

Metallotiyoneinlerin Toksikolojik Önemi

Göknur AKTAY*, Tülin SÖYLEMEZOĞLU*

Metallotiyoneinlerin Toksikolojik Önemi

Özet : Metallotiyonein, tiyol grupları içeren, metal bağlayan ve düşük molekül ağırlıklı bir proteindir. Çinko ve bakır gibi organizmanın büyüme ve gelişmesi için gerekli esansiyel metallerin metabolizmasının yanısıra kadmiyum civa ve demir gibi zararlı ağır metallerin detoksifikasyonunda önemli rolü vardır. Bu proteinin fizyolojik, farmakolojik ve toksikolojik etkileriyle ilgili çalışmalar, biyolojik öneminin, serbest radikallerin neden olduğu hücresel hasarı önlemesine bağlı olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, metallotiyoneinden ayrılan bakır ve demirin Fenton reaksiyonunu indükleyerek oksidatif hasara katkıda bulunabileceği de düşünülmektedir. Bu çelişkili bulgular, biyolojik fonksiyonunu açıklayabilmek için metallotiyoneinin sentez ve yıkılımının yanısıra lipid peroksidasyon gibi bazı biyokimyasal parametreler düzeyinde ileri çalışmaların yapılması gerektiğini göstermektedir. Bu derlemede, bir metalloprotein olan metallotiyoneinin toksikolojik önemi çevre kirliliği, antioksidan özellikleri ve metallerle olan ilişkisi açısından irdelenmiştir.

Anahtar kelimeler : Metalloproteinler, metallotiyoneinler, oksidatif stres, lipid peroksidasyon, iz elementler, ağır metaller.

Received : 24.4.2001

Revised : 5.9.2001

Accepted : 28.9.2001

GİRİŞ

Periyodik tabloda aynı kolonda yer alan elementlerin kimyasal özellikleri birbirine benzer ve genellikle daha üst sıradakiler, alt sıradakilere göre daha az toksiktirler. Üst sırada yer alan elementlerin fizyolojik ve biyokimyasal fonksiyonları varken alt sıralarda yer alan elementlerin detoksifikasyonu için çeşitli mekanizmalar bulunmaktadır. Organizmada, esansiyel ve non-esansiyel metallerin homeostazının yanısıra bazı hastalıkların patojenezinde ve an-

Toxicological Significance of Metallothioneins

Summary : Metallothionein, containing thiol groups is a metal-binding low molecular weight protein. It has an important role not only in the metabolism of the essential metals such as zinc and copper which are necessary for growth and improvement of organisms, but also the detoxification of harmful heavy metals such as cadmium, mercury and iron. The studies carried on the physiological, pharmacological and toxicological effects of this protein indicated that its biological significance depends on the prevention of the cellular damage caused by free radicals. On the other hand, copper and iron departed from metallothionein may cause oxidative stress by inducing the Fenton reaction. The contradiction in these results shows that some more detailed studies such as biological-synthesis and degradation of metallothionein and some biochemical parameters such as lipid peroxidation must be done to explain the biological function of metallothionein. In this review, the toxicological importance of metallothionein, a metalloprotein, in the aspect of environmental pollution, antioxidant properties and the relationship with the metals is discussed.

Key Words: Metalloproteins, metallothioneins, oxidative stress, lipid peroxidation, trace elements, heavy metals.

tioksidan savunmada serüloplazmin, ferritin, transferrin ve metallotiyonein gibi metalloproteinlerin önemli rolleri olduğu bilinmektedir¹⁻⁴. Metallotiyonein (MT)'ler önemli iz elementler olan çinko ve bakırın homeostazı yanında, başta kadmiyum olmak üzere birçok toksik metalin detoksifikasyonundan sorumludur. Bu nedenle toksik ve esansiyel elementlerin organizmadaki biyolojik sonuçlarına mekanizmalarını açıklama amacıyla MT'lerle ilgili birçok araştırma yapılmaktadır.^{3,5,6}

* Ankara Üniversitesi, Adli Tıp Enstitüsü, Dikimevi 06100, ANKARA.

° Yazışma Adresi

METALLOTİYONEİNLER

İlk kez 1957'de at böbrek korteksinden Cd^{+2} ve Zn^{+2} içeren metalloproteinler izole edilmiştir. Metalsiz olanları "Apometalloyonein" veya "tiyonein" olarak adlandırılan bu proteinlerin metal içeren kompleksi "Metalloyonein"dir. MT'ler tek zincirli 61 amino asitten oluşur, molekül ağırlığı yaklaşık 6500-12000 daltondur⁷.

