

Received: 2015.06.30  
Accepted: 2016.10.23  
Published: 2017.02.14

## Rola metalotioneiny w procesie nowotworzenia oraz w leczeniu chorób nowotworowych

### The role of metallothionein in oncogenesis and cancer treatment

Anna Bizoń, Kinga Jędryczko, Halina Milnerowicz

Katedra i Zakład Biomedycznych Analiz Środowiskowych, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

#### Streszczenie

Metalotioneina to niskocząsteczkowe białko bogate w grupy sulfhydrylowe. Reszty cysteinowe metalotioneiny odgrywają główną rolę w procesach fizjologicznych, takich jak: homeostaza pierwiastków niezbędnych, detoksykacja metali ciężkich oraz usuwanie wolnych rodników tlenowych. Zaangażowanie białka w apoptozę, proliferację, angiogenezę oraz detoksykację metali ciężkich zasugerowało jego udział w procesie nowotworzenia oraz w leczeniu chorych z chorobami nowotworowymi.

Związek między ekspresją metalotioneiny a nowotworzeniem wskazuje, że metalotioneina może być prognostycznym markerem nowotworowym. W niektórych narządach zaobserwowano związek między ekspresją metalotioneiny a indukcją nowotworzenia, tempem wzrostu guza oraz opornością organizmu na zastosowaną radioterapię i chemioterapię.

Wykazano wzrost ekspresji metalotioneiny w nowotworach następujących narządów: krtani, trzustki, nerki, macicy i piersi. Spadek ekspresji tego białka zaobserwowano w raku wątroby. Natomiast zróżnicowaną ekspresję stwierdzono w nowotworach tarczycy, stercza, płuc, żołądka oraz niektórych typach nowotworów ośrodkowego układu nerwowego.

Ekspresja metalotioneiny w komórce nowotworowej współtworzy mechanizm obronny guza przed skutkami chemioterapii i promieniowania, hamując procesy mające doprowadzić do pożądanej apoptozy. Te same właściwości metalotioneiny korzystnie wpływają na zdrowe tkanki organizmu, tak samo narażone na działanie chemioterapii czy promieniowania jonizującego, jak komórki guza. Metalotioneina może wiązać związki platyny i usuwać je z komórki hamując apoptozę i powodując oporność guza na podjętą chemioterapię. Ta sama funkcja może chronić komórki zdrowe, w tym kardiocyty, przed negatywnymi skutkami chemioterapii.

Analiza ekspresji metalotioneiny w nowotworach może pomóc w podjęciu decyzji o wyborze metody terapeutycznej pierwszego wyboru. Jednak nie można jednoznacznie stwierdzić, czy wzmożona ekspresja MT pełni wyłącznie rolę czynnika stymulującego powstanie i rozwój procesu nowotworzenia, czy jest czynnikiem hamującym rozwój nowotworu lub jego uzłośliwienie.

**Słowa kluczowe:** metalotioneina • nowotwory • radioterapia • chemioterapia.

#### Summary

Metallothionein is cysteine-rich low molecular mass protein. The involvement of MT in many physiological and pathophysiological processes such as apoptosis, proliferation, angiogenesis, and the detoxification of heavy metals suggested participation of this protein in carcinogenesis and tumor therapy.

Depending on the type of tissue and classification of carcinoma various it was observed relation between MT expression and tumor type, stage, grade, poor prognosis and body resistance to

	<p>radiotherapy and chemotherapy. MT in tumor cell plays important role in defense mechanism against the effect of radiation by inhibiting the processes that lead to the apoptosis. A number of studies have shown an increased expression of MT in various human tumors of larynx, pancreas, kidney, uterus and breast, whereas lower MT expression was detected in liver tumors. Variable MT expression was detected in case of thyroid, prostate, lung, stomach and central nervous system tumors.</p> <p>Also MT plays crucial role in the cytostatics treatment. MT can bind cis-platinum compounds and removes them from the cells, which may lead to multidrug resistance. However, the same functions of MT protect against the negative effects of chemotherapeutic treatment. It is especially important in case of heart cells.</p> <p>Analysis of MT expression in tumor cells may be useful in choosing method of treatment. It is difficult to determine whether increased expression of MT is only a inducing factor of the development of the carcinogenesis, its malignances and multidrug resistance, or it is a factor inhibiting the induction and development of cancer.</p>
<b>Key words:</b>	<b>metallothionein • tumors • radiotherapy • chemotherapy.</b>
<b>Full-text PDF:</b>	<a href="http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1231518">http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1231518</a>
<b>Word count:</b>	4558
<b>Tables:</b>	1
<b>Figures:</b>	2
<b>References:</b>	83

**Adres autorki:** dr Anna Bizoń, Katedra i Zakład Biomedycznych Analiz Środowiskowych, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, ul. Borowska 211, 50-556 Wrocław; e-mail: a\_bizon@op.pl

## WSTĘP

Metalotioneina (MT) to niskocząsteczkowe białko bogate w aktywne grupy sulfhydrylowe (-SH) [44]. Reszty cysteinowe MT odgrywają ważną rolę w procesach fizjologicznych, takich jak: homeostaza niezbędnych pierwiastków (cynk - Zn, miedź - Cu), detoksykacja metali ciężkich (kadm - Cd, rtęć - Hg) oraz usuwanie wolnych rodników tlenowych - głównie rodnika hydroksylowego (OH<sup>•</sup>) oraz anionorodnika ponadtlenkowego (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) [58,59].

Wyodrębniono cztery podstawowe izoformy MT: MT-1, MT-2, MT-3 i MT-4. Izofory MT-1 i MT-2 występują prawie we wszystkich tkankach, MT-3 jest obecna głównie w tkance mózgowej oraz komórkach nabłonkowych stercza i nerek, natomiast izoforma MT-4 jest ograniczona do nabłonka wielowarstwowego skóry i górnych odcinków przewodu pokarmowego [10].

Synteza MT jest stymulowana przez wiele czynników, takich jak: metale (Zn, Cd, Hg), czynniki stresowe (w tym wolne rodniki) i zapalne, glikokortykoidy, promieniowanie jonizujące oraz intensywny wysiłek fizyczny [38].

Metalotioneina występuje w środowisku wewnątrz- i zewnątrzkomórkowym [12,38,77]. Do przestrzeni międzykomórkowej jest uwalniana głównie z komórek uszkodzonych lub martwych. Komórki nowotworowe

mogą powodować uszkodzenia i śmierć otaczających guza zdrowych tkanek, a tym samym zwiększać stężenie MT w przestrzeni pozakomórkowej [25].

Wykazano odwrotną zależność między ekspresją MT a podatnością komórek na apoptozę, dlatego przypisuje się jej działanie antyapoptotyczne [13]. Zaobserwowano także związek między zwiększoną ekspresją MT a tempem proliferacji komórek nowotworowych [17] oraz zwiększoną ekspresją MT w komórkach nowotworów złośliwych w stosunku do łagodnych postaci [40]. Funkcje molekularne oraz zaangażowanie MT w proliferację, angiogenezę i apoptozę wskazały jej istotną rolę w rozwój, przebieg karcynogenezy oraz powstawanie zjawiska wielolekowej oporności (multidrug resistance, MDR) [9].

Ekspresja MT w nowotworach jest zależna od narządu oraz histogenezy nowotworu [40,39]. Zmiany ekspresji izoform MT-1 i MT-2 stwierdzono w nowotworach: tarczycy, płuc, żołądka, jelita, trzustki, pęcherza moczowego, nerki, prostaty, macicy, piersi, skóry i ośrodkowego układu nerwowego [56]. W przypadku izoformy MT-3 wzrost ekspresji zaobserwowano głównie w nowotworach płuc, pęcherza moczowego i języka [30].

Opracowano wiele metod oznaczenia stężenia i ekspresji MT w materiale biologicznym [14,46]. W analizie stężenia MT w chorobach nowotworowych najczęściej stosuje

się metody immunoenzymatyczne, immunohistochemiczne oraz techniki PCR [9,35].

W pracy przedstawiono MT jako białko wielofunkcyjne zaangażowane w nowotworzenie i leczenie chorych z chorobami nowotworowymi oraz jako potencjalny marker prognostyczny wybranych chorób nowotworowych.

### ZAAŃGAŻOWANIE MT W PROCES NOWOTWORZENIA

Wykazano zależność między stężeniem MT a działaniem antyapoptotycznym. Zwiększona ekspresja MT indukuje działanie antyapoptotyczne, natomiast obniżona zwiększa podatność komórek na apoptozę [72]. Również wzrost stężenia MT w obrębie komórki koreluje ze stopniem złośliwienia guza. Stwierdzono także zależność między ekspresją MT a powstawaniem zjawiska MDR [8].

