachova M, Rodrigo MA, Sochor J, Masarik M, Adam V, Hubalek J, Trnkova L, **Kruseova J**, Eckschlager T, Kizek R. Effect of sarcosine on antioxidant parameters and metallothionein content in the PC-3 prostate cancer cell line. *Oncol Rep.* 2013 Jun; 29(6): 2459-66.

Příloha 3

Vyslouzilova L, Krizkova S, Anyz J, Hynek D, Hrabeta J, **Kruseova J**, Eckschlager T, Adam V, Stepankova O, Kizek R. 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 Jun; 34(11): 1637-48.

Příloha 4

Zitka O, Skalickova S, Gumulec J, Masarik M, Adam V, Hubalek J, Trnkova L, **Kruseova J**, Eckschlager T, Kizek R. Redox status expressed as GSH:GSSG ratio as a marker for oxidative stress in paediatric tumour patients. *Oncol Lett.* 2012 Dec; 4(6): 1247-1253.

Příloha 5

Krizkova S, Masarik M, Majzlik P, Kukačka J, **Kruseova J**, Adam V, Prusa R, Eckschlager T, Pohanka M, Stiborova M, Kizek R. Serum metallothionein in newly diagnose patients with childhood solid tumours. *Acta Biochim Pol.* 2010; 57(4): 561-6.

Příloha 6

Pohanka M, Hynek D, Kracmarova A, **Kruseova J**, Rutkay-Nedecky B, Sochor J, Eckschlager T, Kizek R. Voltammetry Assay for Assessment of Oxidative Stress linked pathologies in brain tumor suffered childhood patients. *Int. J. Electrochem. Sci.* 2012; 7: 11978-11992.

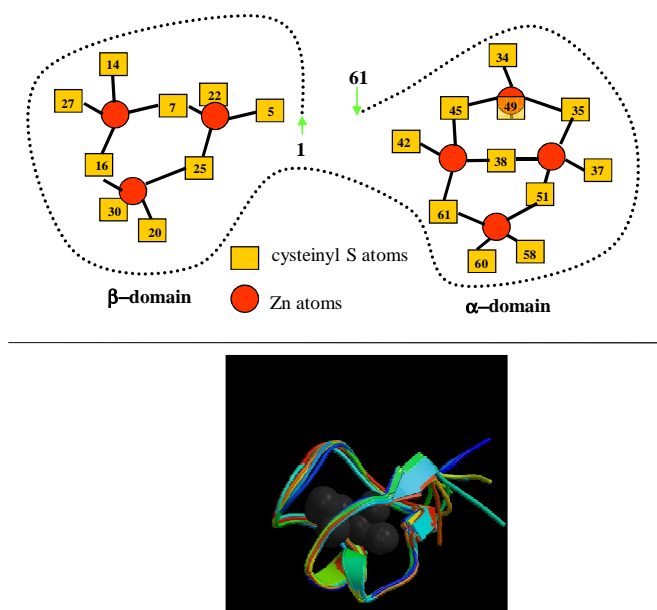
1. Úvod

Metalothioneiny (MT) byly poprvé popsány před více než 50 lety jako nízkomolekulární proteiny, obsahující vysoký počet thiolových skupin (Bell et al., 2009). Poprvé izolovali metalothioneiny Margoshoe a Valle v roce 1957 z koňských ledvin (Eckschlager et al., 2009). Metalothioneiny jsou v přírodě všudypřítomné - vyskytují se u živočichů, rostlin i prokaryont, nacházejí se v cytoplasmě i v organelách - mitochondriích, lysozomech, buněčných jádrech. V lidském organismu se podílejí na celé řadě důležitých biologických procesů.

1.1 Chemická struktura metalothioneinů

Metalothioneiny jsou nízkomolekulární, intracelulární proteiny s molekulovou hmotností 6-10 kDA, které nemají enzymatické aktivity. Obsahují vysoký podíl aminokyseliny cysteinu – 25-30% (Penkowa et al., 2002, Hua et al., 2008).

Obrázek 1: Třírozměrná struktura roztoku lidského metalothioneinu určené pomocí nukleární magnetické rezonanční spektroskopie - převzato z (Eckschlager et al., 2009).



3D structure of solution of human MT [$^{113}\text{Cd}_7$] detected using nuclear magnetic resonance spectroscopy (Cd-7 Metallothionein-2)

Metalothioneiny jsou charakteristické jak obsahem iontů kovů, tak obsahem síry ve formě thiolových (SH) skupin. Většinou se skládají z 60-68 aminokyselinových zbytků. V centrální části své molekuly obvykle obsahují dvacet cysteinových zbytků, přičemž nejčastěji opakujícím se motivem je cystein (C)-serin (S)-cystein(C). Aromatické aminokyseliny v primární struktuře metalothioneinů obvykle chybí. Všechny přítomné cysteiny jsou v redukované podobě a koordinované s ionty kovů, přičemž vytvářejí metalthiolátové klastry. Celkově je jedna molekula savčího metalothioneinu schopna vázat jedenáct jednovazných nebo sedm dvouvazných iontů kovů (Adam et al., 2008). Metalothioneiny mají na obou vazebných místech zinek, který se při vyšší afinitě k thiolům může vyměnit za olovo, měď, kadmium, platinu, stříbro nebo železo. Doména metalothioneinů, která váže kovy se skládá z dvaceti cysteinů, které jsou vázány s lysinem a argininem (Eckschlager et al., 2009). Struktura lidských metalothioneinů je závislá na množství iontů kovů a množství vodíkových radikálů (Maret et al., 2009). Geny pro metalothioneiny se u člověka nachází na chromozómu 16q12-22. U savců jsou popsány čtyři izoformy MT1-4, u lidí je v současné době popsáno již 11 subtypů – jednotlivé izoformy a subtypy metalothioneinů ukazuje tabulka 1.

Tabulka 1: Rozdělení metalothioneinů -převzato z (Petrlová et al., 2004).

MT	Počet aminokyselin	Molekulová hmotnost	Terapeutické pl	swiss-prot označení
MT1A	61	6133.2	8.38	P04731
MT1B	61	6115.3	8.47	P07438
MT1E	61	6014.1	8.38	P04732
MT1F	61	6086.2	8.23	P04733
MT1G	61	6070.2	8.38	P13640
MT1H	61	6039.2	8.49	P80z94
MT1	61	6040.2	8.38	P80295
MT1K	62	6141.3	8.38	P80296
MT1L	61	6068.2	8.38	P80297
MT1R	61	6062.2	8.38	Q93083
MT2	61	6042.1	8.23	P02795
MT3	68	6926.9	4.79	P25713
MT4	62	6418.7	8.38	P47944

Nejčastější jsou izoformy MT1 a MT2, které se vyskytují v celém organismu.

Tabulka 2: Rozdíly mezi MT1 a MT2, počet a sekvence jednotlivých aminokyselin.

10 20 30 40 50 60j
| | | | | |
MDPNCSCATG NSCTCASSCK CKECKCTSCK KSCCSCCPAG CTKCAQGCIC KGASDKCSCC A

Molekulární hmotnost: 6103 Da – METALOTHIONEIN 1 * 61 aminokyselin *

10 20 30 40 50 60
| | | | | |
MDPNCSCAAA GDSCTCANSC TCKACKCTSC KKSCCSCCPP GCAKCAQGCI CKGASDKCSC CA

Molekulární hmotnost: 6083 Da – METALOTHIONEIN 2 * 62 aminokyselin *

V séru je nejčastější izoforma metalothionein 2. Rozdíly v expresi mezi MT2 a ostatními izoformami metalothioneinů jsou dány sekvenčními rozdíly v oblasti promotoru, které umožňují vazbu aktivátorů neboli enhancerů transkripce právě u MT2 izoformy (Samson et al., 1998). Enhancery transkripce MT2 genu jsou kovy, interleukiny, interferony, TNFalfa a glukokortikoidy (Raudenská et al., 2012). Informace o sérových hladinách jednotlivých izoform metalothioneinů dosud chybí. Metalothionein 3 byl nalezen v mozku, kde působí jako inhibitor růstového hormonu. Je primárně syntetizován v astrocytech kortexu, mozkového kmene a míchy (Choudhuri et al., 1995). Později byla jeho exprese prokázána i v ledvinách, pankreatu, střevu, močovém měchýři, prostatě a v řadě nádorových tkání (Hua et al., 2008). Struktura MT3 se výrazně liší od ubiquiterních MT1 a MT2 (Karotki et al., 2009). Metalothionein 4 byl prokázán v dlaždicobuněčných epiteliích kůže, jazyka a žaludku. Účastní se regulace pH žaludeční šťávy, citlivosti chuťových buněk jazyka a má protektivní účinek na poškození kůže UV zářením (Namdargh nabari et al., 2011).

1.2 Metody stanovení metalothioneinů v biologickém materiálu

K měření obsahu metalothioneinů v biologických vzorcích tělních tekutin a tkání používáme různé metody. Endogenní metalothioneiny i jejich isoformy stanovujeme na úrovni transkripční (stanovení mediátorové ribonukleové kyseliny - mRNA) a translační (stanovení hladiny proteinů). Používaná je celá škála metod – Western

blotting, RT PCR nebo Northern blotting, imunofluoresce, imunohistochemie, chromatografie, kapilární elektroforéza, spektrometrie a elektrochemické stanovení hladiny metalothioneinů.

Nejčastěji se metalothionein stanovuje kvantifikací množství kovů vázaných na metalothionein a podle tohoto množství se určí odpovídající hodnota metalothioneinu. Metalothioneiny mají rozdílnou afinitu ke kovům $\text{Hg(II)} > \text{Ag(I)} = \text{Cu(I)} > \text{Cd(II)} > \text{Zn(II)}$ (Moffat et al., 1997). Z toho vychází tzv. saturační metoda Cd-hem, při které se využívá vlastnosti metalothioneinu vázat kadmium Cd(II) místo zinku Zn(II) . Pokud známe koncentraci kadmia určíme podle poklesu jeho hodnoty koncentraci metalothioneinu ve vzorku. Na stejném principu jsou založeny další saturační metody, které používají pouze jiné kovy stříbro Ag(I) a rtuť Hg(II) (Eckschlager et al., 2009).

Absorbční spektrometrie nebo chromatografie stanovuje absolutní počet kovů vázaných na metalothioneiny (Andon et al., 2006).

Další metoda měří metalothioneiny pomocí množství sulfohydrolových skupin s použitím chemického značení Ellmanovým reagentem (5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoová kyselina) nebo téže DTNB), který je využíván ke kvantifikaci thiolových skupin, které s ním reagují a štěpí disulfidickou vazbu na žlutý 2-nitro-5-thiobenzoát. Takto označené sulfhydrylové skupiny jsou detekovány UV spektrometrií nebo fluorimetrií (Eckschlager et al., 2009).

RIA a ELISA jsou vysoce senzitivní metody vhodné pro detekci metalothioneinu v biologických tekutinách i ve tkáních. Tyto metody používají protilátky proti metalothioneinu, které jsou značeny buď radiaktivní látkou – radioimunoanalýza (RIA) nebo enzymem (ELISA) (Eckschlager et al., 2009).

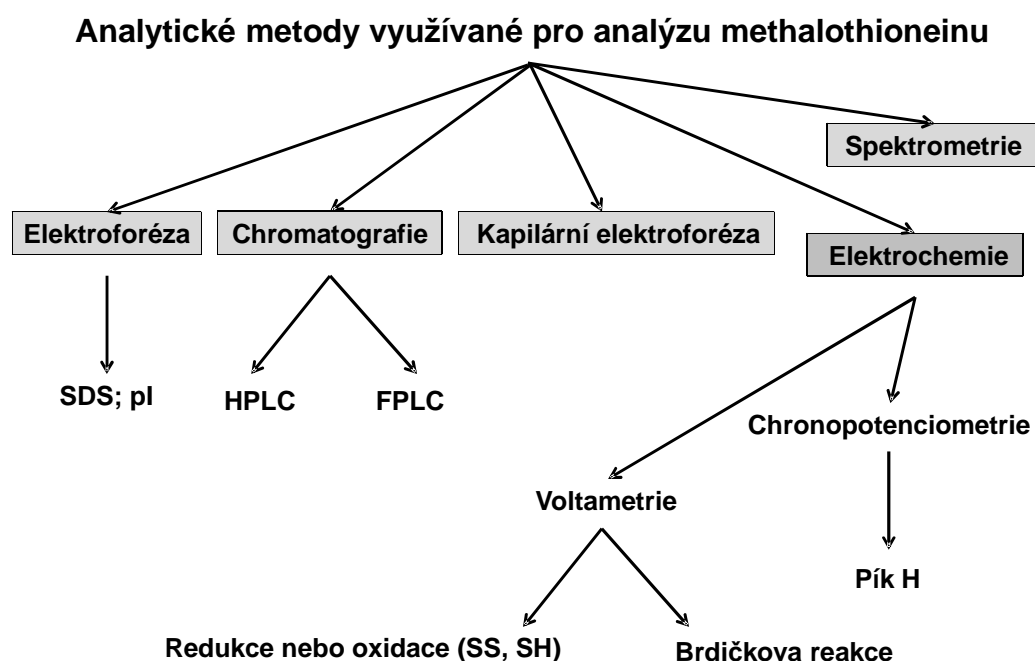
Separační technika odlišuje jednotlivé izofomy metalothioneinů pomocí chromatografie nebo elektroforézy. Nejpoužívanější je tzv. CZE (capillary zone electrophoresis- kapilární zónová elektroforéza), která byla vyvinuta v roce 1990 a používá se od roku 1993 (Eckschlager et al., 2009).

Reverzně transkripční polymerázová řetězová reakce /RT-PCR/ a Northern blotting stanovuje hladinu mediátorové ribonukleové kyseliny (mRNA) jednotlivých

metallothioneinů, jejichž geny jsou v lidském genomu umístěny v klastru na chromosomu 16 q13 (Ganguly et al., 1996).

Mezi elektrochemické metody patří chronopotenciometrické měření hladiny vrcholu H, který vznikne při katalytické reakci elektrolytu v přítomnosti proteinu a voltametrie, která měří redukci nebo oxidaci SS a SH skupin (Kížek et al., 2004).

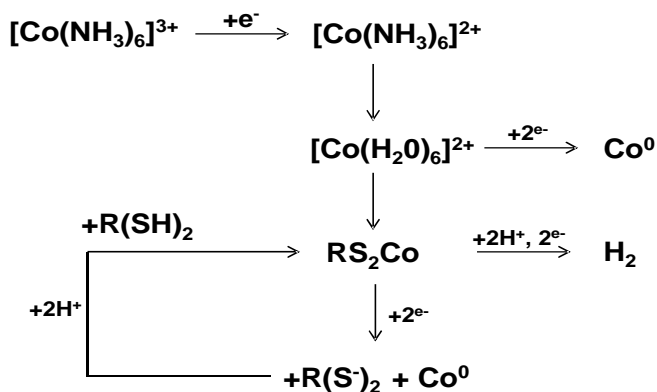
Obrázek 2: Souhrn analytických metod využívaných pro analýzu metalothioneinů - převzato z (Adam et al., 2008).



Impulzem pro vznik voltametrie byl objev polarografu profesorem Jaroslavem Heyrovským, který za tento celosvětový vynález získal v roce 1959 Nobelovu cenu. Jeho žák Rudolf Brdička, v roce 1933 popsal polarografický signál vznikající v přítomnosti proteinů obsahujících síru. Nebylo však zcela zřejmé, které proteiny byly touto metodikou stanovovány. Zjistil, že signál krevního séra zdravého člověka a pacienta s nádorovým onemocněním je výrazně odlišný. Tento nález mohl být proto využit pro rozlišení zdravého a nemocného člověka (Adam et al., 2008). Brdička popsal 100% specifitu této metody při diagnostice nádorových onemocnění. Tato metoda je pojmenována podle svého objevitele Brdičkova filtrační reakce, viz obrázek 3.

Obrázek 3: Pravděpodobné schéma Brdičkovy reakce - převzato z (Adam et al., 2008).

pravděpodobné schéma Brdičkovy reakce

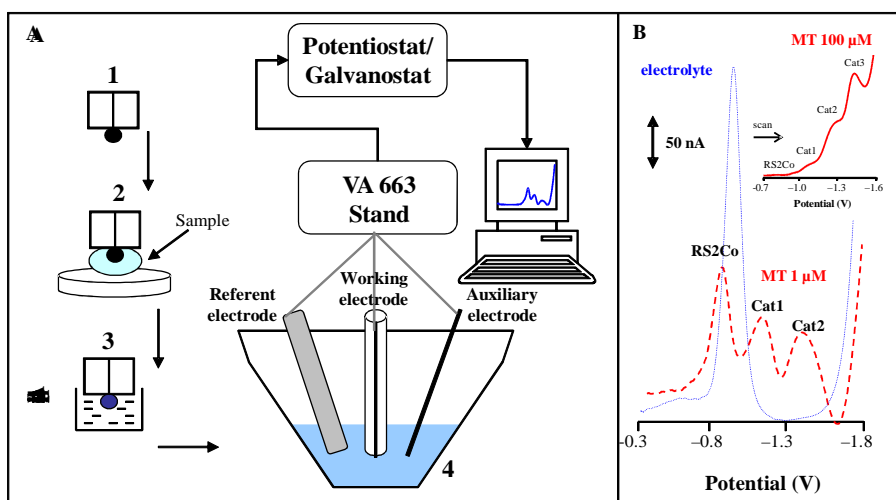


Později bylo od této metody laboratorní diagnostiky nádorů díky dalším novým modernějším analytickým chemickým a molekulárně biologickým postupům upuštěno. V podstatě více než padesát let se Brdičkova metoda nepoužívala. Hlavními důvody byla zejména finanční nákladnost a malá výtěžnost. Teprve později se zjistilo, že Brdička stanovoval skupinu mukoproteinů (MP1, MP2 a MP3). V současnosti se ovšem ukazuje, že právě tyto nízkomolekulární proteiny, jako je třeba metalothionein a glutathion, které Brdička původně stanovil, hrají důležitou roli v mnoha významných biologických procesech. To byl jeden z hlavních důvodů, proč je tato metoda opět v zájmu některých vědeckých pracovišť. Během posledních deseti let byla Brdičkova metoda různými způsoby modifikována. Důležitou vlastností metalothioneinů je, že patří k termostabilním proteinům, které zůstávají přítomné v roztoku i po jeho tepelné denaturaci. Kízek se svým kolektivem (Kízek et al., 2004) také tuto reakci upravili a zjistili, že při Brdičkově reakci vzniká charakteristický elektrochemický signál, který je závislý na množství thiolových skupin v cílové molekule, na její velikosti a koncentraci. Vzniklý signál je navíc závislý na teplotě.