Metalloyonein ifadesi zaman zaman tüm polipeptidler için de kullanılan bir terimdir. MT'ler yaklaşık %30 oranında sistein içermelerine karşın aromatik amino asit ve histidin içermezler. Bu nedenle, diğer proteinlerden farklı olarak 280 nm'de absorban vermezler. Dolayısıyla, ilk tanımlanmaları jel filtrasyonu ile olmuştur⁸. MT'lerde disülfid bağları yoktur ve bulunan sistein rezidülerinin hepsi metal atomlarının proteinlere bağlanmasında rol oynarlar, sisteinin metale oranı 3:1 dir^{7,9}.

Tiyol gruplarını içeren her bir molekül proteine 6 veya 7 atom Zn veya Cd bağlayabilmektedir. Bu nedenle, MT'ler adlandırılırken en çok kullanılan spesifik isimlendirme, "Cd-MT" veya "Cd-tiyonein" ile "Zn-MT" veya "Zn-tiyonein" şeklindedir. Eğer MT'ne birden fazla metal bağlanmışsa, örn: 5.3 mol Cd ve 1.7 mol Zn ise; "Cd-Zn-MT", "Cd-Zn-tiyonein", "Cd 5.3-Zn 1.7- MT" veya "Cd 5.3-Zn 1.7-tiyonein" şeklinde isimlendirilir¹⁰.

Memelilerde başlıca MT-I, MT-II ve MT-III izoformları vardır. İnsanda MT-I in beş izoformu tanımlanmıştır. İlk kez at böbrek korteksinden izole edilmekle birlikte fare, sıçan, tavşan ve tavuk karaciğeri ile insan karaciğer ve böbreklerinden de izole edilmiştir. Ayrıca, pankreas, dalak ve bağırsakta da bu sitozolik proteinlerin varlığı gösterilmiştir. Vücut dokularının pek çoğunda küçük miktarlarda da olsa bulunmuştur¹¹. On beş ayrı türden (insan, maymun, köpek, kedi, inek, domuz, koyun, keçi, tavşan, tavuk, hamster, sıçan, fare, kobay ve kurbağa) alınan taze karaciğerlerde yapılan MT tayinlerinde, en yüksek hepatik MT düzeyi (400-700 $\mu\text{g/g}$ karaciğer) insan, köpek, kedi, domuz ve keçide; daha orta düzeyde (yaklaşık 200 $\mu\text{g/g}$ karaciğer) maymun, inek ve koyunda; en düşük düzeyde ise (2-10 $\mu\text{g/g}$ karaciğer) kemiricilerde bulunmuştur¹².

Birçok memeli türünde, perinatal dönem boyunca Zn-MT düzeyinin arttığı bilinmektedir. Yenidoğan sıçanlarda MT-I konsantrasyonunun en yüksek düzeyde olduğu, yaşla birlikte azaldığı gösterilmiştir¹³. Bu durum, MT'lerin nükleik asit metabolizması, protein sentezi ve diğer metabolik işlemler için gerekli olan çinkoyu hızlı büyüyen dokulara taşıdığı düşünülmüştür. MT'lerin çinko dengesinden sorumlu sitozolik proteinler olduğu kabul edilmektedir^{11,14}. MT'lerin metal bağlama özelliklerinin saptanmasıyla birlikte, esansiyel elementlerin homeostazının yanısıra, esansiyel olmayan metallerin hücrel detoksifikasyonunda da önemli rolleri olabileceği düşünülmüştür. MT'lerin değişik iki değerli katyonlarla indüklendiği, birçok hücre kültürü ve organizmada Cd^{+2} , Zn^{+2} , Cu^{+2} , Ni^{+2} , Bi^{+2} , Hg^{+2} ve Ag^{+2} çalışmalarında desteklenmiştir. Ancak, MT'nin hücre içinde lokalize olmuş bir protein olmasından dolayı Cd^{+2} gibi toksik metallerin vücuttan atılışında uzun süreli korumadan ziyade kısa süreli bir koruma sağladığı düşünülmektedir^{11,15,16}.

Metalloyoneinlerin bazı balık türlerinden de izole edilmesi, deniz ve göllerde biriken civa (Hg^{+2})'nin balıklarda MT sentezini indüklediği ve MT' deki Zn^{+2} ve Cu^{+2} ile yer değiştirerek detoksifiye olduğunu düşündürmektedir¹⁷. MT düzeyleri, özellikle ağır metal kontaminasyonlarında önemli bir belirteçtir. Metalle kontamine olan göl ve nehirler veya maden ocakları yakınlarda bulunan göllerde yaşayan balıkların karaciğerlerinden izole edilen Cu-MT'lerin konsantrasyonu, kontamine olmayan sulardaki balıklara göre yüksek bulunmuştur¹⁸.

