

A STUDY OF METALLOTHIONEIN CONTENT IN FISH TISSUES

STUDIUM OBSAHU METALLOTHIONEINU V TKÁNÍCH RYB

Blašík O.¹⁾, Adam V.^{1,2)}, Petřlová J.¹⁾, Beklová M.³⁾, Sures B.⁴⁾, Kizek R.¹⁾

¹⁾Department of Chemistry and Biochemistry, Mendel University of Agriculture and Forestry, Zemedelska 1, 613 00 Brno, Czech Republic;

²⁾Department of Analytical Chemistry, Masaryk University Faculty of Science, Kotlarska 2, 611 37 Brno, Czech Republic;

³⁾Department of Veterinary Ecology and Environment Protection, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Palackého 1-3, 612 42 Brno, Czech Republic;

⁴⁾Universität Karlsruhe, Ökologie-Parasitologie, D-76128 Karlsruhe, Germany

E-mail: OBlastik@seznam.cz, kizek@sci.muni.cz

ABSTRACT

The aim of this work was to use the chronopotentiometric stripping analysis (CPSA) for studying of binding of heavy metals (Cd, Cu and Ag) to metallothionein (MT) and to determine MT in perch (*Perca fluviatilis*) tissues. *Material and Methods:* An adsorptive transfer stripping technique (AdTS) in connection with CPSA were used for study and determination of MT. Electrochemical measurements were performed with AUTOLAB Analyser connected to VA-Stand 663, using a standard cell with three electrodes. Muscles, gonads, liver and spleen of perch were used as a biological sample. *Results:* We optimized the determination of MT by AdTS CPSA technique in biological samples. We observed the highest concentration of MT in spleen and liver (100 – 350 ng MT/g) followed by gonads (25 – 250 ng MT/g) and muscles (1 – 20 ng MT/g). The determined content of MT in perch tissues probably relates with the fish age and, therefore, with their exposition by heavy metals contained in Svatka River. Moreover, we wanted to study interaction of Cd, Cu and Ag with MT by AdTS CPSA. We observed decrease in MT signal with increasing heavy metal concentration. Cadmium have the highest affinity to MT followed by silver and copper (Cd>>Ag>Cu). AdTS CPSA technique is suitable for sensitive determination of MT in fish tissues and for studying of binding of heavy metals to MT.

Keywords: metallothionein, chronopotentiometric stripping analysis, electrochemical detection, catalytic signal, peak H, perch, heavy metals.

ABSTRAKT

Cílem práce bylo použít chronopotenciometrickou rozpouštěcí analýzu (CPSA) pro studium vazby těžkých kovů (Cd, Cu a Ag) na metallothionein a detekce obsahu metallothioneinu ve tkáních okouna říčního (*Perca fluviatilis*). *Materiály a Metody:* Adsorptivní přenosová rozpouštěcí technika (AdTS) ve spojení s CPSA byla použita pro stanovení MT. Electrochemická měření jsme provedli na přístroji AUTOLAB Analyser spojeným s VA-Stand 663, se standardní celou a třemi elektrodami. Svaly, gonády, játra a slinivka okouna byly použity jako biologický vzorek. *Výsledky:* Optimalizovali jsme stanovení MT pomocí AdTS CPSA techniky v biologických vzorcích. Nejvyšší koncentraci MT jsme zjistili ve

slinivce a játrech (100 – 350 ng MT/g), dále v gonádách (25 – 250 ng MT/g) a svalech (1 – 20 ng MT/g). Zjištěný obsah MT ve tkáních okouna zřejmě souvisí s věkem ryby, a tedy s její expozicí těžkým kovům z řeky Svratky. Mimoto jsme studovali interakci Cd, Cu a Ag s MT pomocí AdTS CPSA. Se stoupající koncentrací kovu klesá signál MT. Kadmium mělo nejvyšší afinitu k MT, dále stříbro a měď ($Cd \gg Ag > Cu$). AdTS CPSA technika je vhodná pro senzitivní stanovení MT ve tkáních ryb a pro studium vazby těžkých kovů na MT.

