

Ekspresja metalotioneiny i jej korelacja z antygenem Ki-67 w gruczolakorakach gruczołu sutkowego suk

MARCIN NOWAK, JANUSZ A. MADEJ, PIOTR DZIĘGIEL*

Katedra Anatomii Patologicznej, Patofizjologii, Mikrobiologii i Weterynarii Sądowej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Norwida 31, 50-375 Wrocław

*Katedra i Zakład Histologii i Embriologii Wydziału Lekarskiego AM, ul. Chałubińskiego 6a, 50-368 Wrocław

Nowak M., Madej J. A., Dzięgiel P.

Expression of metallothionein and its correlation with Ki-67 antigen in bitch's mammary gland adenocarcinomas

Summary

The aim of the research was to show the immunocytochemical expression of MT and Ki-67 and the correlation between these markers in spontaneous epithelium mammary gland cancer in bitches. The samples used in the research were extracted during surgical procedures from 20 bitches of different breeds, ranging from 6 to 15 years of age who had been diagnosed with mammary gland tumors. The prepared samples were then photographed with a microscope, to be later analyzed by a workstation comprised of a computer hooked up to a Carl Zeiss microscope model: Axiophot. The workstation was able to register images and then digitally analyze them. The MultiScanBase V 8.08 program working on a Microsoft Windows platform was used to gather readings. The average correlation value between the Ki-67 and MT expression confirmed by many tests indicated a high index value of Ki-67 antigen as the prognostic agent. The study concluded that the presence of metallothionein in adenocarcinomas of the mammary gland in bitches does not indicate its connection with an increased proliferation potential of the cancer cells as is in the case in women's mammary gland tumors.

Keywords: metallothionein, Ki-67 protein, bitch

Nowotwory gruczołu sutkowego suk należą do najczęściej występujących zmian rozrostowych u tego gatunku zwierząt (10,16), a liczba diagnozowanych przypadków, zwłaszcza ich form złośliwych, stale rośnie (1). W nowotworach sutka określono wiele czynników prognostycznych, m.in. wielkość guza, obecność przerzutów, typ histologiczny czy stopień zróżnicowania komórek. Z kolei postęp biologii molekularnej pozwolił na wykrycie wielu innych czynników, tzw. markerów nowotworzenia, stwierdzanych z reguły w wyższym stężeniu w tkance nowotworowej niż prawidłowej. Do najważniejszych, aktualnie wykorzystywanych w medycynie, zalicza się receptory estrogenowe (ER), receptory progesteronowe (PR), markery proliferacji komórkowej, np. Ki-67 czy jądrowy antygen proliferacyjny (PCNA), a ostatnio także metalotioneiny (MT) (13).

Metalotioneiny są białkami poznanymi blisko 50 lat temu, a pierwszą udaną izolację tych związków dokonano z części korowej nerki końskiej (23). Należą one do grupy niskocząsteczkowych białek o masie 6-10 kD. Zbudowane są z łańcucha polipeptydowego składającego się w zależności od typu MT z 61-68 aminokwasów z wyraźną dominacją (30%) cysteiny. Resz-

ty cysteiny są istotnym składnikiem MT ze względu na ich grupy tiolowe (-SH), które umożliwiają wiązanie z jonami metali (9). Białko to zawiera 4-12 atomów metali ciężkich, związanych przez grupy sulfhydrylowe wykazujące dużą konserwatywność składu aminokwasowego. Wyizolowane MT z różnych narządów zwierząt tylko w niewielkim stopniu różnią się między sobą składem aminokwasów. Strukturę metalotionein tworzą dwie domeny (α i β) sprzężone dimerem lizynowym. Domena α wiąże cztery jony Cd, a domena β trzy jony metali – dwa Zn i jeden Cd (12). Metalotioneina występuje w wielu izoformach, tj. MT-I, MT-II, MT-III i MT-IV, kodowanych przez różne geny (17, 20). Ekspresję genów dla MT-I i MT-II spotyka się w wielu typach komórek prawidłowych, jak również zmienionych nowotworowo. Ekspresję genu dla MT-III stwierdza się w neuronach mózgu, natomiast dla MT-IV jedynie w nabłonku wielowarstwowym płaskim skóry oraz początkowego odcinka przewodu pokarmowego (28). Wzrost częstości transkrypcji genów dla metalotionein, prowadzący do syntezy MT, indukują metale ciężkie, głównie kadm, cynk, rtęć i miedź (3, 26, 29, 32).