Prokázali, že zvýšení teploty elektrolytů o 5-10 °C zvyšuje signál metalothioneinů o více než 50% proti měření při pokojové teplotě.

Specifická tato metody je vyšší než 90% (Adam et al., 2010). Tato metoda byla klíčová pro naši práci, neboť pro měření hladiny metalothioneinů v séru našich dětských pacientů se solidními nádory jsme používali stejný postup. Princip námi užívané metody znázorňuje obrázek 4.

Obrázek 4: Schéma DP voltametrie 4 -převzato z (Eckschlager et al., 2009).



Eckschlager et al.
Fig. 5

1.3 Funkce metalothioneinů v organismu

Přestože metalothioneiny byly objeveny již před více, než 40 lety mnoho jejich biologických funkcí není dosud plně objasněno. Metalothioneiny jsou nejvíce studované proteiny ze skupiny tzv. metaloproteinů, které reprezentují zhruba 30% všech známých proteinů a o jejichž kompletní struktuře a mechanismu metylace máme stále velmi omezené informace (Ngu et al., 2009). Jsou to multifunkční proteiny, které se v buňce nacházejí ve velmi nízké koncentraci a jejich hladina stoupá při zvýšené hladině kovů v organismu (Kavaati et al., 2010). Jednou z hlavních funkcí ubiquiterně se vyskytujících isoform MT1 a MT2 je regulace hladin kovů v organismu. Těžké kovy vyskytující se v životním prostředí mají vliv na lidské zdraví. V organismu máme esenciální těžké kovy (Fe, Cu, Zn, Mn, Co, Mo), které jsou v malých dávkách nepostradatelné pro správnou funkci organismu (jsou součástí molekuly různých enzymů, nebo fungují jako jejich aktivátory) a nebezpečné toxické kovy Hg, Cd, Pb, As, Cr. Esenciální i toxické kovy se vážou na -SH, -COOH a -NH₂ skupiny biomolekul a mění tak jejich strukturu a funkci. Nejzávažnějším účinkem druhé skupiny kovů je, že v toxické koncentraci fungují jako enzymatické jedy a zasahují do mnoha buněčných a metabolických pochodů. Někdy dochází též ke kompetici s esenciálními látkami (olovo nahrazuje vápník v kostech, kde se posléze kumuluje, kadmium nahrazuje zinek v některých enzimech) (Raudenská et al., 2012). Je známo, že mezi jedinci téhož druhu existuje značná variabilita v jejich toleranci a účinku. Právě za tuto vnitrodruhovou variabilitu je odpovědná rozdílná míra exprese a funkčnosti kovy vážících peptidů metalothioneinů a glutathionu. Míra exprese metalothioneinů a jejich schopnost vázat kovy může být mimo jiné narušena změnami na úrovni DNA. Bylo prokázáno, že některé jednonukleotidové polymorfizmy (SNP) jsou asociovány s predispozicemi k různým chorobám a rychlejšímu stárnutí, což potvrzuje klíčovou úlohu metalothioneinů při ochraně organismu a spekuluje se i o možnosti využití těchto polymorfizmů jako ukazatelů rizika pro nositele rizikových genotypů (Raudenská et al., 2012). Jednonukleotidový polymorfizmus (SNP) c. 152A/G v genu MT1A – znamená záměnu A za G na 152. pozici od začátku kódující sekvence genu MT1A je provázen zvýšeným rizikem diabetu. Přítomnost guaninu u tohoto SNP byla signifikantně asociována s incidencí diabetu typu 2 (Cipriano et al., 2006). Jednonukleotidový polymorfizmus (SNP) c. 80A/C v genu MT1A byl asociován s dlouhověkostí v italské populaci. Zvýhodnění byli nositelé alely A (Kavaati et al., 2010), nositelé alely C byli naopak

predisponování k rozvoji kardiovaskulárních nemocí a diabetu typu 2 (Cipriano et al., 2006). Jednonukleotidový polymorfismus (SNP) – 77A/G v MT2A se nachází v regulačním úseku DNA zvaném MRE (metal responsive element), na který se za normálních okolností váže transkripční faktor MTF-1. Pokud se však v sekvenci vyskytuje v této pozici G místo A, MTF -1 se nemůže navázat a míra transkripce MT2A se výrazně snižuje. U nositelů alely G tohoto polymorfismu byl nalezen vyšší obsah kadmia v ledvinách (průměrné hodnoty kadmia byly 87 µg/g tkáně u nositelů genotypu AA, 151 µg/g u genotypu AG a 153 µg/g u genotypu GG) (Kavaalti et al., 2011). Jednonukleotidový polymorfismus (SNP)+838C/G v MT2A je provázen výskytem aterosklerózy, nedostatkem zinku a mědi a vyšší hladinou prozánětlivého cytokinu MCP-1. Ve všech těchto případech byli znevýhodněni nositelé genotypu GG. Genotyp GG tohoto polymorfismu byl též asociován s častějším vznikem nekalcifikovaných plaků v karotidách (Giacconi et al., 2007). Jednonukleotidový polymorfismus (SNP) – 209A/G v MT2A je provázen chronickým zánětem (vysoké plazmatické hladiny IL-6), hyperglykemií se zvýšenou hladinou glykovaného hemoglobinu a nedostatkem zinku. Nositelé genotypu AA mají zvýšené riziko vzniku diabetes melitus 1. typu v kombinaci s aterosklerózou ($p=0,0015$ odds ratio 2,62) a jejími komplikacemi jako je ischemická kardiomyopatie ($p=0,005$ odds ratio=12,6) (Giacconi et al., 2005). Zvýšená exprese MT1A i MT2A byla zjištěna také u Gravesovy-Basedovy choroby (Samson et al., 1998) a v buňkách obklopujících amyloidní plaky vznikající při Alzheimerově chorobě (Hidalgo et al. 2006) a u amyotrofické laterální sklerózy. V další práci polští autoři sledovali vztah hladiny zinku mědi, metalothioneinů a mozkových nádorů. U pacientů s maligními nádory prokázali pozitivní vztah mezi hladinou metalothioneinů a hladinou zinku a negativní vztah mezi metalothioneiny a hladinou mědi. Neprokázali statisticky signifikantní rozdíl mezi hladinou mědi u pacientů s maligními a benigními mozkovými nádory (Florjanczyk et al., 2003). Zinek, jehož metabolismus je ovlivňován metalothioneiny a naopak sám ovlivňuje hladiny metalothioneinů prostřednictvím aktivace transkripčního faktoru MTF-1 (metal-responsive transcription factor), kterou mohou indukovat některé kovy včetně zinku. MRE (metal responsive element), je klíčový pro správnou funkci přirozené i získané imunity (Wong et al., 2007). Deficit zinku je zodpovědný za poruchy T a B maturace, které vedou k lymfopénii. Metalothionein 3 (také nazývaný neuronální růstový faktor) se nachází v mozku, je také přítomen v pankreatu a v tenkém střevu. Metalothionein 3 je syntetizován primárně v astrocytech kůry,

mozkovém kmeni a míše (Choudhuri et al., 1995). Jeho hlavní funkcí je inhibice růstového faktoru v mozku (Faller et al., 2010). V experimentální práci na myších modelech prokázali, že MT1 a MT2 hrají důležitou roli u patologických stavů CNS. Jejich exprese se signifikantně zvyšuje v reaktivních astrocytech, mikroglíích, makrofázích po traumatickém zranění mozku. Tato neuroprotektivní funkce metalothioneinů je navíc zvyšována působením prozánětlivého cytosinu IL-6. Dále hlavní izoformy MT1 a MT2 stimulují astroglíósu, expresi růstových faktorů a jejich receptorů, ovlivňují neurotrofiny (TGF beta, bFGF, VEGF, NT-3,4,5, NGF). Metalothionein 1 má nejvyšší efekt na angiogenezi. Z uvedených experimentálních výsledků vyplývá, že MT1 a MT2 nejen snižují autoimunitní a zánětlivé poškození CNS, ale mají i neuroprotektivní efekt během ischemie a poškození motorických neuronů (Penkowa et al., 2006).

Metalothionein 4 byl detekován v epitelálních buňkách kůže, jazyku a žaludku. Účastní se regulace tvorby pH žaludeční kyseliny, rozlišení chutě jazykem a významný je jeho protektivní účinek na kůži poškozenou UV zářením (Namdarghanbari et al., 2011, Sutherland et al., 2011).

Metalothioneiny reagují také na vyplavení nebo aplikaci některých hormonů, cytokinů a jiných biologicky aktivních látek například glukokortikoidů, IL1 a IL6, INF alfa, TNF alfa a vitamínu D (Abdel-Mageed et al., 1998). Působí také chemotakticky na zánětlivé buňky a ovlivňují angiogenezi (Miyahita et al., 2005). Metalothioneiny se uvolňují i extracelulárně, kde mají imunomodulační efekt, tento proces však ještě není plně objasněn (Eckschlager et al., 2009). Díky ovlivnění hladiny zinku mají metalothioneiny schopnost regulovat syntézu apoenzymů a řady transkripčních faktorů (Eckschlager et al., 2009). Významné je zapojení metalothioneinů do karcinogeneze, což prokazuje celá řada experimentálních a klinických studií. Vlivu metalothioneinů na průběh a chování nádorového onemocnění a vzniku rezistence k chemoterapii a radioterapii budou věnovány další kapitoly. Metalothioneiny významnou měrou ovlivňují oxidativní stres organismu. Mezi prokázané antioxidanty patří enzymy, proteiny a nízkomolekulární látky bilirubin, tokoferol, karotenoidy, ubiquinol, askorbát, glutathion, cystein a urát (Hirokazu et al., 2007). Metalothioneiny se uplatňují v prevenci oxidativního stresu několika způsoby. Mají nízký redoxní potenciál, a proto mohou být oxidovány buněčnými oxidanty (Bell et al., 2009). Metalothioneiny stabilizují lysozomy a snižují apoptózu způsobenou oxidativním

stresem (Baird et al., 2006). V oxidativním stresu je důležitá tzv. Fentonova reakce, při které jsou uvolňovány vodíkové radikály z peroxidu vodíku a dalších reaktivních kyslíkových radikálů. Měď a železo přímo katalyzují uvolnění vodíkových radikálů Fentonovou reakcí a právě tyto radikály mohou blokovat komplex metalothioneinů se zinkem (Formigari et al., 2007). Vztahu metalothioneinů a oxidativnímu stresu v souvislosti s nádorovým bujením bude věnována další kapitola. V literatuře existuje mnoho experimentálních studií, které se snaží objasnit další funkce metalothioneinů. Z výsledků těchto experimentálních prací vyplývá, že metalothioneiny mohou být exportovány a vychytávány buňkami díky mechanismům zprostředkovaným receptory (Maret et al., 2010). Vysoké hladiny metalothioneinů byly detekovány u myši v pankreatické šťávě stimulované pilokarpinem (DeLisle et al., 1996). U krys se zvyšovala žlučová sekrece po dietě obsahující hodně mědi (Evering et al., 1991). V in vitro studiích byly metalothioneiny uvolněny po indukci diferenciaci fibroblastických preadipocytů do adipocytů (Trayhurn et al., 2000). Metalothioneiny byly také detekovány v seminální plasmě sekretované prostatou (Suzuki et al., 1994). Z uvedeného vyplývá, že metalothioneiny jsou významné pro celou řadu důležitých biologických procesů, nicméně mnoho jejich funkcí a biologický význam jejich jednotlivých izoform musí být dále ještě zkoumány.

1.4 Metalothioneiny a karcinogeneze

Rozdíly v expresi metalothioneinů přispívají k charakteristickým vlastnostem nádorových buněk, jako jsou zvýšená proliferace, změny metabolismu, metastázování a rezistence k apoptóze (Pedersen et al., 2009, Krizkova et al., 2010, příloha 5). Pro karcinogenezi je důležitý protein p53, který může být ovlivňován nejen díky vztahu mezi zinkem a p53, ale i přímou vazbou p53 na metalothioneiny. Základní funkce p53 jsou kontrolovat buněčný cyklus, indukovat apoptózu a působit jako tumor supresor. Metalothioneiny ovšem vazbou s p53 v určitých nádorech blokují apoptózu a tím ovlivňují progresi tumoru. Ostrakowitch et al., 2006 prokázala komplex metalothioneinů a p53 v epiteliálních buňkách nádoru prsu, a díky tomuto nálezů autoři předpokládají, že právě tento komplex reguluje apoptózu nádorových buněk. Metalothioneiny jsou nezbytné pro funkci i dalších proteinů zapojených do karcinogeneze například NF-kappa B, PKC α , GTPase, Rab 3A a dalších. Mají také proangiogenní efekt (Eckschlager et al., 2009, Takahashi et al., 2012) a

pravděpodobně se podílí i na posunu nádorů do více invazivních stupňů - zvyšují grade jednotlivých nádorů. (Hiura et al., 1998, Formigari et al., 2007). Vzestup cytoplazmatické i nukleární exprese metalothioneinů hraje důležitou roli ve vzniku metastatické diseminace karcinomů dutiny ústní (Szelachowska et al., 2009). Transkripční faktor – hypoxií indukovaný faktor 1 (HIF-1) je odpovědný za regulaci genů nádorového růstu, angiogeneze a metastázování. Ve Schmitzově studii (Schmitz et al., 2009) porovnávali vztah exprese HIF-1alfa a metalothioneinů s progresí kolorektální karcinomu. Autoři prokázali, že hladina HIF-1alfa statisticky signifikantně koreluje s hladinou metalothioneinů v buňce a předpokládají tedy, že metalothioneiny jsou proto zapojeny do komplexu biologických pochodů indukovaných hypoxií v lidských nádorových tkáních. Aktivace metalothioneinů může hrát důležitou roli v přeměně potenciálně maligních lézí do časných stádií karcinomů (Pontes et al., 2009). Metalothionein 2 zvyšuje tvorbu matrixové metaloproteinázy 9 v nádorových buňkách a tím zvyšuje jejich invazivitu a podporuje metastázování (Raduenská et al., 2012). Úzký vztah metalothioneinů a p53 je odpovědný za agresivitu nádoru dutiny ústní (Cardoso et al., 2009). Expozice kadmíem, má jasný karcinogenní potenciál u lidí i u hlodavců (Filipič et al., 2012). Hlavním zdrojem kadmia v populaci je pravděpodobně cigaretový kouř. V experimentální práci (Rachel et al., 2013) sledovali vztah mezi kadmíem a vlastnostmi epitelálních plicních buněčných linií. Při zvýšené koncentraci kadmia byly v těchto buňkách zvýšené hodnoty hlavních izoform metalothioneinů MT1A a MT2A. Autoři prokázali, že expozice kadmíem vede ke vzniku charakteristických vlastností nádorových buněk. V experimentální práci (Cernei et al., 2013, příloha 2) jsme sledovali vztah sarcosinu v kultivačním mediu, hladin metalothioneinů (stanovených elektrochemicky, tedy stejnou metodou jako v naší klinické studii) u nádorových buněk karcinomu prostaty. Sarcosin je další nově diskutovaný nádorový marker karcinomu prostaty, který ovlivňuje metabolismus aminokyselin a proces metylace, který vzniká během progresu karcinomu prostaty. Tato práce prokázala statisticky signifikantní pozitivní korelaci mezi hladinou sarcosinu a hladinou metalothioneinů stanovenou kapilární elektroforézou a Brdičkovou reakcí, což potvrzuje předpoklad, že sarcosin a metalothioneiny se zapojují do karcinogeneze nádorů prostaty. Bylo publikováno, že exprese metalothioneinu 3 může mít vliv na patogenesi nemalobuněčného karcinomu plic (Weryska B et al., 2013). Samotný nádor stimuluje a remodeluje svoje mikroprostředí, což podporuje jeho růst a indukuje angiogenezi. Nádor mění

extracelulární matrix a funkci existujících buněk a tím ovlivňuje imunitní systém. Například protein RCAS1 je odpovědný za únik nádoru z imunologického dohledu organismu a remodelaci mikroprostředí, stejně tak mohou působit i metalothioneiny (Dutsch-Wicherek et al., 2010).

Na druhou stranu je nutné zmínit, že metalothioneiny naopak redukuje chemickou karcinogenezi indukovanou benzo(a)-pyrenem (B(a)P), který se vyskytuje v kontaminovaném životním prostředí. Metalothionein působí jako protektivní endogenní ochranný faktor proti poškození DNA účinkem B(a)P (Takaishi et al., 2009). V další studii (Kanda et al., 2009) prokázali, že metalothioneiny stanovené metodou RT PCR v hepatocelulárním karcinomu působí jako tumor supresorové geny, které ovlivňují hypermethylyaci. V literatuře je však převaha prací, které potvrzují zejména kancerogenní působení metalothioneinů a nikoliv antikancerogenní.