Klíčové slova: metalothionein, chronopotenciometrická rozpouštěcí analýza, elektrochemická detekce, katalytický signál, pík H, okoun, těžké kovy.

ÚVOD

Metody genomiky umožnily poznání sekvence řady genomů organismů včetně lidského[1,2]. Toto poznání však upozornilo na významnou skutečnost, že genů není tak mnoho a že za procesy v živých systémech jsou zodpovědné proteiny. A začal se formovat nový směr – proteomika, který přináší nové náhledy na funkci metabolismu organismů [3,4]. V životním prostředí organismů se vyskytují rozdílné toxické polutanty včetně těžkých kovů [5,6]. Metalothionein byl objeven v roce 1957 a výzkum je stále velmi intenzivní. V databázi **Expert Protein Analysis System (ExPASy)** Proteomics Server byly v roce 2005 popsány čtyři skupiny metalothioneinů: MT1, MT2, MT3 a MT4 [7]. Molekulové hmotnosti těchto metalothioneinů se pohybují od 6,0–6,9 kDa, počet aminokyselin v polypeptidickém řetězci se pohybuje kolem 61 a hodnota isoelektrického bodu kolísá kolem hodnoty 8.3. Pouze MT3 [8-10] má ve své molekule 68 aminokyselin a hodnota isoelektrického bodu byla vypočtena jako 4.8; více detailních informací je uvedeno v práci [11]. Doposud nejvíce zařazených a identifikovaných metalothioneinů je ve skupině MT1[7,11] (MT1A, MT1B, MT1E, MT1F, MT1G, MT1H, MT1I, MT1K, MT1L a MT1R). Absolutně nejvíce je zastoupena aminokyselina cystein ve více jako 30 %. Mezi další významně zastoupené aminokyseliny patří A, K, S a G a v molekule MT se nevyskytují aromatické aminokyseliny. Molekuly metalothioneinu vytváří díky cysteinů struktury označované jako Metal-thiolate clusters se dvěma vazebnými doménami pro atomy kovů označované jako α a β .

Analytické metody detekce metallothioneinu

Pro určení množství MT jsou nejčastěji využívány analytické postupy využívající kapilární a gelovou elektroforézu. Výrazně méně je využíváno vysoko-účinné kapalinové chromatografie a nebo afinitní chromatografie či spektrofotometrie [12]. Analýza proteinů pomocí elektrochemických metod není příliš rozšířená, ale v posledních letech nabývá znovu na významu jejich značná senzitivita [13-18]. Základy detekce proteinů položil před více jako 70 lety Prof. Rudolf Brdička. Brdička objevil elektrochemický katalytický signál proteinů v přítomnosti kobaltitých solí [19-21]. Vyvinutá a popsaná metodika byla v 50 letech minulého století využívána jako senzitivní a selektivní nástroj pro rozlišení nádorové a normální tkáně [21,22]. Elektrochemická detekce byla vytlačena elektroforetickými metodami. Na počátku 80 let minulého století byla metodika Prof. Brdičky znovu modifikována [23,24] a výrazně upravována pro detekci a analýzu metalothioneinů a to

především u mořských organismů [25-28]. Popsaná metoda je do současné doby velmi oblíbená pro svou snadnost a spolehlivost získaných experimentálních výsledků. Další možností detekce proteinů je objev Prof. Heyrovského, že proteiny usnadňují uvolnění vodíku ze základního elektrolytu. Této skutečnosti nebyla věnována dlouhý čas žádná pozornost pro obtížnou interpretaci získaných experimentálních dat [29-31]. Ukazuje se, že katalytický signál označovaný jako pík H je možné využívat pro vysoce senzitivní stanovení řady proteinů včetně MT [11,13-17,29,32-35]. Vlastní analytické stanovení výrazným způsobem usnadnilo zavedení galvanostatického (přístrojem se vkládá malý proud a měří se potenciál jako funkce času; dt/dE) měření katalytického signálu.