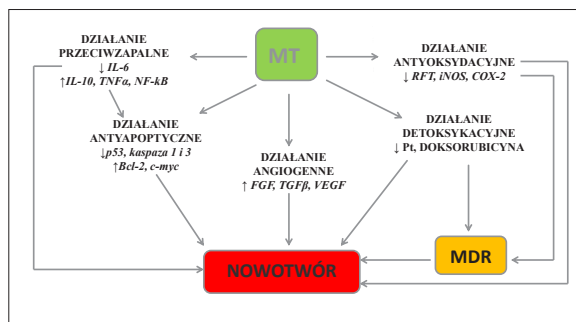
Izoformy MT-1 i MT-2 są zaangażowane w metabolizm Zn. Wpływają na działanie Zn-zależnych białek, niektórych enzymów (np. cynkowo-miedziowozależnej dysmutazy ponadtlenkowej, Cu-Zn SOD), białek palców cynkowych i czynników transkrypcyjnych (takich jak: Sp1, TFIIIA), a także innych białek proapoptotycznych. Analizowano związek izoform MT-1 i MT-2 z białkiem supresorowym p53, ponieważ mutacja genu *TP53* (umiejscowionego u człowieka na chromosomie 17) występuje w większości typów nowotworów [76]. Przeprowadzone badania zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* wykazały silną, pozytywną korelację między zmutowanym p53 a wzrostem stężenia MT-1 i MT-2 w obrębie guza. Jony Zn mają istotne znaczenie w utrzymaniu stabilności białka p53 i jego powinowactwa do DNA. Usunięcie ich w wyniku wzrostu stężenia MT-1 i MT-2, prowadzi do destabilizacji i do dezaktywacji p53, a to hamuje proces apoptozy. Mechanizm ten potwierdzono w badaniach klinicznych u osób chorych na raka jelita grubego [2].

Metalotioneina hamuje także apoptozę przez indukcję wielu antyapoptotycznych onkogenów, zwłaszcza *Bcl-2* (*B-cell lymphoma 2*) oraz genu regulatorowego kodującego czynnik transkrypcyjny *c-myc*, z jednoczesnym zahamowaniem aktywności białek proapoptotycznych, zwłaszcza kaspazy-1 i -3, wykazujących działanie supresyjne względem guza. Zależność między wzrostem stężenia MT-1 i MT-2 a obniżonym stężeniem kaspazy-3 tłumaczy się tym, że do aktywności kaspazy-3, podobnie jak w przypadku białka p53, niezbędne są jony  $Zn^{+2}$  [11,16].

W komórkach zdrowych, izoformy MT-1 i MT-2 są przede wszystkim białkami cytoplazmatycznymi. W komórkach nowotworowych umiejscowienie MT-1 i MT-2 zmienia się wraz z postępem cyklu komórkowego. W fazie  $G_0$  i  $G_1$  są początkowo umiejscowione w cytoplazmie, w  $S$  i  $G_2$  następuje ich ekspresja w jądrze komórkowym. W cyklu komórek nowotworowych, w których wykazano zwiększoną ekspresję izoform MT, stwierdzono skróconą fazą  $G_1$  i szybsze przejście do fazy  $S$  i  $M$  [35].

Istotne znaczenie w mechanizmach karcynogenezy ma regeneracyjna funkcja MT. Badania cytoimmunologiczne prowadzone w limfocytach chłoniaków złośliwych u psów wykazały wyższą ekspresję MT w limfocytach zmienionych nowotworowo niż w prawidłowych, co świadczyło o progresji choroby nowotworowej [41]. Podobnie w rozmazie limfocytów krwi chorych na białaczkę zlokalizowano MT, podczas gdy nie wykazano jej obecności w rozmazie krwi osób zdrowych [420].

W niektórych typach ran MT może indukować proces gojenia przez stymulację leukocytów do chemotaktycznej odpowiedzi oraz wpływać na naprawę uszkodzeń skóry przez regenerację komórek epidermalnych, proliferację fibroblastów i syntezę kolagenu [37,38]. Aktywacja procesu gojenia ran wymaga zaangażowania metaloproteinaz i makrofagów, których aktywność zależy od obecności Zn/Cu-zależnych enzymów, dla których MT może być donorem tych jonów [37]. Wzrost ekspresji MT w uszkodzonych tkankach, zwłaszcza w pierwszych dwóch dobach, może wynikać ze zwiększonego stężenia cytokin i czynników wzrostu [37]. Wykazano także, że interleukina-1 (interleukin, IL-1) jest zaangażowana w metabolizm Zn, który jest znanym induktorem syntezy MT w komórkach skóry, wątroby i szpiku kości [37].



Ryc. 1. Wielokierunkowe działanie kokancerogenne MT

Przewlekłe stany zapalne są głównym czynnikiem patogennym w większości nowotworów. Rozwój wielu chorób nowotworowych koreluje z uprzednio przeżytymi infekcjami w obrębie danego narządu. Wykazano zależność między rakiem nosogardzieli a infekcją wirusa Epsteina-Barr, między zakażeniem bakterią *Helicobacter pylori* a powstawaniem raka żołądka oraz między wirusowym zapaleniem wątroby typu B (wzw B, hepatitis B virus, HBV) i C (wzw C, hepatitis C virus, HCV) a rozwojem nowotworów wątroby [36,60]. Zaobserwowano zwiększoną ekspresję MT w tkankach zapalnych [38,43,47]. Nasze immunoenzymatyczne badania wykazały wzrost stężenia MT w osoczu pacjentów z ostrym oraz przewlekłym zapaleniem trzustki w porównaniu do osób zdrowych. Również badania immunohistochemiczne prowadzone w skrawkach tkanek trzustki pobranych śródoperacyjnie od pacjentów z przewlekłym zapaleniem tego narządu potwierdziły wzrost ekspresji MT w porównaniu do tkanki zdrowej [47].

Przeciwwzajemna funkcja MT-1 i MT-2 wynika z jej oddziaływania z transkrypcyjnym czynnikiem jądrowym kappa-B (nuclear factor kappa-B, NF-κB), uczestniczącym w procesach związanych z powstawaniem stanu zapalnego w komórce oraz komórkowej odpowiedzi na stres. NF-κB jest uważany za czynnik indukujący powstawanie reaktywnych form tlenu (RFT, reactive oxygen species, ROS), dlatego przypisuje się mu duże znaczenie w karcynogenezie. Wykazano, że izoformy MT-1 i MT-2 mogą hamować aktywność NF-κB, potwierdzając ich przeciwwzajemne działanie.

Metalotioneina jest również zaangażowana w proces angiogenezy. Badania *in vivo* i *in vitro* wykazały, że wzrost ekspresji izoformy MT-1 może zwiększyć angiogenezę w obrębie guza, zwiększając tempo nowotworzenia [50]. Isoformy MT-1 i MT-2 zwiększają *de novo* syntezę i ekspresję wielu czynników uczestniczących w angiogenezie, takich jak: czynnik wzrostu fibroblastów (fibroblast growth factor, FGF), transformujący czynnik wzrostu (transforming growth factor, TGF-β) i czynnik wzrostu śródbłonna naczyń (vascular endothelial factor, VEGF), powodując lepsze ukrwienie guza i jego szybszy wzrost [51].

Istotną rolę w procesie nowotworzenia odgrywa także antyoksydacyjna funkcja MT. U transgenicznych myszy z delecją genów kodujących izoformy MT-I i MT-II zaobserwowano większy stres oksydacyjny w komórkach mózgu objawiający się większą śmiertelnością zwierząt niż u myszy z prawidłową ekspresją genów [38]. Natomiast myszy z nadekspresją genów kodujących MT były dużo bardziej odporne na działanie stresu oksydacyjnego, podczas gdy myszy z wyłączonymi genami kodującymi MT były dużo bardziej wrażliwe na onkogenezę indukowaną RFT [65]. MT hamuje także aktywność syntazy tlenu azotu (inducible nitric oxide synthase, iNOS) oraz cyklooksyzogenazy 2 (cyclooksyzogenase 2, COX-2), enzymów katalizujących reakcje, w których powstają RFT, powstrzymując również w ten sposób apoptozę komórek nowotworowych [51].

Wielokierunkowe działanie kokancerogenne MT zamieszczono na ryc. 1.

#### **METALOTIONEINA JAKO POTENCJALNY MARKER PROGNOSTYCZNY WYBRANYCH NOWOTWORÓW**

Zaobserwowany związek między zróżnicowaną ekspresją MT a nowotworzeniem, zasugerował, że MT może być istotnym markerem prognostycznym wybranych chorób nowotworowych [22].

Największe znaczenie ekspresji MT jako markera nowotworowego obserwuje się w nowotworach organów zbudowanych z komórek endodermalnych, które determinują powstawanie nabłonka płuc, krtani, tchawicy, układu pokarmowego i jego gruczołów oraz pęcherza moczowego i niektórych gruczołów dokrewnych [56].