1.5 Metalothionein - prognostický marker u zhoubných nádorů

V současné době je již publikován velký počet studií zabývajících se souvislostí exprese metalothioneinů v buňkách různých typů nádorů a průběhem nádorového onemocnění. Ovšem využití metalothioneinů jako potenciálního diagnostického nebo prognostického znaku či nádorového markeru zůstává stále kontraverzní (Tcheocharis et al., 2002). Tyto studie se zabývají především vztahem mezi metalothioneiny a nádory dospělého věku (Hua et al., 2008). Většina těchto prací stanovovala přítomnost metalothioneinů imunohistochemicky v parafinových vzorcích v tkáních různých tumorů a prokázala u řady z nich pozitivní korelaci mezi zvýšenou expresí metalothioneinů a progresí nádorového onemocnění a/nebo kratším přežitím pacientů. Ve své studii Hua a kolektiv (Hua et al., 2008) potvrdili vztah mezi sníženou expresí MT1 a MT2 a progresí karcinomu prostaty. Multivariantní analýza prognostických faktorů melanomu (tloušťka nádoru, Clarkova klasifikace, ulcerace, pohlaví a lokalizace) prokázala, že zvýšená exprese metalothioneinů je signifikantní další nezávislý prognostický marker melanomu (Eckschlager et al., 2009). I další studie u 1270 pacientů s melanomem prokázala, že imunohistochemicky prokázaná overexprese metalothioneinů v nádorových buňkách primárního melanomu je vysoce významně asociována s vysokým rizikem progresu a nižší dobou přežití (Weinlich et al., 2006). V své práci Ioachim a kolektiv (Ioachim et al., 2000) prokázali, že zvýšená

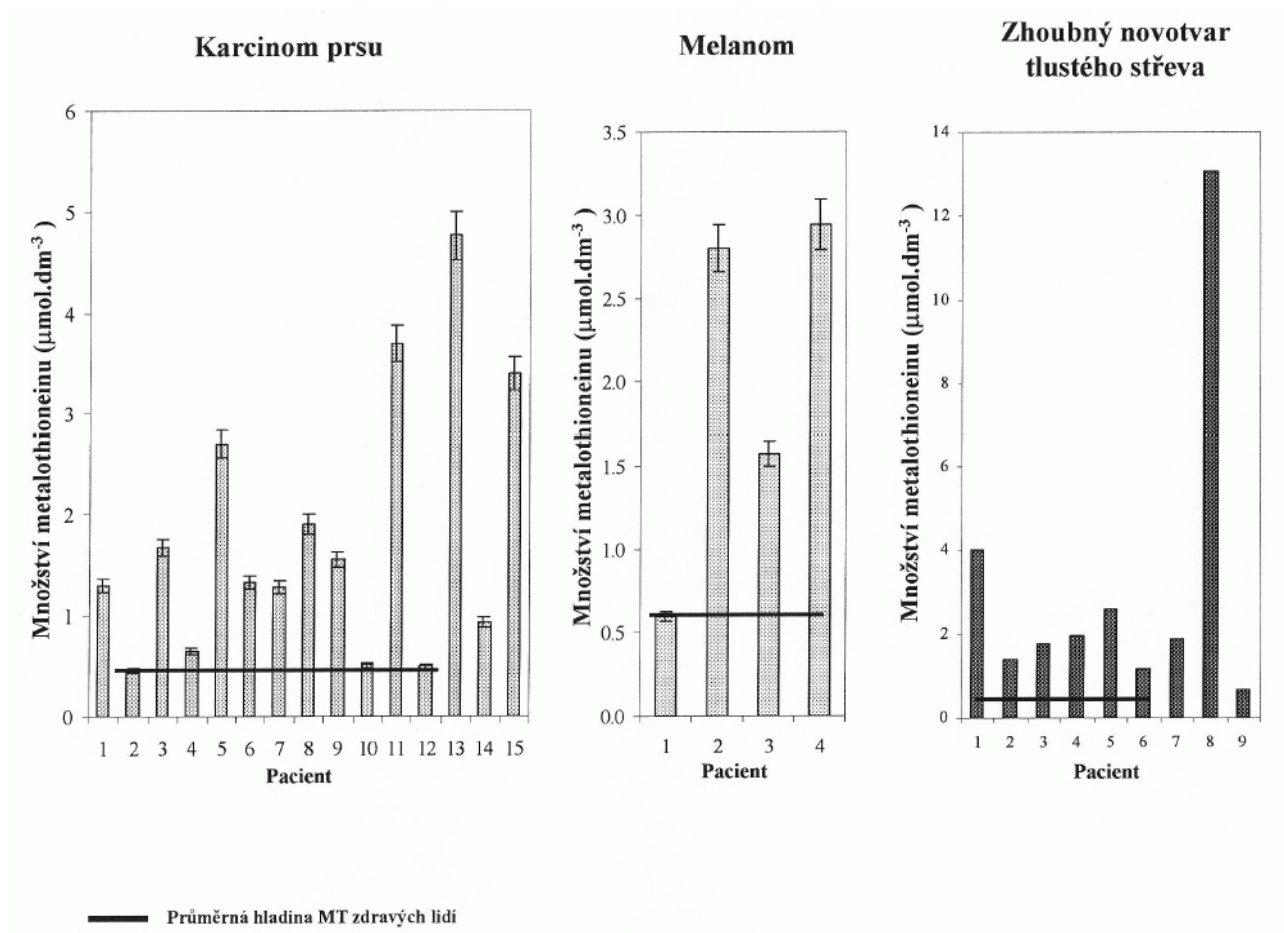
exprese metalothioneinů v močovém měchýři koreluje s agresivním chováním nádoru. Ve studii (Janssen et al., 2002) byla exprese metalothioneinů u kolorektálního karcinomu asociována s vysokým rizikem postižení lymfatických uzlin a kratším celkovým přežitím pacienta. Bay a kolektiv (Bay et al., 2006) prokázali, že vysoká exprese metalothioneinů u nádoru prsu je známkou špatné prognózy. U nádorů ovárií, kdy často může nastat diagnostický problém jako rozlišit benigní, borderline (hraniční) a maligní nádory, prokázala studie (McCluggage et al., 2002), že právě úroveň exprese metalothioneinů může pomoci v tomto rozhodování. Ve studii (Dziegel et al., 2005) měli pacienti s vysokou expresí metalothioneinů u maligního fibrózního histiocytomu, liposarkomu a synovialosarkomu kratší celkovou dobu přežití. Při hodnocení prognostického vztahu metalothioneinů k nádorovému onemocnění je třeba zohlednit i hormonální regulaci nádorového onemocnění. Jak jsem již uvedla, hladiny metalothioneinů jsou ovlivňovány i působením celé řady různých hormonů. Ve studii (Adam et al., 2008) měřili hodnoty metalothioneinů v séru modifikovanou Brdičkovou reakci a zjistili, že buňky nádorů prsu měly hodnotu nižší ve srovnání s ostatními na hormonech nezávislými nádory. Stejný výsledek měla i práce El-Sharkawy et al. 2008, kde prokázali signifikantní inverzní korelaci mezi metalothioneiny a overexpresí estrogenových receptorů u nádorů prsu.

Existují i jiné studie, které u výše zmíněných i dalších nádorových onemocnění tento prognostický význam exprese metalothioneinů naopak nepotvrdily (Jasani et al., 1997, Eckschlager et al., 2009). Práce Ofnera a kolektivu (Ofner et al., 1994) nenašla korelaci mezi expresí metalothioneinů a prognózou kolorektálního karcinomu. Ve Smithově studii (Smith et al., 2005) nebyla prokázána souvislost mezi sníženou expresí MT3 a přežitím pacienta nebo jiným prognostickým znakem. Další multivariatní studie u nádorů prsu také nepotvrdila souvislost mezi expresí metalothioneinů jak na úrovni mRNA tak ani na úrovni proteinů a horší prognózou, vzhledem k silné asociaci metalothioneinů s dalšími faktory negativně ovlivňující prognózu tohoto onemocnění (Jin et al., 2004).

Výše zmíněné práce používají ke stanovení hladiny metalothioneinů v nádorových buňkách řadu různých diagnostických postupů. Nejčastěji byla prokazována exprese metalothioneinů v nádorových tkáních imunohistochemicky. V pilotní studii Petrlové a kolektivu (Petrlová et al., 2006) byla metodou elektrochemického stanovení metalothioneinů v séru vyšetřena skupina dospělých pacientů s onkologickými

diagnózami. V této studii autoři porovnávali sérum dospělých pacientů s melanomem, chronickou lymfatickou leukémií, nádorem prsu, kolorektálním karcinomem a karcinomem ledviny se sérum zdravých dobrovolníků. Hladiny sérových metalothioneinů byly u většiny onkologických pacientů statisticky signifikantně vyšší viz obrázek 5. V naší práci jsme stejnou metodou zjišťovali, zda tento statisticky významný prognostický marker můžeme využít i u různých histologických typů dětských nádorů.

Obrázek 5: Hladiny metalothioneinů a nádorové diagnózy- převzato z (Petrlová et al., 2006).



V obecné rovině je nutné připomenout, že právě nalezení nejen prognostického markeru, ale potenciálně i nového nádorového markeru by mohlo být dalším významným přínosem v léčbě onkologických onemocnění. Na základě analýzy WHO jsou nádorová onemocnění druhou hlavní příčinou úmrtí jak v evropském měřítku, tak

i v České republice. Jejich počet má přes všechny snahy o prevenci stále vzrůstající tendenci. Podle studií WHO lze očekávat, že v nejbližších letech bude ve vyspělých zemích postižen tímto onemocněním během svého života každý třetí občan. V České republice je každoročně odhaleno téměř 60.000 nových případů nádorových onemocnění. Zhoubné novotvary jsou v ČR příčinou úmrtí přibližně 28.000 osob ročně (tedy cca 25% všech úmrtí). Celkem u nás žije téměř 285 tisíc osob, u kterých byl novotvar zjištěn. U dětí jsou nádorová onemocnění také druhou nejčastější příčinou smrti po úrazech. Více než sto nových dětských pacientů s nádorovým onemocněním na milion dětí je ročně hlášeno v České republice. Podle evropských statistik se v současné době daří vyléčit přibližně 45% všech dospělých pacientů. U dětí je celkové přežití příznivější - více než 79%. Jedním z klíčových faktorů zlepšení prognózy pacientů je časná diagnostika onkologického onemocnění. U některých dospělých nádorů máme již specifické nádorové markery (AFP, CA 125, CA 153, CEA, PSA a další), které pomohou odhalit recidivu nebo vznik nového onemocnění ještě před vzplanutím klinických projevů nebo objevením nálezu na zobrazovacích metodách. Tyto nádorové markery jsou produkovány maligními buňkami nebo samotným organismem jako odpověď na průběh nádorového onemocnění. Nádorový marker je definován jako substance, jejíž hladina může být stanovena v krvi, moči nebo ve tkáni a která je ovlivňována samotným karcinogením procesem. Ideální marker by měl splňovat následující požadavky: snadná detekce, dostupnost pro celou populaci bez limitace věku a pohlaví, vysoká závislost na stádiu onemocnění a vysoká specifita rozlišení mezi pacienty s onkologickou diagnózou, nemocnými s nenádorovou diagnózou nebo zdravými lidmi (Křížková et al., 2010, příloha 5). Bohužel řada nádorových markerů je zvýšená až při pokročilém stádiu onemocnění. I přes velké množství studií zabývajících se prognostickým významem metalothioneinů u řady nádorových onemocnění, v literatuře bohužel nejsou dosud žádné informace, o tom, že by hladina metalothioneinů mohla mít u některé nádorové diagnózy stejnou výpovědní hodnotu jako ostatní standardní nádorové markery.

1.6 Metalothioneiny a chemorezistence

Rezistence nádorových buněk k léčbě cytostatiky je způsobena řadou mechanismů, které se často kombinují. K nejčastějším z nich patří redukovaný vstup cytostatika do buňky, jejich zvýšený eflux z buňky, zvýšená oprava DNA, která podmiňuje zvýšenou

toleranci DNA k poškození, defekty v apoptotických drahách, zvýšené odbourávání cytostatika a také zvýšená hladina intracelulárních thiolů glutathionu a metalothioneinu, které mohou některá cytostatika vyvazovat (Eckschlager et al., 2009). Již před 20 lety bylo popsáno, že vysoká koncentrace thiolových skupin v cytoplasmě je schopna vázat platinové alkylační deriváty. Chemorezistence na tyto deriváty je způsobena přenosem platiny z cisplatinu a karboplatiny na metalothioneiny, které způsobují jejich inaktivaci (Andrews et al., 1987). V buněčných liniích neuroblastomových buněk rezistentních k cisplatině kultivovaných v médiích, která obsahovala vysokou koncentraci cisplatinu a karboplatiny byla signifikantně zvýšená hodnota metalothioneinů ve srovnání s buněčnou linií senzitivní na platinové deriváty kultivovanou ve stejném prostředí (Eckschlager et al., nepublikovaná data). Neindukovaná forma MT3 je hlavně exprimována v mozku, ale je zvýšeně exprimována i v řadě nádorových tkání a může se rovněž podílet na vzniku chemorezistence. Studie Karotkiho (Karotki et al., 2009) prokázala, že transplatina reaguje rychleji s cysteinovými ligandy Zn7MT3 než cisplatina. Rychlost reakce cisplatinu a transplatinu se Zn7MT3 byla rychlejší než jejich reakce se Zn7MT2. Další studie potvrdila, že buňky karcinomu ovária rezistentní na cisplatinu mají zvýšenou hladinu jaderného metalothioneinu (Surowiak et al., 2007). Také u pacientů s hepatoblastomem léčených karboplatinou, bylo zjištěno, že pacienti nereagující na léčbu měli vyšší procento buněk exprimujících metalothioneiny (Endo et al., 2004). V další práci Suganuma a kolektiv (Suganuma et al., 2003) prokázali signifikantně vyšší množství metalothioneinů v buňkách karcinomu žaludku rezistentních k léčbě cisplatinou. Endo-Munoz s kolektivem (Endo- Munoz et al., 2010), který ve své studii zjišťoval vliv metalothioneinů na vznik chemorezistence buněk nádoru žaludku během perfúzní cytostatické léčby cisplatinou, nepotvrdil vztah exprese metalothioneinů k rezistenci k platinovým derivátům. Interakce metalothioneinů s cytostatiky není omezená jen na kovalentní vazby (Doz et al., 1993). Metalothioneny například ovlivňují i antineoplastickou aktivitu galia. Autoři další práce prokázali, že indukce tvorby metalothioneinů zinkem má protektivní účinek na cytotoxický efekt galia u buněčných linií lymfomů (Yang et al., 2007).

Byla prokázána i účast metalothioneinů na rezistenci k některým cytostatikům neobsahujících platinu. Bacolod et al., 2009 zjistil, že vazba 1,3-bis(2-chloroethyl)1-nitrosourey (BCNU) na metalothioneiny přispívá k rezistenci k tomuto protinádorovému léku u buněčných linií meduloblastomu. Tento autor prokázal

obdobný efekt i u buněčných linií rhabdomyosarkomu (Bacolod et al., 2002). Ezofageální karcinomy, které neexprimují metalothioneiny, odpovídají lépe na chemoradioterapii (5-fluorouracil a cisplatinu) než karcinomy s vysokou expresí metalothioneinů (Sunada et al., 2005).

Existují i další studie, které prokázaly vliv metalothioneinu na chemorezistenci i u cytostatik, která neobsahují kov. Shimoda et al., 2003 prokázal sníženou apoptózu indukovanou etoposidem u linií karcinomu plic a jater, u kterých byla zvýšená exprese metalothioneinů. Obdobný výsledek popsal Chun s kolektivem (Chun et al., 2004), který u buněčných linií adenokarcinomu žaludku zaznamenal vyšší hladinu metalothioneinu v buňkách neodpovídajících na léčbu irinotecanem než v buňkách citlivých na tuto léčbu. Ženy s karcinomem prsu léčené chemoterapií (cyklofosfamidem, metotrexátem, 5 fluorouracilem nebo doxorubicinem) mají signifikantně delší dobu přežití, pokud nádorové buňky mají nižší expresi metalothioneinů (Yap et al., 2009). Grabellus s kolektivem (Grabellus et al., 2010) chtěli potvrdit před tím publikovaný fakt, že rezistence k melfalanu je asociována s vysokou expresí metalothioneinů. U 41 pacientů se sarkomy končetin sledovali expresi metalothioneinů po léčbě lokální hypertermickou perfusí TNF alfa a melfalanem. Prokázali pouze souvislost mezi obsahem metalothioneinů a nádorovou proliferací, ale jejich obsah v buňkách nebyl prediktivním faktorem pro terapeutickou odpověď na melfalan.

Byly již provedeny některé studie zaměřené na farmakologickou modulaci hladin metalothioneinů s cílem zvýšit jejich množství v normálních tkáních, aby se snížila jejich vnímavost k toxicitě cytostatik (Doz et al., 1993). Stanovení metalothioneinů se však zatím standardně pro predikci účinnosti cytostatik na dané nádorové onemocnění nepoužívá, neboť základní hladiny metalothioneinů v obou chemosensitivních i chemorezistentních nádorových buňkách z biopsie při stanovení diagnózy mohou být nízké a v rezistentních buňkách stoupají až při setkání s příslušným cytostatikem.