MATERIAL AND METHODS

Chemikálie

Metalothionein (MW 7143), obsahoval 5,9 % Cd a 0,5 % Zn, a byl zakoupen u Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) byl získán od Molecular Probes (Eugen, Oregon, USA). Další chemikálie byly zakoupeny od Sigma Aldrich. Zásobní roztok MT byl připraven v ACS vodě jako 10 μg MT/ml s 1 mM TCEP [36] a uchováván v mrazáku při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ [37]. Pracovní roztoky byly ředěny každý den ředěním zásobního roztoku. pH bylo měřeno za použití WTW inoLab Level 3 instrument (Weilheim, Německo), řízený pomocí osobního počítače a programu (MultiLab Pilot; Weilheim, Německo). pH-elektroda (SenTix H) pro kalibraci byl použit set WTW pufrů (Weilheim, Německo).

Elektrochemické měření

Elektrochemické měření bylo provedeno za použití Autolab analyzátoru (EcoChemie, Nizozemí) ve spojení s VA-Stand 663 (Metrohm, Zurich, Švýcarsko). Systém elektrod je složen z rtuťové kapkové elektrody jako pracovní elektrody, Ag/AgCl/3 M KCl referentní elektrody a uhlíková tyčka jako pomocná elektroda. Získaná data byla upravena matematickou korekcí pomocí software GPES 4.4 EcoChemie [38]. Adsorptivní přenosová technika v kombinaci s chronopotenciometrickou rozpouštěcí analýzou (AdTS CPSA). CPSA parametry byly následující: čas akumulace 90 s, I_{str} $-1\text{ }\mu\text{A}$. Po adsorpci MT na HMDE byla elektroda omyta a přenesena do elektrochemické nádoby obsahující 0,1 M H_3BO_3 + 0,05 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (Sigma Aldrich, ACS).

Příprava vzorku

Vzorky pro stanovení MT byly připravovány podle postupu dříve publikovaného [16]. Vzorek byl umístěn na 15 min do $99\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Eppendorf 5430, USA) po té ochlazen na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Denaturovaný homogenát byl centrifukován při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 000 g po dobu 30 min. (Eppendorf 5402, USA).

VÝSLEDKY A DISKUSE

V našich experimentech byl MT stanoven technikou adsorptivní přenosové techniky v kombinaci s chronopotenciometrií při aplikovaném proudu 1 μ A. Metallothionein v množství 1 ng/ml poskytoval velmi dobře reprodukovatelný signál při potenciálu píku H kolem -1.70 V. MT byl adsorbován na povrch pracovní elektrody pro různou dobu akumulace. Získali jsme závislost s pozorovaným maximem při 90 s. Koncentrační závislost nebyla v celém úseku lineární a byla rozdělena na dva lineární úseky 0- 1,2 ng MT/ml ($y = 14386x + 129,55$; $R^2 = 0,9916$) a 2 – 20 ng MT/ml ($y = 2134,2x + 24520$; $R^2 = 0,996$), $n = 3$, S. D. = 8%.

*Detekce metallothioneinu ve tkáních *Perca fluviatilis**

Uvedený postup byl dále ověřován pro detekci MT v biologických vzorcích. Pro naše experimenty bylo využito tkání ryb. Okouni velikosti 10 – 20 cm (*Perca fluviatilis*) byly vyloveni v řece Svatce v létě roku 2004 a jednotlivé tkáně (svalovina, gonady, játra a slezina) do doby analýzy MT zamrazeni na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pomocí námi vypracovaného postupu byl detekován obsah metallothioneinu v jednotlivých tkáních okounů. Největší obsahy MT byly pozorovány v játrech a slezině (350 – 100 ng MT/g). Z dostupných údajů je známo, že významný je obsah MT také v gonádách všech obratlovců, v našich experimentálních vzorcích byl obsah (250 – 25 ng MT/g). Předpokládá se, že v těchto orgánech probíhá velmi intenzivní metabolismus kovů, a proto jsou zde detoxikační mechanismy velmi účinné a tak je i obsah MT relativně vysoký [39,40]. Avšak námi nově vyvinutá a navržená metodika nabízí stanovení MT i v tkáních, kde to do posud nebylo možné. Z tohoto důvodu byl obsah MT také stanoven ve svalovině zkoumaných ryb. Zjistili jsme, že obsahy MT byly skutečně velmi nízké a pohybovaly se v jednotkách až desítkách ng/g. Všechny zkoumané ryby byly zdravé a nebyly vystaveny žádnému kontrolovanému experimentálnímu vystavení těžkým kovům. Koncentrace těžkých kovů v řece jsou nízké, avšak obsah MT v rybách zcela jistě ovlivňují. Proto zjištěný obsah MT pravděpodobně souvisí jednak s i) metabolismem jednotlivé ryby a ii) délkou jejího života, tedy její expozicí těžkým kovům.

