

**WŁAŚCIWOŚCI BIOLOGICZNE METALOTIONEIN
I ICH UDZIAŁ W PROCESACH
OKSYDOREDUKCYJNYCH W KOMÓRKACH,
ZE SZCZEGÓLNYM UWZGLĘDNIENIEM
OŚRODKOWEGO UKŁADU NERWOWEGO CZŁOWIEKA**

BIOLOGICAL PROPERTIES OF THE METALLOTHIONEINS
AND THEIR PARTICIPATION IN THE PROCESSES OF OXIDATION-REDUCTION
IN CELLS, WITH THE PARTICULAR EMPHASIS ON THE HUMAN CENTRAL
NERVOUS SYSTEM

Izabella M. STĘPKOWSKA

Katedra i Zakład Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

Streszczenie: Metalotioneiny (MTs), jako niskocząsteczkowe białka bogate w aktywne grupy sulfhydrylowe, których synteza i okres półtrwania są ściśle związane z aktywnością jonów cynku wewnątrz komórek, wywierają istotny wpływ na wartość potencjału antyoksydacyjnego środowiska wewnątrz- i zewnątrzkomórkowego. MTs współodpowiadają za homeostazę pierwiastków śladowych; oddziałują w procesach regulacji ekspresji genów; wykazują właściwości antyapoptotyczne. Mają zdolność wiązania i neutralizacji zewnątrzpo pochodnych związków elektrofilowych. Przeciwutleniająca właściwość omawianych białek zasługuje na szczególną uwagę, gdyż synteza MTs w warunkach stresu oksydacyjnego – w przeciwieństwie do aktywności GSH oraz podstawowych enzymów antyoksydacyjnych – ulega długotrwałemu nasileniu. Ośrodkowy układ nerwowy (OUN) człowieka jest szczególnie narażony na działanie wysokich stężeń reaktywnych form tlenu (RFT), gdyż zużywa aż 20% puli tego pierwiastka pobranej przez organizm. Stwierdzono, iż wymiar szkodliwych następstw stresu oksydacyjnego w mózgu jest odwrotnie proporcjonalny do zawartości MTs. W mózgu człowieka MTs występują w 3 podstawowych izoformach: MT-1, MT-2, MT-3. MT-1/-2 syntetyzowane są obficie w astrocytach. Izoforma MT-3 jest charakterystyczna dla komórek nerwowych; bierze istotny udział w regulacji aktywności jonów cynku, zwłaszcza w neuronach kory nowej i węchomózgowia. Cynk jest niezbędny dla rozwoju i prawidłowego funkcjonowania OUN człowieka. Jest on silnym stymulatorem syntezy MTs oraz współuczestniczy w wewnątrzustrojowych reakcjach oksydo-redukcyjnych. Metalotioneinom przypisywany jest jednocześnie niekorzystny udział w procesie złośliwienia nowotworów. Przypuszcza się, iż natężona synteza MTs w komórkach nowotworowych jest odpowiedzią na uporczywy stres oksydacyjny toczący się wewnątrz tych komórek i należy ją zaliczyć do głównych mechanizmów neutralizujących proapoptotyczne własności RFT.

Słowa kluczowe: metalotioneiny, potencjał antyoksydacyjny, cynk, mózg, reaktywne formy tlenu.

Summary: Metallothioneins (MTs), as the low molecular weight proteins rich in the active thiol groups, whose synthesis and half-life are closely connected with the activity of zinc ions inside the cell, exert a significant influence on the antioxidant capacity of the environment within and outside the cell. MTs influence the trace elements homeostasis, contribute to the gene expression process and demonstrate the anti-apoptotic properties. They have the ability to bind and neutralize exogenous electrophilic compounds. The antioxidant property of these proteins deserve a special attention, because the MTs synthesis, during the oxidative stress – in contrast to the activity of GSH and the basic antioxidant enzymes – undergo a durable intensification. The human central nervous system (CNS) is particularly exposed to high concentrations of reactive oxygen species (ROS), since it consumes up to 20% of the pool of oxygen absorbed by the body. It was found that the dimension of the harmful effects of oxidative stress in the brain is inversely proportional to the MTs quantity. MTs in the human brain occur in three main isoforms: MT-1, MT-2 and MT-3. MT-1/-2 are synthesized abundantly in astrocytes. Isoform MT-3 which is characteristic for nerve cells, takes an important part in the zinc ions activity regulation, especially in the neocortical and rhinencephalic neurons. Zinc is necessary for development and the proper functioning of the human CNS. It is a potent stimulator of the MTs synthesis, and participates in the oxidation-reduction processes. MTs are also assigned to take a negative part in the malignancy process of tumors. It is assumed that the intense MTs synthesis in the neoplastic cells is a response to the persistent oxidative stress rolling within these cells and should be placed into the main mechanisms for neutralizing pro-apoptotic properties of ROS.

Key words: metallothioneins, antioxidant potential, zinc, brain, reactive oxygen species.

Metalotioneiny (MTs) to izoformy niskocząsteczkowego białka bogatego w grupy sulfhydrylowe. Są szeroko rozpowszechnione w przyrodzie. Pomimo zasobnego zbioru informacji na temat budowy i właściwości biochemicznych metalotionein, powstałego w ciągu przeszło 50 lat prac badawczych, ich fizjologiczna rola do tej pory nie jest w pełni wyjaśniona. MTs zidentyfikowane zostały jako cząsteczki zabezpieczające ustrój przed toksycznym działaniem metali ciężkich (Cd, Pb, Hg) oraz współodpowiedzialne za homeostazę niezbędnych pierwiastków śladowych (cynk, miedź), odznaczają się bowiem wysokim powinowactwem do jonów metali przejściowych (zwłaszcza z grup Ib i IIb). W ostatnich latach, w licznych publikacjach naukowych, podkreśla się funkcję metalotionein jako wydajnego neutralizatora wolnych rodników oraz ich znaczący udział w regulacji procesu proliferacji komórek oraz procesu apoptozy.

CHARAKTERYSTYKA MTs

Badania nad MTs rozpoczęto w latach pięćdziesiątych XX w., gdy wyizolowano z kory nerek końskich białko zawierające dużą ilość kadmu [43]. Oczyszczone białko nazwano metalotioneiną, z racji jego zdolności do łatwego przyłączenia jonów metali dzięki wyjątkowo dużej zawartości grup tiolowych (-SH). Specjalistyczne badania pozwoliły na sukcesywne rozróżnienie kolejnych izoform tego bogatego w cysteinę białka i skłoniły naukowców do utworzenia kilku rodzin i podrodzin (wcześniej klas i podklas) metalotionein charakteryzujących się odrębną strukturalną tożsamością oraz zróżnicowaną rolą biologiczną.

MTs kręgowców, do których zaliczane są te wykryte w tkankach ludzkich, mają masę cząsteczkową w zakresie 6–7 kDa, zbudowane są z 60–68 reszt aminokwaso-

wych, przy czym 20 konserwatywnych reszt stanowią grupy cysteinyłowe [74]. MTs nie zawierają aminokwasów aromatycznych. W ich strukturze pierwszorzędowej na uwagę zasługują charakterystyczne dla danej rodziny MTs, powtarzające się, kilkuaminokwasowe fragmenty, w których reszty cysteinyłowe oddzielone są od siebie jednym lub dwoma różnymi od cysteiny aminokwasami (np. -cys-x-cys- lub -cys-x-x-cys-) lub występują obok siebie (-cys-cys-). Właściwość ta, przede wszystkim, stanowi o drugorzędowej strukturze cząsteczki i jej szczególnych właściwościach biochemicznych, ale również pozwala na opisanie metalotionein należących do danej rodziny jako polimerów o uproszczonym wzorze stechiometrycznym, np. [lys-(x)-(x)-cys-cys-x-cys-cys-pro-x-(x)-cys]_n.

Struktura drugorzędowa MTs nie tworzy mostków disulfidowych. Te niskocząsteczkowe białka składają się z dwóch domen, z których jedna (α) zawiera z reguły 11, a druga (β) – 9 reszt cysteiny. Reszty cysteinyłowe domen warunkują zdolność wiązania odpowiednio czterech oraz trzech dwuwartościowych jonów metali lub 12 (2×6) jonów jednowartościowych, w postaci dwóch oddalonych od siebie klasterów – gniazd molekularnych (każde w innej domenie jednej cząsteczki MT) [55, 77]. W komórkach powstają labilne mieszane kompleksy metalotionein z metalami, tzn. że jedna cząsteczka MT wiąże równocześnie np. jony cynku i miedzi, w zależności od aktywności poszczególnych jonów w otoczeniu. Powinowactwo metalotionein do poszczególnych metali jest zróżnicowane. Wiemy, iż w stanie fizjologicznym MTs związane są w przeważającej części z jonami cynku, jednak cynk z łatwością może ulec oddysocjowaniu i zastąpieniu przez metal o wyższym powinowactwie do MT (szereg metali o zmniejszającym się powinowactwie do MT: $\text{Hg}^{2+} \approx \text{Pb}^{2+} \approx \text{Pt}^{2+} \approx \text{Bi}^{3+} > \text{Cu}^+ \approx \text{Ag}^+ > \text{Cd}^{2+} > \text{Sb}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Ni}^{2+} \approx \text{Co}^{2+}$) [74].