1.7 Metalothioneiny a oxidativní stres

Oxidační stres vzniká nadměrnou tvorbou reaktivních forem kyslíku a dusíku a/nebo poklesem antioxidantní obrany organismu. Volné radikály mohou modifikovat

promotorovou část DNA, která reguluje aktivitu genů – navozuje nebo potlačuje transkripci. Reakcí superoxidu s oxidem dusnatým vznikající peroxinitril nitruje bílkoviny, volné radikály působí lipoperoxidaci, při které vznikají kancerogenní aldehydy, vysoká koncentrace radikálu oxidu dusnatého zrychluje tumorigenezi.

Stanovení oxidačního stresu nemá sice pro diagnózu nádorového bujení význam, protože pozitivní nález je nacházen u mnoha nemocí, ale je důležité o něm vědět vzhledem k možnosti iniciace zhoubného nádoru (Holeček et al., 2010). Chemoterapie i radioterapie redukuje hladinu antioxidantů v séru a tím zvyšují hladinu oxidačního stresu. Nejen samotná onkologická léčba, ale i řada léků užívaných k podpůrné nebo symptomatické léčbě nádorů například analgetika, imunosupresiva nebo některá antibiotika zvyšují také oxidační stres (Tsukahara et al., 2007). Nádorové buňky akumulují velké množství antioxidantů, neboť jim chybí kontrolní mechanismus pro udržení homeostázy. Role antioxidantů v terapii u onkologických pacientů zůstává stále kontraverzní téma. Některé studie u dospělých pacientů popisují po preventivním podání antioxidantů zlepšení doby přežití, zlepšení odpovědi na protinádorovou léčbu a snížení toxických komplikací ve srovnání s kontrolami bez podání antioxidantů, ovšem tyto studie jsou často limitovány nižší statistickou významností. Všeobecně jsou známé studie s vitamínem C, který se často podává na zvýšení antioxidantní obrany. Vitamin C podporuje tvorbu kolagenu tak zvané „vytváření zdi okolo nádoru“ a inhibuje hyaluronidázu, která podporuje šíření nádorů a vznik metastáz. Hladiny vitamínu C bývají u většiny pacientů s nádory sníženy. Na základě recentního výzkumu (Cullen et al., 2013), který ve studii fáze 1 prokázal u dospělých onkologických pacientů, že aplikace vitamínu C snižuje nežádoucí účinky chemoradioterapie a zvyšuje kvalitu života, je v současné době podávání vitamínu C v nádorové léčbě doporučeno i Českou onkologickou společností. V literatuře byl popsán nižší výskyt karcinomu prostaty u pacientů s vysokou hladinou selenu v séru (Combs et al., 2004). Na základě těchto výsledků v současné době (2001–2013) probíhá velká epidemiologická studie v USA – SELECT – na více než 32 000 mužů zaměřená na posouzení vlivu selenu a vitamínu E na incidenci karcinomu prostaty. Selen vázaný na bílkoviny není ihned k dispozici pro periferní buňky, např. prostaty. Navíc metylselenidy jsou rychle vylučovány z těla. Ke snížení rizika karcinomu jsou proto vyžadovány dávky selenu vyšší než jsou přítomny v obvyklé stravě. Hladina selenu by měla být 1,58 $\mu\text{mol/l}$ v krvi nebo 1,23 $\mu\text{mol/l}$ v plasmě (Combs et al., 2004).

V současné době je ovšem stále velmi obtížné přímé měření markerů reaktivních kyslíkových radikálů a oxidativního stresu díky jejich velké nestabilitě a reakcí s mnoha dalšími molekulami. K odhadu měření oxidativního stresu se používají různé degradační biomolekuly (Liu et al., 2012). Ve většině studií se k měření oxidativního stresu používá sérum, plasma, erytrocyty, granulocyty, lymfocyty nebo moč, jsou i studie, ve kterých biomarkery oxidativního stresu měřili v jiných biologických materiálech např. v mozkomíšním moku, bronchoalveolární laváži, v tekutině středního ucha a v některých dalších (Tsukahara et al., 2007). Ve většině případů byla prováděna analýza redukovaného a oxidovaného glutathionu, glutathion peroxidázy, glutathion reductázy, selenu a vitamínů či provitaminů například tokoferolu a karotenu. Bylo zjištěno, že i za normálních fyziologických podmínek jsou děti vystaveny vyššímu oxidativnímu stresu než starší lidé. V naší další studii (Pohanka et al., 2012 -příloha 6) jsme měřili přítomnost LMWA (nízkomolekulárních antioxidantů) u dětí ze stejného séra, které jsme používali i pro měření metalothioneinů. V této studii jsme použili vzorky od 48 pacientů s meduloblastomem, glioblastomem, neuroblastomem a astrocytomem a analyzovali jsme hladinu redukované (GSH) a oxidované formy (GSSG) glutathionu pomocí square wave voltametrie. Nejvyšší korelační koeficient jsme prokázali u pacientů s meduloblastomem. V této práci jsme ověřili, že uvedená metoda je vhodná k měření nízkomolekulárních antioxidantů u dětských onkologických pacientů. Na základě těchto výsledků předpokládáme, že v budoucnu by toto měření mohlo přispět i k rozlišení jednotlivých typů nádorových onemocnění.

1.8 Metalothioneiny u dětí

Práci zabývající se významem metalothioneinů u dětí je ve srovnání s dospělou populací velmi málo. Suzuki s kolektivem (Suzuki et al., 1994) stanovoval imunohistochemicky metalothioneiny v nezralé mozkové tkáni. Fetální mozek v 21 týdnu nevykazoval žádnou expresi, ale gliální tkáň již v 35 týdnu obsahovala metalothioneiny v detekovatelném množství. Během dalšího vývoje se postupně zvyšuje exprese metalothioneinů v bílé hmotě v různých oblastech mozku a to jak v jádrech, tak i v cytoplazmě. Předpokládá se, že metalothioneiny mají důležitý vliv na vývoj a funkci mozku. To bylo potvrzeno i v experimentální práci (Penkowa et al., 2006) viz kapitola funkce metalothioneinů. Další práce sledovala metalothioneiny u autistických dětí. Autoři zjistili, že díky nedostatku metalothioneinů tyto děti mohou

neadekvátně reagovat na přetížení kovy (Eckschlager et al., 2009). Rtuť má neurotoxické účinky, které se projevují zvláště u dětí. Ve své studii Woods a kolektiv (Woods et al., 2013) chtěli potvrdit hypotézu formulovanou na základě již prokázaného zvýšení neurotoxicity rtuti u dospělých s genetickou variabilitou metalothioneinů, která předpokládá, že stejný mechanismus by měl fungovat i u dětí. Ve studii sledovali sedm let v ročních intervalech 507 dětí (věk 8-12 let), které měly amalgámové zubní výplně obsahující rtuť. V této kohortě opakovaně hodnotili neurobehaviorální jednání dětí a přítomnost rtuti v moči. U 330 dětí sledovali varianty genotypu isoform metalothioneinů MT1M (rs2270837) a MT2A (rs10636). U dívek prokázali pouze málo signifikantních interakcí mezi expozicí rtuti a variantami metalothioneinů, ale našli velmi mnoho signifikantních vztahů mezi neurobehaviorálním chováním, hladinou rtuti a variantami MT1M a MT2A u chlapců. Vzhledem k tomu, že hodnota rtuti v moči představuje komplexní odraz celkové expozice rtuti nelze tuto hodnotu vztahovat pouze k dentálním amalgámovým výplním.

Jak jsem již zmínila, jedna z důležitých rolí metalothioneinů je jejich role v obranném antioxidantním systému organismu. Během zánětlivé reakce organismu neutrofilů a endoteliální buňky uvolňují volné kyslíkové radikály, které poškozují tkáně a mohou vyústit až v multiorganové selhání. Chuang s kolektivem (Chuang et al., 2006) prokázal, že děti s těžkým průběhem septického šoku měly nižší hladiny sérových metalothioneinů a v důsledku toho i sníženou antioxidantní kapacitu. Ve skupině dětí s nižší hodnotou metalothioneinů, byl také vyšší počet pacientů, kteří na septický šok zemřeli. Během septického šoku je také snížena exprese řady genů, které jsou spojeny s metabolismem kovů. Wong s kolektivem (Wong et al., 2007) měl ve své práci týkající se průběhu septického šoku u dětí, rozdílné výsledky proti předcházející studii, neboť zjistil, že právě u pacientů s těžkým průběhem septického šoku je zvýšená hladina metalothioneinů a nižší hladina zinku. Mladý rychle rostoucí organismus má vyšší metabolický obrat a předpokládá se, že díky těmto procesům jsou děti i za fyziologických okolností vystaveni vyšším koncentracím ROS (Hirokazu et al., 2007). Nejen septický šok, ale i řada dalších pediatrických onemocnění má souvislost s nerovnováhou mezi ROS a oxidativním stresem. Vzhledem k tomu, že metalothioneiny jsou důležité antioxidanty, které se do antioxidantních procesů zapojují mnoha způsoby, předpokládáme souvislost metalothioneinů i s řadou dalších pediatrických onemocnění, kde ovšem jejich význam nebyl ještě studován. Na rozdíl

od dospělých je u dětí v literatuře také velmi málo údajů o vlivu metalothioneinů na průběh nádorového onemocnění. Exprese metalothioneinů v nádoru prokazovaná imunohistochemicky byla snižena u 80% dětských pacientů s relapsem ependymomu (Peyre et al., 2010). V další studii prokázali metalothioneiny v bioptických vzorcích osteosarkomu a předpokládali, že hrají úlohu ve vývoji tohoto onemocnění specifického pro starší děti a dospívající (Endo- Munoz et al., 2010). Děti s akutní lymfoblastickou leukémií a s pozitivní expresí metalothioneinů v nádorových blastech prokázanou imunocytochemicky měly tendenci k horšímu celkovému přežití ve srovnání se skupinou s negativními blasty. Také relabující pacienti s ALL pokud byli pozitivní na metalothioneiny měli horší celkové přežití než pacienti, jejichž blasty byly negativní. Rozdíly mezi těmito skupinami však nebyly statisticky významné (Sauerbrey et al., 1994). V další práci sledovali vliv Bcl-2, Tp53, p21Waf1/Cip 1 a metalothioneinů na diferenciaci neuroblastomu a jeho odpověď na léčbu, z těchto faktorů pouze nukleární Tp53 měl souvislost s pacientovou prognózou. U této diagnózy metalothioneiny neměly vypovídající hodnotu (Bohórquez et al., 2008).

2. Cíle

Z výše uvedeného vyplývá, že metalothioneiny jsou v lidském organismu zapojeny do celé řady procesů a vzájemně se ovlivňují. Předpokládali jsme, že měření jejich hodnot v séru dětských pacientů v průběhu onkologické léčby může být přínosné z několika aspektů.

Metalothionein nový nádorový marker u dětí?

Vzhledem k významnému zlepšení léčebných modalit – intenzifikaci chemoterapie, zdokonalené radioterapii a cílené, tak zvané biologické léčbě se přežití onkologických pacientů během posledních let významně zlepšilo. Pětileté přežití bez známek onemocnění u dětských onkologických pacientů ve světě i na našem pracovišti je 79%. Pro další zlepšení prognózy nádorů je nezbytná jejich včasná diagnostika. U dětských solidních nádorů nemáme žádný další specifický nádorový marker kromě metabolitů katecholaminů v moči u neuroblastomu, AFP, HCG, beta HCG u germinálních nádorů a AFP u hepatoblastomu. Vzhledem k prokázanému vztahu metalothioneinů a karcinogeneze a také díky jejich prognostickému významu u řady onkologických diagnóz, který jsme popsali výše, jsme předpokládali, že metalothionein v séru by mohl být nový potenciální nádorový marker dětských onkologických onemocnění. Tento marker by také mohl být využitelný nejen k časné diagnostice nádorů dětského věku, ale zvláště k monitorování jejich průběhu, aktivity a rozsahu nádorového onemocnění a eventuálně i k včasnému zachytu pozdních recidiv a relapsů. Rozsáhlé studie by si vyžádaly zařazení sérových hladin tohoto proteinu do skríningu nádorů u dospělých a/nebo u dětí.

Metalothionein a chemorezistence u dětských nádorových onemocnění?

V předcházejících experimentálních studiích na buněčných liniích odvozených od dětského nádoru neuroblastomu prováděných na našem pracovišti, byl již prokázán vztah metalothioneinů ke vzniku chemorezistence k platinovým derivátům. Chtěli jsme tento výsledek ověřit i v klinické studii a prokázat souvislost zvýšené sérové hladiny metalothioneinů po podání cisplatin s možným rizikem menší odpovědi na léčbu, kterou jsme chtěli hodnotit zobrazovacími metodami a podle nálezu posuzovat

možné vyšší riziko časných relapsů díky menší účinnosti chemoterapie. Vzhledem k tomu, že u dospělých pacientů byl popsán vztah mezi zvýšenou hladinou metalothioneinů v nádorových buňkách a vznikem chemorezistence i k některým cytostatikům neobsahujícím kovy, sledovali jsme i pacienty léčené protokoly bez platinových derivátů.

Metalothionein a další biomarkery v onkologické léčbě?

Jak jsme již uvedli, hodnoty metalothioneinů různou měrou ovlivňují nejen aktivitu samotného nádorového onemocnění, ale i multimodální protinádorovou léčbu cytostatiky a radioterapií. Hodnoty metalothioneinů se také mohou měnit po podání kortikoidů, které jsou často nezbytnou součástí podpůrné léčby řady nežádoucích účinků protinádorové léčby, nebo mohou být ovlivněny i aplikací antibiotik, některých dalších léků a krevních derivátů. Naším dalším cílem bylo zhodnocení hladiny metalothioneinů a klinického stavu pacienta. Sledovali jsme souvislost mezi hladinou metalothioneinů s dalšími, již standardně zavedenými markery jako jsou C-reaktivní protein (CRP), hemoglobin, absolutní počet lymfocytů, kreatinin. Vzhledem k tomu, že u několika studií na dětech, byl prokázán růst sérových hladin metalothioneinů s věkem, sledovali jsme i tuto závislost.

Tímto komplexním hodnocením jsme chtěli zjistit, které hodnoty jsou prediktivní pro nádorovou progresi a chemorezistenci, a které jsou pouze reakcí na komplexní onkologickou léčbu a s ní spojené možné komplikace.

Naší prací jsme chtěli rozšířit léčebně preventivní postupy u dětských onkologických pacientů. Cílem bylo zjistit, zda sérové metalothioneiny nemohou být v pediatrické onkologii využity:

- 1/ jako nádorový marker umožňující monitorovat průběh některých nádorů dětského věku;
- 2/ prognostický faktor některých nádorů dětského věku;
- 3/ faktor umožňující predikci rezistence k některým cytostatikům zvláště platinovým.

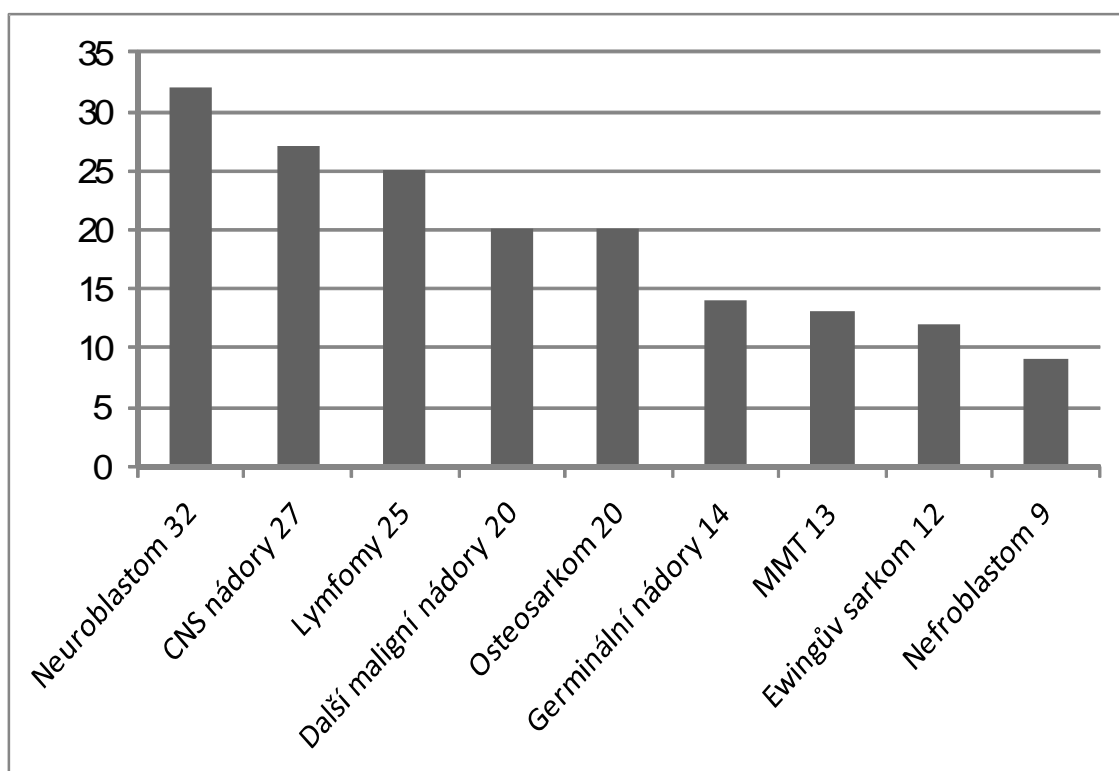
3. Metody a soubor pacientů

V období let 2008-2012 jsme vyšetřili hladiny sérových metalothioneinů v 865 vzorcích séra získaných od 172 pacientů (71 dívek a 101 chlapců) se solidními nádory. Medián věku v době zahájení sledování pacientů byl 9 let 10 měsíců rozsah 2 měsíce- 19 let 6 měsíců. Všichni pacienti byli léčeni na Klinice dětské hematologie a onkologie 2. Lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice v Motole. S odběrem vzorků dali rodiče informovaný souhlas a studie byla před zahájením schválena etickou komisí FNM. Klinické údaje o pacientech uvádí tabulka 3 a obrázek 6.

