

Wstęp: Rak piersi jest obecnie najczęściej występującym nowotworem u kobiet. U chorych z guzami litymi pochodzenia nabłonkowego, w tym także w raku piersi, zaobserwowano krążące komórki nabłonkowe z tych guzów w ich krwi obwodowej zarówno u chorych z przerzutami, jak i u części pacjentów bez przerzutów. Do identyfikacji tych komórek we krwi obwodowej u chorych na raka piersi służy m.in. gen mammaglobiny 1.

Cel pracy: 1. Ocena możliwości wykorzystania oznaczenia ekspresji genu mammaglobiny 1 do wykrycia obecności komórek nowotworowych we krwi obwodowej u chorych na raka piersi.

2. Zbadanie i znalezienie współzależności pomiędzy poziomem ekspresji genu mammaglobiny 1 a klasycznymi czynnikami rokowniczymi w raku piersi.

3. Ocena poziomu ekspresji mRNA mammaglobiny 1 jako czynnika diagnostyczno-prognostycznego u kobiet chorych na raka piersi.

Materiał i metody: Do badania zakwalifikowano 11 potencjalnie zdrowych kobiet, 30 chorych kobiet z łagodnym guzem piersi i 30 kobiet z rakiem piersi przed leczeniem operacyjnym. Detekcja komórek nabłonkowych z krwi obwodowej pacjentek odbywała się za pomocą metody amplifikacji DNA w czasie rzeczywistym (ang. *real-time* PCR, RT-PCR).

Wyniki: Analiza detekcji mRNA mammaglobiny 1 we krwi obwodowej w badanych grupach pacjentek, jak również u osób zdrowych nie wykazała różnicy istotnej statystycznie w częstości występowania wyników dodatnich.

Wnioski: Znaczenie diagnostyczne obecności komórek rakowych we krwi obwodowej wymaga dalszych badań.

Słowa kluczowe: mammaglobina, rak piersi, krew obwodowa.

Czy ludzkie mRNA mammaglobiny 1 jest dobrym markerem detekcji komórek nowotworowych we krwi obwodowej chorych na raka piersi?

Is human mRNA mammaglobin-1 a good marker of carcinoma cells in the peripheral blood of patients with breast cancer?

Konrad Wroński¹, Elżbieta Płuciennik², Maciej J. Żelazowski², Karolina Seta², Magdalena Byczewska², Andrzej K. Bednarek²

¹Oddział Chirurgii Ogólnej i Naczyniowej, Wojewódzki Specjalistyczny Szpital im. dr. M. Pirogowa w Łodzi

²Zakład Kancerogenezy Molekularnej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Wstęp

Rak piersi jest najczęściej występującym nowotworem wśród kobiet na całym świecie. Z roku na rok wzrasta zachorowalność i umieralność spowodowana przez ten nowotwór [1]. W 2004 r. zanotowano w Polsce 12 049 nowych zachorowań i 4887 zgonów z powodu raka piersi. W USA rak piersi jest drugą przyczyną zgonów wśród kobiet i wynosi ok. 50 000 [2]. Wczesne wykrycie, agresywna chirurgia i chemioterapia poprawiają efektywność leczenia i zmniejszają śmiertelność spowodowaną tym nowotworem [3–5].

U chorych z guzami litymi pochodzenia nabłonkowego, w tym w raku piersi, zaobserwowano krążące komórki nabłonkowe z tych guzów we krwi obwodowej pacjentów [6, 7]. Komórki te były obecne we krwi obwodowej chorych z przerzutami, jak i u części pacjentów bez przerzutów.

Komórki nowotworowe z guza mogą pojawić się we krwi obwodowej pacjentów w każdym stadium zaawansowania procesu nowotworowego [6, 8, 9]. W badaniach wykazano, że spośród komórek krążących we krwi 1 na 100 tys.–1 mln dotrze i usytuuje się w innym narządzie, ale tylko niewielki procent z nich rozwinie się w ognisko przerzutowe [10].

Znalezienie czułej metody pozwalającej wykryć 1 komórkę nabłonkową guza w 50 ml krwi obwodowej chorych pacjentek może stanowić jedną z głównych przesłanek do wdrożenia leczenia systemowego u takich chorych [11]. Jednym z głównych markerów identyfikacji komórek raka piersi we krwi obwodowej chorych jest ludzka mammaglobina.

Gen ludzkiej mammaglobiny został odkryty przy użyciu techniki PCR w 1996 r. przez Watsona i Fleminga [12, 13]. Koduje on białko z rodziny uteroglobulin i jest zlokalizowany na chromosomie 11q12.2 [14–16].

Ludzka mammaglobina A, której oficjalnym skrótem jest MGB1 (mammaglobina 1), została po raz pierwszy wyizolowana z krwi obwodowej u chorych na raka piersi w roku 1999 [17]. Funkcja komórkowa tego białka w organizmie ludzkim nie została jeszcze dokładnie poznana. Gen ten jest wykrywany u części chorych sam lub w połączeniu z innymi markerami molekularnymi we krwi obwodowej u chorych na raka piersi lub w przypadku mikroprzerzutów do węzłów chłonnych [10, 18–47]. W większości badań nie stwierdzono korelacji pomiędzy ekspresją mRNA mammaglobiny 1 a klasycznymi czynnikami rokowniczymi we krwi chorych na raka piersi. Może to świadczyć o tym, że gen ten może być nowym i niezależnym czynnikiem prognostycznym w raku piersi lub stać się podstawowym markerem identyfikacji

Introduction: Breast cancer is one of the most common neoplasms in women. In many patients with epithelial tumours, including breast cancer, circulating epithelial cells in the peripheral blood in patients with and without metastases have been observed. Mammaglobin-1 is a marker which can be used to identify these cells in the peripheral blood.

Objectives: 1. To assess the possibility of using signs of mammaglobin-1 expression to detect the presence of cancer cells in patients with breast cancer in the peripheral blood.

2. To examine the correlation between level of gene expression of mammaglobin-1 and the classic prognostic factors in breast cancer.