Metalotioneiny wykazują duże powinowactwo do metali i to zarówno tych niezbędnych do prawidłowej funkcji organizmu (miedź, cynk), jak i toksycznych (kadm). Te właściwości MT warunkują ich wpływ na utrzymywanie homeostazy komórkowej metali (21). Ważna jest również rola tych białek w usuwaniu wolnych rodników, także tych generowanych przez leki przeciwnowotworowe (np. antracykliny). Ponadto białka te biorą udział w wielolekowej oporności na cytostatyki (MDR – Multi Drug Resistance) poprzez wiązanie niektórych chemioterapeutyków (cisplatyna, karboplatyna), aż do powstania form nieaktywnych. Dzięki tym właściwościom wzrost ekspresji MT w komórkach nowotworowych może korelować ze zwiększoną opornością komórek guza na cytostatyki (24, 30, 33, 34).

Metalotioneina wykrywana jest w komórkach tkanek płodu oraz wielu histogenetycznie różnych typów nowotworów zarówno niezłośliwych, jak i złośliwych, głównie w fazie S cyklu komórkowego, kiedy następuje podwojenie ilości DNA w jądrze (21, 25, 29). Dlatego uważa się, że MT może być dobrym wskaźnikiem aktywności proliferacyjnej komórek, a przez to wyznacznikiem progresji nowotworowej (6, 8, 21, 31).

Inną, aktualnie wykorzystywaną w onkologii metodą oceny stopnia proliferacji komórek jest wykrywanie charakterystycznych białek pojawiających się w czasie cyklu komórkowego, np. antygenu Ki-67. Białko to należy do grupy niehistonowych związków występujących w jądrze komórkowym (15). Jego obecność wykrywa się już w fazie G₁ cyklu, następnie wyraźnie wzrasta w fazie S i G₂, ze szczytem w fazie M i gwałtownym zanikiem w G₀. Czasowy układ ekspresji tego białka sprawia, że jest ono wykrywane tylko w komórkach proliferujących (5, 16). Stosunek komórek wykazujących ekspresję Ki-67 do komórek nie wykazujących jej nosi nazwę indeksu proliferacyjnego, będącego wykładnikiem stopnia aktywności proliferacyjnej komórek (2). Skuteczność tego markera została potwierdzona wieloma badaniami, m.in. Gizińskiego i wsp. (16), w których autorzy po przebadaniu 60 guzów gruczołu sutkowego suk, wykazali dodatnią korelację między wysoką wartością indeksu Ki-67 a małym stopniem zróżnicowania komórek, obecnością przerzutów, złym stanem ogólnym i krótkim czasem przeżycia po zabiegu.

Celem niniejszych badań było immunocytochemiczne wykazanie ekspresji MT i Ki-67 oraz korelacji między tymi markerami w spontanicznych nowotworach nabłonkowych gruczołu sutkowego suk.

Materiał i metody

Materiał do badań pobrano w trakcie zabiegu chirurgicznego od 20 suk, różnej rasy, w wieku od 6 do 15 lat, u których zdiagnozowano nowotwór sutka. Guzy nowotworowe weryfikowano histopatologicznie.

Tab. 1. Półilościowa skala IRS uwzględniająca zarówno odsetek komórek pozytywnych (A), jak i intensywność koloru reakcji (B), gdzie ostateczny wynik jest iloczynem tych parametrów (A × B)

A	B
0 pkt – brak komórek z pozytywną reakcją	0 pkt – brak koloru reakcji
1 pkt – do 10% komórek reagujących pozytywnie	1 pkt – mało intensywny kolor reakcji
2 pkt – 11-50% komórek reagujących pozytywnie	2 pkt – średnio intensywny kolor reakcji
3 pkt – 51-80% komórek reagujących pozytywnie	3 pkt – intensywny kolor reakcji
4 pkt – pow. 80% komórek reagujących pozytywnie	