Tabulka 3: Charakteristika hodnocených pacientů.

Počet Pacientů	Chlapci vs.dívky	Věk median a rozmezí /roky/	Metastázy	Recidiva	Exitus
N 172	101(59%)/ 71(41%)	9,8 (0,2-19,5)	93 (54,1%)	12 (7%)	32 (18,6%)

Obrázek 6: Počty pacientů podle diagnózy.



V tabulce 4 uvádíme nejčastěji používaná cytostatika v léčebných protokolech užívaných u našich pacientů. Počet cyklů a kombinace byla dána histologickým typem nádoru a klinickým stádiem onemocnění. Dávka cytostatika byla v průběhu léčby měněna podle aktuální váhy nebo tělesného povrchu jednotlivých pacientů.

Tabulka 4: Nejčastěji podávaná cytostatika.

Nádorové diagnózy	Nejčastější cytostatika dávka cyklus v mg/m² / počet dní v cyklu
Ewingův sarkom	VCR 1,5 mg/m ² - D1, AMD 1,5 mg/m ² -D1 , DOXO 75 mg/m ² - D1-2, VP 150mg/m ² - D1-3 IFO3000 mg/m ² - D1-3
Germinální nádory	BLEO 15mg/m ² - D1, VP 100 mg/m ² -D1-5, CDDP 20mg/m ² -D1-5, VBL 0,11 mg/kg - D1, IFO 1200 mg/m ² D1-5
Hepatoblastom	CARBO 500 mg/m ² - D1, DOXO 60 mg/m ² - D1-2, CDDP 80 mg/m ² - D1
Hodgkinův lymfom	VCR 1,5 mg/m ² - D1, CYC 500 mg/m ² - D1, VP 125mg/m ² -D1-5, DOXO 40 mg/m ² - D1, DTIC 250 mg/m ² - D1
Nádory CNS	VCR 1,5 mg/m ² - D1, CCNU 75mg/m ² -D1 , CDDP 68 mg/m ² - D1, CYC 2000mg/m ² - D1
Nefroblastom	VCR 1,5 mg/m ² - D1, AMD 45 ug/kg- D1, VP 100mg/m ² -D1-3, DOXO 33 mg/m ² - D1
Neuroblastom	VCR 1,5 mg/m ² - D1, CARBO 750 mg/m ² - D1, VP 150 mg/m ² -D1-3, CDDP 80 mg/m ² - D1,CYC 2100 mg/m ² - D1
Non-Hodgkin. lymfom	VCR 1,5 mg/m ² - D1, ARA-C 150 mg/m ² -D1-2, MTX 5000 mg/m ² -D1 DOXO 25 mg/m ² - D1-D2, VP 100mg/m ² - D1-5, CYC 200mg/m ² - D1-5
Osteosarkom	DOXO 37,5 mg/m ² - D1-2, MTX 12 000 mg/m ² D1, CDDP 120 mg/m ² - D1, IFO 3000 mg/m ² D1-3,VP 100 mg/m ² D1-5
Retinoblastom	VCR 1,5 mg/m ² - D1, VP 150 mg/m ² -D1-2 , CDDP 68 mg/m ² - D1

Používaná cytostatika: AMD–aktinomycin D, BLEO–bleomycin, CARBO–karboplatina, CCNU–karmustin, CDDP–cisplatina, CYC–cyklofosamid, DOXO–doxorubicin, DTIC–dakarbazin, IFO–ifosfamid, MTX–metotrexát, VBL–vinblastin, VCR–vinkristin, VP–etoposid.

Standardní podpůrnou léčbou během chemoterapie byla antiemetika ze skupiny antagonistů 5-HT₃ receptorů tzv. setrony nejčastěji ondasetron, při silně emetogenních platinových režimech byly často přidány také kortikoidy (dexamethazon). Vzhledem k intenzivní cytostatické terapii, která způsobuje významnou hematologickou toxicitu grade III-IV jsme pacientům 24 hodin po dokončení podávali růstový faktor stimulující kolonie granulocytů (neupogen) a někteří dostávali i růstový faktor pro červené krvinky (erytropoetin). Pacienty, které jsme přijali s infekčními komplikacemi, jsme nejčastěji léčili antibiotiky – empirickou kombinací první volby byl ampicilin/sulbactam a aminoglykosid při neustupujících teplotách byla antibiotika změněna na kombinaci piperacillin/tazobactam a teicoplanin a při teplotách byla podávána antipyretika (paracetamol nebo ibuprofen). Při mukozitidě měla většina pacientů také analgetika a parenterální výživu.

Odběry krve jsme dělali v době před zahájením chemoterapie, v jejím průběhu, v průběhu infekčních či jiných komplikací protinádorové léčby a poté při pravidelných dispenzárních kontrolách pacientů po ukončení komplexní terapie. Hladinu metalothioneinů jsme porovnávali s aktuálními hodnotami krevního obrazu, urey, kreatininu, kyseliny močové, LDH, aminotransferáz (ALT, AST), celkové bílkoviny a CRP. Hodnota aktuálního krevního obrazu byla stanovena v Oddělení klinické hematologie a hodnoty dalších biochemických markerů v Ústavu lékařské chemie a klinické biochemie Fakultní nemocnice v Motole podle standardních protokolů.

Pro měření metalothioneinů jsme využili zbývající sérum po standardně prováděném biochemickém vyšetření. Toto sérum jsme během 24 hodin odseparovali a zamrazili na teplotu -70°C. Tyto vzorky byly poté na suchém ledu odeslány k dalšímu zpracování do Ústavu chemie a biochemie Mendelovy Univerzity v Brně. Na třech vzorcích krve jsme ověřili, že hladiny metalothioneinů v séru se významněji nelišily ve vzorcích, které byly zpracovány ihned po odběru nebo byly uschovány 3 dny v pokojové teplotě či v lednici. Vzorek krve dobrovolníka byl rozdělen na 3 alikvoty- jeden byl zpracován ihned, druhý byl zpracován po 3 dnech skladování v lednici a třetí po 3 dnech skladování při pokojové teplotě.

Metalothioneiny byly stanoveny modifikovanou Brdičkovou reakcí. Ze získaných vzorků bylo odebráno 10 µl a s 990 µl 0,2 M fosfátového pufru o pH 7 byl po dobu 15 minut denaturován při teplotě 99 °C v termobloku (Eppendorf, Hamburg, Německo). Takto připravené vzorky byly analyzovány upraveným postupem absorpční

přenosové techniky (AdTS) s diferenční pulzní voltametrií (DPV). Metalothioneiny byly stanovovány v 5 µl analyzovaného vzorku. Vyšetření bylo prováděno na přístroji Autolab Analyser (EceChemie, Nizozemí) ve spojení s VA-Stand 663 (Metrohm, Švýcarsko) v klasickém tříelektrodovém uspořádání. Jako pracovní elektroda byla použita visící rtuťová kapková elektroda (HMDE) s plochou kapky 0,4 mm², referenční elektroda byla Ag/AgCl/3 M KCl a jako pomocná sloužila grafitová elektroda. Základní elektrolyt (1 mmol/l Co(NH₃)₆Cl₃ a amonný pufr, (NH₃ + NH₄Cl, pH 9,6) byl po každých pěti analýzách vyměněn. Parametry AdTS DPV jsou následující: počáteční potenciál -0,70 V, konečný potenciál -1,75 V, modulační čas 0,057 s, časový interval 0,2 s, potenciálový krok 2,0 mV, modulační amplituda 250 mV, E_{ads} = 0 V, teplota 5°C. Z proměřovaných vzorků byl před měřením odstraněn kyslík probubláváním argonem nasyceným vodou po dobu 120 s. Vzorek byl na visící rtuťové kapce adsorbován po dobu 120 s.

Data byla hodnocena jako parametrická. Kolmogorov-Smirnov test byl použit pro testování normální distribuce hladin metalothioneinu a normální rozložení dat nebylo odmítnuto (K-S test, p=0,17). Statistické hodnocení a použití vhodných metod jsme konzultovali se statistikem se zkušenostmi v biomedicinském výzkumu- Mgr. M. Hladíkovou. Výsledky byly zpracovány jako průměr ± směrodatná odchylka (S.D.) pokud byla použita jiná metoda je to vysvětleno ve výsledcích. Rozdíly s p<0,05 byly považovány za statisticky signifikantní. Používané testy: pro porovnání hladin metalothioneinů mezi dvěma skupinami nepárový t-test, u párových dat párový t-test, v kalkulaci věku a pro korelaci hladin metalothioneinů s dalšími parametry Pearsonův korelační koeficient nebo test parciální korelace koeficientů s kontrolou variace věku (korelace metalothioneinů s kreatininem, protože obě hodnoty rostly s věkem pacienta) a porovnání mezi skupinami jednofaktorovou analýzou rozptylu (one-way ANOVA test) (zvláště Scheffeho testem), který jsme používali pro srovnání střední odchylky. Byl použit software IBM SPSS Statistika (Release 20,0 , IBM Corporation, Armonk, NY, USA).

4. Výsledky

4.1 Metalothioneiny a nádorové diagnózy

Průměrná hladina metalothioneinů v séru u dětí se solidními maligními nádory byla $2,67 \pm 0,5 \mu\text{M}$. Neprokázali jsme statisticky signifikantní rozdíl v hladinách mezi jednotlivými nádory viz tabulka 5.

Tabulka 5: Hladiny metalohioninenů u jednotlivých diagnóz.

Nádorové diagnózy	N	Průměr	Směrodatná odchylka	95% interval spolehlivosti průměru		Minimální hodnota	Maximální hodnota
				Od	Do		
CNS nádory	27	2,82	0,52	2,61	3,02	1,82	3,72
Ewingův sarkom	12	2,67	0,67	2,26	3,12	1,35	3,87
Germinální nádor	14	2,91	0,91	2,39	3,44	2,16	5,55
Lymfomy	25	2,64	0,45	2,43	2,79	2,02	4,28
Maligní mezenchymální nádory	13	2,55	0,38	2,32	2,78	1,72	3,15
Nefroblastom	9	2,36	0,27	2,15	2,57	1,86	2,73
Neuroblastom	32	2,53	0,39	2,39	2,67	1,96	3,78
Osteosarkom	20	2,74	0,59	2,47	3,02	1,94	3,91
Další maligní nádory	20	2,51	0,41	2,32	2,77	1,97	3,33
Celý soubor	172	2,66	0,55	2,58	2,74	1,35	5,55

Nejvyšší hladinu metalothioneinů jsme prokázali u germinálních nádorů (MT $2,92 \pm 0,9 \mu\text{M}$) a druhou nejvyšší hodnotu jsme zaznamenali u mozkových nádorů (MT $2,82 \pm 0,5 \mu\text{M}$). Tyto rozdíly ovšem nebyly statisticky signifikantní a byly pravděpodobně způsobeny věkovou distribucí. Hladiny metalothioneinů u dětí s nádory jsme srovnávali s hodnotami v séru u dospělých zdravých dobrovolníků měřenými stejnou metodou. Průměrná hladina metalothioneinů v séru této kontrolní skupiny byla $0,52 \pm 0,2 \mu\text{M}$ (Křížková et al., 2010-příloha 2). Průměrný věk kontrolní skupiny byl 27 let.

Milenerowicz et al., 2010, kteří používali metodu ELISA (enzymo imuno absorbní technika), měli prakticky stejné výsledky u zdravých dospělých dobrovolníků. Singh a Hanson (Singh, Hanson, 2006) měli ve skupině 50 zdravých dětí (věk 2-11 let) průměrnou hladinu metalothioneinů měřenou imunoesejí přibližně 2 $\mu\text{M/L}$. Poněkud vyšší hodnotu jsme naměřili Brdičkovou modifikovanou reakcí v naší kontrolní skupině dětí s renálním onemocněním, ale s normální hladinou kreatininu (MT $1,42 \pm 0,09 \mu\text{M/l}$). Pokud porovnááme hladiny metalothioneinů u dětí s nádorovým onemocněním se skupinou dospělých zdravých dobrovolníků je hodnota u nemocných dětí až pětkrát vyšší. Když srovnáme hladinu metalothioneinů u dětí s onkologickou diagnózou a u dětí s renálním postižením je tato hodnota o polovinu vyšší. Oba dva tyto rozdíly byly statisticky signifikantní (T-test, $p < 0,01$). Prokázali jsme vysoce signifikantní pozitivní korelaci mezi hladinou metalothioneinů a věkem, která byla nezávislá na typu nádorového onemocnění $p=0.009$ (F 7,05, $df=1$), parametr odhadu věku $B=0,023$ (pozitivní).

4.2 Metalothioneiny a aktivita nádorového onemocnění

Neprokázali jsme žádný rozdíl v hladinách metalothioneinů mezi pacienty s aktivním novým nádorovým onemocněním před začátkem a během léčby. Statisticky signifikantní rozdíl rovněž nebyl mezi pacienty s lokalizovaným nádorovým onemocněním a metastatickým postižením nebo nádorem progredujícím v průběhu terapie, ani mezi aktivním nádorovým onemocněním a kompletní remisí. Podrobné hodnocení uvádíme v tabulce 6. V našem souboru měli pacienti, kteří později relabovali významně nižší hladinu metalothioneinů ve srovnání s ostatními pacienty. Průměrná hladina metalothioneinů během sledování u pacientů, kteří recidivovali před zjištěním recidivy byla 2,34 μM , pacienti, kteří zůstali v dlouhodobé kompletní remisi měli hladiny 2,67 μM . Tento rozdíl byl statisticky vysoce významný ($p=0,001$). Našli jsme také signifikantní pokles hladin metalothioneinů u dětí během dispenzarizace více než dva měsíce po ukončení léčby ve srovnání s hodnotou odebrané do dvou měsíců po ukončené léčbě.

4.3 Metalothioneiny a chemoterapie

Hladina metalothioneinů u pacientů s aktivním nádorovým onemocněním léčených chemoterapií proti těm, kteří byli pouze operováni nebo záření byla významně nižší ($p=0,02$). Nebyl zde žádný statistický rozdíl mezi pacienty léčenými protokoly obsahujícím platinu a těmi, které platinové deriváty nedostávali.

Tabulka 6: Korelace aktivity nádorového onemocnění s hladinou metalothioneinů.

Metastázy	N	Průměr	Směrodatná odchylka	Střední chyba průměru	T test
Ano	93	2,62	0,48	0,05	$p= 0,63$
Ne	79	2,66	0,58	0,06	
Nádor	N	Průměr	Směrodatná odchylka	Střední chyba průměru	T test
NO+DP	72	2,55	0,54	0,06	$p=0,8$
CR	72	2,53	0,42	0,05	
Relaps	N	Průměr	Směrodatná odchylka	Střední chyba průměru	T test
Ano	160	2,67	0,54	0,04	$p=0,001$
Ne	12	2,34	0,26	0,07	

NO – nové onemocnění, DP – progrese onemocnění, CR – kompletní remise.

Tabulka 7: Srovnání hladin metalothioneinů po ukončené léčbě.

	Průměr	N	Směrodatná odchylka	Střední chyba průměru	T test
MT hladiny první odběr po léčbě	2,62	76	0,62	0,07	p=0,001
MT další sledování > 2 měsíce	2,41	76	0,62	0,07	

4.4 Metalothioneiny a vztah k dalším biochemickým parametrům

V našem souboru jsme našli významnou negativní korelaci mezi hladinou metalothioneinů a absolutním počtem lymfocytů ($p < 0,001$) a pozitivní korelaci mezi hladinami metalothioneinů a kreatininu v séru ($p = 0,003$). Hodnoty metalothioneinů u pacientů s normálními a zvýšenými hodnotami kreatininu uvádí tabulka 8.

Tabulka 8: Hodnoty metalothioneinů u pacientů s normálními a zvýšenými hodnotami kreatininu (průměr MT ze všech měření pacienta).

průměrný kreatinin nad normou	N	Průměr		Střední chyba průměru	T test p= Nepředpokládáme shodné odchyly
Ne	119	2,55		0,04	0,003
Ano	47	2,87		0,10	t=-3,75 df=61

Korelace mezi hemoglobinem a hladinami metalothioneinů nebyla statisticky signifikantní ($p = 0,085$). Neprokázali jsme žádný rozdíl v hladině metalothioneinů mezi pacienty s probíhajícím infekčním onemocněním a zvýšenou hladinou CRP ve srovnání se skupinou, kde byla hodnota CRP v normě ($p = 0,91$). Korelace s dalšími laboratorními výsledky rovněž nebyla významná. Statistické hodnocení a korelaci mezi jednotlivými laboratorními parametry uvádí tabulka 9.

Tabulka 9: Korelace metalothioneinů a dalších laboratorních nálezů.