3. To assess the level of mammaglobin-1 expression as a diagnostic and prognostic factor in women with breast cancer.

Material and methods: 11 potentially healthy women, 30 women with benign tumours and 30 women with breast cancer before operative treatment were classified in this investigation. The detection of epithelial cells in the peripheral blood was performed by RT-PCR method.

Results: The analysis of detection of mRNA mammaglobin-1 from the peripheral blood of examined patients did not show statistical significance in frequency of occurrence of positive results.

Conclusions: The diagnostic significance of presence of carcinoma cells in the peripheral blood needs more investigations.

Key words: mammaglobin, breast cancer, peripheral blood.

komórki nowotworowej raka piersi poza tkanką gruczołu mlekowego. W wielu badaniach w grupach pacjentek zdrowych, a także chorych na inne nowotwory nie zlokalizowano tego białka zarówno we krwi obwodowej, jak i w tkance guza [10, 17, 19, 24, 25, 27, 30, 34, 36, 38, 42–48].

Mammaglobina B jest białkiem, które ma podobną budowę do mammaglobiny A. Marker ten nazywany jest także lipofiliną C, SCGB2A1 (ang. *secretoglobin family 2A, member 1*), ale jego oficjalny skrót to MGB2. Pierwszy raz ludzka mammaglobina B została wykryta w ludzkiej śluzówce macicy i w macicy szczura [49, 50]. Gen ten jest wysoce specyficzny dla guzów rozwijających się w tkankach hormonozależnych. Wiele badań wskazuje, że marker ten może być wykorzystywany do wykrywania mikroprzerzutów w węzłach chłonnych, a także komórek nabłonkowych krążących we krwi obwodowej chorych na raka piersi i jajnika [51–57]. mRNA mammaglobiny B, podobnie jak mRNA mammaglobiny A, znajduje się w komórkach raka piersi krążących we krwi i może być wykryty za pomocą metody RT-PCR [26, 51–58].

Cel pracy

1. Ocena możliwości wykorzystania oznaczenia ekspresji genu mammaglobiny 1 we krwi obwodowej do wykrycia obecności komórek nowotworowych we krwi obwodowej u chorych na raka piersi.
2. Zbadanie i znalezienie współzależności pomiędzy poziomem ekspresji genu mammaglobiny 1 a klasycznymi czynnikami rokowniczymi w raku piersi.
3. Ocena poziomu ekspresji mRNA mammaglobiny 1 jako czynnika diagnostyczno-prognostycznego u kobiet z rakiem piersi.

Materiał i metody

Badania zostały przeprowadzone w Klinice Chirurgii Onkologicznej Katedry Onkologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi i w Zakładzie Kancerogenezy Molekularnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi w latach 2005–2007.

Do badania zakwalifikowano 11 potencjalnie zdrowych kobiet, 30 kobiet z łagodnym guzem piersi i 30 kobiet chorych na raka piersi. W tab. 1. przedstawiono kryteria włączenia kobiet do wyżej wymienionych trzech grup. Dobór kobiet do każdej z grup był losowy.

W tab. 2. przedstawiono charakterystykę patologiczno-histopatologiczną pacjentek z łagodnymi guzami piersi, które brały udział w prezentowanym ba-

Tabela 1. Kryteria włączenia osób do badania

Table 1. Criteria of qualifying patients for the research

Kobiety zdrowe
<p>pleć żeńska zgoda chorej brak w wywiadzie choroby nowotworowej wiek powyżej 18. roku życia chore nie przyjmowały żadnych leków</p>
Pacjentki z łagodnym guzem piersi
<p>pleć żeńska łagodny guz piersi, który został potwierdzony w badaniu cytologicznym lub w badaniu histopatologicznym zgoda chorej brak w wywiadzie choroby nowotworowej</p>
Chore na raka piersi
<p>pleć żeńska rak piersi, który został potwierdzony w badaniu cytologicznym lub w badaniu histopatologicznym zgoda chorej chora nie była poddana przedoperacyjnemu leczeniu hormonoterapią i/lub chemioterapią brak w wywiadzie innej choroby nowotworowej</p>

Tabela 2. Charakterystyka pacjentek z łagodnymi guzami piersi włączonych do badania**Table 2.** Features of benign breast tumour patients qualified for the research

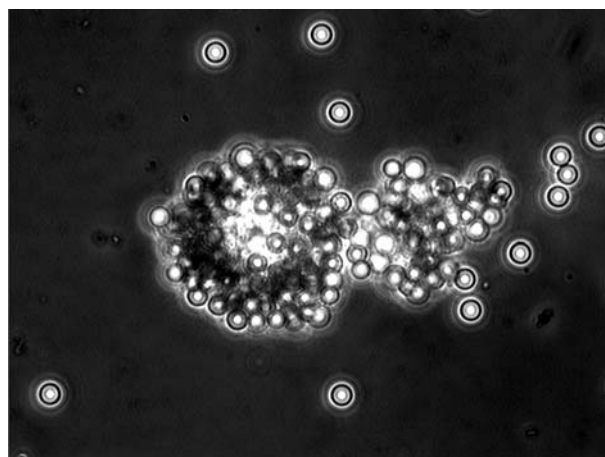
Cecha	Liczba pacjentek z łagodnymi guzami piersi (n=30)
wiek:	
<50	22
≥50	8
typ histopatologiczny:	
dysplasia benigna	6
fibroadenoma	16
laesio fibroso-cystica	6
papillomatosis	2

Tabela 3. Charakterystyka pacjentek chorych na raka piersi włączonych do badania**Table 3.** Features of breast cancer patients qualified for the research

Cecha	Liczba chorych na raka piersi (n=30)
wiek:	
<50	7
≥50	23
typ histopatologiczny:	
carcinoma ductale infiltrans	28
carcinoma lobulare	2
złośliwość histologiczna (G):	
G1	2
G2	11
G3	15
receptor estrogenowy:	
pozytywny	15
negatywny	15
receptor progesteronowy:	
pozytywny	8
negatywny	22
zajęte węzły chłonne:	
z metastazą	14
bez metastazy	16
wielkość guza:	
<2 cm	9
2–3 cm	14
>3 cm	7

daniu. W tab. 3. zamieszczono charakterystykę patologiczno-histopatologiczną chorych na raka piersi zakwalifikowanych do tego badania.