W nowotworach tarczycy wyróżnia się głównie: raka brodawkowatego (papillary thyroid cancer, PTC), raka pęcherzykowego (follicular thyroid carcinoma, FTC), raka rdzeniastego (medullary thyroid carcinoma, MTC) oraz gruczolaka pęcherzykowego (follicular adenoma) i wole tarczycy (nodulat goitre).

Raka brodawkowatego w 80% cechuje powolny wzrost i dobre prognozowanie w leczeniu [78]. Jednak niektóre przypadki charakteryzują się dużą agresywnością, opornością na leczenie i wysoką śmiertelnością, dlatego ważna jest dokładna identyfikacja PTC z wykorzystaniem nowych, selektywnych markerów. Wykazano, że w PTC ekspresja MT pozytywnie koreluje ze stopniem zaawansowania klinicznego (classification of malignant tumours, TNM). Ocena ekspresji MT może być także istotna w przewidywaniu ryzyka wystąpienia przerzutów do węzłów chłonnych. Nie zaobserwowano natomiast związku między ekspresją MT a typem histologicznym i wielkością guza oraz płcią i wiekiem pacjenta [78].

W badaniach immunohistochemicznych wykazano zróżnicowany wzrost ekspresji MT w zależności od rodzaju nowotworów tarczycy: w wolech tarczycy - 73% wzrost, w gruczolaku pęcherzykowym - 70,9%, w PTC - 45,8% i najwyższy 85,7% w FTC. Najniższą ekspresję MT wykazano w MTC [35]. Zwiększoną ekspresję MT zaobserwowano także w gruczolakach i rakach tarczycy [9]. Natomiast Ferrario i wsp. wykazali spadek ekspresji izoform MT w FTC i PTC. Uzyskane wyniki badań prowadzono zarówno w czasie ekspresji genów techniką mikromacierzy, jak i na poziomie białka metodą immunohistochemiczną na skrawkach tkanek tarczycy prawidłowej oraz objętej procesem nowotworzenia [20]. Zmiany w ekspresji MT w poszczególnych rodzajach nowotworów tarczycy mogą wskazywać na zmienny metabolizm komórkowy w nowotworach tego narządu [20]. Badanie ekspresji MT w pęcherzykowych nowotworach tarczycy może być użyteczne w różnicowaniu ich łagodnych (follicular adenoma) i złośliwych postaci (follicular carcinoma).

Badania prowadzone w tkankach nowotworowych krtani (laryngeal cancer) pobranych podczas biopsji od osób, u których potwierdzono początkową fazę procesu nowotworowego, wykazały, że proliferacja komórkowa koreluje ze zwiększoną ekspresją izoform MT-1 i MT-2 w porównaniu do tkanek zdrowych [55]. Wzmoczona ekspresja MT dotyczy nie tylko samych komórek rakowych, ale także tkanek zdrowych, reaktywnych względem nowotworu [23]. Nie potwierdzono jednak zależności między ekspresją MT a stopniem zaawansowania nowotworu oraz roli MT jako potencjalnego markera prognostycznego [24].

W badaniach nad nowotworami jamy ustnej i gardła, nie stwierdzono bezpośredniego związku między ekspresją MT-1 i MT-2 w obrębie jądra i/lub cytoplazmy komórek nowotworowych a stadium klinicznym i wielkością guza

[7]. Nie wykazano także zmian w ekspresji MT w przypadku leczenia związkami cisplatyny [7].

W niedrobnokomórkowym raku płuc (non-small-cell lung carcinoma NSCLC), który jest uważany za mniej złośliwą postać, wykazano wzrost ekspresji MT w komórkach nowotworowych. Zwiększona ekspresja MT korelowała ze zwiększoną proliferacją komórek nowotworowych oraz z krótszym czasem przeżycia pacjentów [18]. W NSCLC wykazano także, że zwiększona ekspresja MT zwiększa oporność nowotworu na leczenie doksorubicyną, co także może mieć gorsze rokowanie [81].

Drugi rodzaj raka płuc - rak drobnokomórkowy (small-cell lung carcinoma, SCLC), jest bardziej podatny na proces złośliwienia. Odsetek 5-letnich przeżyć wynosi zaledwie 5%. Dużym problemem jest również oporność komórek nowotworowych na zastosowaną chemioterapię [28]. W przypadku SCLC stwierdzono, że nadekspresja MT jest niezależnym czynnikiem prognozującym krótsze przeżycie pacjentów poddanych chemioterapii oraz wykazano związek między ekspresją MT a białkiem p53 w prognozowaniu przeżycia pacjentów [28]. Immunohistochemiczne badania prowadzone przez Theoharisa i wsp. nie wykazały obecności MT w SCLC, natomiast potwierdziły zwiększoną ekspresję tego białka w jądrze i cytoplazmie w tkance objętej rakiem płaskonabłonkowym płuc (squamous cell lung carcinoma), który jest rodzajem NSCLC [71].

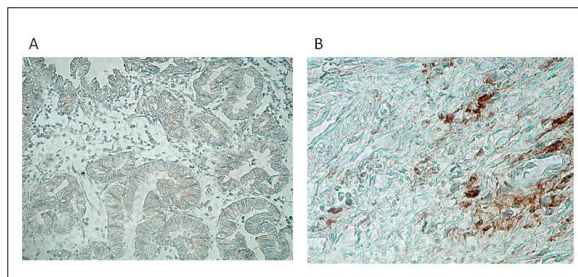
W nowotworach żołądka (stomach/gastrin cancer) opublikowano sprzeczne wyniki. Stwierdzono istotny spadek ekspresji izoform MT-1 i MT-2 w zaawansowanych stadiach raka żołądka w porównaniu do tkanek zdrowych i nie wykazano zależności między ekspresją MT a typem nowotworu i czasem przeżycia pacjenta [74]. Janssen i wsp. analizując ekspresję MT-1 i MT-2 metodą radioimmunologiczną (radioimmunoassay, RIA) wykazali obniżoną ekspresję izoform tego białka w zaawansowanym stadium raka żołądka w porównaniu do zdrowych tkanek śluzówki żołądka [26,27]. Natomiast badania prowadzone przez Eberta i wsp. z użyciem technik RT-PCR i Northern blot wykazały wzrost ekspresji izoformy MT-2a w raku żołądka. Nie stwierdzono istotnej korelacji między wielkością ekspresji izoform MT a stadium i stopniem zróżnicowania oraz typem nowotworu [19].

W raku wątroby (liver cancer) wzmocniona ekspresja MT dotyczy przede wszystkim komórek reaktywnych, bezpośrednio otaczających struktury nowotworowe i pojawia się jako odpowiedź ustroju na istniejący i postępujący proces nowotworzenia [9]. W komórkach bezpośrednio objętych nowotworem wykazano spadek ekspresji MT zarówno w raku wątrobowo-komórkowym (hepatocellular carcinoma, HCC), jak i gruczolaku wątroby (liver adenocarcinoma) [9]. Zaobserwowano odwrotną zależność między ekspresją MT a apoptozą w tkankach raka wątrobowo-komórkowego, co wiązało się z dłuższym czasem przeżycia pacjentów [9,70].

W raku trzustki (pancreatic cancer) badanie ekspresji MT może być istotnym markerem w ustaleniu stopnia złośliwienia guza [54]. Zwiększona ekspresja MT dodatkowo koreluje ze wzmoczoną proliferacją oraz z krótszym okresem przeżycia pacjentów [54].

Immunohistochemiczne badania prowadzone na skrawkach tkanek trzustki z gruczolako-torbielakami (pancreatic serous cyst adenoma, SCA) oraz gruczolakorakami (adenocarcinomas) wykazały zróżnicowaną ekspresję MT w zależności od rodzaju nowotworu [68]. W SCA zaobserwowano słabą ekspresję MT, zbliżoną do obserwowanej w zdrowej tkance trzustki, co potwierdza nieinwazyjny i miejscowy charakter nowotworu. Nie wykazano zależności między ekspresją MT a białkiem p53. W gruczolakorakach wykazano zwiększoną ekspresję MT, która pozytywnie korelowała ze zwiększoną ekspresją p53 oraz gorszym rokowaniem u pacjentów niż w przypadku gruczolako-torbielaków trzustki [68]. Na ryc. 2 przedstawiono immunohistochemiczne umiejscowienie MT w tkance trzustki objętej zmianą łagodną (gruczolako-torbielak) oraz złośliwą (gruczolakorak).

Ekspresja MT odgrywa istotną rolę w nowotworach organów zbudowanych z komórek mezodermalnych, takich jak nerki i kora nadnerczy, stercz oraz komórki macicy i endometrium [56].