		MT	ANL	CRP	Hgb
MT	Pearson r	1	-0,252**	0,009	0,132*
	významnost dvoustranná	-	0,001	0,912	0,085
	N	172	171	152	171
ANL	Pearson r	-0,252**	1	-0,126	-0,040
	významnost oboustranná	0,001	-	0,119	0,599
	N	171	174	154	174
CRP	Pearson r	0.009	-0.126	1	0.039
	významnost oboustranná	0.912	0.119	-	0.635
	N	152	154	154	154

ANL – absolutní počet lymfocytů, CRP – C reaktivní protein, Hgb - hemoglobin

5. Diskuze

Studium etiopatogeneze dětských nádorů je předmětem zájmu nejen onkologických výzkumných center, ale i mnoha dalších vědních oborů například preventivní medicíny, molekulární genetiky, virologie, patologie. Většina klinických i experimentálních studií vyžaduje časté odběry krve, což znamená při součtu všech výzkumných odběrů u jednoho pacienta poměrně značnou zátěž a u malých dětí to může představovat i relativně významnou krevní ztrátu. Odběr 10 ml krve u dítěte s hmotností 10 kg představuje ztrátu asi 1,5% celkového krevního objemu. V naší práci jsme proto nechtěli dětské pacienty zatížit žádnými odběry prováděnými pouze z výzkumných důvodů. Díky tomu, že metalothionein je termostabilní protein, mohli jsme pro jeho měření využít séra zbylá po rutinním biochemickém vyšetření, která by se jinak po dvou dnech automaticky zničila. Stabilitu jsme ověřili na třech vzorcích krve zdravých dobrovolníků. Četnost odběrů ve studii se tedy řídila pouze indikací ošetřujícího lékaře podle aktuálních požadavků léčby a klinického stavu pacienta. Na druhou stranu jsme ovšem díky tomuto postupu byli limitováni, neboť jsme nemohli měřit hladiny metalothioneinů v přesně daných časových intervalech a k statistickému potvrzení našich otázek jsme potřebovali delší dobu sledování a větší počet pacientů.

Jak jsme již uvedli bylo zveřejněno velké množství publikací zabývajících se stanovením metalothioneinů v nádorové tkáni, naproti tomu informací týkající se souvislosti sérových hladin metalothioneinů s průběhem nádorového onemocnění je málo. Na našem pracovišti jsme studovali metalothioneiny v séru pacientů stejnou metodu již u tří onkologických onemocnění dospělého věku. Zvýšená hladina metalothioneinů v séru pacientů s nádorem prostaty negativně korelovala s Gleasonovým skóre (Gumulec et al., 2012). Sérová hladina metalothioneinů u pacientů se spinocelulárním karcinomem hlavy a krku významně korelovala s invazivitou nádoru a klinickým stádiem (Krejčová et al., 2012, Sochor et al., 2012). Další zahraniční studie sledovala sérové metalothioneiny u pacientů s hepatocelulárním karcinomem, u těchto pacientů byla hladina metalothioneinů nižší ve srovnání s kontrolní skupinou (Nakayama et al., 2002). Předpokládali jsme, že u různých typů dětských nádorových onemocnění nalezneme souvislosti s průběhem nádorového onemocnění. U žádné z diagnóz jsme ovšem naši hypotézu nepotvrdili. Neprokázali jsme rozdíl mezi lokalizovaným onemocněním, metastázami nebo

progredujícím onemocněním. Také mezi jednotlivými nádorovými diagnózami nebyly statisticky signifikantní rozdíly v hladinách metalothioneinů. Nejvyšší hodnotu jsme prokázali u germinálních nádorů a nádorů CNS, ale není jasné zda je to podmíněno diagnózou nebo spíše věkem, který je právě u těchto nádorů vyšší a hladiny metalothioneinů u dětí s věkem rostou.

Mozkové nádory představují po leukémiích a lymfomech druhé nejčastější nádorové onemocnění dětí a mladistvých. Tyto nádory mají nejvyšší úmrtnost. Přestože byla u této skupiny onemocnění identifikována řada signifikantních prognostických faktorů (nekróza, podíl mitóz, diferenciací, vaskulární proliferace, tumor supresorové geny a jejich proteiny (Tp53, c-erbB2), geny buněčného cyklu (p27, p14ARF) a další), stále zůstává predikce léčebných výsledků dětí s nádory CNS obtížná (Rickert et al., 2005). V experimentální práci (Florianczyk et al., 2003) prokázali u maligního a benigního gliomu a astrocytomu, že hladina metalothioneinů u maligních nádorů byla vyšší než u benigních. Hui a kolektiv (Hui et al., 1998) porovnávali hladinu metalothioneinů v nádorových buňkách u 114 pilocytických astrocytomů, astrocytomů vyššího gradu a glioblastomů. Glioblastomy měli také signifikantně nejvyšší procento buněk obsahujících metalothioneiny ve srovnání s ostatními méně agresivními nádory a tento rozdíl byl vysoce statisticky významný. Z výsledků jeho studie vyplývá, že metalothioneiny mají také souvislost se vzestupem maligního potenciálu astrocytomu. V naší studii jsme měli pouze pacienty, kteří měli high grade glioblastomy, meduloblastomy a ependymomy a dostávali chemoterapii a radioterapii. Většina astrocytomů nižšího stupně malignity je léčena pouze operací a často bohužel nejsou odesláni vůbec na onkologické pracoviště, proto jsme je do studie nezahrnuli. Nejvyšší hodnota metalothioneinů u nádoru CNS v naší studii mohla být ovlivněna selektivním výběrem vysoce agresivních maligních nádorů CNS, a také tím, že tkáň centrální nervové soustavy obsahuje i za fyziologických podmínek vysoké množství metalothioneinů zvláště metalothioneinu 3. Dalším nádorem s nejvyšší hodnotou metalothioneinů byly germinální nádory. U těchto pacientů mohla být hodnota metalothioneinů ovlivněna nejen podáním cisplatin, což jsme ale statisticky nepotvrdili, ale jak jsme již uvedli i starším věkem pacientů.

V úvodu této studie jsme již citovali práce prokazující zvýšenou hladinu metalothioneinů v buňkách řady zhoubných nádorů u dospělých (Dziegel et al., 2005, Weinlich et al., 2006, Eckschlager et al., 2009). V naší práci jsme také prokázali, že

dětští pacienti se solidními nádory měli pětkrát vyšší hodnotu sérových metalothioneinů než kontrolní skupina dospělých zdravých jedinců a o polovinu vyšší hodnotu ve srovnání s dětmi s renálním postižením, ale bez onkologické diagnózy. Při našem měření jsme stanovovali pouze celkovou hodnotu metalothioneinů v séru. Thirummorthy et al., 2011 zkoumali koncentraci jednotlivých izoform metalothioneinů u nádorů prsu, prostaty, ledviny a štítné žlázy. U těchto typů nádorů zjistili změny exprese jednotlivých izoform metalothioneinů jak ve smyslu snížení tak zvýšení. Předpokládali jsme, že zde musí být nějaký mechanismus, který přímo ovlivňuje množství a strukturu metalothioneinů. Při vysoké koncentraci mohou vznikat polymery metalothioneinů, které mohou ovlivňovat jejich elektrochemické vlastnosti a tím i výsledky měření. Jak jsme již uvedli, hladina metalothioneinů u nádorových onemocnění je ovlivněna i aktuálním množstvím kovů v organismu a mírou oxidativního stresu. Proto jsme u 56 vzorků od pacientů hodnocených v této studii měřili hladinu metalothioneinů v séru i jinou metodou - enzymoimunoesejí a současně jsme ve stejném vzorku stanovovali i hladinu zinku. Průměrná hodnota zinku v séru našich pacientů byla $6,0 \pm 0,8 \mu\text{M}$ a průměrná hodnota Zn v kontrolní skupině byla $15 \pm 2 \mu\text{M}$. Průměrná hodnota metalothioneinu stanovená metodou ELISA byla $2,3 \pm 0,2 \mu\text{M}$ a $2,2 \pm 0,1 \mu\text{M}$ stanovená Brdičkovou metodou. Kontrolní skupina dobrovolníků měla průměrnou hodnotu $0,6 \pm 0,2 \mu\text{M}$ stanovenou metodou ELISA a $0,5 \pm 0,1 \mu\text{M}$ elektrochemicky. Tato studie jasně potvrdila, že imunologická i elektrochemická metoda jsou plně zastupitelné a navíc prokázala, že hodnota zinku byla u našich onkologických pacientů snížena o 40% proti kontrolní skupině (Vysloužilová et al., 2013- příloha 2). Tento výsledek je ve shodě i s dalšími studiemi, které prokázaly sníženou hladinu zinku u řady dalších solidních dětských nádorů. Stejně výsledky byly zaznamenány i u jiných onkologických diagnóz: Hodgkinova lymfomu, leukémií, kostních sarkomů a mozkových nádorů (Dalvi et al., 2010, Yaprak et al., 2010). Neprokázáli jsme však opět žádný rozdíl v hladinách zinku a metalothioneinů mezi jednotlivými diagnózami. V současné době je předmětem rozsáhlé diskuze, zda jsou snížené sérové hladiny zinku u pacientů s nádory příčinou nebo následkem vzniku nádoru. Pokud by se nízké hladiny zinku skutečně podílely na vzniku zhoubných nádorů byla by suplementace snadným preventivním opatřením.

V naší práci jsme mimo jiné chtěli zjistit, zda lze sérové hladiny metalothioneinů rutinně použít jako nádorový marker. V naší kohortě pacientů jsme měli pouze malý

počet pacientů s nádorovým onemocněním, kde bylo možné využít nějaký prověřený nádorový marker (germinální nádory c AFP, HCG, beta HCG, hepatoblastom – AFP, non-Hodgkinský lymfom – LDH). V době diagnózy při zvýšené hodnotě těchto markerů jsme nezaznamenali pozitivní nebo negativní korelaci těchto markerů s hladinami metalothioneinů, ale jednalo se o soubor, který byl malý pro statistické hodnocení korelací (Kruseova et al., nepublikovaná data).

Pacienti po ukončené onkologické léčbě jsou pravidelně sledováni v dispenzární ambulanci. Jedním z hlavních cílů těchto kontrol, je včas odhalit případnou recidivu a tím zlepšit prognózu těchto pacientů. V rámci doporučení pro léčbu a sledování dětských onkologických diagnóz evropské pracovní skupiny dětské onkologie SIOP i severoamerické skupiny dětské onkologie COG – mají všichni pacienti pravidelné RTG, CT, UZ a MRI vyšetření, kdy zejména rentgenové metody přináší pacientům určitou míru radiační zátěže. Předmětem řady odborných diskusí je, jak často tyto kontroly u dětí provádět. Pokud dojde k recidivě maligního onemocnění je šance na vyléčení pacienta menší než při primární diagnóze. Tato šance je ještě menší, pokud recidivu onemocnění odhalíme pozdě. Pro dětské nádory ovšem nemáme nádorový marker, který by včas určil, zda dojde k recidivě onemocnění a mohli jsme tedy snížit počet rentgenových kontrol. Myslíme si, že tedy jeden z důležitých výsledků naší práce byl nález statisticky nižší sérové hladiny metalothioneinů u pacientů s časným relapsem onemocnění. Již v první pilotní práci (Adam et al., 2008), která sledovala hladinu metalothioneinů u různých nádorových diagnóz měřených stejnou metodou zjistili, že pacienti s první a s druhou recidivou dětské akutní lymfoblastické leukémie měli nižší hodnotu metalothioneinu ve srovnání se skupinou, která byla trvale v kompletní remisi onemocnění. Peyre s kolektivem (Peyre et al., 2010) prokázali, že až 80% dětí s recidivou ependymomu má down regulaci MT3 genů, která není způsobena delecí těchto genů ani metylací jejich promotoru. Expresí MT3 byla obnovena inhibitory histondeacetylázy nebo léčbou zinkem. Z toho je možné vyvodit hypotézu, že právě down regulace genů pro metalothioneiny může být zodpovědná za pozdější časný vznik recidivy onemocnění. V našem souboru jsme však měli pouze 12 pacientů s časnou recidivou onemocnění, a pouze tři z tohoto souboru měli nádory CNS. Naproti tomu Hui a kolektiv (Hui et al., 1998) u skupiny nádorů CNS neprokázal vztah mezi expresí metalothioneinů a recidivou astrocytomy. Pacienti s nádory prsu léčení adjuvantní chemoterapií (cyklofosfamid, metotrexát, 5 fluorouracil a doxorubicin) s vysokou expresí metalothioneinů měli signifikantně nižší riziko

recidivy. Lze předpokládat, že metalothioneiny by mohly mít prediktivní význam pro včasný záchyt recidivy u této skupiny onemocnění (Yap et al., 2009). Tento náález je dalším podnětem pro sledování hladin metalothioneinů, abychom na větším počtu pacientů mohli potvrdit souvislost jejich nižší hladiny se zvýšeným rizikem vzniku relapsu onemocnění. Pokud bychom tento náález potvrdili opakovaně, bylo by vhodné rizikovou skupinu s nízkou hladinou metalothioneinů kontrolovat častěji zobrazovacími metodami, než pacienty s příznivou hodnotou. Pro časný záchyt recidivy může být přínosný i náš další náález pomalého poklesu hladiny metalothioneinů během dvou měsíců po ukončení léčby. Tento interval jsme vybrali, neboť v tomto období by mělo po ukončené chemoterapii již dojít k obnově hematopoézy a rekonstituci imunity, stejně tak jako k normalizaci většiny ostatních systémů (Rasmussen, Arvin, 1982). Proto jsme předpokládali, že i hladiny metalothioneinů by se měly snížit k normě ve stejném intervalu. Je možné, že další vzestup metalothioneinů by mohl být také známkou recidivy onemocnění. K ověření této hypotézy je však nutná delší doba sledování většího souboru pacientů.

Většina klinických i experimentálních studií týkajících se vzniku chemorezistence nádorů, byla dělána u dospělých pacientů. Například u akutní lymfoblastické leukémie existuje více různých mechanismů snižujících efekt chemoterapie, které jsou však odlišné u dětí a dospělých. V naší práci jsme nezaznamenali žádnou statistickou souvislost mezi sérovými hladinami metalothioneinů a podávání platinových derivátů a ani dalších cytostatik. Předpokládáme, že zde samozřejmě existují i další mechanismy odpovědné za vznik chemorezistence u dětských solidních nádorů k platinovým cytostatikům. Rovněž sérové hladiny metalothioneinů jsou ovlivňovány řadou různých faktorů a vznik rezistence k cytostatikům by mohl být pouze jedním z nich.

V naší práci jsme prokázali, že hladiny metalothioneinů byly ovlivňovány nejen samotným nádorovým procesem, ale i celou řadou dalších procesů spojených s chemoterapií a s léčebnými komplikacemi. Jedním z velmi závažných nežádoucích účinků protinádorové léčby je vznik septického šoku v důsledku imunosupresivního a myelotoxického účinku chemoterapie a radioterapie. Ten u našich pacientů vznikne nejčastěji v období pancytopenie po proběhlé chemoterapii. Všeobecně se předpokládá, že nerovnováha mezi nadbytkem kyslíkových radikálů a nízkou hladinou antioxidantů vede u pacientů v septickém šoku k multiorgánovému selhání.

Nicméně aktuální změny totální antioxidační kapacity v těžké sepsi zůstávají kontraverzní a v podstatě není znám ani přesný mechanismus vzniku septického šoku. Mezi antioxidanty, které mohou ovlivnit oxidační stres a tím ovlivnit průběh septického šoku patří kyselina močová, bilirubin a vitamíny A, C a E. Hladina těchto antioxidantů stoupá jako odpověď na akutní fázi oxidativního stresu. Chuang a kolektiv (Chuang et al., 2006) sledoval souvislost prognózy dětí v septickém šoku s hodnotou celkové antioxidační kapacity (TAC). Zjistil, že skupina pacientů, která na septický šok zemřela, měla vyšší hodnotu TAC. Sérová TAC u těchto pacientů také pozitivně korelovala s hladinou kyseliny močové. V našem souboru pacientů v septickém šoku jsme nezaznamenali výrazný vzestup kyseliny močové. Také jsme neprokázali korelaci mezi hladinou metalothioneinů a hodnotou kyseliny močové v séru. Příčinou může být to, že většina pacientů měla pancytopenii a tím i velmi omezený přísun výživy, díky bolestivé mukozitidě, kterou pacienti po onkologické léčbě v pancytopenii a septických stavech zpravidla mají. Při parenterální výživě pak ti pacienti mají nízkou celkovou hladinu kyseliny močové. Její elevaci vidíme, většinou až při velmi těžkém renálním selhání při multiorgánovém selhání. Také výše zmíněná práce Chuang et al., 2006 připouští, že elevace kyseliny močové současně s TAC mohla být dána i mírou renálního poškození, který většinou doprovází pacienty se zvláště nepříznivým průběhem septického šoku.