Metalotioneiny występują w komórce również w postaci niezwiązanej z metalami – jako **apotioneiny** (apo-T = T) i jako takie uczestniczą w przemianach oksydacyjno-redukcyjnych. Wolne metalotioneiny są jednak bardziej podatne na działanie enzymów proteolitycznych; ich zawartość w komórce jest z reguły niższa niż zawartość MT. Niska wartość stałej dysocjacji dla klasterów metalotionein w warunkach doświadczalnych (np. dla $\text{Zn}_7\text{-T:K}_{\text{dys}} = 3,2 \times 10^{-13}$ mol/l; pH=7,4) świadczy, iż w formie związanej z metalami proteiny te są bardzo stabilne. Jony metali uwalniane są z połączenia z apotioneinami pod wpływem zmian w potencjale utleniająco-redukującym środowiska [5,23,36,38,41,74].

BIOSYNTENZA I WYSTĘPOWANIE MTs

Dotychczas z organizmu człowieka wyizolowano MTs należące do czterech typów (podrodzin) (MT-1, MT-2, MT-3, MT-4). Ustalono, iż MT-1 oraz MT-2 syntetyzowane są w sposób skoordynowany prawdopodobnie we wszystkich komórkach narządów obwodowych oraz mózgu [37,54,56,77]. Z tego względu te dwie ogólnoustrojowe izoformy MT w badaniach biochemicznych traktowane są jako podstawowe i często opisywane łącznie jako MT-1/MT-2 lub ogólnie, jako metalo-

tionieina – MT [14, 54, 55]. Natomiast izoforma MT-3, mająca jako apotioneina największą masę cząsteczkową (zbudowana z 68 reszt aminokwasowych), jest syntetyzowana w neuronach, choć ostatnio stwierdzono jej obecność także w komórkach niektórych nowotworów wywodzących się z tkanek obwodowych (pęcherza moczowego, nerki, gruczołu krokowego) oraz w prawidłowych komórkach kanalików nerkowych [40,61,66]. Izoformę MT-4 wykrywa się w komórkach nabłonka wielowarstwowego płaskiego [74].

TABELA 1. Miejsca występowania poszczególnych izoform ludzkiej metalotioneiny
TABLE 1. The places of the occurrence of different isoforms of the human metallothioneins

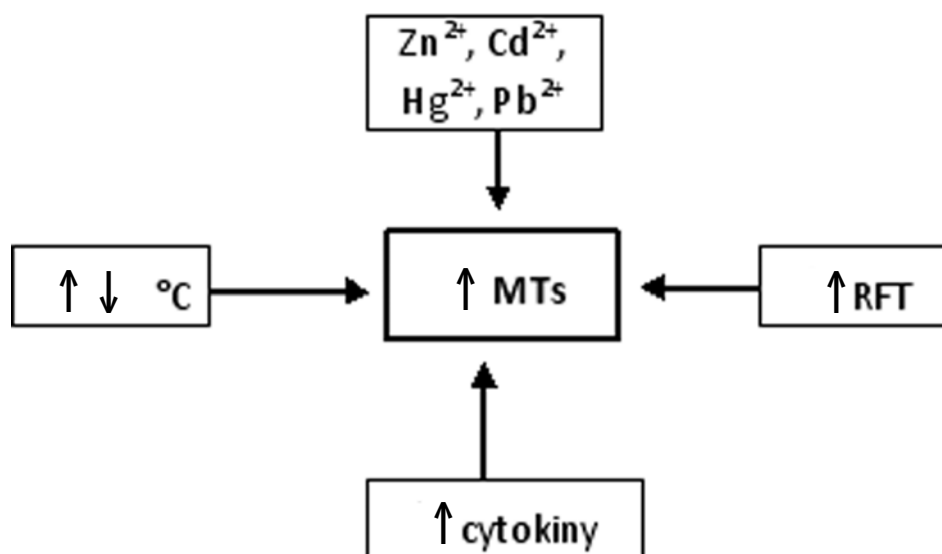
MT-1/2	wszystkie jądrzaste komórki tkanek obwodowych, komórki pełniące funkcje odżywcze i podporowe OUN, płyny śródtkankowe, osocze krwi
MT-3	neurony, komórki kanalików nerkowych, niektóre nowotwory
MT-4	komórki nabłonka wielowarstwowego płaskiego

W komórkach ludzkich, w obrębie chromosomu 16 w loci q13, wykryto kilkanaście genów kodujących izoformy apo-T, przy czym nie wszystkie z nich ulegają ekspresji. Spośród poznanych genów największa liczba (11) koduje podtypy metalotioneiny pierwszej: MT-1A, -1B, -1E, -1F, -1G, -1H, -1I, -1J, -1K, -1L, -1X. Dla pozostałych typów apo-T zidentyfikowano tylko po jednym genie (MT-2A, MT-3, MT-4) [55].

Biosynteza MTs indukowana jest przez różnorodne czynniki (ryc. 1), spośród których należy wymienić: jony metali, niektóre hormony (glukokortykoidy), cytokiny (zwłaszcza IL-6), wyłożony wysiłek fizyczny, liczne – zarówno egzo-, jak i endogenne – związki o właściwościach utleniających, mutageny, w tym promieniowanie X i jonizujące [56,74]. Należy więc przyjąć, iż istnieje wiele niespecyficzných czynników wywierających wpływ na ekspresję genów kodujących MTs.

W większości publikacji poświęconych budowie i funkcji MTs, białka te opisywane są jako wewnątrzkomórkowe [51, 55]. Jednak ostatnio, wzrastająca liczba doniesień przedstawia MTs jako cząsteczki aktywne również pozakomórkowo [40,47,54]. Istnieją też liczne, starsze prace dotyczące metod ilościowego oznaczania MTs w płynach ustrojowych człowieka oraz zwierząt doświadczalnych intoksykowanych kadmem i cynkiem [13].

W komórce, MTs obecne są głównie w cytoplazmie i mitochondriach. Zauważono, iż w zależności od fazy cyklu życia komórki, MTs ulegają przemieszczeniu do jądra komórkowego. Mały rozmiar i charakterystyczna, spięta struktura cząsteczek MTs umożliwiają im łatwe przechodzenie przez pory błony jądrowej. Translokację MT-1 i MT-2 do jądra komórkowego stwierdzono w fazie S cyklu oraz w przebiegu stresu oksydacyjnego [9,12,40]. Skupiska metalotioneiny obserwowano również w jądrach fibroblastów traktowanych wysokimi stężeniami pierwiastków śladowych: cynku, miedzi, żelaza [24, 25].



RYCINA 1. Główne czynniki pobudzające syntezę metalotionein – MTs
 FIGURE 1. The main factors stimulating the synthesis of metallothioneins

BIOLOGICZNE FUNKCJE MTs

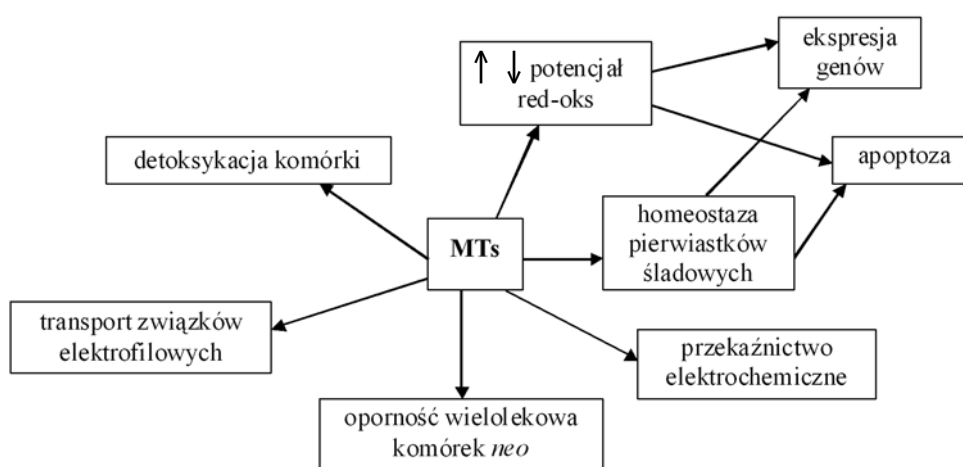
Metalotioneinom przypisuje się liczne funkcje (ryc. 2). Z racji wysokiego powinowactwa do jonów metali przejściowych pełnią **funkcję detoksykacyjną** wobec metali ciężkich i nadmiaru pierwiastków śladowych [9,77]. Tę właściwość MTs potwierdzono w licznych doświadczeniach prowadzonych zarówno *in vitro*, jak *in vivo*. Stwierdzono, iż w warunkach zwiększonego dostarczania jonów metali, znacząco wzrasta zawartość MTs w nerkach, wątrobie, jelitach zwierząt doświadczalnych [32]. Odnotowuje się istotną zależność między zawartością MTs w tkankach a stężeniem cynku. Poszczególnym izoformom metalotioneiny przypisuje się ważną rolę w zachowaniu **homeostazy mikroelementów** w ustroju oraz funkcję wewnątrzkomórkowego **rezerwuaru** tych pierwiastków (zwłaszcza cynku oraz miedzi) [9,24,36].