Çevrede toksik elektrofilik maddelerin fazla miktarda bulunması, organizmaların hücrel koruyucularla donanmasını zorunlu kılmıştır. Prokaryot ve tek hücreli ökaryotlarda yapılan oksidatif hasar ve DNA hasarı incelemelerinde, protektif proteinlerin transkripsiyonunda artış olduğu görülmüştür^{19,20}.

Metalloyoneinlerin antioksidan özellikleri

Metalloyoneinler, toksik maddeler ve oksidatif strese yol açan etkenlerle indüklenebilmektedir. Hayvan çalışmalarında sıcak ve soğuk çevre koşulları, ağır ekzersiz, CCl_4 intoksikasyonu ve alkilleyici maddelerle de MT sentezinin arttığı bilinmektedir. Ayrıca, glu-

kokortikoidler, bakteriyel enfeksiyonlar, inflamasyon, hipersensitivite reaksiyonları ve indometasinin indüklediği enteropatide de arttığı gösterilmiştir (Tablo-1)^{15,21,22}.

Tablo-1 Metalloiyonein sentezini indükleyen etkenler

- Metaller (Zn^{+2} , Cu^{+2} , Cd^{+2} , Hg^{+2})
- UV Radyasyon
- Kimyasal maddeler (Parakuat, CCl_4)
- Alkilleyici maddeler
- Kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar (doksorubisin, cisplatin, bleomisin)
- İnflamasyon
- Sitokinler (interleukin-1, interleukin-6, TNF- α : tümör nekroz faktör)
- Glukokortikoidler (deksametazon)
- Katekolaminler (epinefrin, norepinefrin)
- Forbol Esterleri
- Adenozin
- Bakteriyel Enfeksiyonlar (?)
- Fiziksel ve Kimyasal stresler (sıcak, soğuk, ekzersiz)
- Polipeptid Hormonlar (Anjiyotensin-II, Glukagon)

İnflamasyon mekanizmasında en çok kabul edilen görüş, serbest demirin neden olduğu radikal reaksiyonlarının inflamasyona yol açtığı, aynı şekilde prooksidanların da radikal oluşumu ile inflamasyonu başlattığı, inflamasyonlu bölgeden sitokinlerin salınmasıyla hepatik MT sentezinin arttığıdır^{23,24}.

Cisplatin, adriamisin, bleomisin, siklofosamid gibi antikanser ilaçların antitümör aktivitelerinin, MT düzeyi kontrol grubunun iki katı kadar olduğunda basıldığı gözlenmiştir. Diğer taraftan, 5-fluorourasil ve vinblastinin de antitümör aktiviteleri tümördeki MT düzeyindeki artıştan güçlü bir şekilde etkilenmektedir. Bu sonuçlar, antikanser ilaç tedavisindeki hastalarda multipl ilaç tedavisine karşı direnç gelişebileceğini göstermektedir^{25,26}.

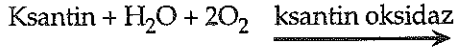
Doksorubisinin kardiyotoksik ve hepatotoksik etkilerine karşı MT'nin koruyucu etkisini araştırmak amacıyla yapılan çalışmalarda, MT-IIa geni transfer edilen farelere uygulanan doksorubisinin kalp ve ka-

raciğerde neden olduğu morfolojik değişiklikler gözlenmemiştir^{27,28}.

MT'lerin stres faktörlerine karşı oluşturduğu bu koruyucu etkiye karşın, ağır metallerin dokularda birikmelerine ve iz element metabolizmasının bozulmasına neden olabileceği görüşü de savunulmaktadır^{3,29}. İnorganik civa (Hg^{+2}) ve Cd^{+2} enjeksiyonundan sonra MT'deki Zn^{+2} 'nin bağlı olduğu noktaya daha fazla affinite gösteren Cd^{+2} ve Hg^{+2} 'nin bağlanması, bu metallerin toksik etkisini önlerken^{6,30} dokulardaki MT'ne bağlı ağır metal düzeyini artırır, çinko dağılımını bozar. Deney hayvanı dokuları ile otopsi materyallerinde yapılan araştırmalarda, çinko düzeylerinin yanısıra bakır, magnezyum ve kalsiyum düzeylerinin de değiştiği gösterilmiştir^{4,29,31}. İz element dengesinin bozulması, biyokimyasal savunma mekanizmaları içinde yer alan metalloenzimlerin aktivitesinde azalmaya neden olur. Hücre membran stabilitesinin bozulmasına neden olan bu değişiklik, lipid peroksidasyon artışı ile sonuçlanır^{32,33}.