Při hodnocení korelace hladin metalothioneinů s dalšími laboratorními parametry jsme prokázali jejich vazbu k absolutnímu počtu lymfocytů. Jedním z možných vysvětlení této korelace je, že lymfocyty produkují cytokiny nebo jejich tvorbu indukují. Cytokiny jako jsou IL1, 2, 6 a TNF mohou indukovat tvorbu metalothioneinů. Tvorbu lymfocytů také ovlivňuje suplementace zinkem, který je rovněž induktorem metalothioneinů (Wong et al., 2007, Malavolta et al., 2008). Autoři sledovali změny v metabolismu zinku v leukocytech periferní krve u dětských pacientů v septickém šoku. Pacienti, kteří na septický šok zemřeli, měli zvýšenou hladinu metalothioneinů. Také Cvijanovich et al., 2009 ve své práci prokázali souvislost mezi závažností septického šoku, stupněm poškození orgánů, hladinou metalothioneinů a nízkou hladinou sérového zinku. V našem souboru pacientů jsme u tří pacientů, kteří prodělali septický šok zaznamenali až dvojnásobný nárůst sérové hladiny metalothioneinů, po zlepšení stavu hladiny metalothioneinů opět klesly k normálním (průměrným) hodnotám daného pacienta (Kruseová et al., nepublikovaná data), což je v shodě s výše uvedenými literárními údaji. U těchto pacientů jsme však z

technických důvodů neměřili sérovou hladinu zinku. U tří dalších pacientů nabíraných několik dní před úmrtím pro progresi nádorové onemocnění, byla hladina metalothioneinů snížena o více než polovinu ve srovnání s jejich předchozími průměrnými hodnotami. Předpokládáme, že nízká hladina metalothioneinů může mít souvislost s celkovým vyčerpáním organismu, který již nebyl schopen reagovat produkcí metalothioneinů na patologické stimuly. Ve studii (Adam et al., 2008) stanovovali stejnou metodou hodnotu metalothioneinů u dětské ALL a u různých typů dospělých nádorů. Průměrné hodnoty u pacientů s dětskou ALL byly 2,29 μM což byly obdobné hodnoty jako u naší skupiny pacientů se solidními nádory. Důležité je, že i v tomto souboru pacientů měli výsledky měření od tří pacientů, kteří v průběhu dané hospitalizace zemřeli a obsah metalothioneinů byl také velmi nízký 1,0 μM . Tyto v podstatě kazuistické nálezy nebyly statisticky významné vzhledem k malému počtu vyšetřených pacientů a lze předpokládat, že vzhledem ke klinické i etické stránce bude velmi obtížné získat rozsáhlejší soubor, který by umožnil statistické zpracování.

Zjištění, že hodnota CRP v séru nekoreluje s hladinami metalothioneinů nasvědčuje, že metalothioneiny nepatří mezi proteiny akutní fáze zánětu, a mohou tedy být laboratorním markerem nezávislým na akutní fázi zánětu.

Zinek je esenciální prvek, který je zahrnutý do mnoha buněčných pochodů. Je nutný pro správnou biologickou funkci přibližně 300 enzymů (Wei et al., 2008). U lidí je jeho deficit spjatý s inhibicí růstu a také je dáván do vztahu s karcinogenezí některých nádorů. Metalothionein je tedy v popředí zájmu prací, které se metabolismem zinku v lidském organismu zabývají (Gibson et al., 2008). Již jsme uvedli, že jednonukleotidový polymorfismus (SNP) metalothioneinu +838 C/G MT 2A a 209 A/G MT2A je spojen s nedostatkem zinku (Raudenská et al., 2012). Klinické studie u dětí v rozvojových zemích prokázaly, že zvýšení suplementace zinkem obnovuje aktivitu NK buněk, hojení ran a rezistenci proti infekcím (Wong et al., 2007). Jedna z experimentálních studií (Tran et al., 2009) byla zaměřena na možnost snížení stupně poškození sliznice u myši po léčbě metotrexátem. Autoři sledovali, zda existuje souvislost mezi zvýšeným přísunem zinku a hladinami metalothioneinů. Zvýšená hladina metalothioneinů korelovala s menší toxicitou metotrexátu na střevo a nižší infiltrací neutrofilů, ale suplementace zinkem nesnížila rozsah poškození indukovaný metotrexátem. V naší studii dostávali metotrexát ve vysokých dávkách s následnou aplikací leukovorinu všichni pacienti léčení pro osteosarkom a non-Hodgkinský

lymfom, v odběrech po jeho podání jsme zvýšenou hladinou metalothioneinů nezaznamenali, pacientům jsme také nepodávali zinkové preparáty. Obecně nepanuje ohledně suplementace zinkem u onkologických pacientů jednotný názor.

Vzhledem k tomu, že zinek zvyšuje expresi MT1 a MT2, uvažovali Hua a kolektiv ve své práci (Hua et al., 2008) o možném využití zinku v prevenci a léčbě karcinomu prostaty. Vycházeli z toho, že při progresi karcinomu prostaty je snižená hladina MT1 a 2 a zinek je velmi účinný induktor těchto izoform metalothioneinů. Jejich výzkum potvrdil, že v buňkách linie PC-3 odvozené od karcinomu prostaty je snižená exprese MT1 a MT2. Nalezli 95% redukci ve srovnání s normálními buňkami prostaty a pouze mírné snížení exprese MT1 a MT2 u benigní hyperplázie prostaty (BPH). Léčba zinkem významně indukovala expresi MT1 a MT2 v PC3 a BPH buňkách linií odvozených od karcinomu prostaty, což bylo ve shodě s obnovenou buněčnou hladinou tohoto biogenního kovu. Endogenní MT3 byl detekovaný a obnovený po léčbě zinkem zejména u benigní hyperplázie. I přes tento pozitivní výsledek se v současné době v prevenci ani léčbě dospělých nebo dětských nádorových onemocnění zinek rutinně nepoužívá. V této oblasti jsou nutné další klinické studie fáze 1 a 2. Je možné, že právě pro snadnou korelaci sérových hladin metalothioneinů a zinku, by Brdičkova elektrochemická metoda mohla být pro tento výzkum přínosná.

Velmi důležitý je nález statisticky vysoce signifikantního vztahu mezi sérovou hladinou metalothioneinu a kreatininu. Jedním z možných vysvětlení je poškození ledvin v důsledku chemoterapie nebo infekčních komplikací léčby. izoformy MT1 a MT2, které tvoří největší podíl metalothioneinů jsou produkovány zejména v ledvinách (Eckschlager et al., 2009). U deseti pacientů jsme dva dny po aplikaci erythropoetinu zaznamenali nárůst hodnot metalothioneinu o 50% proti průměrným hodnotám (Kruseová et al., nepublikovaná data). Bylo ovšem nemožné získat dostatečný počet vzorků umožňující statistické hodnocení, neboť jak je výše uvedeno odběry byly dělány dle indikace ošetřující lékaře daného pacienta. Oxidativní stres je odpovědný za celou řadu nemocí a předpokládá se, že může mít souvislost s chronickým postižením ledvin. Jak víme metalothioneiny jsou také antioxidanty, a jejich nejvyšší koncentrace je v ledvinách. Je tedy pravděpodobné, že jejich zvýšená syntéza je reakcí na oxidativní stres vzniklý možným poškozením ledvin při onkologické léčbě. Bylo například již publikováno, že L-FABP (proteiny vážící mastné kyseliny -14-15 kDa, které transportují mastné kyseliny z plazmy do míst oxidace v

mitochondriích a peroxisomech) mohou být antioxidantními enzymy v ledvinách a jejich sekrece v moči odráží oxidativní stres v proximálních tubulech. Předpokládá se, že L-FABP mohou být potenciálním biomarkerem pro progresi chronického onemocnění ledvin (Tsukahara et al., 2007). V našem souboru jsme neměli zařazeny pacienty s nádorovým postižením ledvin, ale ve studii spolupracujícího pracoviště (Adam et al., 2008) měli pacienti s nádory ledvin jednu z nejnižších hladin metalothioneinů - 1,82 μM ve srovnání s ostatními nádorovými diagnózami dospělého věku, což podporuje náš předpoklad, že je významná souvislost mezi metalothioneiny a funkcemi ledvin. Vzhledem k tomu, že hladiny metalothioneinů korelují s poškozením ledvin, připravujeme další studii, která bude sledovat vylučování metalothioneinů v moči a sledovat možnou korelaci mezi zvýšenou hladinou kreatininu v séru, hodnotou metalothioneinů v moči a současně budeme hodnotit i známky oxidativního stresu.

V naší studii jsme dále prokázali statisticky významnou pozitivní korelaci mezi sérovými hladinami metalothioneinů a věkem dětských pacientů se zhoubnými nádory. Stejný výsledek měla i práce Malavolty a kolektivu (Malavolta et al., 2008), kde prokázali, že exprese metalothioneinů se ze začátku zvyšuje s věkem, ale poté se u lidí starších 70 let snižuje. Tento jev byl popsán i na experimentálním modelu u mláďat krys (Bauerly et al., 2005). Natale s kolektivem (Natale et al., 2004) na zvířecím modelu prokázal, že nízká hladina metalothioneinů v nezralé tkáni CNS vysvětluje zvýšenou citlivost myší ve věku 14 dní na poškození mozku oxidativním stresem ve srovnání s dospělými, které mají vyšší hladiny mozkových metalothioneinů. Je možné, že právě nízká hladina metalothioneinů u dětských onkologických pacientů je odpovědná za závažnější nežádoucí účinky chemo a radioterapie u velmi malých dětí ve srovnání s adolescenty. Tito pacienti mají díky nízkému věku v době léčby i vyšší procento vzniku pozdních chronických následků onkologické léčby.

Analytických metod pro citlivou analýzu metalothioneinů není mnoho. V současnosti prakticky neexistuje žádná vhodná analytická metoda pro jejich rutinní stanovení. Téměř všechny klinické studie jsou založeny na imunohistochemickém stanovení za použití různých protilátek proti metalothioneinům, případně na detekci hladiny mRNA za využití technik molekulární biologie. Většina těchto postupů vyžaduje velmi složitou přípravu vzorku, náročné a drahé přístrojové vybavení (Adam et al., 2008).

Mezi analytické metody vyžadující velmi nízké provozní a pořizovací náklady patří elektrochemické techniky. Výsledky naší práce prokázaly, že modifikovaná Brdičkova reakce je vhodnou a relativně málo nákladnou metodou ke stanovování hladiny metalothioneinů v séru pacientů. Elektrochemické metody jsou ke stanovení metalothioneinů stále používané málo, ačkoliv i předcházející studie potvrzují, že tuto metodu lze rutinně používat k určení metalothioneinů v séru onkologických pacientů i v normálních i nádorových buňkách.

6. Závěry

V naší práci jsme prokázali, že diferenciální pulzní voltametrie s automatickou přípravou vzorků je vhodnou metodou pro určení metalothioneinů v séru dětských onkologických pacientů. Tato metoda je rychlá, relativně levná a umožňuje účinnou analýzu velkého množství vzorků. Její limitací je nemožnost rozlišení jednotlivých izoform metalothioneinů.

Dětské pacienty s různými typy solidních nádorů mají vyšší hladinu sérových metalothioneinů ve srovnání s kontrolní skupinou zdravých mladých dospělých jedinců, se skupinou dětí s onemocněním ledvin a také ve srovnání se skupinou zdravých dětí popsaných v literatuře. Hladina metalothioneinů po ukončené chemoterapii klesá.

Prokázali jsme vysoce statisticky významnou korelaci mezi sérovými hladinami kreatininu a metalothioneinů a mezi absolutním počtem leukocytů a hladinou metalothioneinů. Předpokládáme, že vysvětlením korelace metalothioneinů a kreatininu je poškození ledvin, jedním z hlavních míst syntézy metalothioneinu 1 a 2. Neprokázali jsme žádnou korelaci mezi hladinou metalothioneinů a aktivitou (remise, progres) ani rozsahem nádorového onemocnění. Všichni pacienti s časným relapsem měli nižší hladinu metalothioneinů, proto předpokládáme, že tento náález by mohl sloužit jako prediktivní faktor časných recidiv. Samozřejmě jsou nutné další rozsáhlejší studie zaměřené na studium metalothioneinů v séru dětských onkologických pacientů, abychom naše hypotézy mohli jednoznačně potvrdit. Je nutné také najít další citlivější metody, které umožní určení jednotlivých izoform metalothioneinů v séru, neboť právě znalost jednotlivých izoform, vzhledem k jejich odlišným funkcím, pomůže lépe pochopit patofyziologické pochody, které se při léčbě dětských solidních nádorů odehrávají.

7. Seznam zkratek

AFP - alfa fetoprotein

AMD – aktinomycin D

AMK – aminokyseliny

ANL – absolutní počet lymfocytů

B - benzen

BCNU - nitrosourea

BCL2 - B-cell lymphoma 2 protein

beta HCG – beta podjednotka lidského choriogonadotropinu

b FGF - b fibroblastický růstový faktor

BLEO - bleomycin

C – cytosin

CA 125 - nádorový marker karcinomu ovária

CARBO – karboplatina

CEA - karcinoembryonální nádorový antigen

CCNU - karmustin

C - erb B2- erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog 2

COG - children oncology group (dětská onkologická společnost – USA)

CR – kompletní remise

CRP - C reaktivní protein

CYC - cyklofosfamid

CT – výpočetní tomografie

DNA – deoxyribonukleová kyselina

DOXO – doxorubicin

DTIC – dakarbazin

ELISA – enzymatická imunoanalýza

HgB - hemoglobin

HIF (1) – hypoxií indukovaný transkripční faktor 1

FNM - Fakultní nemocnice Motol

G - guanin

GSH - redukovaná forma glutahionu

GSSG - oxidovaná forma glutathionu

GTP – guanosin trifosfát

IFO - ifosfamid

IL - interleukin

INF alfa - interferon alfa

LMWA - nízkomolekulární antioxidanty

MCP1 - Monocyte chemoattractant protein-1 (prozánětlivý cytokin)

MMT – maligní mezenchymální nádory

MRI - magnetická rezonance

MT - metalothionein

MTF1 - transkripční faktor regulovaný kovy 1

MTX- metotrexát

NT - neurotrofin 3,4,5

NGF - neuronální růstový faktor

NF-kappa B – nukleární faktor kB

P – pyren

Pb - olovo

PSA - specifický antigen prostaty

PKC α – protein kinase C

p 14 ARF - alternate reading frame (ARF) product of the CDKN2A locus

p 27 - Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B

RAb 3A - RAS-associated protein RAB3A

RIA – radioimunoanalýza

ROS - reaktivní kyslíkové radikály

RTG - rentgen

S - serin

SH - thiolové skupiny

SIOP - evropská společnost dětské onkologie

SNP - jednonukleotidový polymorfismus

UZ - ultrazvuk

VBL – vinblastin

VCR - vinkristin

VP - vepesid

VEGF - vaskulární růstový faktor

TAC - celková antioxidační kapacita

TGF beta – transforming growth factor β

TNF - faktor nekrózy nádoru

8. Literatura

Abdel -Mageed AB, Agrawal KC. Activation of nuclear factor kappa B: Potential role in metallothionein-mediated mitogenic response. *Cancer Research* 1998; 58: 2335-2338.

Adam V, Blastik O, Křížková S, et al. Application of the Brdička reaction in determination of metallothionein in patients with tumours. *Chemické Listy* 2008; 102: 51-58.

Adam V, Petrlova J, Wang J, et al. Zeptomole electrochemical detection of metallothioneins. *PloS One* 2010; 5: e11441.

Andon B, Barbosa J, Sanz-Nebot V. Separation and characterization of rabbit liver apothioneins by capillary electrophoresis coupled to electrospray ionization time of flight mass spectrometry. *Electrophoresis* 2006; 27: 3661-3670.

Andrews PA, Murphy MP, Howell SB. Metallothionein-Mediated Cisplatin resistance in Human ovarian -Carcinoma Cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1987; 19: 149-154.

Bacalod MD, Johnson SP, Ali-Osman F, et al. BCNU- sequestration by metallothioneins may contribute to resistance in medulloblastoma cell line. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2009; 63: 753-758.

Bacalod MD, Johnson SP, Ali-Osman F, et al. Mechanisms of resistance to 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosurea in human medulloblastoma and rhabdomyosarcoma. *Mol.Cancer Ther.* 2002; 1: 727-736.

Baird SK, Kurz T, Brunk UT. Metallothionein protects against oxid active stress-induced lysosomal destabilization. *Biochemical Journal* 2006; 394: 275-283.

Bauerly KA, Kelleher SIL, Lonnerdal B. Effects of copper supplementation on copper absorption tissue distribution, and copper transporter expression in an infant rat model. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2005; 288: 1007-1014.

Bay BH, Jin RX, Huang JX ,et al. Metallothionein as a prognostic biomarker in breast cancer. *Exp. Biol. and Med.* 2006; 231: 1516-1521.

Bedrníček J, Vícha A, Jarošová M, et al. Characterization of drug resistant neuroblastoma cell lines by comparative genomic hybridization. *Neoplasma* 2005; 52: 415-419.

Bell SG, Vallee BL. The metallothionein/thionein system: an oxidoreductive metabolic zinc link. *Chem. biochemie* 2009; 5: 55-62.

Bohórquez LC, González CR, Mendoza GE, et al. TP 53, BCL 2, p21Waf1/Cip1 and metallothionein as markers of differentiation, response to treatment and prognosis in neuroblastoma tumors. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 2008; 30: 105-112.

Cardosso SV, Silveria-Junior JB, De Carvalho Machado V, et al. Expression of metallothionein and p53 antigens are correlated in oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* 2009; 29: 1189-93.

Cipriano C, Malavolta M, Costarelli L, et al. Polymorphism in MT1 a gene coding region are associated with longevity in Italian Central female population. *Biogerontology* 2006; 7: 357-365.

Combs G F Jr. Status of selenium in prostate cancer patients prevention. *Br. J. Cancer* 2004; 91(2): 195–199.

Cullen J, Kubecova M, et al. Využití intravenózního vitamínu C u onkologického pacienta. *Farmakoterapie* 2013; 9: 494-450.

Cvijanovich NZ, King JC, Flori HR. Zinc homeostatis in pediatric critical illness. *Pediatr. Crit. Care Med.* 2009; 10: 29-34.

Dalvi R, Bajaj S. Zinc nutritional status in indian children with cancer. *Pediatr. Blood Cancer* 2010; 55: 954-954.

DeLisle RC, Sarras MP, Hidalgo J, et al. Metallothionein is a component of exocrine pancreas secretion: implications for zinc homeostasis. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 1996; 271: 1103-1110.