MTs traktowane są jako biologiczne **transportery** pierwiastków śladowych, których dystrybucja regulowana jest przez oddziaływania oksydacyjno-redukcyjne między MTs a innymi cząsteczkami, np. glutationem [9,14,23]. Utrzymuje się, iż MTs regulują ekspresję genów głównie przez dostarczanie jonów cynku licznym metaloproteinom i czynnikiem transkrypcyjnym [9,24, 25, 54, 55, 77].

Metalotioneiny wykazują znaczną zdolność **neutralizacji egzogennych toksycznych związków elektrofilowych** z uwagi na wysoki potencjał redukujący ich cząsteczki. Stwierdzono, iż MTs przyczyniają się do wielolekowej oporności komórek nowotworowych. Mogą z łatwością wiązać i dezaktywować np. związki

platyny wykorzystywane w chemioterapii choroby nowotworowej lub niwelować skutki stresu oksydacyjnego wywołanego np. przez podanie antracykliny [8,24,33, 38,68,69,70].

Opisywane białka biorą zasadniczy udział w neutralizacji reaktywnych form tlenu (RFT) i reaktywnych form azotu (RFA) powstałych w organizmie. Metalotioneina cynkowa bardzo szybko reaguje z anionorodnikiem ponadtlenkowym (stała szybkości reakcji $K=4 \times 10^5 \cdot 1 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) oraz z wyjątkowo toksycznym rodnikiem wodorotlenowym (stała szybkości reakcji $K=2,7 \times 10^{12} \cdot 1 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) [5]. Dowiedziono, iż MTs pełnią funkcję ochronną wobec DNA w warunkach stresu oksydacyjnego [11,21].



RYCINA 2. Procesy biochemiczne, w których uczestniczą metalotioneiny
 FIGURE 2. The biochemical processes in which metallothioneins participate

METALOTIONEINY A OŚRODKOWY UKŁAD NERWOWY

Mózg, choć stanowi jedynie ok. 2% masy ciała dorosłego człowieka, zużywa – głównie w procesie fosforylacji oksydacyjnej – aż 20% tlenu pobieranego przez organizm. Intensywnie prowadzony przez komórki OUN metabolizm tlenowy bez wątplenia przyczynia się do powstania w nich znacznych ilości RFT, albowiem głównym układem, w którym generowane są reaktywne formy tlenu, jest łańcuch oddechowy mitochondriów. Dodatkowo, tkanki OUN zawierają znaczne ilości nienasyconych kwasów tłuszczowych, z którymi szczególnie łatwo reagują RFT. Mózg wykazuje także niższą aktywność enzymów antyoksydacyjnych w porównaniu z innymi narządami [3,58]. Jednocześnie komórki tkanki nerwowej, w porównaniu z komórkami innych tkanek, nie ulegają wymianie w czasie życia człowieka. Jest więc wysoce prawdopodobne, iż OUN skuteczną obronę antyoksydacyjną zawdzięcza wydajnej syntezie metalotionein, zwłaszcza w komórkach gleju.

Synteza MTs w OUN zwiększa się wraz z rozwojem organizmu, począwszy od okresu embrionalnego [55, 77]. Wykazano, iż zawartość mRNAs dla MTs jest zmienna, w zależności od obszaru mózgu. Najintensywniejszą produkcję MTs stwierdza się w regionach zbudowanych z astrocytów, przy czym substancja biała obfituje w MT-1 i -2, natomiast nie zawiera MT-3 [21]. MT-1/-2 wytwarzane są także przez komórki spłotu naczyńnkowego i opon [55,77]. MT-1/-2 gromadzą się głównie peryferycznie w komórkach glejowych, na biegunie wierzchołkowym komórek pajęczynówki oraz nabłonka nerwowego, co wskazuje na ochronne lub/i transportowe właściwości MT [1,10,76,77].

Interesujące jest, iż przyrost zawartości mRNAs dla MT-1 oraz MT-2 i następujący po nim wzrost stężenia białek odnotowywano 24 godziny do 3 dni po urazie mózgu [54,55,56,77]. Stwierdzono, iż zachodzi wprost proporcjonalna zależność między wysoką zawartością MT-1/-2 w komórkach gleju a dobrym rokowaniem po uszkodzeniu OUN. Zauważono, iż w komórkach gleju graniczących z miejscem przerwania ciągłości tkanek mózgu, mniej więcej po upływie doby od urazu dochodzi do wzmożonej syntezy MT-1/-2, po czym następuje regeneracja neuronów i wzrost ich aksonów [14,77].

Jednak wzrost ekspresji genów kodujących MT-1 oraz MT-2 stwierdzono również w licznych patologich OUN, takich jak: czasowe niedokrwienie i hipoksja z następującą po nich reperfuzją, stwardnienie rozsiane, autoimmunologiczne zapalenie mózgu i rdzenia kręgowego, choroba Alzheimera, Parkinsona, Picka, jak również w zapaleniu nerwów obwodowych [19,56,72,75,77].

Izofорма MT-3, postrzegana jako charakterystyczna dla komórek nerwowych, jest w nich syntetyzowana w procesie ciągłym. Z największym natężeniem wytwarzana jest w komórkach kory nowej, hipokampa, opuszki węchowej i zakrętu zębatego [55,77]. Początkowo, MT-3 określano jako czynnik hamujący wzrost neuronów – GIF (*growth inhibitory factor*), takiej właściwości nie wykazuje ani MT-1, ani MT-2 [77].

Ważne jest, iż regiony mózgu bogate w metalotioneinę, a głównie jej izofর্মę MT-3, odpowiadają obszarom szczególnie bogatym w cynk [20]. MT-3 opisywana jest jako cząsteczka odpowiedzialna za sekwestrację i dystrybucję jonów cynku w zakończeniach neuronów magazynujących ten pierwiastek w pęcherzykach synaptycznych [21,55].

Liczne biochemiczne badania nad chorobą Alzheimera i Parkinsona wskazują, iż u molekularnych podstaw tych trwałych zaburzeń struktury i funkcji OUN leżą reakcje wolnorodnikowe w przebiegu stresu oksydacyjnego [16]. Zauważono również, iż wczesnym stadium rozwoju tych chorób neurodegeneracyjnych towarzyszą: niska ekspresja MT-3 oraz zaburzenia w homeostazie cynku. Z niedoborem MT-3 i nieprawidłową dystrybucją cynku w komórkach nerwowych są związane: zwiększona podatność na toksyczne działanie metali (glinu, kadmu) i na szkodliwe skutki stresu oksydacyjnego oraz nadmierny wzrost aksonów [2,77]. Na podstawie tych danych i faktu obecności MT-3 w neuronach gromadzących cynk nasuwa się realny wniosek, iż regulacja ekspresji genu dla apotionein jest ważna dla podtrzymania stabilnego stężenia jonów cynku w komórkach nerwowych i przestrzeniach międzykomórkowych.

METALOTIONEINY A CYNK

Metalotioneiny są ważnymi niskocząsteczkowymi białkami magazynującymi duże ilości cynku. Jedna cząsteczka MT może związać 7 kationów Zn^{2+} (7 moli Zn^{2+} /mol proteiny) [49,77]. Cynk, obok wapnia i magnezu, występuje obficie w mózgu, choć zaliczany jest do pierwiastków śladowych. Jest niezbędny dla rozwoju OUN. Gromadzony jest w pęcherzykach presynaptycznych neuronalnych zakończeń pobudzających (w neuronach struktur układu brzeźnego i kory nowej). Jest to tzw. **pula pęcherzykowa** cynku, z której pierwiastek uwalniany jest w momencie pobudzenia synapsy. We frakcji cytozolowej neuronu wyróżnia się także **pulę strukturalną** cynku, na którą składają się kationy metalu związane z białkami nieenzymatycznymi (do których zaliczyć należy przede wszystkim MTs) lub z drobnocząsteczkowymi ligandami oraz **pulę metaboliczną**, w której Zn^{2+} współdziała z licznymi enzymami.