**Ryc. 2.** Immunohistochemiczne umiejscowienie MT w tkance trzustki objętej zmianą łagodną (A - gruczolako-torbielak) oraz złośliwą (B - gruczolakorak)

Wykazano korelację między ekspresją MT a wielkością guza w nowotworach nerkowokomórkowych (renal cell carcinoma, RCC), które są bardzo częste u ludzi, stosunkowo trudnym leczeniem i krótką przeżywalnością [75]. Odwrotną zależność stwierdzono między wzmoczoną ekspresją MT w obrębie komórek rakowych a odsetkiem przeżywalności pacjentów dotkniętych RCC [48]. Nie wykazano związku ekspresji MT od stopnia zaawansowania nowotworu oraz jego skłonnością do przerzutów [48,75].

W nowotworach złośliwych stercza (prostate cancer) wykazano sprzeczne wyniki. Wei i wsp. zaobserwowali obniżoną ekspresję MT w tkance stercza objętej nowotworem złośliwym w porównaniu do komórek zdrowych [79]. W badaniach *in vitro* prowadzonych na komórkach raka stercza wykazano prawie 95% spadek ekspresji izoform MT -1 i MT-2 w porównaniu do prawidłowej tkanki [79].

W komórkach raka stwierdzono znacznie mniejsze wyśnienie MT w obrębie jądra komórkowego niż w komórkach zdrowych. Obniżona ekspresja MT korelowała zarówno ze stopniem zaawansowania raka stercza, jak i z postępowaniem choroby [79]. Nie wykazano zależności między stopniem zahamowania ekspresji MT a stosowanym w praktyce diagnostycznej markerem raka stercza, tzw. swoistym antygenem sterczowym (prostate-specific antygen, PSA) [3]. Natomiast w badaniach prowadzonych przez Yamasaki i wsp. stwierdzono zwiększone stężenie MT w komórkach nowotworowych jako skutek niedotlenienia, co może wywołać chemiooporność [83]. Szczególnie w przypadku izoformy MT-2a wykazano 3-8-krotny wzrost ekspresji MT w nowotworowych liniach komórkowych stercza (androgen-sensitive human prostate adenocarcinoma cells - LNCaP i human prostate cancer cell lines - PC-3) [83].

Badano również ekspresję MT w nowotworach macicy, wśród których wyróżnia się trzy główne typy – mięsaki macicy, nowotwory endometrium oraz rak szyjki macicy.

W badaniach immunohistochemicznych prowadzonych w tkance nowotworowej mięśni gładkich macicy (smooth-muscle uterine tumors) wykazano wzrost ekspresji MT w komórkach nowotworowych w porównaniu do prawidłowych komórek mięśni macicy, co wskazuje, że MT może być rozpatrywana jako marker transformacji nowotworowej w tkankach tego narządu [39].

W raku szyjki macicy stwierdzono wzrost ekspresji MT w miarę postępowania choroby, zwłaszcza w okresie przechodzenia nowotworu z fazy II do III [71]. Podobną zależność zaobserwowano w raku kolczystokomórkowym skóry (squamous cell carcinoma, SCC) w obrębie tkanek macicy. Potwierdzono zależność między ekspresją MT a stadiem guza, związanym ze wzmoczoną proliferacją [45]. W gruczolakorakach, mięsakach i mięśniakomięsakach tkanek endometrium, komórkowa ekspresja MT dodatkowo korelowała ze stopniem złośliwienia nowotworu oraz zdolnościami proliferacyjnymi tkanek nowotworowych. Potwierdzono zatem przydatność oznaczania stężenia/ekspresji MT jako markera prognostycznego w rokowaniu przeżycia pacjentek [16].

Ekspresja MT jako markera nowotworzenia może być również istotna w nowotworach tkanek wywodzących się z komórek ektodermalnych, takich jak: skóra właściwa, nabłonek jelita oraz układ nerwowy i narządy zmysłów.

W nowotworach skóry wyróżnia się głównie: raka podstawokomórkowego (basal-cell carcinoma, BCC), SCC oraz czerniaka złośliwego. Największy odsetek występowania (60-70% wszystkich nowotworów skóry) dotyczy BCC, który cechuje się miejscowym wzrostem i niewielką zdolnością do tworzenia przerzutów, lecz w stadiach zaawansowanych może spowodować znaczną destrukcję skóry i tkanek głębszych.

Wykazano zwiększoną ekspresję MT w tkance objętej SCC w porównaniu do BCC, co wskazuje, że badanie eks-

presji MT może być istotne w różnicowaniu tych dwóch typów nowotworów skóry. Wzrost ekspresji wiąże się ze zwiększoną agresywnością choroby [5]. Badania immunohistochemiczne prowadzone na skrawkach tkanek czerniaka wykazały zwiększoną ekspresję MT w tkance nowotworowej, co wiązało się ze złym rokowaniem [80]. W badaniach *in vitro* prowadzonych przez Suzuki i wsp. zaobserwowano, że brak ekspresji MT u myszy indukował szybsze powstawanie nowotworów skóry wywołane przez dimetylobenzantracen i 12-mirystynian 13-octan forbolu (phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA) w porównaniu do zwierząt z prawidłową ekspresją tego białka [65].

Analizowano ekspresję MT oraz KI-67, uznanego markera proliferacji, w tkance włókniakomięsaków. Wykazano bardzo niewielką korelację między analizowanymi parametrami ( $r=0,14$ ), co wskazuje, że w tego typu nowotworze oznaczanie ekspresji MT jako markera prognostycznego nie znajduje zastosowania [53]. Niejednoznaczna rola MT w nowotworach skóry wymaga dalszych badań.

Nowotwór piersi był jednym z pierwszych nowotworów, w którego komórkach zidentyfikowano obecność MT wykorzystując metody immunohistochemiczne. Wykazano zależność między wzrostem ekspresji MT, zarówno w obrębie jądra komórkowego, jak i w cytoplazmie a stadiem zaawansowania guza, stopniem nawracalności choroby oraz prognozowaniem najbardziej złośliwych typów nowotworów piersi [64]. Wzrost ekspresji MT w komórkach nowotworowych korelował ze złośliwością guza [9]. Nie stwierdzono bezpośredniej zależności między ekspresją MT a przeżywalnością pacjentów dotkniętych najbardziej inwazyjnymi i podatnymi na złośliwienie postaciami raka piersi [4]. Wynika to najprawdopodobniej z tego, że te postaci nowotworów wiążą się ze złą prognozą, przez co badanie ekspresji MT nie może być wystarczającym markerem [56]. Badania immunohistochemiczne prowadzone w gruczolakorakach gruczołu sutka suk analizowane metodą półilościową (semiquantitative metod) wykazały zróżnicowaną ekspresję MT sugerującą wewnątrzsobnicze zmiany w ekspresji tego białka [52]. W hormonozależnym raku piersi wykazano odwrotną zależność między ekspresją MT a statusem receptorów estrogenowych i progesteronowych oraz zaobserwowano, że brak receptorów estrogenowych zwiększa ekspresję MT, co może się wiązać z krótszym przeżyciem chorych [56]. Nie można zatem jednoznacznie ustalić rolę MT w nowotworach piersi.

Analizowano również ekspresję MT w nowotworach ośrodkowego układu nerwowego (OUN, central nervous system, CNS). W największym odsetku zwiększoną ekspresję izoform MT-1 i MT-2 zaobserwowano w oponiakach, zwłaszcza atypowych o największym stopniu złośliwienia [56]. Badania immunohistochemiczne ekspresji MT w komórkach glejaka wykazały, że ekspresja MT w ponad 50% komórek nowotworowych zwiększa przeżywalność pacjentów w porównaniu z pacjentami, u których MT występowała poniżej 50% komórek nowotworowych [17].

**Tabela 1.** Ekspresja MT w wybranych narządach objętych chorobą nowotworową

Narząd	Typ nowotworu	Wzrost ↑, spadek ↓ ekspresji MT
<b>Narządy zbudowane z komórek endodermalnych</b>		
Tarczycza	wole tarczycy	↑ [35]
	gruczolak pęcherzykowy	↑ [35]
	rak brodawkowy	↑ [35] ↓ [20]
	rak pęcherzykowy	↑ [35]
	rak rdzeniasty tarczycy	~
Krtień	rak krtani	↑ [23,55]
Jama ustna i gardło	nowotwory jamy ustnej i gardła	~ [7]
Płuca	niedrobnokomórkowy rak płuc	↑ [18,81]
	drobnokomórkowy rak płuc	↑ [28] ↓ [71]
Żołądek	rak żołądka	↓ [26,27,74] ↑ [19]
Wątroba	rak wątrobowo-komórkowy	↓ [9]
	gruczolak wątroby	↓ [9]
Trzustka	gruczolakorak	↑ [54,68]
<b>Narządy zbudowane z komórek mezodermalnych</b>		
Nerki	rak nerkowo-komórkowy	↑ [48,75]
Prostata	rak prostaty	↓ [3,79] ↑ [83]
Macica	nowotwór mięśni gładkich macicy	↑ [42]
	rak szyjki macicy	↑ [71]
	rak kolczysto-komórkowy macicy	↑ [45]
	gruczolakoraki, mięsaki, mięśniakomięsaki, endometrium	↑ [16]
<b>Narządy zbudowane z komórek ektodermalnych</b>		
Skóra	rak podstawno-komórkowy	~ [5]
	rak kolczysto-komórkowy	↑ [5]
	czerniak	↑ [80]
Piersi	rak piersi	↑ [4, 64]
	hormonozależny rak piersi	↑ [56]
	gruczolakorak gruczołu sutka	~ [52]
Osrodkowy układ nerwowy (OUN)	oponiaki	↑ [56]
	łagodne nowotwory CUN	↑ [51]
	nowotwory złośliwe CUN	↓ [51]