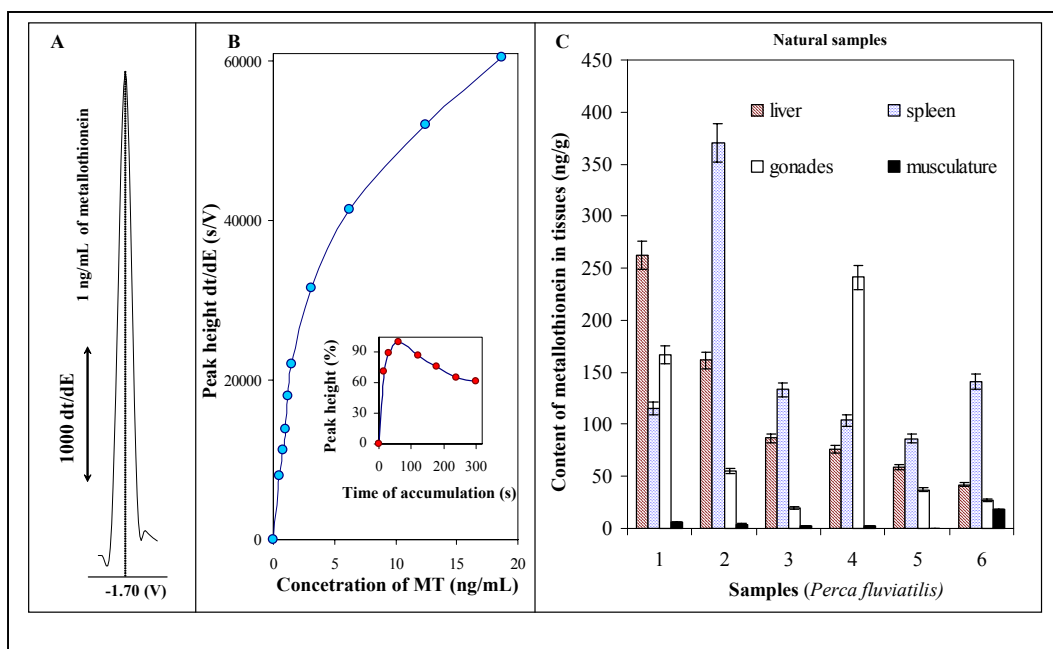
Interakce metallothioneinu s kadmíem, mědí a stříbrem

Velmi zajímavé je studium vazby těžkých kovů přímo do molekuly MT, které nabízí možnosti dalšího využití pro diagnostiku, sledování terapeutické koncentrace a konstrukce biosenzorů [41,42]. Metodou, která umožní studium interakce těžkého kovu a MT je přenosová technika využívající několikanásobné přemístění modifikované pracovní elektrody [42]. V našich experimentech bylo technologický postup následující: i) nejdříve byl na povrchu pracovní elektrody adsorbován MT, ii) elektroda byla omyta v destilované vodě, iii) umístěna do roztoku těžkého kovu, iv) znovu omyta v pufru a v) umístěna do nádoby, kde probíhá vlastní elektrochemické měření.