Jony cynku obecne są także w **mitochondriach**, w warunkach prawidłowej pracy komórki. Mitochondrialna i cytozolowa pula cynku mogą być uruchamiane niezależnie od siebie. Mobilizacja puli cytozolowej związanej z białkami nieenzymatycznymi indukuje częściową utratę różnicy potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej ($\Delta\Psi_m$), co sugeruje możliwe funkcjonalne znaczenie przemieszczania cynku pomiędzy pulą cytozolową i mitochondrialną lub też oddziaływanie Zn^{2+} na mitochondrium od zewnątrz. Stwierdzono, iż przy dużym cytozolowym obciążeniu cynk jest wychwytywany przez mitochondria, z których może być następnie uwolniony. Jednak nadmierna akumulacja cynku w tych organellach prowadzi do ich uszkodzenia [18,42,80].

Zaobserwowano, iż w czasie ataków padaczki lub przy niedokrwieniu mózgu częściowym lub uogólnionym dochodzi do natężonego uwalniania jonów cynku z zakończeń presynaptycznych, a następnie do jego wychwytu i akumulacji w zakońzeniach postsynaptycznych. Cynk zgromadzony w nadmiernej ilości w neuronie może odpowiadać za jego uszkodzenie i śmierć. Sugeruje się, iż toksyczność cynku wobec neuronów jest skutkiem jego szkodliwego oddziaływania na pracę mitochondriów [80]. Po przeanalizowaniu przedstawionych informacji oczywistą wydaje się przypisywana metalotioneinom, które sekwestrują istotne ilości cynku, funkcja ochronna wobec komórek OUN. Potwierdzeniem tej własności MTs mogą być także wyniki innych doświadczeń *in vitro*, w których wykazano, iż apotioneina znosi spowodowaną przez Zn^{2+} blokadę łańcucha oddechowego mitochondriów [38].

Przypuszcza się, iż uszkodzenia struktur mózgu charakterystyczne dla chorób neurodegeneracyjnych są bezpośrednim następstwem wystąpienia stresu oksydacyjnego. Istnieją badania przeprowadzone na hodowlach neuronów, które wskazują, iż jony cynku uwalniane są z połączenia z MTs w obecności utlenionych związków disiarczkowych, takich jak: utleniony glutation (GSSG) lub 2,2'-ditiopirydyna (DTDP). Cytozolowe pule cynku są więc mobilizowane w odpowiedzi na zmiany w potencjale utleniająco-redukującym komórki [38]. Liczne doniesienia naukowe informują o antyoksydacyjnych właściwościach jonów cynku. Na podstawie właściwości fizykochemicznych cynku przypuszcza się, iż pierwiastek ten, obecny w fizjologicznych ilościach w komórce, może pełnić funkcję ochronną wobec makrocząsteczek w

środowisku sprzyjającym powstaniu zwiększonych ilości RFT. Jony cynku mogą bowiem wypierać jony żelaza i miedzi z przestrzeni, w której mogłoby dojść do powstawania rodnika wodorotlenowego poprzez katalizę reakcji Habera-Weissa [5,36].

Wydaje się jednak, iż zarejestrowany efekt antyoksydacyjny niskich stężeń jonów Zn^{2+} wynika głównie z ich wyjątkowej zdolności do indukcji syntezy metalotionein. Analizując opublikowane wyniki licznych doświadczeń dotyczących MTs łatwo spostrzec, iż cynk, pomimo nie największego powinowactwa do MTs, jest najlepszym stymulatorem syntezy tych białek. Wykazano, iż przy podawaniu zwierzętom pokarmu wzbogaconego w ten mikroelement dochodzi do znacznego wzrostu zawartości mRNAs dla MTs oraz produktów translacji w tkankach. Stwierdzono jednak, iż ilość mRNAs dla MTs w tkankach OUN nie ulega drastycznemu obniżeniu nawet przy braku suplementacji organizmu w jony metalu, czego się nie obserwuje w tkankach obwodowych np. w wątrobie [21].

Ciekawych danych dostarczyły doświadczenia określające wpływ wysokich stężeń jonów cynku na hodowle komórek HeLa [57]. Wysokie stężenia Zn^{2+} silnie indukowały syntezę MTs. Jednakże w stanie przesylenia środowiska hodowli tym kationem stopień charakterystycznych dla stresu oksydacyjnego uszkodzeń nDNA był wysoki zarówno w normalnych warunkach funkcjonowania komórek, jak i po potraktowaniu hodowli nadtlakiem wodoru. Na podstawie tych obserwacji postulowano, iż efektywną ochronę przed zgubnymi dla komórek skutkami stresu oksydacyjnego gwarantują MTs w warunkach niskich stężeń jonów cynku.

W pracach doświadczalnych zostało wykazane działanie antyapoptotyczne jonów cynku w stężeniach fizjologicznych [9,29,36,57]. Wydaje się jednak, iż antyapoptotyczne właściwości Zn^{2+} wynikają głównie z ich zdolności do indukcji syntezy apotionein. Działanie antyapoptotyczne MTs opisywane było przez licznych badaczy [24,39,46,51]. Można więc przyjąć, iż jest ono wypadkową silnych właściwości antyoksydacyjnych tych białek oraz ich istotnego udziału w homeostazie jonów Zn^{2+} .

METALOTIONEINY A POTENCJAŁ UTLENIAJĄCO-REDUKUJĄCY KOMÓRKI

Wykazano, iż synteza MTs indukowana jest przez czynniki wywołujące stres oksydacyjny, np. przez hiperoksję, promieniowanie jonizujące, wysiłek fizyczny, hipotermię, substancje chemiczne, takie jak: etanol, parakwat (dichlorek 1,1'-dimetylo-4,4'-bis-pirydyniowy), wodoronadtlenek tert-butylu oraz substancje biologiczne zaangażowane w inicjację procesu zapalnego, głównie cytokiny [54,63]. Fakt ten może wynikać z mechanizmów obronnych komórki i z wybitnej zdolności MTs do neutralizacji RFT [78]. Stwierdzono, iż wymiar szkodliwych następstw stresu oksydacyjnego jest odwrotnie proporcjonalny do zawartości MTs w tkankach mózgu [14,20,54].

Obserwowano blisko 12-krotne nasilenie syntezy MTs po zastosowaniu antymyocyny oraz blisko 4-krotne po zastosowaniu 2,4-dinitrofenolu, przy czym aktywność enzymów antyoksydacyjnych pozostawała w zasadzie bez zmian (dinitrofenol spowo-

dował jedynie 1,3-krotny wzrost aktywności Mn-SOD) [33]. Zarówno antymycyna, jak i 2,4-dinitrofenol zaburzają prawidłową pracę mitochondriów i wtórnie, silnie generują anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$). Na podstawie tego doświadczenia przypisuje się MTs ważną rolę ochronną przeciw skutkom stresu oksydacyjnego indukowanego w mitochondriach.

Zauważono, iż natężona synteza MTs towarzyszy szybkiemu zwiększeniu czynności metabolicznych w komórkach, np. w brunatnej tkance tłuszczowej w czasie intensywnej termogenezy, co może potwierdzać ważny udział MTs w neutralizacji wolnych rodników, które w tych warunkach powstają w większych ilościach [51,55,74].

Wykazano, iż MT-1/-2 istotnie redukują uszkodzenia DNA wywołane działaniem wysokich stężeń rodnika hydroksylogowego (HO^{\cdot}) [44,62]. Badano, na przykład, wpływ obecności metalotionein na funkcję szpiku kostnego zwierząt napromieniowanych różnymi dawkami fal X i stwierdzono istotnie większe, niekorzystne zmiany ilościowe i jakościowe komórek krwi obwodowej i szpiku kostnego (większy spadek liczby leukocytów i większy wzrost liczby mikrojądrzastych retikulocytów we krwi obwodowej oraz większy wzrost liczby polichromatycznych mikrojądrzastych erytrocytów w szpiku) u myszy szczepu pozbawionego genu kodującego MT-1/-2 w porównaniu z grupą kontrolną, tj. zwierzętami szczepu dzikiego syntetyzującymi MTs. Przy czym doświadczenia wykonano również na grupach zwierząt, których dieta uprzednio wzbogacona była w bizmut lub cynk, oraz monitorowano zmiany w zawartości MTs w tkankach wszystkich zwierząt [62]. Podobnie, zwierzęta laboratoryjne, u których zaburzono prawidłową syntezę MTs, wykazywały zwiększoną podatność na toksyczne działanie organicznych związków kancerogennych, tlenku azotu lub kadmu [9,51,54].