~ - nie stwierdzono bezpośredniego związku

W łagodnych postaciach nowotworu OUN stężenie MT jest podwyższone, podczas gdy w złośliwych obniżone, co wskazuje na przydatność oznaczania stężenia/ekspresji MT zarówno w ustaleniu postaci guza, jak i jego podatności na zezłośliwienie [51]. Badania *in vitro* prowadzone na ludzkich kulturach komórek OUN wykazały, że preinkubacja komórek z 5 Cd lub 100  $\mu$ M Zn indukuje syntezę MT oraz chroni neurony i astrocyty przed negatywnymi skutkami radioterapii [6]. Eliminacja działań niepożądanych radioterapii mogłaby zwiększać odsetek pacjentów z dobrą prognozą przeżycia [6].

W tabeli 1 przedstawiono zmiany ekspresji MT w wybranych chorobach nowotworowych.

### WPEŁYW METALOTIONEINY NA RADIOTERAPIĘ

Promieniowanie jonizujące wykorzystywane w radioterapii ma na celu zniszczenie guza przez wywołanie niemożliwych do naprawy uszkodzeń DNA i śmierci komórek nowotworowych. Skuteczność radioterapii jest przede wszystkim związana z tym, iż zdrowa tkanka jest bardziej zdolna do naprawy uszkodzeń DNA w porównaniu z bardzo szybko dzielącymi się komórkami guza [82].

Oddziaływanie promieniowaniem jonizującym na guz nowotworowy może mieć charakter pośredni albo bezpośredni. Bezpośrednie oddziaływanie to frontalne skierowanie promieniowania jonizującego na guz. Działaniem pośrednim jest oddziaływanie przez inne substancje znajdujące się w komórce. W komórce największą jest woda. Prawdopodobieństwo, że promieniowanie jonizujące uderzy w jej cząsteczkę jest największe. W ten sposób dochodzi do radiolizy wody, która powoduje rozpad cząsteczek  $H_2O$  i powstawanie RFT [57]. MT bierze udział w neutralizacji powstających w wyniku zastosowania radioterapii RFT. Zarówno w badaniach *in vivo*, jak i *in vitro* wykazano, że izoformy MT-1 i MT-2 redukują uszkodzenia DNA powstające w wyniku ponadnormatywnego stężenia szczególnie toksycznego  $OH^\bullet$ . Porównywano także zdolności antyoksydacyjne MT oraz glutation (glutathione, GSH) w reakcjach neutralizacji RFT [1]. Wykazano, że MT chroni około 38,5-50 razy bardziej skutecznie strukturę DNA przed atakiem rodnika  $OH^\bullet$  aniżeli GSH [49,63].

Komórka dotknięta procesem onkogenezy może zachować silne właściwości proliferacyjne, mimo narażenia na RFT [67]. Wzmocniona ekspresja MT w samych komórkach nowotworowych może być istotnym czynnikiem zapobiegającym ich destrukcji w wyniku działania promieniowania jonizującego [63]. Dotyczy to zwłaszcza nowotworów wykazujących pierwotną, wzmoczoną ekspresję MT [21].

Wstępne badanie ekspresji MT w obrębie komórek danego guza, pobranych w wyniku biopsji, może stanowić ważne kryterium doboru właściwego leczenia, w tym także rezygnacji z radioterapii, zwłaszcza gdy działania niepożądane wydają się niewspółmiernie wysokie w stosunku do spodziewanych rezultatów terapeutycznych [69].

Wprawdzie radioterapia jest ważną metodą leczenia chorych nowotworowo o dużym stopniu skuteczności, jednak jej stosowanie wiąże się każdorazowo z niebezpieczeństwem powstania zjawiska tzw. wtórnej karcynogenezy.

Toksyczność radioterapii wzrasta wówczas, gdy stwierdzenie pierwotnej oporności danego nowotworu na promieniowanie jonizujące wymaga większych jego dawek. Problem był przedmiotem badań, których wyniki sugerują możliwość wykorzystania wzmoczonej ekspresji MT w komórkach zdrowych, jako swego rodzaju protektora przed negatywnym wpływem RFT i innych wolnych rodników na tkanki niedotknięte procesem karcynogenezy. Zwłaszcza badania przeprowadzone na myszach wykazały, że indukcja MT, będąca odpowiedzią organizmu na jonizację, przyczynia się do spadku odsetka działań niepożądanych radioterapii w zakresie uszkodzeń szpiku kostnego [61,62].

Zdolność MT do usuwania RFT może wpływać na niepowodzenie w leczeniu promieniowaniem jonizującym. Ekspresja MT w komórce nowotworowej współtworzy mechanizm obronny guza przed skutkami promieniowania, hamując procesy mające doprowadzić do pożądanej apoptozy. Jednak te same właściwości MT są pożądane w przypadku zdrowych tkanek organizmu, tak samo narażonych na działanie promieniowania jonizującego, jak komórki guza [56,61,63].

W nowotworach mózgu wraz z postępowaniem procesu karcynogenezy utrzymuje się zasadniczo nieduża ekspresja MT w komórkach guza przy jednoczesnym znacznym wzroście jej stężenia w komórkach otaczających. Ekspresja może być dodatkowo indukowana leczeniem skojarzonym – celowanym podaniem preparatów zawierających związki Zn [56,63]. W ten sposób MT może chronić zdrowe tkanki otaczające guz przed szkodliwymi działaniami radioterapii, zwłaszcza w podatnych na szybką destrukcję neuronach i astrocytach [6].

Właściwości MT w porównaniu do efektów radioterapii, mogą decydować o wyborze metody leczenia. Wstępne badanie ekspresji MT w komórkach guza może przesądzać o konieczności wyeliminowania radioterapii jako metody pierwszego wyboru, ponieważ w nadekspresji MT w tkance guza, należy założyć wystąpienie zjawiska wzmoczonej oporności na promieniowanie jonizujące. Jest to szczególnie istotne w leczeniu, w którym dużą rolę odgrywa bilansowanie ewentualnych zysków i strat, jakie można osiągnąć, stosując radioterapię [56, 63].

### WPEŁYW METALOTIONEINY NA AKTYWNOŚĆ I SKUTECZNOŚĆ WYBRANYCH LEKÓW PRZECIWNOWOTWOROWYCH

Istotą działania leków przeciwnowotworowych jest hamowanie proliferacji komórek raka. Oprócz toksyczności leków przeciwnowotworowych, dużym problemem jest MDR. W badaniach dotyczących zależ-



ności między ekspresją MT a zjawiskiem MDR postawiono hipotezę, że wewnątrzkomórkowe stężenie MT może być czynnikiem determinującym powstanie i rozwój oporności nowotworu na zastosowane środki farmakologiczne wynikające m.in. z detoksykacyjnej funkcji MT.

Przeprowadzono badania eksperymentalne na myszach z transplantowanymi komórkami nowotworowymi. Wykazano obniżoną aktywność cytostatyczną leków z grupy preparatów alkilujących (przede wszystkim cyklofosfamid oraz melfalanu), a także niektórych antracyklin (doksorubicyny, bleomycyny i peplomycyny). Częściowe zahamowanie przeciwnowotworowego działania tych leków obserwowano nawet wówczas, gdy ekspresja MT wewnątrz komórki wzrastała jedynie dwukrotnie w stosunku do stężenia tego białka u myszy kontrolnych. Stwierdzono także, że działanie innych leków np. mitomycyny C, 5fluorouracylu i winblastyny pozostawało bez zmian nawet w warunkach wielokrotnego wzrostu ekspresji MT.

Jednocześnie nie wykazano różnicy w ekspresji mRNA glikoproteiny P (P-glycoprotein 1, Pgp, synonim multydrug resistance protein 1, MDR1) czy GSH, czynników uważanych dotychczas za podstawowe determinanty MDR [56].

W badaniach eksperymentalnych prowadzonych na myszach analizowano wpływ ekspresji MT na aktywność leków przeciwnowotworowych z grupy alkilujących oraz chloru cynku. Wykazano, że wskutek zwiększonej indukcji MT dochodzi do zahamowania działania nie tylko leków pierwszego wyboru, ale także włączonych następnie leków z grupy antracyklin. Stwierdzono zatem, że indukcja MT determinuje krzyżową, złożoną oporność na cytostatyki [56].