MT bez přítomného těžkého kovu poskytoval dobře vyvinutý a reprodukovatelný signál při potenciálu -1.65 V . Vzniklý potenciálový posun byl pravděpodobně způsoben použitou přenosovou technologií. V našich dalších experimentech byl studován vliv tří

těžkých kovů (kadmia, mědi a stříbra) na změnu katalytického signálu MT. Zjistili jsme, že kadmium, měď i stříbro snižují katalytický signál. Nejvýraznější změna signálu byla pozorována když MT byl vystaven rozdílným koncentracím kadmia. V přítomnosti 50 μM Cd došlo k poklesu katalytického signálu MT přibližně 10x. Na získaném chronopotenciogramu byl při potenciálu kolem -0.55 V pozorován signál, který odpovídá kadmiu navázanému do struktury MT. Při aplikaci nižších koncentrací těžkých kovů bylo možné pozorovat prudký pokles katalytického signálu MT u kadmia, mědi i stříbra. Při interakcích s vyšší koncentrací kadmia, mědi i stříbra byl pozorován pozvolnější pokles signálu MT. Katalytický signál MT nejvýznamněji klesal u kadmia, stříbra a nejméně u mědi. V případě aplikované koncentrace 100 μM kadmia byl pozorovaný signál MT velmi nízký v porovnání se signálem MT. Ze získaných experimentálních výsledků je zřejmé, že nejvyšší afinita aplikovaných těžkých kovů k námi použitému MT byla následující: $\text{Cd} \gg \text{Ag} > \text{Cu}$. Potenciál katalytických signálů se zvyšující aplikovanou koncentrací posouval směrem do negativních potenciálů. V případě interakce kadmia byla změna potenciálu velmi malá (kolem 10 mV), avšak v případě mědi byla pozorována změna kolem 100 mV.

Obr. 1 CPESA elektrochemický záznam 1 ng MT/ml (A). Vliv koncentrace MT na výsledný CPESA signál (B). Změna obsahu metalothioneinu v tkáních ryb (C).



ZÁVĚR

MT představuje nový potenciální marker pro diagnostiku nádorových onemocnění a nebo zátěže životního prostředí člověka. Z tohoto důvodu je nezbytné popsat vhodné analytické postupy, které umožní snadnou, rychlou, přesnou a levnou diagnostiku [43,44]. Jak se ukazuje, elektrochemické metody mohou tyto podmínky splnit.

PODĚKOVÁNÍ

Práce na tomto projektu byla podporována granty: GAČR 525/04/P132, RASO 8/2005, MŠMT 6215712402 a FRVŠ 2348/F4a.

LITERATURA

- [1] T.G. Wolfsberg, J. McEntyre and G.D. Schuler Guide to the draft human genome, *Nature* 409 (2001) 824-826.
- [2] E.S. Lander et al.: Initial sequencing and analysis of the human genome, *Nature* 409 (2001) 860-921.
- [3] W. Maret Exploring the zinc proteome, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 19 (2004) 15-19.
- [4] J. Szpunar Advances in analytical methodology for bioinorganic speciation analysis: metallomics, metalloproteomics and heteroatom-tagged proteomics and metabolomics, *Analyst* 130 (2005) 442-465.
- [5] G.F. Nordberg Cadmium and health in the 21st Century - historical remarks and trends for the future, *Biometals* 17 (2004) 485-489.
- [6] J. Zehnalek, V. Adam and R. Kizek Influence of heavy metals on production of protecting compounds in agriculture plants, *Listy Cukrov.* 120 (2004) 222-224.
- [7] Expert Protein Analysis System, ExPASy Proteomics Server, Swiss Institute of Bioinformatics, Basel, 2005, pp. <http://www.expasy.ch/>.
- [8] R.D. Palmiter, S.D. Findley, T.E. Whitmore and D.M. Durnam MT-III, a brain specific member of the metallothionein gene family, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 6333-6337.
- [9] M. Aschner, M.G. Cherian, C.D. Klaassen, R.D. Palmiter, J.C. Erickson and A.I. Bush Metallothioneins in brain - The role in physiology and pathology, *Toxicol. Appl. Pharm.* 142 (1997) 229-242.
- [10] S. Kameo, K. Nakai, N. Kurokawa, T. Kanehisa, A. Naganuma and H. Satoh Metal components analysis of metallothionein-III in the brain sections of metallothionein-I and metallothionein-II null mice exposed to mercury vapor with HPLC/ICP-MS, *Anal. Bioanal. Chem.* 381 (2005) 1514-1519.
- [11] J. Petrlova, O. Blastik, R. Prusa, J. Kukacka, D. Potesil, R. Mikelova, V. Adam, J. Zehnalek and R. Kizek Using of electrochemical methods for studying of metallothionein content in the human blood serum of a patient poisoned by lead and treated by platinum, *Biomed. Papers* 149 (2005) in press.
- [12] M. Dabrio, A.R. Rodríguez, G. Bordin, M.J. Bebianno, M. De Ley, I. Šestáková, M. Vašák and M. Nordberg Recent developments in quantification methods for metallothionein, *J. Inorg. Biochem.* 88 (2002) 123-134.
- [13] R. Prusa, O. Blastik, D. Potesil, L. Trnkova, J. Zehnalek, V. Adam, J. Petrlova, F. Jelen and R. Kizek Metallothioneins as a marker of tumor diseases, *Clin. Chem.* 51 (2005) A.