Również w doświadczeniach *in vitro* potwierdzono skuteczną funkcję MTs jako cząsteczek chroniących DNA oraz lipidy błonowe przed działaniem wolnych rodników, zwłaszcza rodnika wodorotlenowego generowanego przez układy mikrosomalne. Jednocześnie, w badaniach **porównywano wydajność MTs i GSH** w reakcjach neutralizacji RFT. Wykazano, iż MT-1/-2 jest ewidentnie bardziej wydajnym zmiataczem wolnych rodników niż zredukowany glutation [9,11,44,45]. Porównując stężenia molowe, MT-1/-2 z 50-krotnie większą wydajnością niż glutation zapobiegała pęknięciom plazmidowego DNA inkubowanego w środowisku aktywnych enzymów mikrosomalnych wytwarzających rodnik hydroksylogowy. Istotne jest także, iż przeprowadzono doświadczenie potwierdzające ochronne działanie wobec DNA grup tiolowych MT. Cząsteczki MT, których reszty -SH zostały uprzednio utlenione wysokimi stężeniami nadtlenu wodoru, nie zabezpieczały plazmidu przed pęknięciami wywołanymi HO^{\cdot} . Jednocześnie stwierdzono 10-krotnie większą wydajność cząsteczek MT w porównaniu z cząsteczkami GSH w hamowaniu reakcji peroksydacji lipidów błonowych oraz w neutralizacji rodnika nadtlenkowego kwasów tłuszczowych [44].

Analizując przedstawione wyniki, warto obliczyć stosunek molowy oraz masowy reszt cysteinyłowych wchodzących w skład glutationu oraz cząsteczki metalotioneiny do pozostałych reszt aminokwasowych budujących te antyoksydanty. Otóż, biorąc pod uwagę dwie podstawowe izoformy MT, tj. MT-1 i MT-2, należy stwierdzić, iż

podobnie jak w GSH, w cząsteczce MT stosunek liczby moli cysteiny do liczby pozostałych aminokwasów tworzących białko wynosi ok. 1/3 (20 reszt cysteinylowych przypadających na 61–62 aminokwasy). Zbliżony jest również stosunek masy molowej reszt cysteinylowych do sumy mas pozostałych aminokwasów i wynosi w obu przypadkach ok. 0,38. Wydaje się więc, iż MTs swój wysoki potencjał antyoksydacyjny zawdzięczają nie tylko wysokiej liczbie grup tiolowych, lecz specyficznym właściwościom całej cząsteczki. Potwierdzeniem tego przypuszczenia może być również fakt, iż izoforma MT-3, która w swej cząsteczce zawiera tę samą liczbę grup -SH co izoformy MT-1/-2, różni się jednak budową – ma funkcję czynnika hamującego wzrost neuronów, której nie wykazują pozostałe izoformy MT.

Rozpatrując własności przeciwutleniające metalotionein trzeba także zauważyć, iż w warunkach szoku tlenowego synteza MTs, a więc również ich potencjał redukujący – wzrasta. Natomiast potencjał redukujący glutationu (wyrażony stosunkiem: $R = \text{GSH}/\text{GSSG}$) w warunkach szoku tlenowego ulega drastycznemu obniżeniu. Np. mierzony w tkance wątroby w warunkach fizjologicznych wynosił 350, podczas głodzenia – 150, a pod wpływem stresu oksydacyjnego – 2. Ilość glutationu zredukowanego w komórkach uzależniona jest od diety, zwiększa się ok. 3-krotnie przy diecie wysokobiałkowej, a np. przy nadczynności tarczycy spada 40% poniżej normy (mierzona w tkance wątroby). Fizjologiczne stężenie glutationu zmienia się w zależności od tkanki. Np. w mięśniu sercowym R dla glutationu jest kilkakrotnie niższy w porównaniu z wątrobą, lecz jest stabilny [10,16,33,36].

MTs współdziałają z innymi antyoksydantami [11,38,51,55,74]. Grupy SH- należą do najbardziej reaktywnych grup w komórce. Potwierdzono, iż klaster metalotionein są stabilizowane przez wysokie wewnątrzkomórkowe stężenia GSH. Przeprowadzono doświadczenia, w których utleniony glutation oddziałuje z metalotioneinami i powoduje uwalnianie kationów metalu z kompleksów z białkiem [38]. Doświadczenia na hodowlach komórek wskazują, iż MTs mogą pełnić funkcję donorów jonów miedzi i cynku np. dla cytoplazmatycznej dysmutazy ponadtlenkowej [55].

METALOTIONEINY A NOWOTWORY

Wysoki potencjał antyoksydacyjny (redukujący) środowiska wewnątrzkomórkowego i płynów śródtkankowych jest gwarantem prawidłowego funkcjonowania tkanek i narządów. Niezneutralizowane RFT najprawdopodobniej odgrywają zasadniczą rolę również w procesie inicjacji i promocji nowotworu. Wśród badaczy przeważa pogląd, iż komórki nowotworowe w trybie ciągłym i przewlekłym wytwarzają zwiększone ilości RFT. Wzmoczoną produkcję aktywnych form tlenu w komórkach transformowanych traktuje się jako jedną z przyczyn licznych mutacji i niestabilności genomu oraz zaistnienia różnorodności populacji komórek w obrębie guza [6,15,17,26,28,53,73]. Szok tlenowy, jak wyżej wspomniano, jest silnym impulsem stymulującym syntezę MTs. Można przypuszczać, iż natężona synteza MTs jest odpowiedzią komórki na toczący się stres oksydacyjny. Liczne doniesienia naukowe

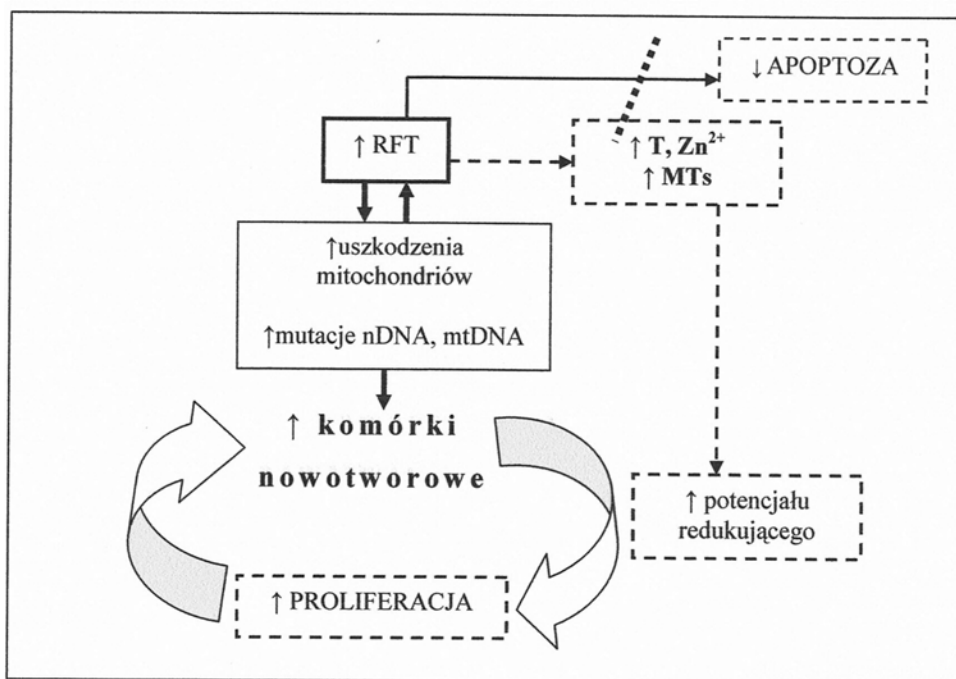
informują o wzmożonej syntezie MTs w różnorodnych ludzkich nowotworach oraz o tendencji do wzrostu zawartości MTs wraz ze stopniem złośliwości guza [9,22,40,51,67,68,69,70].

Guzy nowotworowe OUN, pod względem częstości zachorowań, stanowią ok. 9% ogółu nowotworów człowieka; w większości przypadków zachorowania bardzo źle rokują. Największą grupę pierwotnych nowotworów OUN człowieka stanowią guzy wywodzące się z tkanki nerwowo-nabłonkowej. Glejaki należą do nowotworów złośliwych naciekających i niszczących okoliczne tkanki. Wykazują tendencję do szybkich nawrotów i zwiększania stopnia złośliwości. Stwierdzono doświadczalnie, iż nowotwory szeregu astrocytarnego cechuje wysoka zawartość MTs w porównaniu z łagodnymi nowotworami OUN. Stężenie MTs w glejakach wydaje się wzrastać w miarę wzrostu stopnia złośliwości, aż do zaistnienia postaci anaplastycznej [67].