MT gibi sülfidril içeren ve hepatositlerde yer alan bir diğer major protein de glutatyon (GSH) dur. GSH'in birçok fonksiyonu vardır: Serbest radikallerin veya lipid peroksidlerin neden olduğu oksidatif strese karşı hücrel korunmada, ağır metal detoksifikasyonunda, ilaç ve diğer kimyasalların metabolik işlemlerinde, prostaglandinler, lökotrienler ve 17- β -estradiol gibi endojen substratların metabolik işlemlerinde önemli rolü vardır³⁴. Ayrıca, amino asit transportu ve eritrosit membran stabilitesinde de rolü olduğu³⁵ ve MT gibi GSH'in da çinko metabolizmasında bir rolü olduğu ve safrayla çinko atılımının GSH bağımlı bir işlem olabileceği ileri sürülmektedir³⁶.

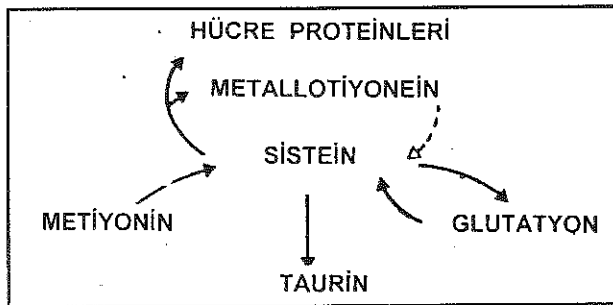
MT ve GSH sistein deposudurlar. Sisteinin metal bağlama kapasitesi çok yüksektir. Serbest sistein nörotoksiktir, "sistein deoksijenaz" ile detoksifiye olur. MT'lerin ileri sürülen antioksidan etkilerinin, GSH gibi sülfidril gruplarından ileri geldiği düşünülmektedir. Bu teoriye göre, MT'ler, ksantin oksidaz reaksiyonu sonucu oluşan serbest radikalleri temizler ve lipid peroksidasyonu inhibe eder. Ksantin oksidaz, endotel hücresinde önemli bir serbest oksijen radikali kaynağıdır (Reaksiyon-1)^{34,37}.



Reaksiyon-1. Ksantin oksidaz reaksiyonu ve radikal oluşumu

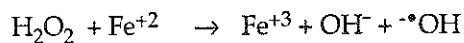
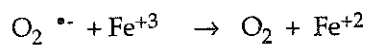
Bu tip çalışmalar, her ne kadar MT'nin antioksidan etkisini destekleyici çalışmalar olarak değerlendirilebilirse de çelişkili bulgular hala vardır. MT'nin CCl_4 'ün neden olduğu lipid peroksidasyonu önleyemediği bildirilmiştir³⁸. Bu nedenle, MT'lerin in vivo çalışmalarda serbest radikallere karşı koruyucu rolü hala tartışmalıdır.

MT de GSH gibi sülfidril grupları taşımasına karşın, MT indüklenmesine neden olan birçok madde GSH ile konjuge olarak GSH tüketimine neden olmaktadır. Bu nedenle bazı araştırmacılar, MT' deki tiyol gruplarının antioksidan etkisi olmadığını, başlıca sistein metabolizmasında rolleri olduğunu kabul etmektedir (Şekil-1). Bu görüşe göre, MT sentezinin in-



Şekil 1. Sistein metabolizması

düklenmesi ile radikal oluşumu, lipid peroksidasyon ve GSH metabolizması arasında bir ilişki yoktur. Kısaca, MT'nin *invivo* ortamda oksidatif strese karşı doğrudan bir koruyucu rolü olmadığı iddia edilmektedir³⁶⁻³⁸. Diğer taraftan, MT'lerin Fe^{2+} 'yi bağlayarak Fenton reaksiyonunu (Reaksiyon-2) önlediği de iddialar arasında olup antioksidan etkisini destekleyici bir görüştür.



Reaksiyon-2 Fenton reaksiyonu.

Bu reaksiyon genellikle " demirin katalizlediği Haber-Weiss reaksiyonu " olarak bilinse de " süperoksit güdümlü Fenton reaksiyonu " demek daha doğrudur³⁹.

MT'lerin yapısı aydınlatıldıkça, fizyolojik fonksiyonları da açıklığa kavuşacaktır. *In vitro* çalışmalarda MT'lerin serbest $\text{}^{\bullet}\text{OH}$ ve $\text{O}_2^{\bullet-}$ radikallerini temizlediği gösterilmişse de, hücresel toksisitede, hücresel hedef ve MT'lerin subsellüler yerleşimi kritik rol oynar. Çünkü, GSH' a sistein, Cu-Zn-SOD'a Cu^{+2} ve Zn^{+2} verebilir. Sistein rezidüleri bulunduğu gibi $\text{}^{\bullet}\text{OH}$ radikallerinin temel hedefleridir. Ayrıca, MT'lerden Zn^{+2} salıverilmesinin de radikal hasarını baskıladığı bilinmektedir⁴⁰. Oysa, MT'ler Fe^{+2} salıvererek Fenton reaksiyonuna katkıda bulunuyor da olabilirler⁴¹.