Badano również wpływ ekspresji MT na aktywność cytostatyków bazujących na związkach platyny (Pt). Podstawowym mechanizmem działania kompleksów Pt jest inhibicja replikacji DNA prowadząca do apoptozy komórkowej [16]. W terapii związkami Pt zastosowanie znalazły głównie: cisplatyna, karboplatyna oraz oksaliplatyna [31]. W leczeniu związkami Pt dużym problemem jest oporność komórek rakowych na te związki [16]. Za najważniejszy czynnik oporności uznaje się zwiększoną aktywność procesów naprawy uszkodzonego DNA. W ten sposób komórki nowotworowe wytwarzają system obronny przed toksycznym działaniem Pt, blokując zakładany terapeutyczny skutek programowanej śmierci komórkowej [15], co może się wiązać z nadexpresją białek antyapoptotycznych.

Metalotioneina, przez aktywne grupy sulfhydrylowe, wykazuje duże powinowactwo do Pt, co wpływa destrukcyjnie na działanie kompleksów tego pierwiastka. Wzrost ekspresji MT wiąże białka z atomami Pt w obrębie cząsteczki danego związku, przez co zaburzona zostaje jego budowa i funkcja molekularna. Mechanizm inicju-

jący apoptozę komórkową przez uszkodzenie struktury DNA za pomocą wiązania Pt-N(7)G nie może być już tak skuteczny. Brak osiągnięcia założonego skutku i śmierci komórek nowotworowych powoduje powstanie wtórnej oporności na leczenie danym związkiem Pt i zahamowanie postępów terapeutycznych [33].

Badania elektrochemiczne wykazały, że największa interakcja zachodzi między atomami Pt w oksaliplatynie a MT-2. Nieznacznie mniejsza między atomem Pt a MT-2 w przypadku cisplatyny. Najmniej reaktywny związek stwierdzono między atomem Pt w karboplatynie a MT-1 [31]. Wpływ MT na oporność związków Pt może zależeć nie tylko od rodzaju danego kompleksu, ale także od ekspresji konkretnej izoformy MT w komórce.

Wzrost ekspresji MT jako zmiatacza wolnych rodników oraz jej udział w procesach angiogennych guza może uruchamiać dalszą proliferację komórek nowotworowych [33,34]. Natomiast nowo powstałe komórki generują wzrost stężenia białek oporności wielolekowej, takich jak: Pgp, białko oporności wielolekowej (multydrug resistance-related protein, MRP) i białko oporności raka piersi (breast cancer resistance protein, BCRP), odpowiedzialnych za eliminację cytostatyków z komórki.

Wykazano także, że wyłączenie genów kodujących MT u myszy zwiększało wrażliwość zwierząt na leczenie cytostatykami w porównaniu do grupy kontrolnej charakteryzującej się prawidłową ekspresją MT [32,56].

Analizowano także wpływ ekspresji MT na terapię lekami z grupy antracyklin. Podstawową zasadą działania antracyklin, a zwłaszcza doksorubicyny (DOX) oraz daunorubicyny (DRB), jest indukcja topoizomazy II oraz interakcje z DNA komórek rakowych, powodujące modyfikację układu zasad azotowych zaburzające procesy replikacji i transkrypcji.

Uszkodzenia struktury DNA mogą być również wywołane zwiększonym stężeniem RFT powstałych w wyniku działania antracyklin [66]. Oddziaływanie RFT na DNA powoduje jedno- lub dwuniciowe pęknięcia łańcucha, które mogą zapoczątkowywać proces apoptozy [66]. Ze względu na właściwości antyoksydacyjne MT jest czynnikiem sprzyjającym powstawaniu oporności na antracykliny i hamującym apoptozę.

W leczeniu DOX, zaobserwowano pozytywną rolę MT. Jednym z najczęściej obserwowanych działań niepożądanych leczenia antracyklinami jest ich kardiotoksyczność. Średnio po upływie roku od rozpoczęcia terapii DOX drastycznie wzrasta ryzyko powstania kardiomiopatii, często prowadzącej do przewlekłej niewydolności krążenia [66]. Badania wykazały, że MT mogą odgrywać rolę kardioprotektora dzięki zdolnościom antyapoptycznym i antyoksydacyjnym chronią komórki mięśnia sercowego przed negatywnym działaniem antracyklin [29].

## PODSUMOWANIE

Rola i znaczenie MT w powstawaniu, rozwoju i leczeniu chorych z chorobami nowotworowymi jest ambivalentna. Niektóre funkcje MT, takie jak regeneracyjna, antyoksydacyjna, angiogenna i detoksykacyjna mogą się przyczyniać do rozwoju nowotworu, podczas gdy przeciwnie działanie może działać supresyjnie na nowotwór.

MT nie można uznać za uniwersalny marker nowotworowy. Wiele nowotworów nie wykazuje korelacji między ekspresją MT w komórkach nowotworach a stopniem zaawansowania, wielkością guza i zdolnością do przerzutów.

Ekspresja MT ma istotne znaczenie w zastosowanym leczeniu przeciwnowotworowym. W radioterapii zdolność MT do wiązania wolnych rodników może zahamować letalny wpływ RFT na struktury DNA komórek nowotworowych, natomiast chroni komórki zdrowe przed uszkodzeniami wynikającymi z oddziaływania promieniowania jonizującego.

W chemioterapii za powstawanie zjawiska MDR odpowiada przede wszystkim zdolność MT do wiązania metali obecnych w lekach alkilujących, takich jak cisplatyna. Zwiększona ekspresja MT dezaktywuje Pt, hamując apoptozę komórek nowotworowych. W razie użycia antracyklin, a zwłaszcza DOX i DRB, zdolność MT do neutralizacji wolnych rodników jest głównym czynnikiem sprzyjającym powstawaniu oporności na chemioterapeutyki. Natomiast dzięki zdolnościom antyapoptocznym i antyoksydacyjnym MT może skutecznie chronić komórki mięśnia sercowego przed kardiotoxycznością tych leków.

Ważne jest opracowanie takich metod terapeutycznych, które umożliwiłyby wyeliminowanie lub zminimalizowanie roli MT jako czynnika MDR, z jednoczesnym zachowaniem ich wpływu na ochronę komórek zdrowych, narażonych na szkodliwe działania radio- i chemioterapii.