Zdolność do natężonej syntezy MTs przez glejaki – w porównaniu z łagodnymi nowotworami OUN, przede wszystkim oponiakami w I stopniu złośliwości histologicznej – może być pochodną natury komórek glejowych. Możliwe jest, iż glejaki dlatego wykazują wysoką złośliwość, ponieważ wywodzą się z komórek syntetyzujących MTs z dużą wydajnością. Słuszną może się okazać hipoteza, iż zdolność do intensywnej syntezy MTs przez komórki tkanki, z której wywodzi się dany nowotwór, predysponuje transformowane komórki do osiągnięcia fenotypu komórek dzielących się bardzo intensywnie i niepoohamowanie. Komórki gwiazdziaków, w których stwierdza się wysoką zawartość MTs w porównaniu z łagodnymi guzami opon [67], wykazują wysoki potencjał proliferacyjny oraz szczególną zdolność do migracji [65]. Podobnie, odnotowano wysoką zawartość MTs w rakach jamy nosowo-gardłowej oraz dodatnią korelację między stężeniami MTs i cynku w tych guzach a aktywnością proliferacyjną komórek [30]. Wysoką zawartość MTs stwierdzono także w nowotworach przerzutowych OUN [67].

Za zdolnością do natężonej syntezy MTs przez komórki nowotworowe, jako czynnikiem warunkującym proces wzrostu nowotworu, przemawia fakt, iż niska wartość potencjału utleniająco-redukującego, czyli wysoki potencjał redukujący, jest warunkiem niezbędnym dla podziałów komórek. O niskiej wartości potencjału oksydacyjno-redukcyjnego stanowi głównie wysoka aktywność grup tiolowych w komórce. Wzrost wartości potencjału utleniająco-redukującego decyduje o zahamowaniu procesu proliferacji i wejściu komórek w fazę różnicowania. Dalej postępujący wzrost wartości potencjału utleniającego w komórce jest przyczyną zainicjowania procesu apoptozy lub w skrajnych przypadkach stresu oksydacyjnego – nekrozy [60]. Na podstawie tych informacji można sformułować hipotezę, iż wysoki potencjał redukujący MTs może stanowić istotny czynnik w „błędnym kole” procesów biochemicznych toczących się w nieuporządkowany sposób w komórce nowotworowej (rys. 3).

Nowotwory wywodzące się z komórek gleju opisywane są jako szczególnie odporne na chemio- i radioterapię. Opublikowano prace, w których oporność nowotworów na leczenie metodami cytotoksycznymi łączona jest ze zdolnością komórek do natężonej syntezy MTs, którym przypisuje się znaczący udział w mechanizmie wielokierunkowej oporności komórek nowotworowych na środki cytotoksyczne [4,8,29,51,69,70,71].



RYCINA 3. Prawdopodobny mechanizm oddziaływania metalotionein w procesie promocji i złośliwienia nowotworów

FIGURE 3. The likely mechanism of the contribution of metallothioneins to the processes of promotion and malignancy of the neoplasms.

Środki chemiczne stosowane przy zwalczaniu nowotworów są induktorami powstawania RFT lub wykazują bezpośrednie powinowactwo do kwasów nukleinowych – blokują transkrypcję i podziały komórek. Podobnie, mechanizm toksycznego wpływu promieni jonizujących na komórki opiera się na reaktywności wolnych rodników tlenowych powstałych w reakcji radiolizy wody. Skutkiem działania wysokich stężeń RFT są poważne uszkodzenia przede wszystkim cząsteczki nDNA. Wszelkie nienaprawione aberracje nDNA teoretycznie winny doprowadzić do likwidacji uszkodzonej komórki, zwykle przez uruchomienie szlaków apoptozy. Utrzymuje się, iż MTs w istotnym stopniu przyczyniają się do zaburzenia procesu apoptozy w komórkach transformowanych. Zauważono, iż metalotioneiny ulegają akumulacji w jądrze komórkowym i mitochondriach, czyli strukturach odpowiedzialnych za torowanie uszkodzonej komórki na drogę programowanej śmierci [9,12,24,25,40,54]. Prace przypisujące metalotioneinom właściwości antyapoptotyczne są liczne [9,24,39,50,54,55,64].

Wiadomo, iż w komórce nowotworowej proces programowanej śmierci jest zaburzony tak, iż komórka może się dzielić intensywnie, pomimo licznych nieprawidłowości w jej strukturze i funkcji. W badaniach doświadczalnych wykazano, iż RFT lub czynniki upośledzające system antyoksydacyjny komórki mogą indukować

apoptozę, natomiast przeciwutleniacze przeciwdziałają zaistnieniu apoptozy [4, 39]. Niedostateczna wrażliwość komórek nowotworowych na czynniki, które powinny doprowadzić do uruchomienia mechanizmu programowanej śmierci, może więc wynikać m.in. z prominentnych właściwości antyoksydacyjnych MTs, które nowotwór syntetyzuje często z dużym natężeniem.

Nadzieję na opracowanie skutecznych przeciwnowotworowych środków leczniczych często się wiąże z rozpoznaniem systemów stanowiących o potencjale utleniająco-redukującym komórki transformowanej. Z tego względu słuszne wydaje się stwierdzenie, iż zagadnienia opisane w niniejszej pracy należą do ważnych dla medycyny eksperymentalnej i klinicznej.

PODZIĘKOWANIE

Bardzo dziękuję Pani Profesor Dr hab. Marcie Stryjeckiej-Zimmer – Kierownikowi Katedry i Zakładu Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie – za cenne wskazówki udzielone mi przy przygotowaniu niniejszej publikacji.

LITERATURA

- [1] ASCHNER M, PHILBERT MA. Glial cells. *Comprehensive Toxicology* 2010; **13**: 199–219.
- [2] ASMUSSEN JW, AMBJØRN M, BOCK E, BEREZIN V. Peptides modeled after the α -domain of metallothionein induce neurite outgrowth and promote survival of cerebellar granule neurons. *Eur J Cell Biol* 2009; **88**: 433–443.
- [3] AUGUSTYNIAK A, MICHALAK K, SKRZYDLEWSKA E. Wpływ stresu oksydacyjnego indukowanego etanolem na ośrodkowy układ nerwowy. *Post Hig Med Dosw* 2005; **59**: 464–471.
- [4] BACOLOD MD, FEHDRAU R, JOHNSON SP, BULLOCK NS, BIGNER DD, COLVIN M, FRIEDMAN HS. BCNU-sequestration by metallothioneins may contribute to resistance in medulloblastoma cell line. *Cancer Chemother Pharmacol* 2009; **63**: 753–758.
- [5] BARTOSZ G. *Druga twarz tlenu*. PWN Warszawa 2008.
- [6] BEHREND L, HENDERSON G, ZWACKA RM. Reactive oxygen species in oncogenic transformation. *Biochem Soc Trans* 2003; **31**: 1441–1444.
- [7] BO A, ZHANG H, ZHANG X, WANG X, LAN Y. Clinical significance on the expressions of metallothionein in three types cancer of woman. *Chinese-German J Clin Oncol* 2008; **7**: 59–61.
- [8] BREDEL M. Anticancer drug resistance in primary human brain tumors. *Brain Res Rev* 2001; **35**: 161–204.
- [9] CAI L, LIU Q, CHERIAN MG. Metallothionein and intracellular sequestration of metals. *Comprehensive Toxicology* 2010; **4**: 501–517.
- [10] CARRASCO J, ADLARD P, COTMAN C, QUINTANAA, PENKOWA M, XU F, VAN NOSTRAND WE, HIDALGO J. Metallothionein-I and -III expression in animal models of Alzheimer disease. *Neuroscience* 2006; **143**: 911–922.
- [11] CASADEI M, PERSICHINI T, POLTICELLI F, MUSCI G, COLASANTI M. S-Glutathionylation of metallothioneins by nitrosative/oxidative stress. *Exp Gerontol* 2008; **43**: 415–422.
- [12] CECCATELLI S, DARÉ E, MOORS M. Methylmercury-induced neurotoxicity and apoptosis. *Chem Biol Interact* 2010; **188**: 301–308.
- [13] CHANG CC, LAUWERYNS R, BERNARD A, ROELS H, BUCHET JP, GARVEY JS. Metallothionein in cadmium-exposed workers. *Environ Res* 1980; **23**: 422–428.
- [14] CHUNG RS, FUNG SJ, LEUNG YK, WALKER AK, MCCORMACK GH, CHUAH MI, VICKERS JC, WEST AK. Metallothionein expression by NG2 glial cells following CNS injury. *Cell Mol Life Sci* 2007; **64**: 2716–2722.
- [15] CIRAK B, INCIB S, PALAOGLUB S, BERTAN V. Lipid peroxidation in cerebral tumors. *Clin Chim Acta* 2003; **327**: 103–107.