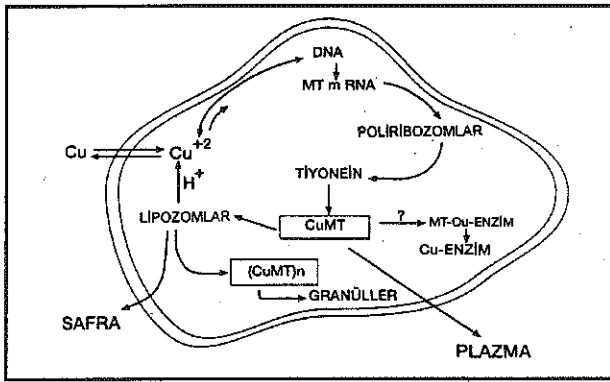
Metallotiyoineinlerin toksik etkileri

MT'lerin sadece kısa süreli koruyucu etkilerinin olduğu, uzun dönemde koruyucu rollerinin şüpheli olduğu söylenmektedir. Ancak, uzun vadede hücrelerde direnç gelişimi de gözardı edilmemelidir. MT'nin, intrasellüler kadmiyumu bağlayarak oluşturduğu Cd-MT kompleksinin non-toksik olduğu düşünülmektedir⁵. Bununla birlikte, ekstrasellüler Cd-MT kompleksi, proksimal tübüleri hedef alan güçlü bir nefrotoksindir. Cd-MT injeksiyonuyla ratlarda ve renal epitel hücre kültürlerinde nefrotoksik etki gösterilmiştir⁴². Kısaca, Cd^{+2} maruziyeti süresince, intrasellüler MT koruyucu iken ekstrasellüler MT'nin zararlı olduğu söylenebilir. Cd-MT nefrotoksitesinin mekanizması çok iyi aydınlatılamamıştır. İntrasellüler serbest Cd^{+2} toksiktir. Muhtemelen, Cd-MT injeksiyonundan sonra Cd^{+2} salıverilmektedir. Renal epitelin tersine, hepatositler kadmiyum klorürün toksik etkilerine Cd-MT'den daha duyarlıdır. Proksimal tübülün Cd-MT'ne duyarlı olması, Cd^{+2} 'un kronik toksik etkisinden kaynaklanıyor olabilir⁴³.

Metallotiyoineinlerin hepatositlerdeki rolü

Bakır ve çinko, mitokondriyal ve nükleer fraksiyonlara ve süperoksit dismutaz (SOD)'a transfer olmadan önce hepatositlerden hızla alınıp MT ve diğer sitozolik proteinlere bağlanır. Bakırın serüloplazmin

ve transkriptin gibi hepatik bakır enzimlerine transferi ve MT'ne bağlanması canlıların türüne ve bakır içeriğine bağlıdır. İnce bağırsaklardan absorbe olan bakır, bakır- albumin veya bakır-histidin kompleksleri halinde karaciğere taşınır ve tiyoneine bağlanır veya MT'nin boş bir bölümüne bağlanır, ya da MT'deki Zn^{+2} ile yer değiştirir. Eğer ortamda fazla miktarda Cu^{+2} iyonları kalırsa, MT-mRNA ve MT sentezini indüklerler. Sentezlenen MT'ler fazla Cu^{+2} iyonları ile şelasyon oluştururlar. Bu yolla ortamdaki fazla bakır sistemden uzaklaştırılır. Muhtemelen, Cu-MT kompleksi daha sonra yıkılır ve Cu^{+2} serbest kalır. Serbest bakır, ya bakır bağımlı reaksiyonlarda kullanılır ya da atılır. Bir kısım Cu-MT ise safra veya kana sahnır. Eğer karaciğerde Cu-MT düzeyi çok artarsa bu kompleks lizozom ve diğer organellere alınır ve burada granüller halinde toplanır. Bu granüller daha sonra safra ile atılır (Şekil-2)^{44,45}.