Do określenia wielkości guza u chorych na raka piersi posłużono się pomiarem histopatologicznym, który był wykonany po usunięciu guza. Określenie poziomu receptorów estrogenowych, jak również progesteronowych odbywało się w Zakładzie Patologii Katedry Onkologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

**Ryc. 1.** Kulki magnetyczne połączone z dwoma komórkami nabłonkowymi – widok spod mikroskopu świetlnego**Fig. 1.** Magnetic balls connected with two epithelial cells – microscopic view

W Klinice Chirurgii Onkologicznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi od kobiet chorych na raka piersi, kobiet z łagodnymi guzami piersi, a także zdrowych pobierano przed zabiegiem operacyjnym 10 ml krwi obwodowej. Izolację komórek nabłonkowych z krwi wykonano za pomocą superparamagnetycznych kulek Dynabeads Epithelial Enrich (DynaL Biotech Norway) (ryc. 1) zgodnie z instrukcją podaną przez producenta. Następnie z komórek nabłonkowych izolowano RNA i przepisywano na cDNA za pomocą ImProm-II reverse transcriptase (Promega, Madison, WI). Potem za pomocą testu RT-PCR, używając odczynników SYBR® Green I using qPCR Core kit For SYBR® Green I (Eurogentec, Belgium), oceniano poziom ekspresji genów mRNA mammaglobiny 1.

Do oznaczania ekspresji genu mammaglobiny-1 stosowano primery: forward 5'-TTGGTTTCTCACCATACCCTGCAGTTC-3', reverse 5'-ACTCTGAGCAATGTTGAGGTGTTTATGCAA-3'. Dla każdej próbki wykonano krzywą topnienia produktu PCR co pozwoliło wyeliminować detekcję niespecyficznych produktów oraz tworzenie dimerów-primerów.

W celu sprawdzenia liczby wychwytywanych komórek nabłonkowych z krwi, do krwi zdrowej kobiety dodano komórki nowotworowe raka piersi MCF7 w liczbie 10, 100, 1000 i 10 000 komórek na 10 ml krwi i poddano takiemu samemu procesowi obróbki jak w przypadku krwi uzyskanej od pacjentek z łagodnymi guzami piersi, chorych na raka piersi i zdrowych. Otrzymane wyniki wskazują na różnice wychwytywów komórek nabłonkowych w zależności od liczby zgromadzonych w probówce komórek MCF7. Zastosowana metoda oznaczania poziomu ekspresji genu mammaglobiny pozwalała na wykrycie co najmniej 10 komórek nabłonkowych guza znajdujących się w 10 ml krwi obwodowej.

Wyniki

U każdej pacjentki wykonano w dwóch powtórzeniach oznaczenie poziomu ekspresji genu mammaglobiny 1. Jako ostateczny wynik pozytywny badania przyjęto co najmniej jedno pozytywne oznaczenie.

W przypadku kobiet zdrowych pozytywny wynik dla oznaczenia mRNA mammaglobiny 1 otrzymano tylko dla jednej

Tabela 4. Wyniki oznaczeń poziomu ekspresji mRNA mammaglobiny 1 dla pacjentek zdrowych

Table 4. The results of the mRNA mammaglobin-1 expression in the group of healthy patients

Ekspresja genu mammaglobiny dla pacjentek zdrowych	Liczba pacjentek (n=11)
pozytywna	1
negatywna	10

Tabela 5. Wyniki oznaczeń poziomu ekspresji mRNA mammaglobiny 1 dla pacjentek z łagodnymi guzami piersi

Table 5. The results of the mRNA mammaglobin-1 expression in the group of benign breast tumour patients

Ekspresja genu mammaglobiny dla pacjentek zdrowych z łagodnymi guzami piersi	Liczba pacjentek (n=30)
pozytywna	4
negatywna	26

Tabela 6. Wyniki oznaczeń poziomu ekspresji mRNA mammaglobiny 1 dla chorych na raka piersi

Table 6. The results of the mRNA mammaglobin-1 expression in the group of breast cancer patients

Ekspresja genu mammaglobiny dla pacjentek z rakiem piersi	Liczba pacjentek (n=30)
pozytywna	8
negatywna	22

kobiety (n=11) (tab. 4.). W grupie pacjentek z łagodnym guzem piersi pozytywny wynik obserwowano u 4 z 30 pacjentek (tab. 5.), a w grupie z rakiem piersi w 8 z 30 przypadków (tab. 6.).

Charakterystyka badanych grup pacjentek

W badaniu wzięły udział kobiety w różnym wieku. Chore na raka piersi były w wieku 41–84 lat, a ich średni wiek wynosił 58,9 roku ($\pm 11,2$ roku). Pacjentki z łagodnym guzem piersi były istotnie młodsze, ich wiek wahał się od 18 do 69 lat, średnio wynosił 38,9 roku ($\pm 13,7$ roku). Różnica wieku w tych grupach okazała się istotna statystycznie ($t=6,182$; $p<0,007$). Najmłodsze były osoby zdrowe – w wieku 24–49 lat, średni wiek wynosił 31,7 roku ($\pm 7,5$ roku). Zróznicowa-

nie wieku w grupie pacjentek zdrowych było znacznie mniejsze niż u chorych na raka piersi.

Średni wiek chorych na raka piersi okazał się istotnie statystycznie wyższy niż u osób zdrowych ($t=7,399$; $p<0,001$), natomiast różnica wieku pacjentek z guzem łagodnym i osób zdrowych nie okazała się istotna statystycznie ($p>0,05$).

Analiza wyników ekspresji mRNA mammaglobiny 1 w komórkach nabłonkowych izolowanych z krwi obwodowej pacjentek chorych na raka piersi

Dotądnie wyniki mRNA mammaglobiny częściej występowały u kobiet do 50. roku życia (frakcja 0,43) niż u pacjentek starszych (frakcja 0,22). Także ta różnica w częstości występowania wyników dodatnich u młodszych i starszych pacjentek nie okazała się istotna statystycznie ($p>0,05$) (tab. 7.).