- [16] CIU K, LUO X, XU K, VEN MURTHY MR. Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2004; **28**: 771–799.
- [17] DEBIEC-RYCHTER M. Cytogenetyka guzów OUN. W: Mossakowski MJ, Liberski PP [red.] Guzy układu nerwowego. Wrocław: Wydawnictwo Ossolińskich. 1997: 23–30.
- [18] DINELEY KE, RICHARDS LL, VOTYAKOVA TV, REYNOLDS II. Zinc causes loss of membrane potential and alters production of reactive oxygen species in isolated brain mitochondria. *Mitochondrion* 2005; **5**: 55–65.
- [19] DUCE JA, BUSHAI. Biological metals and Alzheimer's disease: Implications for therapeutics and diagnostics. *Prog Neurobiol* 2010; **92**: 1–18.
- [20] EBADI M, BROWN-BORG H, REFAEY HE, SINGH BB, GARRETT S, SHAVALI S, SHARMA SK. Metallothionein-mediated neuroprotection in genetically engineered mouse models of Parkinson's disease. *Brain Res Mol Brain Res* 2005; **134**: 67–75.
- [21] EBADI M, SHARMA S. Metallothioneins 1 and 2 attenuate peroxynitrite-induced oxidative stress in Parkinson disease. *Exp Biol Med* 2006; **231**: 1576–1583.
- [22] FABRIK I, KRIZKOVA S, HUSKA D, ADAM V, HUBALEK J, TRNKOVA L, ECKSCHLAGER T, KUKACKA J, PRUSA R, KIZEKA R. Employment of electrochemical techniques for metallothionein determination in tumor cell lines and patients with tumor disease. *Electroanalysis* 2008; **20**: 1521–1532.
- [23] FENG W, CAI J, PIERCE WM, FRANKLIN RB, MARET W, BENZ FW, KANG YJ. Metallothionein transfers zinc to mitochondrial aconitase through a direct interaction in mouse hearts. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; **332**: 853–858.
- [24] FORMIGARI A, IRATO P, SANTON A. Zinc, antioxidant systems and metallothionein in metal mediated-apoptosis; biochemical and cytochemical aspects. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 2007; **146**: 443–459.
- [25] FORMIGARI A, SANTON A, IRATO P. Efficacy of zinc treatment against iron-induced toxicity in rat hepatoma cell line H4-II-EC3. *Liver International* 2007; **27**: 120–127.
- [26] HANIMOGLU H, TANRIVERDI T, KACIRA T, SANUS GZ, ATUKEREN P, AYDIN S, TUNALI Y, GUMUSTAS K, KAYNAR MY. Relationship between DNA damage and total antioxidant capacity in patients with transitional meningioma. *Clin Neurol Neurosurg* 2007; **109**: 561–566.
- [27] HELAL GK, HELAL OK. Metallothionein attenuates carmustine-induced oxidative stress and protects against pulmonary fibrosis in rats. *Arch Toxicol* 2009; **83**: 87–94.
- [28] HILEMAN EO, LIU J, ALBITAR M, KEATING MJ, HUANG P. Intrinsic oxidative stress in cancer cells: a biochemical basis for therapeutic selectivity. *Cancer Chemother Pharmacol* 2004; **53**: 209–219.
- [29] HOGSTRAND C, KILLE P, NICHOLSON RI, TAYLOR KM. Zinc transporters and cancer: a potential role for ZIP7 as a hub for tyrosine kinase activation. *Trends Mol Med* 2009; **15**: 101–111.
- [30] JAYASURYAA, BAY BH, YAP WM, TAN NG, TAN BKH. Proliferative potential in nasopharyngeal carcinoma: correlation with metallothionein expression and tissue zinc levels. *Carcinogenesis* 2000; **21**: 1809–1812.
- [31] KAROTKI AV, VASAK AEM. Reaction of human metallothionein-3 with cisplatin and transplatin. *J Biol Inorg Chem* 2009; **14**: 1129–1138.
- [32] KLAASSEN CD, LIU J, DIWAN BA. Metallothionein protection of cadmium toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009; **238**: 215–220.
- [33] KONDOH M, INOUE Y, ATAGI S, FUTAKAWA N, HIGASHIMOTO M, SATO M. Specific induction of metallothionein synthesis by mitochondrial oxidative stress. *Life Sci* 2001; **69**: 2137–2146.
- [34] KOUMURAA, HAMANAKA J, SHIMAZAWA M, HONDA A, TSURUMA K, UCHIDA Y, HOZUMI I, SATOH M, INUZUKA T, HARA H. Metallothionein-III knockout mice aggravates the neuronal damage after transient focal cerebral ischemia. *Brain Res* 2009; **1229**: 148–154.
- [35] KOUMURA A, KAKEFUDA K, HONDA A, ITO Y, TSURUMA K, SHIMAZAWA M, UCHIDA Y, HOZUMI I, SATOH M, INUZUKA T, HARA H. Metallothionein -3 deficient mice exhibit abnormalities of psychological behaviors. *Neurosci Lett* 2009; **467**: 11–14.
- [36] KRĘŻEL A, MARET W. Zinc-buffering capacity of a eucaryotic cell at physiological pZn. *J Biol Inorg Chem* 2006; **11**: 1049–1062.
- [37] LEUNG YKJ, PANKHURST M, DUNLOP SA, RAY S, DITTMANN J, EATON ED, PALUMAA P, SILLARD R, CHUAH MI, WEST AK, CHUNG RS. Metallothionein induces a regenerative reactive astrocyte phenotype via JAK/STAT and RhoA signalling pathways. *Exp Neurol* 2010; **221**: 98–106.
- [38] LI Y, HAWKINS BE, DEWITT DS, PROUGH DS, MARET W. The relationship between transient zinc ion fluctuations and redox signaling in the pathways of secondary cellular injury: relevance to traumatic brain injury. *Brain Res* 2010; **1330**: 131–141.