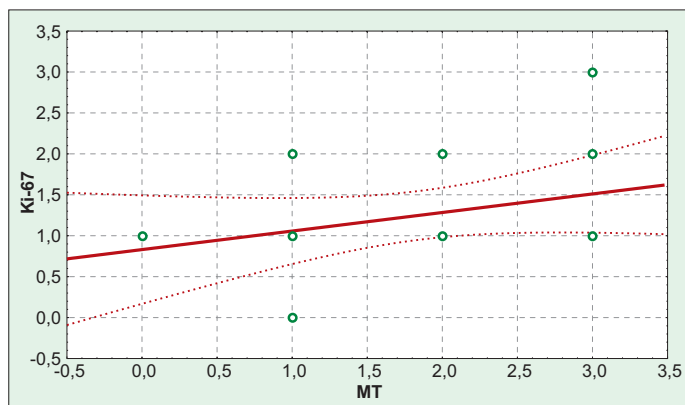
Wycinki nowotworów utrwalano w 10% zbuforowanej formalinie, odwadniano, a następnie zatapiano w bloczki parafinowe. Do oznaczania ekspresji MT (MT-I i MT-II) i antygenu Ki-67 na skrawkach parafinowych wykorzystano mysie monoklonalne przeciwciała anti-MT (klon E9) oraz anti-Ki-67 (klon MIB-1). Do wizualizacji badanych antygenów użyto zestaw odczynników LSAB2⁺ oraz diaminobenzyny (DAB). Badane skrawki parafinowe na ekspresję jądrowego antygenu Ki-67 poddano procedurze gotowania w kuchence mikrofalowej w Antigen Retrieval Solution, celem odblokowania determinant antygenowych. Za każdym razem przeprowadzano również kontrolę ujemną z wykorzystaniem Primary Negative Control. Wszystkie przeciwciała oraz odczynniki pochodziły z firmy Dako-Cytomation.

Z otrzymanych preparatów wykonano zdjęcia mikroskopowe, które poddano komputerowej analizie na stanowisku złożonym z komputera sprzężonego z mikroskopem firmy Carl Zeiss model Axiophot. Cały zestaw miał możliwość zapisu obrazu i jego cyfrowej analizy. Do pomiarów wykorzystano program MultiScaneBase V 8.08 pracujący w środowisku Windows.

Dla oceny ekspresji MT zastosowano zmodyfikowaną skalę półilościową IRS (tab. 1) (27). Metoda ta uwzględnia zarówno odsetek komórek pozytywnych, jak i intensywność koloru reakcji, a ostateczny wynik jest iloczynem tych parametrów i wynosi od 0 do 12 pkt. (brak reakcji – 0 pkt. (–); słaba reakcja 1-2 pkt. (+), średnia reakcja 3-4 pkt. (++) , intensywna reakcja 6-12 pkt. (+++)). Ekspresję Ki-67 oznaczono również półilościowo, oceniając odsetek pozytywnych komórek (0-5% – brak reakcji (–), 6-25% słaba reakcja (+), 26-50%, średnia reakcja (++), powyżej 50% intensywna reakcja (+++)). Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej z zastosowaniem programu Statistica PL (StatSoft, Polska), wykorzystując analizę korelacji Spearmana.

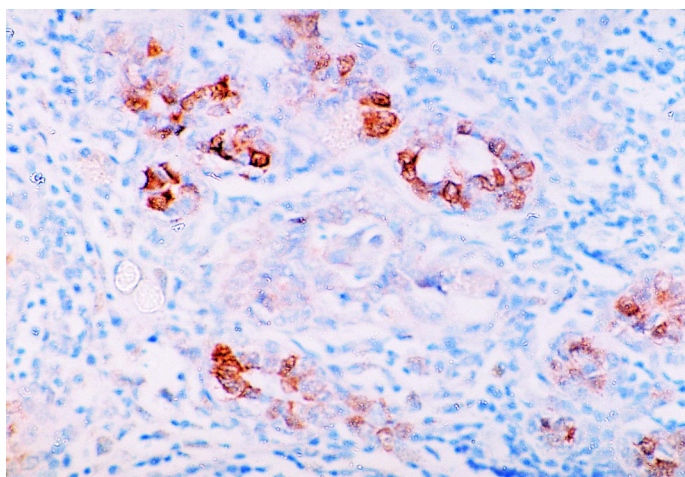
Wyniki i omówienie

Wykrywanie ekspresji MT w komórkach różnych tkanek można przeprowadzić wieloma specyficznymi metodami, m.in. testem ELISA, metodami radioimmunologicznymi, immunohistochemicznymi oraz Western-blot, w których bezpośrednio lub pośrednio ocenia się ilość i rodzaj tych białek. W przypadku tkanek nowotworowych najpopularniejszą metodą jest badanie immunohistochemiczne, w którym wykorzystuje się specyficzne przeciwciała skierowane przeciwko determinantom antygenowym MT (12). Metoda ta