Analiza dodatnich wyników mRNA mammaglobiny 1 w zależności od wielkości guza nie wykazała istotnej statystycznie zależności w tym zakresie ($p>0,05$) (tab. 8.). Ponadto mammaglobinę obserwowano rzadko, ale nieistotne statystycznie różnice obserwowano przy guzach odpowiadających wielkości pT1 (frakcja 0,36) i wielkości pT2 (frakcja 0,21).

W badaniu nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w częstości wyników dodatnich mRNA mammaglobiny 1 przy rozpoznaniach odnoszących się do stopnia złośliwości histologicznej nowotworu (G) ($p>0,05$) (tab. 9.). Wyniki dodatnie w przypadku mammaglobiny 1 występowały u co czwartej pacjentki z rozpoznaniem G2 i u co piątej z rozpoznaniem G3.

Węzły chłonne z przerzutami były obecne niemal u połowy pacjentek. Badanie związku pomiędzy obecnością przerzutów w węzłach chłonnych a dodatnimi wynikami mRNA mammaglobiny 1 nie wykazało istotnej statystycznie korelacji w żadnym z tych parametrów ($p>0,05$) (tab. 10.). Obecność ekspresji mammaglobiny 1 obserwowano u co czwartej pacjentki zarówno z przerzutami w węzłach chłonnych, jak i bez nich (frakcje po 0,25).

Nie zaobserwowano statystycznie istotnej zależności między ekspresją mammaglobiny 1 a obecnością receptorów estrogenowych ($p>0,05$) (tab. 11.). Częstość wyników dodatnich mammaglobiny 1 była niemal identyczna w obu podgrupach (z receptorem estrogenowym i bez niego).

Nie stwierdzono istotnej statystycznie zależności pomiędzy częstością dodatnich wyników mRNA mammaglobiny 1 a poziomem receptorów progesteronowych ($p>0,05$) (tab. 12.). Zwraca uwagę fakt, że w większości przypadków (frakcja 0,73)

Tabela 7. Zależność między wynikiem mRNA mammaglobiny 1 a wiekiem chorych na raka piersi

Table 7. The interdependence between the result of the mRNA mammaglobin-1 and the breast cancer patients' age

Wyniki MGB 1	Wiek (lata)				Razem
	do 50 lat		powyżej 50 lat		
	liczba pacjentek	frakcja	liczba pacjentek	frakcja	
+	3	0,43	5	0,22	8
-	4	0,57	18	0,78	22
razem	7	1,00	23	1,00	30

$\chi^2=1,224$; $p>0,05$

Tabela 8. Zależność między wynikiem mRNA mammaglobiny 1 a wielkością guza u chorych na raka piersi**Table 8.** The interdependence between the result of the mRNA mammaglobin-1 and the size of the tumour in the group of breast cancer patients

MGB 1	Wielkość guza				Razem
	pT1		pT2		
	liczba pacjentek	frakcja	liczba pacjentek	frakcja	
+	4	0,36	4	0,21	8
-	7	0,64	15	0,79	22
razem	11	1,00	19	1,00	30

 $\chi^2=0,835$; $p>0,05$ **Tabela 9.** Zależność pomiędzy wynikiem mRNA mammaglobiny 1 a rozpoznaniem u chorych na raka piersi**Table 9.** The interdependence between the result of the mRNA mammaglobin-1 and the diagnosis in the group of breast cancer patients

MGB 1	Rozpoznanie						Razem
	G1		G2		G3		
	liczba pacjentek	frakcja	liczba pacjentek	frakcja	liczba pacjentek	frakcja	
+	1	0,50	3	0,27	3	0,20	7
-	1	0,50	8	0,73	12	0,80	21
razem	2	1,00	11	1,00	15	1,00	28

 $\chi^2=0,189$; $p>0,05$ **Tabela 10.** Zależność pomiędzy wynikiem mRNA mammaglobiny 1 a obecnością przerzutów w węzłach chłonnych u chorych na raka piersi**Table 10.** The interdependence between the result of the mRNA mammaglobin-1 and the presence of cancer cells in the lymph nodes in the group of breast cancer patients

Wyniki MGB 1	Węzły chłonne				Razem
	z przerzutami		bez przerzutów		
	liczba pacjentek	frakcja	liczba pacjentek	frakcja	
+	4	0,29	4	0,25	8
-	10	0,71	12	0,75	22
razem	14	1,00	16	1,00	30

 $\chi^2=0,049$; $p>0,05$ **Tabela 11.** Zależność pomiędzy wynikiem mRNA mammaglobiny 1 a poziomem receptorów estrogenowych u chorych na raka piersi**Table 11.** The interdependence between the result of the mRNA mammaglobin-1 and the level of estrogen receptors in the group of breast cancer patients

MGB 1	Poziom receptorów ER								Razem
	brak		niski		średni		wysoki		
	n	frakcja	n	frakcja	n	frakcja	n	frakcja	
+	4	0,27	-	-	2	0,33	2	0,33	8
-	11	0,73	3	1,00	4	0,67	4	0,67	22
razem	15	1,00	3	1,00	6	1,00	6	1,00	30

 n – liczba pacjentek; $p>0,05$

Tabela 12. Zależność pomiędzy wynikiem mRNA mammaglobiny 1 a poziomem receptorów progesteronowych u chorych na raka piersi
Table 12. The interdependence between the result of the mRNA mammaglobin-1 and the level of progesterone receptors in the group of breast cancer patients

MGB 1	Poziom receptorów PR								Razem
	brak		niski		średni		wysoki		
	n	frakcja	n	frakcja	n	frakcja	n	frakcja	
+	6	0,27	1	0,50	–	–	1	0,20	8
–	16	0,73	1	0,50	1	1,00	4	0,80	22
razem	22	1,00	2	1,00	1	1,00	5	1,00	30

n – liczba pacjentek; *p* > 0,05

w ogóle brak było receptorów progesteronowych, a wysoki poziom tych receptorów obserwowano jedynie u co szóstej pacjentki (frakcja 0,17). Do obliczeń, podobnie jak w przypadku receptorów estrogenowych, kategorie łączono: niski + średni + wysoki poziom receptorów.