- [14] R. Prusa, R. Kizek, L. Trnkova, J. Vacek and J. Zehnalek Study of relationship between metallothionein and heavy metals by CPSA method, *Clin. Chem.* 50 (2004) A28-A29.
- [15] R. Prusa, D. Potesil, M. Masarik, V. Adam, R. Kizek and F. Jelen Fast and sensitive electrochemical detection of native, denatured, and aggregated forms of tumor suppressor protein p53, *Mol. Biol. Cell* 15 (2004) 249A-249A.
- [16] R. Kizek, L. Trnkova and E. Palecek Determination of metallothionein at the femtomole level by constant current stripping chronopotentiometry, *Anal. Chem.* 73 (2001) 4801-4807.
- [17] L. Trnkova, R. Kizek and J. Vacek Catalytic signal of rabbit liver metallothionein on a mercury electrode: a combination of derivative chronopotentiometry with adsorptive transfer stripping, *Bioelectrochemistry* 56 (2002) 57-61.
- [18] J. Vacek, Z. Andrysik, L. Trnkova and R. Kizek Determination of azidothymidine - an antiproliferative and virostatic drug by square-wave voltammetry, *Electroanalysis* 16 (2004) 224-230.
- [19] R. Brdicka Application of the polarographic effect of proteins in cancer diagnosis, *Nature* 139 (1937) 330-330.
- [20] R. Brdicka Polarographic investigations in serological cancer diagnosis, *Nature* 139 (1937) 1020-1021.
- [21] J. Heyrovsky Polarographic research on cancer, *Nature* 142 (1938) 317-319.
- [22] R. Brdicka Zur frage nach der natur der polarographisch feststellbaren serumveränderungen bei Krebs., *Klinische Wochenschrift* 18 (1938) 305-308.
- [23] E. Palecek and Z. Pechan Estimation of nanogram quantities of proteins by pulse polarographic techniques, *Anal. Biochem.* 42 (1971) 59-71.
- [24] M. Brazdova, R. Kizek, L. Havran and E. Palecek Determination of glutathione-S-transferase traces in preparations of p53 C-terminal domain (aa320-393), *Bioelectrochemistry* 55 (2002) 115-118.
- [25] R.W. Olafson and P.E. Olsson Electrochemical detection of metallothionein, *Methods in Enzymol.* 205 (1991) 205-213.
- [26] R.W. Olafson and R.G. Sim Electrochemical approach to quantitation and characterization of metallothioneins, *Anal. Biochem.* 100 (1979) 343-351.
- [27] J.A.J. Thompson and R.P. Cosson An improved electrochemical method for the quantification of metallothioneins in marine organisms, *Marine Environ. Res.* 11 (1984) 137-152.
- [28] A. Temara, M. Warnau, P. Dubois and W.J. Langston Quantification of metallothioneins in the common asteroid *Asterias rubens* (Echinodermata) exposed experimentally or naturally to cadmium, *Aquatic Toxicol.* 38 (1997) 17-34.