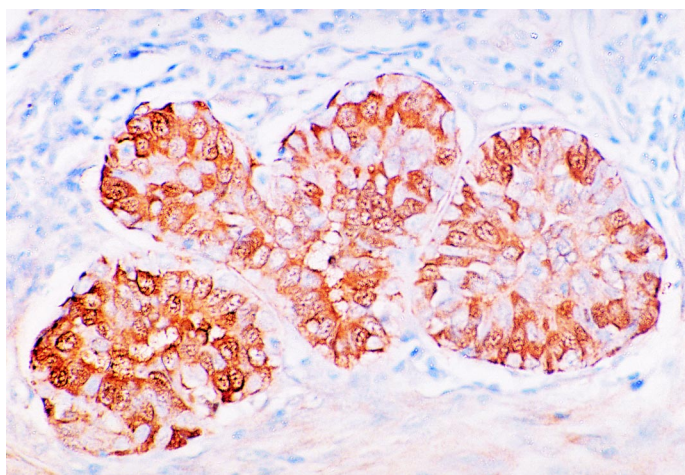


Ryc. 1. Korelacja Spearmana przedstawiająca miarę skojarzenia między wartościami nasilenia ekspresji MT i Ki-67. Wsp. korelacji $r = 0,33112$

pozwala na mikroskopową ocenę miejsca ekspresji białka i jego dokładnej lokalizacji w komórce, jak również na ocenę stopnia nasilenia reakcji barwnej. Stopień reakcji, jak również lokalizacja, może być różna w zależności od rodzaju tkanki czy typu nowotworu (4).

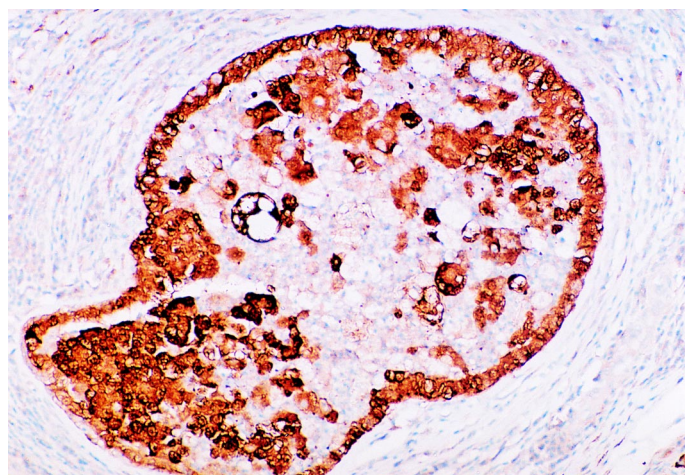


Ryc. 2. Niska ekspresja metalotioneiny w gruczolakoraku gruczołu sutkowego suk. Pow. 400 ×

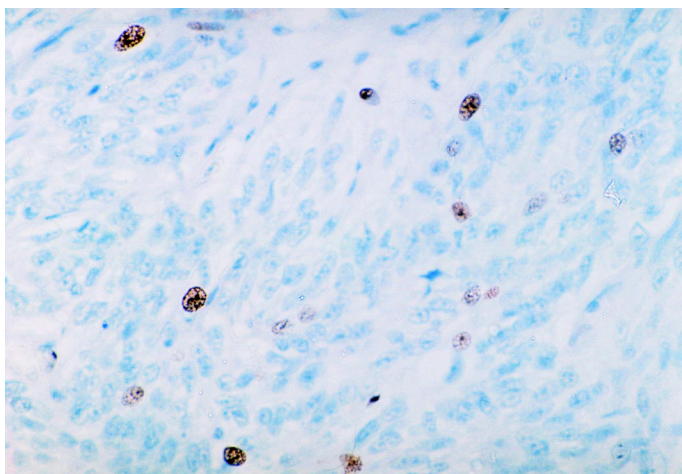


Ryc. 3. Wysoka ekspresja metalotioneiny w gruczolakoraku gruczołu sutkowego suk. Pow. 400 ×