Analiza wyników ekspresji mRNA mammaglobiny 1 w komórkach nabłonkowych izolowanych z krwi obwodowej pacjentek z łagodnym guzem piersi

Analizie statystycznej poddano wyniki dotyczące pacjentek z łagodnym guzem piersi. Analiza ta nie wykazała istotnej statystycznie zależności pomiędzy częstością wyników dodatnich mRNA mammaglobiny 1 a wiekiem pacjentek (*p* > 0,05) (tab. 13.). Warto zauważyć, że nieco częściej dodatnie wyniki uzyskiwano u pacjentek młodszych (do 50. roku

życia). Częstość dodatniej mammaglobiny 1 wynosiła odpowiednio: 0,14 i 0,13.

W grupie pacjentek z guzem łagodnym nie stwierdzono związku pomiędzy rozpoznaniem a częstością dodatnich wyników mRNA mammaglobiny 1 (*p* > 0,05) (tab. 14.). Nieco częściej wyniki dodatnie telomerazy uzyskiwano przy rozpoznaniu dysplazji łagodnej piersi (frakcja 0,79). Dodatnią mRNA mammaglobinę 1 zaobserwowano jedynie u czterech pacjentek (a więc rzadko): u dwóch z rozpoznaniem włókniaka i dwóch z rozpoznaniem dysplazji łagodnej piersi.

Także wielkość łagodnego guza piersi nie miała istotnego wpływu na częstość wyników dodatnich (*p* > 0,05) (tab. 15.). Dwie spośród czterech pacjentek, które miały dodatnią mRNA mammaglobinę 1, charakteryzowały się guzem o wymiarach 2–3 cm.

Tabela 13. Zależność pomiędzy wynikiem mRNA mammaglobiny 1 a wiekiem pacjentek z łagodnym guzem piersi
Table 13. The interdependence between the result of the mRNA mammaglobin-1 and the benign breast tumour patients' age

Wyniki MGB 1	Wiek (lata)				Razem
	<50 lat		≥50 lat		
	n	frakcja	n	frakcja	
+	3	0,14	1	0,13	4
–	19	0,86	7	0,87	26
razem	22	1,00	8	1,00	30

n – liczba pacjentek; *p* > 0,05

Tabela 14. Zależność pomiędzy wynikiem mRNA mammaglobiny 1 a rozpoznaniem u pacjentek z łagodnym guzem piersi
Table 14. The interdependence between the result of the mRNA mammaglobin-1 and the diagnosis in the group of benign breast tumour patients

MGB 1	Rozpoznanie				Razem
	gruczolakowłókniak		dysplazja łagodna		
	n	frakcja	n	frakcja	
+	2	0,13	2	0,14	4
–	14	0,87	12	0,86	26
razem	16	1,00	14	1,00	30

n – liczba pacjentek; *p* > 0,05

Tabela 15. Zależność pomiędzy wynikiem mRNA mammaglobiny 1 a wielkością guza u pacjentek z łagodnym guzem piersi
Table 15. The interdependence between the result of the mRNA mammaglobin-1 and the size of tumour in the group of benign breast tumour patients

MGB 1	Wielkość guza (cm)						Razem
	<2		2–3		>3		
	n	frakcja	n	frakcja	n	frakcja	
+	1	0,11	2	0,14	1	0,14	4
–	8	0,89	12	0,86	6	0,86	26
razem	9	1,00	14	1,00	7	1,00	30

n – liczba pacjentek; *p* > 0,05

Tabela 16. Wyniki mRNA mammaglobiny 1 u chorych w badanych grupach
Table 16. The results of the mRNA mammaglobin-1 in the group under examination

Wyniki MGB 1	Grupa					
	chore na raka piersi		pacjentki z łagodnym guzem piersi		kobiety zdrowe	
	n	frakcja	n	frakcja	n	frakcja
+	8	0,27	4	0,13	1	0,09
–	22	0,73	26	0,87	10	0,91
razem	30	1,00	30	1,00	11	1,00

Porównanie wyników oznaczeń ekspresji mRNA mammaglobiny 1 w komórkach nabłonkowych izolowanych z krwi obwodowej badanych grup pacjentek

Dodatkowo wyniki mRNA mammaglobiny 1 występowały najczęściej u chorych na raka piersi (frakcja 0,27), następnie z guzem łagodnym (frakcja 0,13), a najrzadziej – tylko u jednej osoby zdrowej (tab. 16.). Różnice między grupami nie okazały się istotne statystycznie (*p* > 0,05) (tab. 17.).

Dyskusja

W przeprowadzonym badaniu u 1 (9,1%) z 11 zdrowych kobiet występowała ekspresja ludzkiej mRNA mammaglobiny 1, podobnie jak w badaniu Liu i wsp. [49]. W innych badaniach [10, 17, 19, 20, 23–30, 34, 36, 38, 42–48] w grupie potencjalnie zdrowych kobiet nie wykazano ekspresji mammaglobiny we krwi.

W wykonanym badaniu ekspresja genu ludzkiej mammaglobiny w komórkach nabłonkowych wyizolowanych z krwi obwodowej była wykryta u 8 (26,6%) z 30 chorych na raka piersi. Wyniki te są podobne do innych badań, w których wykrywalność mRNA mammaglobiny 1 w komórkach nabłonkowych z krwi była także niska [20, 36, 43]. W części badań, w których wykorzystano test gniazdowy RT-PCR (*nested RT-PCR*) [17], RT-PCR [23, 37, 39] i cDNA [38] do oznaczania ekspresji ludzkiej mammaglobiny we krwi obwodowej chorych na raka piersi, stwierdzono wysoką ekspresję tego genu.