Doz F, Roosen N, Rosenblum ML. Metallothionein and anticancer agents, the role of metallothionein in cancer chemotherapy. *J. Neurocol.* 1993; 17: 123-129.

Dutsch-Wicherek M. RCAS1, MT ,and vimentin as potential markers of tumor microenvironment remodeling. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2010; 63: 181-188.

Dziegiel P, Salwa-Zurawska W, Zurawski J, et al. Prognostic significance of augmented metallothionein (MT) expression correlation with Ki67 antigen expression in selected soft tissue sarcoma . *Histol. Histopathol.* 2005; 20: 83-89.

Eckschlager T, Adam V, Hraběta J, et al. Metallothioneins and cancer. *Curr. Protein Pept. Sci.* 2009; 10: 360-375.

El-Sharkawy SL, Farrag AR. Mean nuclear area and metallothionein expression in ductal breast tumors: correlation with estrogen receptor status. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 2008; 16: 108-112.

Endo-Munoz L, Cumming A, Sommerville S, et al. Osteosarcoma is characterised by reduced expression of markers of osteoclastogenesis and antigen presentation compared with normal bone. *Br. J. Cancer* 2010; 103: 73-81.

Endo T, Yoshikawa M, Ebara, M, et al. Immunohistochemical metallothionein expression in hepatocellular carcinoma: Relation to tumor progression and chemoresistance to platinum agents. *J. Gastroenterol.* 2004; 39: 1196-1201.

Evering W, Haywood S, Bremner I, et al. The protective role of metallothionein in copper-overload. II. Transport and excretion of immunoreactive MT-1 in blood, bile and urine of copper-loaded rats. *Chem. Biol. Interact.* 1991; 78: 297-305.

Fabrik L, Adam V, Křížková S, et al. Určení hladiny termostabilních thiolů u pacientů se zhoubným nádorem. *Klinická onkologie* 2007; 20: 384 – 390.

Faller P. Neuronal growth-inhibitory factor (metallothionein-3): Reactivity and structure of metal-thiolate clusters. *FEBS J.* 2010; 277: 2921-2930.

Filipič M. Mechanisms of cadmium induced genomic instability. *Mutat Res.* 2012; 733: 69-77

Florianczyk B, Osuchowski J, Kaczmarczyk R. Influence of metallothioneins on zinc and copper distribution in brain tumours. *Folia. neuropathol.* 2003; 41: 11-14.

Formigari A, Irato P, Santon A, et al. Zinc, antioxidant systems and metallothionein in metal mediated – apoptosis: Biochemical and cytochemical aspects. *Comp. Biochem. Physiol.* 2007; 146: 443-459.

Ganguly S, Taioli E, Baranski B. Human metallothionein gene expression determined by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction as a biomarker of cadmium exposure. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 1996; 5: 291-301.

Giacconi, R, Cipriano C, Muti E, et al. Novel-209A/G MT2A polymorphisms in old patients with type 2 diabetes and atherosclerosis: relationship with inflammation (IL-6) and zinc. *Biogerontology* 2005; 6: 407-413.

Giacconi R, Muti E, Malavolta M, et al. The +838 C/G MT2A polymorphism, metals, and inflammatory/immune response in carotid artery stenosis in elderly people. *Mol. Med.* 2007; 13: 388-395.

Gibson RS, Hess SY, Hotz C, et al. Indicators of zinc status at the population level: a review of the evidence. *Br. J. Nutr.* 2008; 3: 14-23.

Grabellus F, Sheu SY, Tötsch M, et al. Overexpression of the drug resistance-associated protein metallothionein does not correlate with response of sarcomas to isolated limb perfusion treatment. *J. Surg. Oncol.* 2010; 10: 465-470.

Gumulec J, Masarik M, Krizkova S, et al. Evaluation of alpha methylacyl-CoA racemase metallothionein and prostate specific antigen as prostate cancer prognostic markers. *Neoplasma* 2012; 59: 191-200.

Hidalgo J, Penkowa M, Espejo C, et al. Expression of metallothionein-I, -II, and -III in Alzheimer disease and animal models of neuroinflammation. *Exp. Biol. Med (Maywood)* 2006; 9: 1450-1458.

Hirokazu T. Biomarkers for Oxidative Stress: Clinical Application in Pediatric medicine. *Curr. Med. Chem.* 2007; 14: 229-351.

Hiura T, Khalid H, Yamashita H, et al. Immunohistochemical analysis of metallothionein in astrocytic tumors in relation to tumor grade, proliferative potential, and survival. *Cancer* 1998; 83: 2361-2369.

Holeček V. Oxidační stres u nádorových onemocnění. *Klin. Biochem. Metab.* 2010; 18(39):225-230.

Hua Wie, Desouki MM, Lin S, et al. Differential expression of metallothioneins (MTs) 1, 2, and 3 in response to zinc treatment in human prostate normal and malignant cells and tissues. *Molecular Cancer* 2008; 7: 1-7.

Choudhuri S, Kramer KK, Berman NE, et al. Constitutive expression of metallothionein genes in mouse brain. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1995; 131: 144-154.

Chuang C C, Shieh S C, Chi C H, et al. Serum total antioxidant capacity reflects severity of illness in patients with severe sepsis. *Critical Care*; 2006; 10: 15-19.

Chun JH, Kim HK, Kim E, et al. Increase expression of metallothionein is associated with irinotecan resistance in gastric cancer. *Cancer Research* 2004; 64: 4703-4706.

Ioachim EE, Kitsiou E, Carassavoglou C, et al. Immunohistochemical localization of metallothionein in endometrial lesions. *J. Pathol.* 2000; 191: 269-273.

Janssen AML, van Duij W, Kubben F, et al. Prognostic significance of metallothionein in human gastrointestinal cancer. *Clin. Cancer Res.* 2002; 8: 1889-1896.

Jasani G, Schmid KW. Significance of metallothionein overexpression. *Histopathology* 1997; 31: 211-214.

Jin RX, Huang JX, Tan PH, et al. Clinicopathological significance of metallothioneins in breast cancer. *Pathol. Oncol. Research* 2004; 10: 74-79.

Kanda M, Nomoto S, Oakamura Y, et al. Detection of metallothionein 1G as a methylated tumor suppressor gene in human hepatocellular carcinoma using a novel method of double combination array analysis. *Int. J. Oncol.* 2009; 35: 477-483.

Karotki AV, Vasák M. Reaction of human metallothionein-3 with cisplatin and transplatin. *J. Biol. Inorg. Chem.* 2009; 14: 1129-38.

Kížek R, Vacek J, Trnkova L, et al. Application of catalytic reactions on a mercury electrode for electrochemical detection of metallothioneins. *Chemické Listy* 2004; 98: 166-173.

Krejčova L, Fabrik I, Hynek D, et al. Metallothionein electrochemically determined using Brdicka reaction as a promising blood marker of head and neck malignant tumours. *Int. J. Electrochem. Scin.* 2012; 7: 1767-1784.

Křížkova S, Bláhova P, Nakielna J, et al. Comparison of metallothionein detection by using Brdicka reaction and Enzyme/Linked Immunosorbent Assay employing chicken yolk antibodies. *Electroanalysis* 2009; 21: 2575-2583.

Kyvaati Z, Mergen G, Söylemezoglu T. Effect of metallothionein core promoter region polymorphism on cadmium, zinc and copper levels in autopsy kidney tissues from a Turkish population. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2010; 1: 252-255.

Liu J, Litt M, Segal R, et al. Metabolomics of oxidative stress in recent studies of endogenous and exogenously administered intermediate metabolites. *Int. J. Mol. Scin.* 2011; 12: 6469- 501.

Malavolta M, Cipriano C, Costarelli L, et al. Metallothionein downregulation in very old age: A phenomenon associated with cellular senescence ? *Rejuv. Res.* 2008; 11: 455-459.

Maret W. Fluorescent probes for the structure and function of metallothionein. *J Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2009; 877: 3378-83.

Maret W. Metalloproteomics, metalloproteomes, and the annotation of metalloproteins. *Metallomics* 2010; 2: 117-125.

McCluggage WG, Strand K, Abuldkadir A. Immunohistochemical localization of metallothionein in benign and malignant epithelial ovarian tumors. *Int. J. Gynecol. Cancer* 2002; 12: 62-65.

McGee HM, Woods GM, Bennett B, et al. The two faces of metallothionein in carcinogenesis: photoprotection against UVR-induced cancer and promotion of tumor survival. *Photochem. Photobiol.Sci.* 2010; 9: 586-596.

Milnerowicz H, Bizoń A. Determination of metallothionein in biological fluids using enzyme-linked immunoassay with commercial antibody. *Acta Biochim Pol* 2010; 57: 99-104

Miyashita H, Sato Y. Metallothionein 1 is downstream target of vascular endothelial zinc finger 1 (VEZF1) in endothelial zinc finger 1 (VEZF1) in endothelial cells and participates in the regulation of angiogenesis. *Endothelium* 2005; 12:163-170.

Moffatt P, Denizeau F. Metallothionein in physiological and physiopathological processes. *Drug Metab. Rev.* 1997; 29: 261-307.

Nakayama A, Fukuda H, Ebara M, et al. A new diagnostic method for chronic hepatitis, liver cirrhosis, and hepatocellular carcinoma based on serum metallothionein, copper, and zinc levels. *Biol. Pharmacol. Bull.* 2002; 25: 426-431.

Namdarghanbari M, Wobig W, Krezoski S, et al. Mammalian metallothionein in toxicology, cancer, and cancer chemotherapy. *J. Biol. Inorg. Chem.* 2011; 16: 1087-1101.

Natale JE, Knight JB, Cheng Y, et al. Metallothionein and mitigate age – dependent secondary brain injury. *J. Neurosci. Res.* 2004; 78: 303-314.

Ngu TT, Stillman MJ. Methylation of metallothioneins. *JUMB Life.* 2009; 61: 438-446.

Ofner D, Maier H, Riedmann B, et al. Immunohistochemical Metallothionein Expression in Colorectal Adenocarcinoma. Correlation with Tumor Stage and Patient Survival. *Virchows Arch.* 1994; 425: 491-497.

Ostrakhovitch EA, Olsson PE, Jiang S, et al. Interaction of metallothionein with tumor suppressor p53 protein. *FEBS Lett.* 2006; 580: 1235-1238.

Pedersen MO, Larsen A, Stoltenberg M, et al. The role of metallothionein in oncogenesis and cancer prognosis. *Prog. Histochem. Cytochem.* 2009; 44: 29-64.

Penkowa M. Metallothionein expression and roles in the central nervous system. *Biomed. Rev.* 2002; 13:1-15.

Penkowa M. Metallothionein I+II expression and roles during neuropathology in the CNS. *Dan. Med. Bull.* 2006; 53: 105-121.

Petrlová J, Blastik O, Průša R, et al. Determination of metallothionein content in patients with breast and colon cancer, and malignant melanoma. *Klinická Onkologie* 2006; 19: 138-142.

Peyre M, Commo F, Dantas-Barbosa C, et al. Portrait of ependymoma recurrence in children: biomarkers of tumor progression identified by dual-color microarray based gene expression analysis. *Plos One* 2010; 24: 129-132.

Pontes HA, de Aquino Xavier FC, da Silva TS, et al. Metallothionein and p-Akt proteins in oral dysplasia and in oral squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study. *J. Oral Pathol. Med.* 2009; 38: 644-650.

Rachel J, Tokar E, Xu Y, et al. Chronic cadmium exposure in vitro induces cancer cell characteristics in human lung cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2013; 273: 281-288.

Rasmussen L, Arvin .A. Chemotherapy-induced immunosuppression. *Environ. Health Perspect.* 1982; 43: 421-425.

Raudenská M, Šmerková K, Tanhäuserová V, et al. Metallothionein a jeho role v detoxikaci těžkých kovů a predispozici k chorobám. *Prakt. Lék.* 2012; 6: 322-326.

Rickert CH, Paulus W. Prognosis-related histomorphological and immunohistochemical markers in central nervous system tumors of childhood and adolescence. *Acta Neuropathol.* 2005; 109: 69-92.

Samson SL, Gedamu L. Molecular analyses of metallothionein gene regulation. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 1998; 59: 257-288.

Sauerbrey A, Zintl F, Volm M. Expression of metallothionein in initial and relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Ann. Hematol.* 1994; 69: 111-115.

Shi YH, Amin K, Sato B, et al. The metal-responsive transcription factor -1 protein is elevated in human tumors. *Cancer Biol. Ther.* 2010; 9: 469-476.

Shimoda R, Achanzar WE, Qu E, et al. Metallothionein is a potential negative regulator of apoptosis. *Toxicol. Sci.* 2003; 73: 294-300.

Schmitz KJ, Muller CI, Reis H, et al. Combined analysis of hypoxia-inducible factor 1 alpha and metallothionein indicates an aggressive subtype of colorectal carcinoma. *Int. J. Colorectal Dis.* 2009; 24: 1287-1296.

Singh VK., Hanson J. Assessment of metallothionein and antibodies to metallothionein in normal and autistic children having exposure to vaccine-derived thimerosal. *Pediatr. Allergy Immunol.* 2006; 17: 291-296.

Smith E, Drew PA, Tian ZQ, et al. Metallothionein 3 expression is frequently down regulated in oesophageal squamous cell carcinoma by DNA methylation. *Mol. Cancer* 2005; 4: 42.

Sochor J, Hynek D, Krejcová L, et al. Study of metallothionein role in spinocellular carcinoma tissues of head and neck tumours using brdicka reaction. *Int. J. Electrochem. Sci.* 2012; 7: 2136-2152.

Suganuma K, Kubota T, Saikawa Y, et al. Possible chemoresistance-related genes for gastric cancer detected by edna microarray. *Cancer Sci.* 2003; 94: 355-359.

Sunada F, Itabashi M, Ohkura H, et al. P53 negativity, cdc25b positivity, and metallothionein negativity are predictors of a response of esophageal squamous cell carcinoma to chemoradiotherapy. *World J. Gastronetrol* 2005; 11: 5696-5700.

Surowiak P, Materna V, Maciejczyk A, et al. Nuclear metallothionein expression correlates with cisplatin resistance of ovarian cancer cells and poor clinical outcome. *Virchows. Arch.* 2007; 450: 279-285.

Sutherland DEK, Stillman MJ. The magic numbers of metallothionein. *Metallomics* 2011; 8: 444-463.

Suzuki K, Nakajima K, Otaki N, et al. Methallothionein in developing human brain. *Biol. Signals* 1994; 3: 188-192.

Szelachowska J, Dziegiel P, Jelen-Krzeszewka J, et al. Correlation of metallothionein expression with clinical progression of cancer in the oral cavity. *Anticancer Res.*, 2009; 29: 589-595.

Takahashi S. Molecular functions of metallothionein and its role in hematological malignancies. *J. Hematol. Oncol.* 2012; 5: 1-8.

Takaishi M, Sawada M, Shimada A, et al. Protective role of metallothionein in benzo(a)pyrene-induced DNA damage. *J. Toxicol. Sci.* 2009; 34: 449-58.

Theocharis SE, Margeli AP, Klijanienko JT, et al. Metallothionein expression in human neoplasia. *Histopathology* 2002; 40: 143-151.

Thirummorthy N, Shyam SA, Manisenthil K, et al. A review of metallothionein isoforms and their role in pathophysiology. *World J. Surg. Oncol.* 2011; 20: 54-69.

Tran CD, Sundar S, Howarth GS. Dietary zinc supplementation and methotrexate-induced small intestinal mucositis in metallothionein-knockout and wild type mice. *Cancer Biol. Ther.* 2009; 17: 8.

Trayhurn P. Metallothionein gene expression and secretion in white adipose tissue. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2000; 279: 2329-2335.

Tsukahara H. Biomarkers for Oxidative Stress: Clinical Application in Pediatric Medicine. *Curr. Med. Chem.* 2007; 14: 339-351.

Weinlich G, Eisendle K, Hassler E, et al. Metallothionein – overexpression as a highly significant prognostic factor in melanoma: a prospective study on 1270 patients. *Br J Cancer* 2006; 27: 835-841.

Weryska P, Pula B, Muszczanska-Bernhard B, et al. Expression of metallothionein-III in patients with non-small cell lung cancer. *Anticancer Res.* 2013; 33: 965-974.

Wie H, Desouki M, Lin S, et al. Differential expression of metallothioneins (Mts)1,2, and 3 in response to zinc treatment in human prostate normal and malignant cells and tissues. *Mol. Cancer* 2008; 7: 11-11.

Wong HR, Shanley TP, Sakthivel B, et al. Genome level expression profiles in pediatric septic shock indicate a role for altered zinc homeostasis in poor outcome. *Physiol Genomics* 2007; 30: 146-155.

Woods JS, Heyer NJ, Russo JE, et al. Modification of neurobehavioral effects of mercury by genetic polymorphism of metallothionein in children. *Neurotoxicol. Teratol.* 2013; 39: 36-44.

Yang MY, Kroft SH, Chitambar CR. Gene expression analysis of gallium resistant and gallium-sensitive lymphoma cells reveals a role for metal-responsive transcription factor-1, metallothionein-2A, and zinc transporter-1 in modulating the antineoplastic activity of gallium nitrate. *Mol. Cancer Ther.* 2007; 6: 633-643.

Yap XL, Tan HY, Huang JX, et al. Over-expression of metallothionein predicts chemoresistance in breast cancer. *J. Pathol.* 2009; 217: 563-570.

Yaprak D, Yalcin B, Pinar A, et al. Nutritional status of children with cancer and serum selenium and zinc levels. *Pediatr. Blood Cancer* 2010; 55: 949-950.