- [29] R. Kizek, J. Vacek, L. Trnkova, B. Klejdus and L. Havel Application of catalytic reactions on a mercury electrode for electrochemical detection of metallothioneins, *Chem. Listy* 98 (2004) 166-173.
- [30] M. Tomschik, L. Havran, M. Fojta and E. Paleček Constant current chronopotentiometric stripping analysis of bioactive peptides at mercury and carbon electrodes, *Electroanalysis* 10 (1998) 403–409.
- [31] M. Tomschik, L. Havran, E. Paleček and M. Heyrovský The "presodium" catalysis of electroreduction of hydrogen ions on mercury electrodes by metallothionein. An investigation by constant current derivative stripping chronopotentiometry, *Electroanalysis* 12 (2000) 274–278.
- [32] L. Havran, S. Billova and E. Palecek Electroactivity of avidin and streptavidin. Avidin signals at mercury and carbon electrodes respond to biotin binding, *Electroanalysis* 16 (2004) 1139-1148.
- [33] M. Masarik, A. Stobiecka, R. Kizek, F. Jelen, Z. Pechan, W. Hoyer, T.M. Jovin, V. Subramaniam and E. Palecek Sensitive electrochemical detection of native and aggregated alpha-synuclein protein involved in Parkinson's disease, *Electroanalysis* 16 (2004) 1172-1181.
- [34] E. Palecek, M. Masarik, R. Kizek, D. Kuhlmeier, J. Hassmann and J. Schulein Sensitive electrochemical determination of unlabeled MutS protein and detection of point mutations in DNA, *Anal. Chem.* 76 (2004) 5930-5936.
- [35] M. Strouhal, R. Kizek, J. Vacek, L. Trnkova and M. Nemec Electrochemical study of heavy metals and metallothionein in yeast *Yarrowia lipolytica*, *Bioelectrochemistry* 60 (2003) 29-36.
- [36] R. Kizek, J. Vacek, L. Trnkova and F. Jelen Cyclic voltammetric study of the redox system of glutathione using the disulfide bond reductant tris(2-carboxyethyl)phosphine, *Bioelectrochemistry* 63 (2004) 19-24.
- [37] J. Petrlova, D. Potesil, R. Mikelova, O. Blastik, V. Adam, L. Trnkova, F. Jelen, R. Prusa, J. Kukacka and R. Kizek Attomole voltammetric determination of metallothionein, *Electrochim. Acta* submitted (2005).
- [38] AUTOLAB, GPES Manual, in: Autolab Electrochemical Instruments, Eco Chemie BV, Utrecht, 1997.
- [39] G. Nordberg, T. Jin, P. Leffler, M. Svensson, T. Zhou and M. Nordberg Metallothioneins and diseases with special reference to cadmium poisoning, *Analisis* 28 (2000) 396-400.
- [40] M. Nordberg and G.F. Nordberg Toxicological aspects of metallothionein, *Cell. Mol. Biol.* 46 (2000) 451-463.
- [41] V. Adam, J. Zehnalek, J. Petrlova, D. Potesil, B. Sures, L. Trnkova, F. Jelen, J. Vitecek and R. Kizek Phytochelatin modified electrode surface as a sensitive heavy-metal ion biosensor, *Sensors* 5 (2005) 70-84.

- [42] V. Adam, J. Petrlova, D. Potesil, J. Zehnalek, B. Sures, L. Trnkova, F. Jelen and R. Kizek Study of metallothionein modified electrode surface behaviour in the presence of heavy metal ions - biosensor, *Electroanalysis* DOI: 10.1002/elan.200403264 (2005).
- [43] V. Adam, J. Petrlova, D. Potesil, P. Lubal, J. Zehnalek, B. Sures and R. Kizek New electrochemical biosensor to determine platinum cytostatics to DNA structure, *Chem. Listy* 99 (2005) 353-393.
- [44] S. Billova, R. Kizek, F. Jelen and P. Novotna Square-wave voltammetric determination of cefoperazone in a bacterial culture, pharmaceutical drug, milk, and urine, *Anal. Bioanal. Chem.* 377 (2003) 362-369.