Analiza dodatnich wyników mRNA mammaglobiny 1 w zależności od wielkości guza nie wykazała w badaniu autorów niniejszej pracy zależności istotnej statystycznie, podobnie jak w innych badaniach [36, 38, 39, 43, 46–48]. W badaniach Houghtona i wsp. [22] i Cerveiry i wsp. [38] wy-

Tabela 17. Porównanie wyników mRNA mammaglobiny 1 w badanych grupach

Table 17. The comparison of the results of mRNA mammaglobin-1 in the group under examination

Porównywane grupy pacjentek	Mammaglobina 1	
	wartość testu χ^2	istotność <i>p</i>
chore na raka piersi – pacjentki z łagodnym guzem piersi	0,938	<i>p</i> > 0,05
chore na raka piersi – kobiety zdrowe	0,607	<i>p</i> > 0,05
pacjentki z łagodnym guzem piersi – kobiety zdrowe	0,029	<i>p</i> > 0,05

kazano statystyczną różnicę między ekspresją ludzkiej mammaglobiny 1 a wielkością guza.

Nie stwierdzono także istotnych statystycznie różnic w częstości wyników dodatnich przy rozpoznaniach odnoszących się do stopnia złośliwości histologicznej nowotworu (G). Takie same wyniki otrzymano w innych badaniach [36, 38, 43, 46, 48].

Węzły chłonne z przerzutami występowały niemal u połowy pacjentek. Badanie związku pomiędzy przerzutami w węzłach chłonnych a dodatnimi wynikami ekspresji mRNA mammaglobiny 1 nie wykazało istotnej statystycznie korelacji. Tylko w jednym badaniu udało się znaleźć pozytywną korelację pomiędzy ekspresją ludzkiej mRNA mammaglobiny we krwi a liczbą węzłów chłonnych z przerzutami [20]. W pozostałych badaniach [38, 39, 43, 47, 48] takiej korelacji nie wykazano.

Częstość otrzymanych w badaniu dodatnich wyników mRNA mammaglobiny 1 nie zależała także w sposób istotny statystycznie od poziomu receptorów estrogenowych, podobnie jak i w innych opublikowanych pracach [38, 43, 46, 47]. Tylko w pracy Zacha i wsp. [17] taka zależność została udowodniona.

Nie stwierdzono istotnej statystycznie zależności pomiędzy częstością dodatnich wyników mRNA mammaglobiny 1 a poziomem receptorów progesteronowych. W żadnej z opublikowanych prac, w których porównywano ekspresję ludzkiej mRNA mammaglobiny 1 z obecnością receptorów progesteronowych, nie wykazano takiej zależności [38, 43, 46, 47].

W grupie pacjentek z guzem łagodnym nie stwierdzono związku pomiędzy rozpoznaniem a częstością dodatnich wyników analizowanych parametrów. Ekspresję mRNA mammaglobiny obserwowano jedynie u 4 (13,3%) z 30 pacjentek. W pracach, w których badano ekspresję ludzkiej mammaglobiny w komórkach nabłonkowych wyizolowanych z krwi obwodowej pacjentek z łagodnymi guzami w piersi, nie wykazano ekspresji tego genu [44, 45, 47].

W prezentowanym w niniejszej pracy badaniu wielkość łagodnego guza piersi nie miała istotnego wpływu na ekspresję ludzkiej mammaglobiny w komórkach nabłonkowych wyizolowanych z krwi obwodowej pacjentek z łagodnym guzem piersi.

Podsumowanie

Wyniki dodatniej ekspresji genu mammaglobiny 1 występowały najczęściej u chorych na raka piersi, sporadycznie u kobiet z guzem łagodnym i w grupie osób zdrowych.

W świetle przeprowadzonych badań detekcja mRNA mammaglobiny 1 w komórkach nabłonkowych izolowanych z krwi obwodowej pacjentek zdrowych, z guzem łagodnym i chorych na raka piersi nie okazała się istotna statystycznie. Znaczenie diagnostyczne obecności komórek rakowych we krwi obwodowej wymaga dalszych badań, gdyż ich obecność może wynikać z cech biologicznych guza, takich jak: struktura tkanki, stopień unaczynienia, martwica czy po prostu wielkość guza. Mogą też być istotnym wskaźnikiem zagrożenia przerzutami. Potwierdzenie tej ostatniej możliwości wymaga dalszej obserwacji badanych pacjentek.