Şekil 2. Bakır metabolizmasında metalotiyoneinin fonksiyonu

Metallotiyoneinlerin biyolojik yıkımları

MT'lerin serbest radikallerin temizlenmesinden sonraki akıbetleri pek bilinmemekle birlikte tekrar dolaşıma katıldığı, yıkılıma uğradığı veya metal bağlama kapasitesinin değiştiği düşünülmektedir. Hayvan çalışmalarında, Cd^{+2} , Zn^{+2} ve Cu^{+2} injeksiyonuyla indüklenen MT'lerin yarılanma ömürleri Cd-MT' de 80, Zn-MT' de 20 ve Cu-MT' de 17 saat bulunmuştur. Bu proteinin izoformları karşılaştırıldığında ise MT-I'in MT-II'den daha kısa bir yarılanma ömrü olduğu bildirilmiştir. Çalışmalar MT'ne bağlı metallerin MT'den kolaylıkla ayrılabilmesini göstermektedir⁴⁶⁻⁴⁸. MT'den metalin ayrılması sonucu proteinin çok düzgün olan zincir yapısı gelişigüzel ve dağınık bir şekil alır. Bu durum, proteini proteolitik enzimlerin etkisine açık kıl-

maktadır. Metalin pek azının bile ayrılması sonucunda MT, proteazların saldırısına uğramaktadır⁴⁹. Bununla birlikte, metalin proteinden ayrılma hızının da MT'nin biyolojik yıkılım hızını kısıtlayan bir etken olduğu düşünülmektedir^{46,48}.

Hücre kültürleriyle yapılan çalışmalar bu konuda değişik tartışmalara neden olmuştur. Ancak, MT'nin biyolojik yıkılımının çinkonun proteinden ayrılma hızından çok MT'deki yapısal değişimle ilgili olduğu görüşü benimsenmektedir^{50,51}. MT'nin biyolojik yıkılımıyla ilgili diğer bir konu ise, yıkılımın lizozomlarda gerçekleştiğidir. Bu organelin diğer proteinlerin yıkılımında da rolü vardır. Ayrıca *in vitro* olarak lizozomal enzimlerin MT'ni yıkabildiği gösterilmiştir⁵². Oysa, bir proteaz inhibitörü olan klorokinle yapılan çalışmalarda hepatositlerdeki Zn-MT'nin yıkılımının hem lizozomal hem de lizozomal olmayan kompartmanlarda olduğu bildirilmiştir⁵³.

In vivo ve *in vitro* çalışmalarda Cd- ve Zn-MT'nin proteolize olan duyarlılığı konusunda bir görüş birliği olmasına karşın bu durum Cu-MT için geçerli değildir. Proteinin bu metalloformu *in vivo* olarak kolaylıkla yıkılırken, *in vitro* olarak lizozomal enzimlere dirençlidir^{46,48,52}. Diğer taraftan, metal-MT kompleksi, düşük molekül ağırlıklı olmasından dolayı böbreklerden kolaylıkla süzulebilmektedir. Metalin ayrılmasından sonra serbest kalan MT'nin büyük bir kısmının geri absorbe olurken, küçük bir miktarının ise idrarla atıldığı bildirilmiştir⁵⁴. *In vivo* yıkılımda proteinin modifikasyonu önde gelmektedir. Muhtemelen bu modifikasyon da serbest oksijen radikallerinin etkisiyle olmaktadır⁵⁵. *In vivo* ve *in vitro* çalışmalardan elde edilen sonuçların birbirini tutmaması; MT'lerin izoformlarının fonksiyonlarının aydınlatılması, ağır metal detoksifikasyonundaki rollerinin karşılaştırılması ve MT'lerin biyolojik yıkılımlarının yanısıra organ ve biyolojik sıvılara dağılımıyla ilgili daha ileri çalışmalara gereksinim olduğunu göstermektedir.

KAYNAKLAR

- 1- Lee SH, Lancey R, Montaser A, Madani N, Linder MC. Ceruloplasmın and copper transport during the latter part of gestation in the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 203(4):428-39, 1993.