## PODZIĘKOWANIA

Dziękujemy dr Marioli Śliwińskiej-Mossoń za udostępnienie fotografii immunohistochemicznej lokalizacji MT w skrawkach nowotworowych tkanek trzustki.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] Abel J., de Ruiter N.: Inhibition of hydroxyl-radical-generated DNA degradation by metallothionein. *Toxicol. Lett.*, 1989; 47: 191-196
- [2] Arriaga J.M., Bravo I.A., Bruno L., Morales-Bayo S., Hannois A., Sanchez-Loria F., Pairola F., Huertas E., Roberti M.P., Rocca Y.S., Aris M., Barrio M.M., Baffa-Trasci S., Levy E.M., Mordoh J., Bianchini M.: Combined metallothioneins and p53 proteins expression as a prognostic marker in patients with Dukes stage B and C colorectal cancer. *Hum. Pathol.*, 2012; 43: 1695-1703
- [3] Athanassiadou P., Bantis A., Gonidi M., Athanassiades P., Ageloidou E., Grapsa D., Nikolopoulou P., Patsouris E.: The expression of metallothioneins on imprint smears of prostate carcinoma: correlation with clinicopathologic parameters and tumor proliferative capacity. *Tumori*, 2007; 93: 189-194
- [4] Bay B.H., Jin R., Huang J., Tan P.H.: Metallothionein as a prognostic biomarker in breast cancer. *Exp. Biol. Med.*, 2006; 231: 1516-1521
- [5] Borges Junior P.C., Ribeiro R., Cardoso S.V., Berbet A., Rocha A., Espindola F.S., Loyola A.M.: Metallothionein immunolocalization in actinic skin nonmelanoma carcinomas. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.*, 2007; 15: 165-169
- [6] Cai L., Cherian M.G., Iskander S., Leblanc M., Hammond R.R.: Metallothionein induction in human CNS in vitro: neuroprotection from ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Biol.*, 2000; 76: 1009-1017
- [7] Cardoso S.V., Barbosa H.M., Candellori I.M., Loyola A.M., Aguiar M.C.: Prognostic impact of metallothionein on oral squamous cell carcinoma. *Virchows Arch.*, 2002; 441: 174-178
- [8] Carpenè E., Andreani G., Isani G.: Metallothionein functions and structural characteristics. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 2007; 21, Suppl. 1: 35-39
- [9] Cherian M.G., Jayasurya A., Bay B.H.: Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis. *Mutat. Res.*, 2003; 533: 201-209
- [10] Cherian M.G., Kang Y.J.: Metallothionein and liver cell regeneration. *Exp. Biol. Med.*, 2006; 231: 138-144
- [11] Chimienti F., Seve M., Richard S., Mathieu J., Favier A.: Role of cellular zinc in programmed cell death: temporal relationship between zinc depletion, activation of caspases, and cleavage of Sp family transcription factors. *Biochem. Pharmacol.*, 2001; 62: 51-62
- [12] Chung R.S., Penkowa M., Dittmann J., King C.E., Bartlett C., Asmussen J.W., Hidalgo J., Carrasco J., Leung Y.K., Walker A.K., Fung S.J., Dunlop S.A., Fitzgerald M., Beazley L.D., Chuah M.I., Vickers J.C., West A.K.: Redefining the role of metallothionein within the injured brain: extracellular metallothioneins play an important role in the astrocyte-neuron response to injury. *J. Biol. Chem.*, 2008; 283: 15349-15358
- [13] Coyle P., Philcox J.C., Carey L.C. and Rofe A.M.: Metallothionein: The multipurpose protein. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2002; 59: 627-647
- [14] Dabrio M., Rodriguez A.R., Bordin G., Bebianno M.J., De Ley M., Sestakova I., Vasak M., Nordberg M.: Recent developments in quantification methods for metallothionein. *J. Inorg. Biochem.*, 2002; 88: 123-134
- [15] Desoize B., Madoulet C.: Particular aspects of platinum compounds used at present in cancer treatment. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 2002; 42: 317-325
- [16] Dutsch-Wicherek M., Sikora J., Tomaszewska R.: The possible biological role of metallothionein in apoptosis. *Front. Biosci.*, 2008; 13: 4029-4038
- [17] Dziegiel P.: Expression of metallothioneins in tumor cells. *Pol. J. Pathol.*, 2004; 55: 3-12
- [18] Dziegiel P., Jeleń M., Muszczyńska B., Maciejczyk A., Szulc A., Podhorska-Okolów M., Cegielski M., Zabel M.: Role of metallothionein expression in non-small cell lung carcinomas. *Rocz. Akad. Med. Białymst.*, 2004; 49, Suppl. 1: 43-45
- [19] Ebert M.P., Günther T., Hoffmann J., Yu J., Miehle S., Schulz H.U., Roessner A., Korc M., Malfertheiner P.: Expression of metallothionein II in intestinal metaplasia, dysplasia, and gastric cancer. *Cancer Res.*, 2000; 60: 1995-2001

- [20] Ferrario C., Lavagni P., Gariboldi M., Miranda C., Losa M., Cleris L., Formelli F., Pilotti S., Pierotti M.A., Greco A.: Metallothionein 1G acts as an oncosuppressor in papillary thyroid carcinoma. *Lab. Invest.*, 2008; 88: 474-481
- [21] Gliński B., Mucha-Małecka A., Jakubowicz J., Frączek-Błachut B.: Rola radioterapii w leczeniu chorych z pierwotnymi i przerzutowymi guzami wątroby. *Współ. Onkol.*, 2008; 12: 272-275
- [22] Gumulec J., Raudenska M., Adam V., Kizek R., Masarik M.: Metallothionein - immunohistochemical cancer biomarker: a meta-analysis. *PLoS One*, 2014; 9: e85346
- [23] Hishikawa Y., Koji T., Dhar D.K., Kinugasa S., Yamaguchi M., Nagasue N.: Metallothionein expression correlates with metastatic and proliferative potential in squamous cell carcinoma of the oesophagus. *Br. J. Cancer*, 1999; 81:712-720
- [24] Ioachim E., Assimakopoulos D., Peschos D., Zissi A., Skevas A., Agnantis N.J.: Immunohistochemical expression of metallothionein in benign premalignant and malignant epithelium of the larynx: correlation with p53 and proliferative cell nuclear antigen. *Pathol. Res. Pract.*, 1999; 195: 809-814
- [25] Ishii K., Usui S., Yamamoto H., Sugimura Y., Tatematsu M., Hirano K.: Decreases of metallothionein and aminopeptidase N in renal cancer tissues. *J. Biochem.*, 2001; 129: 253-258
- [26] Janssen A.M., van Duijn W., Kubben F.J., Griffioen G., Lamers C.B., van Krieken J.H., van de Velde C.J., Verspaget H.W.: Prognostic significance of metallothionein in human gastrointestinal cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2002; 8: 1889-1896
- [27] Janssen A.M., van Duijn W., Oostendorp-Van De Ruit M.M., Kruiderien L., Bosman C.B., Griffioen G., Lamers C.B., van Krieken J.H., van De Velde C.J., Verspaget H.W.: Metallothionein in human gastrointestinal cancer. *J. Pathol.*, 2000; 192: 293-300
- [28] Joseph M.G., Banerjee D., Kocha W., Feld R., Stitt L.W., Cherian M.G.: Metallothionein expression in patients with small cell carcinoma of the lung: correlation with other molecular markers and clinical outcome. *Cancer*, 2001; 92: 836-842
- [29] Kang Y.J., Zhou Z.X., Wang G.W., Buridi A., Klein J.B.: Suppression by metallothionein of doxorubicin-induced cardiomyocyte apoptosis through inhibition of p38 mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275:13690-13698
- [30] Karotki A.V., Vasák M.: Reaction of human metallothionein-3 with cisplatin and transplatin. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2009; 14: 1129-1138
- [31] Kensova R., Kremplova R., Smerkova K., Zitka O., Hynek D., Adam V., Beklova M., Trnkova L., Stibrova M., Eckschlager T., Hubalek J., Kizek R.: Interactions of platinum-based cytostatics with metallothionein revealed by electrochemistry. *Int. J. Electrochem. Sci.*, 2013; 8: 4472-4484
- [32] Kondo Y., Woo E.S., Michalska A.E., Choo K.H., Lazo J.S.: Metallothionein null cells have increased sensitivity to anticancer drugs. *Canc. Res.*, 1995; 55: 2021-2023
- [33] Krizkova S., Fabrik I., Adam V., Hrabeta J., Eckschlager T., Kizek R.: Metallothionein – a promising tool for cancer diagnostics. *Bratisl. Lek. List.*, 2009; 110: 93-97
- [34] Krizkova S., Ryvolova M., Hrabeta J., Adam V., Stiborova M., Eckschlager T., Kizek R.: Metallothioneins and zinc in cancer diagnosis and therapy. *Drug Metab. Rev.*, 2012; 44: 287-301
- [35] Królicka A., Kobierzycki C., Puła B., Podhorska-Okolów M., Piotrowska A., Rzeszutko M., Rzeszutko W., Rabczyński J., Domosławski P., Wojtczak B., Dawiskiba J., Dzięgiel P.: Comparison of metallothionein (MT) and Ki-67 antigen expression in benign and malignant thyroid tumours. *Anticancer Res.*, 2010; 30: 4945-4949
- [36] Kundu J.K., Surh Y.J.: Inflammation: gearing the journey to cancer. *Mutat. Res.*, 2008; 659: 15-30
- [37] Lansdown A.B.: Metallothioneins: potential therapeutic aids for wound healing in the skin. *Wound Repair Regen.*, 2002; 10: 130-132
- [38] Lynes M.A., Zaffuto K., Unfricht D.W., Marusov G., Samson J.S., Yin X.: The physiological roles of extracellular metallothionein. *Exp. Biol. Med.*, 2006; 231: 1548-1554
- [39] Madej J.A., Madej P., Kamiński K., Milnerowicz H., Łagan J., Nowak M., Dzimira S.: Immunohistochemiczna lokalizacja metalotioneiny (MT) w mięśniakach macicy u kobiet. *Klin. Perinat. Ginekol.*, 2003; 39: 31-34
- [40] Madej J.A., Milnerowicz H., Dzimira S.: Immunohistochemiczna lokalizacja metalotioneiny (MT) w nowotworach nabłonkowych u zwierząt. *Medycyna Wet.*, 1999; 55: 806-808
- [41] Madej J.A., Milnerowicz H., Dzimira S., Nowak M.: Immunocytochemiczna lokalizacja metalotioneiny w chłoniakach złośliwych u psów. *Medycyna Wet.*, 2002; 58: 857-859
- [42] Madej J.A., Milnerowicz H., Kuryszek J., Dzimira S., Kapuśniak V.: Immunohistochemical localisation of metallothionein in leukemic lymphocytes in BLV - infected cattle. *Pol. J. Vet. Sci.*, 2000; 3: 227-230
- [43] Manso Y., Adlard P.A., Carrasco J., Vašák M., Hidalgo J.: Metallothionein and brain inflammation. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2011; 16: 1103-1113
- [44] Margoshes M., Vallee B.L.: A cadmium protein from equine kidney cortex. *J. Am. Chem. Soc.*, 1957; 79: 4813-4814
- [45] McCluggage W.G., Maxwell P., Bharucha H.: Immunohistochemical detection of metallothionein and MIB1 in uterine cervical squamous lesions. *Int. J. Gynecol. Pathol.*, 1998; 17: 29-35
- [46] Milnerowicz H., Bizoń A.: Determination of metallothionein in biological fluids using enzyme-linked immunoassay with commercial antibody. *Acta Biochim. Pol.*, 2010; 57: 99-104
- [47] Milnerowicz H., Jabłonowska M., Bizoń A.: Change of zinc, copper, and metallothionein concentrations and the copper-zinc superoxide dismutase activity in patients with pancreatitis. *Pancreas*, 2009; 38: 681-688
- [48] Mitropoulos D., Kyrouti-Vouglari A., Theocharis S., Serafetinides E., Moraitis E., Zervas A., Kittas C.: Prognostic significance of metallothionein expression in renal cell carcinoma. *World J. Surg. Oncol.*, 2005; 3: 5
- [49] Miura T., Muraoka S., Ogiso T.: Antioxidant activity of metallothionein compared with reduced glutathione. *Life Sci.*, 1997; 60: 301-309
- [50] Miyashita H., Sato Y.: Metallothionein 1 is a downstream target of vascular endothelial zinc finger 1 (VEZF1) in endothelial cells and participates in the regulation of angiogenesis. *Endothelium*, 2005; 12: 163-170
- [51] Nielsen A.E., Bohr A., Penkowa M.: The balance between life and death of cells: roles of metallothioneins. *Biomark. Insights*, 2006; 1: 99-111
- [52] Nowak M., Madej J.A., Dzięgiel P.: Ekspresja metalotioneiny i jej korelacja z antygenem Ki-67 w gruczolakorakach gruczołu sutkowego suk. *Medycyna Wet.*, 2006; 62: 427-431
- [53] Nowak M., Madej J.A., Dzięgiel P.: Extent of metallothionein expression in correlation with expression of Ki-67 antigen in soft tissue fibrosarcomas in dogs. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, 2007; 51: 139-144
- [54] Ohshio G., Imamura T., Okada N., Wang Z.H., Yamaki K., Kyogoku T., Suwa H., Yamabe H., Imamura M.: Immunohistochemical study of metallothionein in pancreatic carcinomas. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 1996; 122: 351-355
- [55] Pastuszewski W., Dzięgiel P., Kręcicki T., Podhorska-Okolów M., Ciesielska U., Gorzyńska E., Zabel M.: Prognostic significance of metallothionein, p53 protein and Ki-67 antigen expression in laryngeal cancer. *Anticancer Res.*, 2007; 27: 335-342