Piśmiennictwo

- Bieche I, Tozlu S, Girault I, Lidereau R. Identification of a three-gene expression signature of poor-prognosis breast carcinoma. *Mol Cancer* 2004; 3: 37.
- Donegan WL, Spratt JS. *Cancer of the breast*. 4th ed. Saunders, Philadelphia 1995.
- Smith RA, Saslow D, Sawyer KA, et al.; American Cancer Society High-Risk Work Group; American Cancer Society Screening Older Women Work Group; American Cancer Society Mammography Work Group; American Cancer Society Physical Examination Work Group; American Cancer Society New Technologies Work Group; American Cancer Society Breast Cancer Advisory Group. American Cancer Society guidelines for breast cancer screening: update 2003. *CA Cancer J Clin* 2003; 53: 141-69.
- Etzioni R, Urban N, Ramsey S, McIntosh M, Schwartz S, Reid B, Radich J, Anderson G, Hartwell L. The case for early detection. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 243-52.
- Smith RA, Cokkinides V, Eyre HJ; American Cancer Society. American Cancer Society guidelines for the early detection of cancer, 2003. *CA Cancer J Clin* 2003; 53: 27-43.
- Ring A, Smith IE, Dowsett M. Circulating tumour cells in breast cancer. *Lancet Oncol* 2004; 5: 79-88.
- Wroński K. Is human mammaglobin mRNA the best marker for detection breast cancer cells in the peripheral blood? *Onkol Pol* 2007; 10: 124-9.
- Vannucchi AM, Bosi A, Glinz S, et al. Evaluation of breast tumour cell contamination in the bone marrow and leukapheresis collections by RT-PCR for cytokeratin-19 mRNA. *Br J Haematol* 1998; 103: 610-7.
- Krag DN, Ashikaga T, Moss TJ, et al. Breast cancer cells in the blood: a pilot study. *Breast J* 1999; 5: 354-8.
- Fabisiewicz A, Kulik J, Kober P, et al. Detection of circulating breast cancer cells in peripheral blood by a two-marker reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay. *Acta Biochim Pol* 2004; 51: 747-55.
- Stathopoulou A, Valachonikolis I, Mavroudis D, et al. Molecular detection of cytokeratin-19-positive cells in the peripheral blood of patients with operable breast cancer: evaluation of their prognostic significance. *J Clin Oncol* 2002; 20: 3404-12.
- Watson MA, Fleming TP. Isolation of differentially expressed sequence tags from human breast cancer. *Cancer Res* 1994; 54: 4598-602.
- Watson MA, Fleming TP. Mammaglobin, a mammary-specific member of the uteroglobin gene family, is overexpressed in human breast cancer. *Cancer Res* 1996; 56: 860-5.
- Klug J, Beier HM, Bernard A, et al. Uteroglobin/Clara cell 10-kDa family of proteins: nomenclature committee report. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 923: 348-54.
- Ni J, Kalf-Suske M, Gentz R, Schageman J, Beato M, Klug J. All human genes of the uteroglobin family are localized on chromosome 11q12.2 and form a dense cluster. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 923: 25-42.
- Beier HM. Uteroglobin: a hormone-sensitive endometrial protein involved in blastocyst development. *Biochim Biophys Acta* 1968; 160: 289-91.
- Zach O, Kasparu H, Krieger O, Hehenwarter W, Girschikofsky M, Lutz D. Detection of circulating mammary carcinoma cells in the peripheral blood of breast cancer patients via a nested reverse transcriptase polymerase chain reaction assay for mammaglobin mRNA. *J Clin Oncol* 1999; 17: 2015-9.
- Weigelt B, Bosma AJ, Hart AA, Rodenhuis S, van 't Veer LJ. Marker genes for circulating tumour cells predict survival in metastasized breast cancer patients. *Br J Cancer* 2003; 88: 1091-4.
- Mitas M, Mikhitarian K, Walters C, et al. Quantitative real-time RT-PCR detection of breast cancer micrometastasis using a multi-gene marker panel. *Int J Cancer* 2001; 93: 162-71.
- Grunewald K, Haun M, Urbanek M, et al. Mammaglobin gene expression: a superior marker of breast cancer cell in peripheral blood in comparison to epidermal growth factor receptor and CK-19. *Lab Invest* 2000; 80: 1071-7.
- Gillanders WE, Mikhitarian K, Hebert R, et al. Molecular detection of micrometastatic breast cancer in histopathology-negative axillary lymph nodes correlates with traditional predictors of prognosis: an interim analysis of a prospective multi-institutional cohort study. *Ann Surg* 2004; 239: 828-37.
- Houghton RL, Dillon DC, Molesh DA, et al. Transcriptional complementarity in breast cancer: application to detection of circulating tumor cells. *Mol Diag* 2001; 6: 79-91.
- Zehentner BK, Persing DH, Deme A, et al. Mammaglobin as a novel breast cancer biomarker: multigene reverse transcription-PCR assay and sandwich ELISA. *Clin Chem* 2004; 50: 2069-76.
- Corradini P, Voena C, Astolfi M, et al. Maspin and mammaglobin genes are specific markers for RT-PCR detection of minimal residual disease in patients with breast cancer. *Ann Oncol* 2001; 12: 1693-8.
- Ring AE, Zabaglo L, Ormerod MG, Smith IE, Dowsett M. Detection of circulating epithelial cells in the blood of patients with breast cancer: comparison of three techniques. *Br J Cancer* 2005; 92: 906-12.
- Ooka M, Sakita I, Fujiwara Y, et al. Selection of mRNA markers for detection of lymph node micrometastases in breast cancer patients. *Oncol Rep* 2000; 7: 561-6.