- [39] LIU Q, WANG G, ZHOU G, TAN Y, WANG X, WEI W, LIU L, XUE W, FENG W, CAI L. Angiotensin II-induced p53-dependent cardiac apoptotic cell death: Its prevention by metallothionein. *Toxicol Lett* 2009; **191**: 314–320.
- [40] LIU ZM, VAN HASSELT A, SONG FZ, VLANTIS AC, CHERIAN MG, KOROPATNICKE J, CHEN GG. Expression of functional metallothionein isoforms in papillary thyroid cancer. *Mol Cell Endocrinol* 2009; **302**: 92–98.
- [41] MA H. Simultaneous determination of metallothionein and thionein with cadmium-hemoglobin saturation method. *J Am Sci* 2005; **1**: 28–33.
- [42] MALAIYANDI LM, VERGUN O, DINELEY KE, REYNOLDS IJ. Direct visualisation of mitochondrial zinc accumulation reveals uniporter-dependent and -independent transport mechanisms. *J Neurochem* 2005; **93**: 1242–1250.
- [43] MARGOSHES M, VALLEE BL. A cadmium protein from equine kidney cortex. *J Am Chem Soc* 1957; **79**: 4813–4814.
- [44] MIURA T, MURAOKA S, OGISO T. Antioxidant activity of metallothionein compared with reduced glutathione. *Life Sci* 1997; **60**: 301–309.
- [45] MOCCHIGLIANI E, BERTONI-FREDDARI C, MARCELLINI F, MALAVOLTA M. Brain, aging and neurodegeneration: Role of zinc ion availability. *Prog Neurobiol* 2005; **75**: 367–390.
- [46] NAGAŃSKA E, MATYJA E. Apoptotic neuronal changes enhanced by zinc chelator – TPEN in organotypic rat hippocampal cultures exposed to anoxia. *Folia Neuropathol* 2006; **44**: 125–132.
- [47] NAKAJIMA K, KODAIRA T, KATO M, NAKAZATO K, TOKITA Y, KIKUCHI H, SEKINE H, SUZUKI K, NAGAMINE T. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for metallothionein -I and -II in plasma of humans and experimental animals. *Clin Chim Acta* 2010; **411**: 758–761.
- [48] OGRA Y, SUZUKI KT. Nuclear trafficking of metallothionein: possible mechanisms and current knowledge. *Cell Mol Biol* 2000; **46**: 357–365.
- [49] PALUMAA P, TAMMISTE I, KRUUSEL K, KANGUR L, JÖRNVALL H, SILLARD R. Metal binding of metallothionein-3 versus metallothionein-2: lower affinity and higher plasticity. *Biochim Biophys Acta* 2005; **1747**: 205–211.
- [50] PEDERSEN MØ, LARSEN A, STOLTENBERG M, PENKOWA M. Cell death in the injured brain: Roles of metallothioneins. *Prog Histochem Cytochem* 2009; **44**: 1–27.
- [51] PEDERSEN MØ, LARSEN A, STOLTENBERG M, PENKOWA M. The role of metallothionein in oncogenesis and cancer prognosis. *Prog Histochem Cytochem* 2009; **44**: 29–64.
- [52] PEDERSEN MØ, LARSEN A, STOLTENBERG M, PENKOWA M. Bio-released gold ions modulate expression of neuroprotective and hematopoietic factors after brain injury. *Brain Res* 2010; **1307**: 1–13.
- [53] PELICANO H, CARNEY D, HUANG P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resistance Updates* 2004; **7**: 97–110.
- [54] PENKOWA M, FLORIT S, GIRALT M, QUINTANA A, MOLINERO A, CARRASCO J, HIDALGO J. Metallothionein reduces CNS inflammation, neurodegeneration, and cell death following kainic acid-induced epileptic seizures. *J Neurosci Res* 2005; **79**: 522–534.
- [55] PENKOWA M. Metallothioneins are multipurpose neuroprotectants during brain pathology. *FEBS J* 2006; **273**: 1857–1870.
- [56] POULSEN CB, PENKOWA M, BORUP R, NIELSEN FC, CÁCERES M, QUINTANA A, MOLINERO A, CARRASCO J, GIRALT M, HIDALGO J. Brain response to traumatic brain injury in wild-type and interleukin-6 knockout mice: a microarray analysis. *J Neurochem* 2005; **92**: 417–432.
- [57] RACHIDI W, CHIMIENI F, AOUFFEN M, SENATOR A, GUIRAUD P, SEVE M, FAVIER A. Prion protein protects against zinc-mediated cytotoxicity by modifying intracellular exchangeable zinc and inducing metallothionein expression. *J Trace Elem Med Biol* 2009; **23**: 214–223.
- [58] RÖHRDANZ E, SCHMUCK G, ÖHLER S, KAHL R. The influence of oxidative stress on catalase and MnSOD gene transcription in astrocytes. *Brain Res* 2001; **900**: 128–136.
- [59] SANTON A, FORMIGARI A, IRATO P. The influence of metallothionein on exposure to metals: an *in vitro* study on cellular models. *Toxicology in Vitro* 2008; **22**: 980–987.
- [60] SCHAFER FQ, BUETTNER GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Rad Biol Med* 2001; **30**: 1191–1212.
- [61] SENS MA, SOMJI S, LAMM DL, GARRETT SH, SLOVINSKY F, TODD JH, SENS DA. Metallothionein isoform 3 as a potential biomarker for bladder cancer. *Environ Health Perspect* 2000; **108**: 413–418.
- [62] SHIBUYA K, SUZUKI JS, KITO H, NAGANUMA A, TOHYAMA C, SATOH M. Protective role of metallothionein in bone marrow injury caused by X-irradiation. *J Toxicol Sci* 2008; **33**: 479–484.

- [63] SHRIVASTAVA K, SHUKLAD, BANSALA, SAIRAM M, BANERJEE PK, ILAVAZHAGAN G. Neuroprotective effect of cobalt chloride on hypobaric hypoxia-induced oxidative stress. *Neurochem Int* 2008; **52**: 368–375.
- [64] SIRCHIA R, LONGO A, LUPARELLO C. Cadmium regulation of apoptotic and stress response genes in tumoral and immortalized epithelial cells of the human breast. *Biochimie* 2008; **90**: 1578–1590.
- [65] SŁOWIŃSKI J. Nowotwory OUN. W: Słowiński J [red.] *Neuropatologia*. Katowice: Wydawnictwo Śląskiej Akademii Medycznej 2002: 116–137.
- [66] STANKOVIC RK, CHUNG RS, PENKOWA M. Metallothioneins I and II: Neuroprotective significance during CNS pathology. *IJBCB* 2007; **39**: 484–489.
- [67] STĘPKOWSKA IM. Ocena zawartości metalotionein oraz aktywności enzymów antyoksydacyjnych w nowotworach ośrodkowego układu nerwowego człowieka. Lublin: Uniwersytet Medyczny w Lublinie II Wydział Lekarski z Oddziałem Anglojęzycznym. 2008: 135–144.
- [68] SUROWIAK P, MATERNA V, MACIEJCZYK A, PUDEŁKO M, MARKWITZ E, SPACZYŃSKI M, DIETEL M, ZABEL M, LAGE H. Nuclear metallothionein expression correlates with cisplatin resistance of ovarian cancer cells and poor clinical outcome. *Virchows Arch* 2007; **450**: 279–285.
- [69] TEWS DS, NISSEN A, KÜLGEN C, GAUMANN AKA. Drug resistance-associated factors in primary and secondary glioblastomas and their precursor tumors. *J Neurooncol* 2000; **50**: 227–237.
- [70] THEOCHARIS SE, MARGELIAP, KLIJANIENKO JT, KOURAKLIS GP. Metallothionein expression in human neoplasia. *Histopathology* 2004; **45**: 103–118.
- [71] TIKOO K, ALI IY, GUPTA J, GUPTA C. 5-Azacytidine prevents cisplatin induced nephrotoxicity and potentiates anticancer activity of cisplatin by involving inhibition of metallothionein, pAKT and DNMT1 expression in chemical induced cancer rats. *Toxicol Lett* 2009; **191**: 158–166.
- [72] TORTOSA R, VIDAL E, COSTA C, ALAMILLO E, TORRES JM, FERRER I, PUMAROLA M. Stress response in the central nervous system of a transgenic mouse model of bovine spongiform encephalopathy. *Vet J* 2008; **178**: 126–129.
- [73] TOULLEC A, GERALD D, DESPOUY G, BOURACHOT B, CARDON M, LEFORT S, RICHARDSON M, RIGAILL G, PARRINI MC, LUCCHESI C, BELLANGER D, STERN MH, DUBOIS T, SASTREGARAU X, DELATTRE O, VINCENT-SALOMON A, MECHTA-GRIGORIOU F. Oxidative stress promotes myofibroblast differentiation and tumour spreading. *Mol Med* 2010; **2**: 211–230.
- [74] VAŠÁK M. Advances in metallothionein structure and functions. *J Trace Elem Med Biol* 2005; **19**: 13–17.
- [75] VIDAL E, ACIN C, FORADADA L, MONZON M, MARQUEZ M, MONLEON E, PUMAROLA M, BADIOLA JJ, BOLEA R. Immunohistochemical characterisation of classical scrapie neuropathology in sheep. *J Comp Path* 2009; **141**: 135–146.
- [76] VIDAL E, TORTOSA R, MÁRQUEZ M, SERAFIN A, HIDALGO J, PUMAROLA M. Infection of metallothionein 1+2 knockout mice with Rocky Mountain Laboratory scrapie. *Brain Res* 2008; **1196**: 140–150.
- [77] WEST AK, HIDALGO J, EDDINS D, LEVIN ED, ASCHNER M. Metallothionein in the central nervous system: roles in protection, regeneration and cognition. *Neurotoxicology* 2008; **29**: 489–503.
- [78] YANG HY, WANG YM, PENG SQ. Basal expression of metallothionein suppresses butenolide-induced oxidative stress in liver homogenates *in vitro*. *Toxicol* 2009; **53**: 246–253.
- [79] YOSHIDA M, SAEGUSA Y, FUKUDA A, AKAMA Y, OWADA S. Measurement of radical-scavenging ability in hepatic metallothionein of rat using *in vivo* electron spin resonance spectroscopy. *Toxicol* 2005; **213**: 74–80.
- [80] ZATTA P, DRAGO D, BOLOGNIN S, SENSI SL. Alzheimer's disease, metal ions and metal homeostatic therapy. *Trends Pharmacol Sci* 2009; **30**: 346–355.

Redaktor prowadzący – Bożena Kamińska-Kaczmarek

Otrzymano: 20.07. 2010 r.

Przyjęto: 30.09. 2010 r.

Dr n. med. Izabella Monika Stepkowska

Katedra i Zakład Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu Medycznego

ul. Chodźki 1, 20-091 Lublin

E-mail: iza.stepkowska@umlub.pl