- 2- Samuelson G, Bratteby LE, Berggren K, Elverby JE, Kempe B. Dietary iron intake and iron status in adolescents. *Acta. Paediatr.*, 85,1033-1038, 1996.
- 3- Cherian, MG, Goyer RA. Metallothioneins and their role in the metabolism and toxicity of metals. *Life Sci.*, 23, 1-10,1978.
- 4- Aktay G. Kadmiyum Hepatotoksisitesine Etanol ve E vitamininin Etkisi, Doktora Tezi, Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır, 1993.
- 5- Suzuki KT, Kawahara S, Sunaga H, Kobayashi E, Shimajo N. Discriminative uptake of metals by the liver and its relation to induction of metallothionein by cadmium, copper and zinc. *Comp. Biochem. Physiol.*, 95C, 279-284, 1990.
- 6- Roesijadi G. Metal transfer as a mechanism for metallothionein-mediated metal detoxification. *Cell.Mol.Biol.* 46, 393-405, 2000.
- 7- Hamer D H. Metallothionein. *Annu. Rev. Biochem.*, 55, 913-951, 1986
- 8- Kagi JHR., Himmelhoch SR., Whanger PD, Bethune JL, Vallee BL. Equine hepatic and renal metallothioneins. Purification, molecular weight, amino acid composition and metal content. *J. Biol. Chem.*, 249, 3537-3542, 1974.
- 9- Bremner I, Young BW. Isolation of copper-zinc thioproteins from the livers of copper-injected rats. *Biochem. J.*, 157, 517-520, 1976.
- 10- Kojima Y. Definitions and nomenclature of metallothioneins. *Methods Enzymol.*, 205, 8-10, 1991.
- 11- Nordberg M, Nordberg GF. Toxicological aspects of metallothionein. *Cell.Mol.Biol.*, 46,451-463, 2000.
- 12- Bryan-Henri R, Liu J, Choudhuri S, Klaassen CD. Species variation in hepatic metallothionein. *Toxicol. Lett.*, 74, 23-33, 1994.
- 13- Durnam DM, Palmiter RD. Transcriptional regulation of the mouse metallothionein-1 gene by heavy metals. *J. Biol. Chem.*, 256, 5712-5716, 1981.
- 14- Richards MP, Cousins RJ. Metallothionein and its relationship to the metabolism of dietary zinc in rats. *J. Nutr.*, 106, 1591-1599, 1976.
- 15- Brady OF. Induction of metallothionein in rats. *Methods Enzymol.*, 205, 559-585, 1991.
- 16- Oh SH, Deagen JT, Whanger PD, Weswig PH. Biological function of metallothionein: Its induction in rats by various stresses. *Am. J. Physiol.*, 234, E282-285, 1978.
- 17- Bouqueneau JM. Evidence for the protective effect of metallothioneins against inorganic mercury injuries to fish. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 23, 218-219, 1979.
- 18- Nriagu JO, Wong HKT, Coker RD. Deposition and chemistry of pollutant metals in lakes around the smelters of Sudbury, Ontario. *Environ. Sci. Technol.*, 16, 551-560, 1982.
- 19- Ohi S, Gardenosa G, Pine R, Huang PC. Cadmium induced accumulation of metallothionein messenger RNA in rat liver. *J. Biol. Chem.*, 256, 2180-2184, 1981.
- 20- Basu A, Lazo JS. A hypothesis regarding the protective role of metallothioneins against the toxicity of DNA interactive anticancer drugs. *Toxicol Lett.*, 50, 123-35, 1990.
- 21- Sato M, Bremner I. Oxygen free radicals and metallothionein. *Free Radic. Biol. Med.*, 14, 325-337, 1993.
- 22- Hidalgo J, Company L, Borrás M, Garvey JS, Armario A. Metallothionein response to stress in rats: role in free radical scavenging. *Am. J. Physiol.*, 255, E518-524, 1988.
- 23- Min KS, Terano Y, Onosaka S, Tanaka K. Induction of metallothionein by nonmetallic compounds associated with acute-phase response in inflammation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 111, 152-162, 1991.
- 24- Sobocinski PZ, Canterbury WJ. Hepatic metallothionein induction in inflammation. *Ann. N.Y.Acad.Sci.*, 210, 354-367, 1982.
- 25- Eastman A. Mechanisms of resistance to cisplatin. *Cancer.Treat.Res.*, 57,233-249,1991.
- 26- Okazaki Y, Miura N, Satoh M, Imura N, Naganuma A. Metallothionein-mediated resistance to multiple drugs can be induced by several anticancer drugs in mice. *Biochem. Biophys.Res.Commun.*, 245, 815-818,1998.
- 27- Kang YJ, Chen Y, Yu A, Voss-Mc Cowan M, Epstein PN. Overexpression of metallothionein in the heart of transgenic mice suppresses doxorubicin cardiotoxicity. *J.Clin.Invest.*, 100,1501-1506, 1997.
- 28- Kimura T, Fujita I, Itoh N, Muto N, Nakanishi T, Takahashi K, Azuma J, Tanaka K. Metallothionein acts as a cytoprotectant against doxorubicin toxicity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 292,299-302, 2000.
- 29- Kimura T, Itoh N, Min KS, Fujita I, Muto N, Tanaka K. Tissue accumulation of cadmium following oral administration to metallothionein-null mice. *Toxicol.Lett.*, 99, 85-90, 1998.
- 30- Satoh M, Nishimura N, Kanayama Y, Naganuma A, Suzuki T, Tohyama C. Enhanced renal toxicity by inorganic mercury in metallothionein-null mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 283, 1529-1533 1997.
- 31- Honda R, Tsuritani I, Ishizaki M, Yamada Y. Zinc and copper levels in ribs of cadmium-exposed persons with special reference to osteomalacia. *Environ.Res.*, 75, 41-48, 1997.
- 32- Yiin SJ, Chern CL, Sheu JY, Lin TH. Cadmium-induced lipid peroxidation in rat testes and protection by selenium. *Biomaterials*, 12, 353-359, 1999.
- 33- Parat MO, Richard MJ, Beani JC, Favier A. Involvement of zinc in intracellular oxidant/antioxidant balance. *Biol.Trace.Elem.Res.*, 60, 187-204, 1997.
- 34- Deneke SM. Thiol-based antioxidants. *Curr. Top. Cell. Regul.*, 36, 151-180, 2000.
- 35- Meister A. Glutathione, ascorbate, and cellular protection. *Cancer Res.*, 54, 1969-1975, 1994.
- 36- Wong KI, Klaassen CD. Relationship between liver and kidney levels of glutathione and metallothionein in rats.