27. Watson MA, Dintzis S, Darrow CM, Voss LE, DiPersio J, Jensen R, Fleming TP. Mammaglobin expression in primary, metastatic, and occult breast cancer. *Cancer Res* 1999; 59: 3028-31.
28. Leygue E, Snell L, Dotzlaw H, Hole K, Troup S, Hiller-Hitchcock T, Murphy LC, Watson PH. Mammaglobin A potential marker of breast cancer nodal metastasis. *J Pathol* 1999; 189: 28-33.
29. Núñez-Villar MJ, Martínez-Arribas F, Pollán M, Lucas AR, Sánchez J, Tejerina A, Schneider J. Elevated mammaglobin (h-MAM) expression in breast cancer is associated with clinical and biological features defining a less aggressive tumour phenotype. *Breast Cancer Res* 2003; 5: R65-70.
30. Zehentner BK, Carter D. Mammaglobin: a candidate diagnostic marker for breast cancer. *Clin Biochem* 2004; 37: 249-57.
31. O'Brien N, Maguire TM, O'Donovan N, Lynch N, Hill AD, McDermott E, O'Higgins N, Duffy MJ. Mammaglobin a: a promising marker for breast cancer. *Clin Chem* 2002; 48: 1362-4.
32. Zehantner BK, Dillon DC, Jiang Y, et al. Application of a multigene reverse transcription PCR assay for detection of mammaglobin and complementarity transcribed genes in breast cancer lymph nodes. *Clin Chem* 2002; 48: 1225-31.
33. Han JH, Kang Y, Shin HC, et al. Mammaglobin expression in lymph nodes is an important marker of breast carcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 2003; 127: 1330-4.
34. Bossolasco P, Ricci C, Farina G, Soligo D, Pedretti D, Scanni A, Deliliers GL. Detection of micrometastatic cells in breast cancer by RT-PCR for the mammaglobin gene. *Cancer Det Prev* 2002; 26: 60-3.
35. Ooka M., Tamaki Y, Sakita I, et al. Bone marrow micrometastases detected by RT-PCR for mammaglobin can be an alternative prognostic factor of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2001; 67: 169-75.
36. Suchy B, Austrup F, Driesel G, Eder C, Kusiak I, Uciechowski P, Grill HJ, Giesing M. Detection of mammaglobin expressing cells in blood of breast cancer patients. *Cancer Lett* 2000; 158: 171-8.
37. Reinholz MM, Nibbe A, Jonart LM, et al. Evaluation of a panel of tumor markers for molecular detection of circulating cancer cells in women with suspected breast cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 3722-32.
38. Cerveira N, Torres L, Rocha P, Bizarro S, Pereira D, Abreu J, Henrique R, Teixeira MR, Castedo S. Highly sensitive detection of the MGB1 transcript (mammaglobin) in the peripheral blood of breast cancer patients. *Int J Cancer* 2004; 108: 592-5.
39. Silva AL, Tomé MJ, Correia AE, Passos-Coelho JL. Human mammaglobin RT-PCR assay for detection of occult breast cancer cells in hematopoietic products. *Ann Oncol* 2002; 13: 422-9.
40. Span PN, Waanders E, Manders P, Heuvel JJ, Foekens JA, Watson MA, Beex LV, Sweep FC. Mammaglobin is associated with low-grade, steroid receptor-positive breast tumors from postmenopausal patients, and has independent prognostic value for relapse-free survival time. *J Clin Oncol* 2004; 22: 691-8.
41. Ferrucci PF, Rabascio C, Mazzetta C, et al. Mammaglobin expression in leukapheresis products is a predictive marker of poor prognosis in women with high-risk breast cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10 (18 Pt 1): 6039-46.
42. Lin YC, Wu Chou YH, Liao IC, Cheng AJ. The expression of mammaglobin mRNA in peripheral blood of metastatic breast cancer patients as an adjunct to serum tumor markers. *Cancer Lett* 2003; 191: 93-9.
43. Ntoulia M, Stathopoulou A, Ignatiadis M, Malamos N, Mavroudis D, Georgoulas V, Lianidou ES. Detection of Mammaglobin A-mRNA-positive circulating tumor cells in peripheral blood of patients with operable breast cancer with nested RT-PCR. *Clin Biochem* 2006; 39: 879-87.
44. Zach O, Kasparu H, Wagner H, Krieger O, Lutz D. Prognostic value of tumour cell detection in peripheral blood of breast cancer patients. *Acta Med Austriaca Suppl* 2002; 59: 32-4.
45. Roncella S, Ferro P, Bacigalupo B, et al. Human mammaglobin mRNA is a reliable molecular marker for detecting occult breast cancer cells in peripheral blood. *J Exp Clin Cancer Res* 2005; 24: 256-71.
46. Lin YC, Chen SC, Hsueh S, Lo YF, Chow-Wu YH, Liaw IC, Cheng AJ. Lack of correlation between expression of human mammaglobin mRNA in peripheral blood and known prognostic factors for breast cancer patients. *Cancer Sci* 2003; 94: 99-102.
47. Liu N, Zhang W, Shao Y. Mammaglobin mRNA measurement in the detection of micrometastasis in peripheral blood of breast cancer patients. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2001; 23: 317-9.
48. Chen CC, Hou MF, Wang JY, Chang TW, Lai DY, Chen YF, Hung SY, Lin SR. Simultaneous detection of multiple mRNA markers CK19, CEA, c-Met, Her2/neu and hMAM with membrane array, an innovative technique with a great potential for breast cancer diagnosis. *Cancer Lett* 2006; 240: 279-88.
49. Müller-Schöttle F, Classen-Linke I, Beier-Hellwig K, Sterzik K, Beier HM. Uteroglobulin expression and release in the human endometrium. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 923: 332-5.
50. Becker RM, Darrow C, Zimonjic DB, Popescu NC, Watson MA, Fleming TP. Identification of mammaglobin B, a novel member of the uteroglobulin gene family. *Genomics* 1998; 54: 70-8.
51. Adib TR, Henderson S, Perrett C, Hewitt D, Bourmpoulia D, Ledermann J, Boshoff C. Predicting biomarkers for ovarian cancer using gene-expression microarrays. *Br J Cancer* 2004; 90: 686-92.
52. Moreno-Bueno G, Sánchez-Estévez C, Cassia R, et al. Differential gene expression profile in endometrioid and nonendometrioid endometrial carcinoma: STK15 is frequently overexpressed and amplified in nonendometrioid carcinomas. *Cancer Res* 2003; 63: 5697-702.
53. Nissan A, Jager D, Roystacher M, et al. Multimarker RT-PCR assay for the detection of minimal residual disease in sentinel lymph nodes of breast cancer patients. *Br J Cancer* 2006; 94: 681-5.
54. Aihara T, Fujiwara Y, Ooka M, Sakita I, Tamaki Y, Monden M. Mammaglobin B as a novel marker for detection of breast cancer micrometastases in axillary lymph nodes by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Breast Cancer Res Treat* 1999; 58: 137-40.
55. Mercatali L, Valenti V, Calistri D, et al. RT-PCR determination of msp-1 and mammaglobin B in peripheral blood of healthy donors and breast cancer patients. *Ann Oncol* 2006; 17: 424-8.
56. Bignotti E, Tassi RA, Calza S, et al. Differential gene expression profiles between tumor biopsies and short-term primary cultures of ovarian serous carcinomas: identification of novel molecular biomarkers for early diagnosis and therapy. *Gynecol Oncol* 2006; 103: 405-16.
57. Santin AD, Zhan F, Bellone S, et al. Gene expression profiles in primary ovarian serous papillary tumors and normal ovarian epithelium: identification of candidate molecular markers for ovarian cancer diagnosis and therapy. *Int J Cancer* 2004; 112: 14-25.
58. Ouellette RJ, Richard D, MacEneaney E. RT-PCR for mammaglobin genes, MGB1 and MGB2, identifies breast cancer micrometastases in sentinel lymph nodes. *Am J Pathol* 2004; 121: 637-43.

Adres do korespondencji

dr med., mgr zarz. **Konrad Wroński**
Oddział Chirurgii Ogólnej i Naczyniowej
Wojewódzki Specjalistyczny Szpital im. dr. M. Pirogowa w Łodzi
ul. Wólczajska 195
90-531 Łódź
tel. +48 42 636 76 11
e-mail: konradwronski@poczta.wp.pl

Praca finansowana ze środków własnych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o numerze: 502-11-391.