- [56] Pedersen M.Ø., Larsen A., Stoltenberg M., Penkowa M.: The role of metallothionein in oncogenesis and cancer prognosis. *Prog. Histochem. Cytochem.*, 2009; 44: 29-64
- [57] Przybyszewski W.M., Wideł M., Rzeszowska-Wolny J.: Kardiotoxyczne następstwa promieniowania jonizującego i antracyklin. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2006; 60: 397-405
- [58] Ruttkey-Nedecky B., Nejd L., Gumulec J., Zitka O., Masarik M., Eckschlager T., Stiborova M., Adam V., Kizek R.: The role of metallothionein in oxidative stress. *Int. J. Mol. Sci.*, 2013; 14: 6044-6066
- [59] Sabolić I., Breljak D., Skarica M., Herak-Kramberger C.M.: Role of metallothionein in cadmium traffic and toxicity in kidneys and other mammalian organs. *Biometals*, 2010; 23: 897-926
- [60] Schiller J.T., Lowy D.R.: Virus infection and human cancer: an overview. *Recent Results Cancer Res.*, 2014; 193: 1-10
- [61] Shibuya K., Nishimura N., Suzuki J.S., Tohyama C., Naganuma A., Satoh M.: Role of metallothionein as a protective factor against radiation carcinogenesis. *J. Toxicol. Sci.*, 2008; 33: 651-655
- [62] Shibuya K., Suzuki J.S., 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] Stępkowska I.M.: Właściwości biologiczne metalotioneiny i ich udział w procesach oksydoredukcyjnych w komórkach, ze szczególnym uwzględnieniem ośrodkowego układu nerwowego człowieka. *Postępy Biol. Komórki*, 2010; 37: 869-885
- [64] Surowiak P., Materna V., Gyorffy B., Matkowski R., Wojnar A., Maciejczyk A., Paluchowski P., Dziegiel P., Pudelko M., Kornafel J., Diel M., Kristiansen G., Zabel M., Lage H.: Multivariate analysis of oestrogen receptor alpha, p52, metallothionein and CD24 expression in invasive breast cancers. *Br. J. Cancer*, 2006; 95: 339-346
- [65] Suzuki J.S., Nishimura N., Zhang B., Nakatsuru Y., Kobayashi S., Satoh M., Tohyama C.: Metallothionein deficiency enhances skin carcinogenesis induced by 7,12-dimethylbenz[ $\alpha$ ]anthracene and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in metallothionein-null mice. *Carcinogenesis*, 2003; 24: 1123-1132
- [66] Szulawska A., Czyż M.: Molekularne mechanizmy działania antracyklin. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2006; 60: 78-100
- [67] Ścibior-Bentkowska D., Czczot H.: Komórki nowotworowe a stres oksydacyjny. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2009; 63: 58-72
- [68] Śliwińska-Mossoń M., Milnerowicz H., Rabczyński J., Milnerowicz S.: Immunohistochemical localization of metallothionein and p53 protein in pancreatic serous cystadenomas. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 2009; 57: 295-301
- [69] Ślosarek K.: Podstawy planowania leczenia w radioterapii na podstawie skryptu kursu „Praktyczne aspekty współczesnej radioterapii”, Polskie Towarzystwo Onkologiczne Oddział Śląski, Gliwice 2007, 95-134
- [70] Tao X., Zheng J.M., Xu A.M., Chen X.F., Zhang S.H.: Downregulated expression of metallothionein and its clinicopathological significance in hepatocellular carcinoma. *Hepatol. Res.*, 2007; 37: 820-827
- [71] Theocharis S.E., Margeli A.P., Koutselinis A.: Metallothionein: a multifunctional protein from toxicity to cancer. *Int. J. Biol. Markers*, 2003; 18: 162-169
- [72] Thirumorthy N., Manisenthil Kumar K.T., Shyam Sundar A., Panayappan L., Chatterjee M.: Metallothionein: an overview. *World J. Gastroenterol.*, 2007; 13: 993-996
- [73] Trynda-Lemiesz L., Śliwińska-Hill U.: Kompleksy metali w terapii nowotworowej. Teraźniejszość i przyszłość. *Nowotwory J. Oncol.*, 2011; 61; 465-474
- [74] Tuccari G., Giuffrè G., Arena F., Barresi G.: Immunohistochemical detection of metallothionein in carcinomatous and normal human gastric mucosa. *Histol. Histopathol.*, 2000; 15: 1035-1041
- [75] Tüzel E., Kirkali Z., Yörükoglu K., Mungan M.U., Sade M.: Metallothionein expression in renal cell carcinoma: subcellular localization and prognostic significance. *J. Urol.*, 2001; 165: 1710-1713
- [76] Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M.: Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Intract.*, 2006; 160: 1-40
- [77] Vasak M.: Advances in metallothionein structure and functions. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 2005; 19: 13-17
- [78] Wang N., Dong C.R., Jiang R., Tang C., Yang L., Jiang Q.F., Chen G.G., Liu Z.M.: Overexpression of HIF-1 $\alpha$ , metallothionein and SLUG is associated with high TNM stage and lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 2014; 7: 322-330
- [79] Wei H., Desouki M.M., Lin S., Xiao D., Franklin R.B., Feng P.: 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: 7
- [80] Weinlich G., Topar G., Eisendle K., Fritsch P.O., Zelger B.: Comparison of metallothionein-overexpression with sentinel lymph node biopsy as prognostic factors in melanoma. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, 2007; 21: 669-677
- [81] Werynska B., Pula B., Muszczyńska-Bernhard B., Gomulkiewicz A., Piotrowska A., Prus R., Podhorska-Okolow M., Jankowska R., Dziegiel P.: Metallothionein 1F and 2A overexpression predicts poor outcome of non-small cell lung cancer patients. *Exp. Mol. Pathol.*, 2013; 94: 301-308
- [82] Wronkowski Z., Bruzewicz S.: Chemioterapia i radioterapia. PZWL Warszawa 2007; 45-124
- [83] Yamasaki M., Nomura T., Sato F., Mimata H.: Metallothionein is up-regulated under hypoxia and promotes the survival of human prostate cancer cells. *Oncol. Rep.*, 2007; 18: 1145-1153

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.