- Toxicology*, 19, 39-47, 1981.
- 37- Tateishi N, Higashi T, Naruse A, Nakashima K, Shiozaki H, Sakamoto K. Rat liver glutathione: Possible role as a reservoir of cysteine. *J. Nutr.*, 107, 51-60, 1977.
- 38- Min KS, Terano Y, Onosaka S, Tanaka K. Induction of metallothionein synthesis by menadione or carbon tetrachloride is independent of free radical production. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 113, 74-79, 1992.
- 39- Minotti G, Aust SD. The role of iron in the initiation of lipid peroxidation. *Chem. Phys. Lipids*, 44, 191-208, 1987.
- 40- Schroder JJ, Cousins RJ. Metallothionein and zinc metabolism in hepatocytes. *Methods Enzymol.*, 205, 575-584, 1991.
- 41- Thornalley PJ, Vasak M. Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. *Biochem. Biophys. Acta.*, 827, 36-44, 1985.
- 42- Sato M, Nagai Y. Cadmium in rat kidney subcellular particles after injection of cadmium-metallothionein. *J. Toxicol. Sci.*, 11, 29-39, 1986.
- 43- Squibb KS, Pritchard JB, Fowler BA. Cadmium-metallothionein nephropathy: Relationships between ultrastructural/ biochemical alterations and intracellular cadmium binding. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 229, 311-321, 1984.
- 44- Bremner I. Metallothionein and copper metabolism in liver. *Methods Enzymol.*, 205, 583-591, 1991.
- 45- McArdle HJ, Bingham MJ, Summer K, Ong TJ. Cu metabolism in the liver. *Copper Transport and Its Disorders*, Ed.: Leone and Mercer, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 1999.
- 46- Bremner I, Hoekstra WG, Davies NT, Young BV. Effect of zinc status of rats on the synthesis and degradation of copper-induced metallothionein. *Biochem. J.*, 174, 883-892, 1978.
- 47- Held DD, Hoekstra WG. The effects of zinc deficiency on turn-over of cadmium-metallothionein in rat liver. *J. Nutr.*, 114, 2274-2282, 1984.
- 48- Feldman SL, Cousins RJ. Degradation of hepatic zinc-thionein following parenteral zinc administration. *Biochem. J.*, 10, 583-588, 1976.
- 49- Winge DR, Miklossy KA. Domain nature of metallothionein. *J. Biol. Chem.*, 257, 3471-3476, 1982.
- 50- Krezoski SK, Villalobos J, Shaw CF, Petering DH. Kinetic lability of zinc bound to metallothionein in Ehrlich cells. *Biochem. J.*, 255, 483-491, 1988.
- 51- Ohtake H, Hasegawa K, Koga M. Zinc-binding protein in the liver of neonatal, normal and partially hepatectomized rats. *Biochem. J.*, 174, 999-1005, 1978.
- 52- Mehra RK, Bremner I. Studies on the metabolism of rat liver copper-metallothionein. *Biochem. J.*, 227, 903-938, 1985.
- 53- Chen ML, Failla ML. Degradation of zinc-metallothionein in monolayer cultures of rat hepatocytes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 191, 130-138, 1989.
- 54- Shaikh ZA, Ellis KJ, Subramanian KS, Greenberg A. Biological monitoring for occupational cadmium exposure: the urinary metallothionein. *Toxicology*, 63, 53-62, 1990.
- 55- Sato M, Bremner I. Biliary excretion of metallothionein and a possible degradation product in rats injected with copper and zinc. *Biochem. J.*, 223, 475-479, 1984.