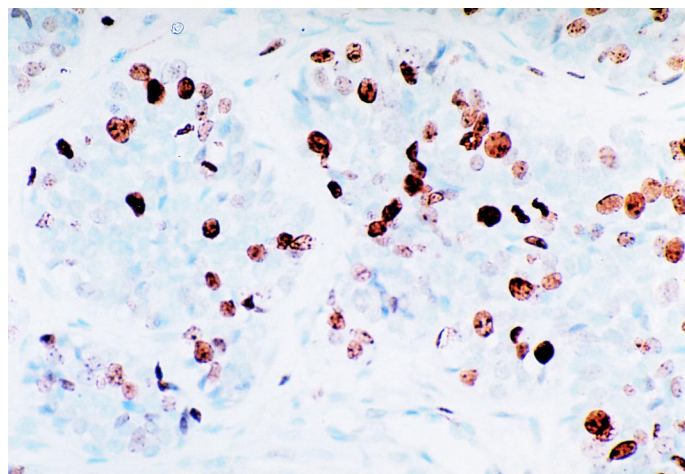
Rak sutka u kobiet był jednym z pierwszych nowotworów, w którego komórkach udało się stwierdzić obecność MT, wykorzystując metody immunohistochemiczne. W większości badań wykazano wyraźną, dodatnią korelację między nasileniem ekspresji MT a gorszym rokowaniem (37). Dodatnią korelację zaobserwowano także między ekspresją MT a stopniem zróżnicowania guza (G-grading) oraz ekspresją antygenu Ki-67 (21, 22) i pojawianiem się przerzutów (35). W badaniach własnych, przeprowadzonych na gruczolakorakach gruczołu sutkowego suk (potwierdzonych badaniem histopatologicznym), wykazano również dodatnią korelację między ekspresją MT a Ki-67 (ryc. 1), jednak jej poziom ($r = 0,33112$) był średni, czym różni się od wyraźnie wyższych wartości korelacji uzyskiwanych w analogicznych badaniach gruczolakoraków sutka u kobiet. W 95% przebadane gruczolakoraki wykazywały ekspresję zarówno MT (ryc. 2 do 4), jak i Ki-67 (ryc. 5 i 6) na przynajmniej +. W całym przebadanym materiale 35% guzów wykazywało słabą ekspresję MT (+), a 5% jej brak (–), co jest zbieżne z wynikami uzyskanymi przez Dincer i wsp. (11), w których na 67 przebadanych złośliwych nowotworów gruczołu sutkowego suk w ponad 40% przypadków nie stwierdzono ekspresji MT. W badaniach własnych 35% guzów wykazało ekspresję MT na poziomie +, 30% na poziomie ++ oraz 30% na poziomie +++ (ryc. 7). W przypadku Ki-67 70% guzów wykazało ekspresję Ki-67 na poziomie +, 20% na poziomie ++ oraz 5% na poziomie +++ (ryc. 8). Należy dodać, że w 40% przypadków średnia (3-4 pkt. skali IRS) oraz intensywna (6-12 pkt.) ekspresja MT korelowała ze słabą (+) ekspresją antygenu Ki-67 uważanego za sprawdzony czynnik prognostyczny guzów nowotworowych. Potwierdza to wyniki badań przeprowadzonych na nowotworach gruczołu sutkowego suk przez Cardoso i wsp. (7), gdzie opisano dłuższy czas przeżycia pacjentów, u których w usuniętych guzach stwierdzono wyższą ekspresję MT niż u tych, u których ekspresja MT była niższa. Należy zaznaczyć, że określe-



Ryc. 4. Wysoka ekspresja metalotioneiny w części brzeżnej wyspy rakowej w gruczolakoraku gruczołu sutkowego suk. Pow. 400 ×



Ryc. 5. Niska ekspresja białka Ki-67 w gruczolakoraku gruczołu sutkowego suk. Pow. 400 ×

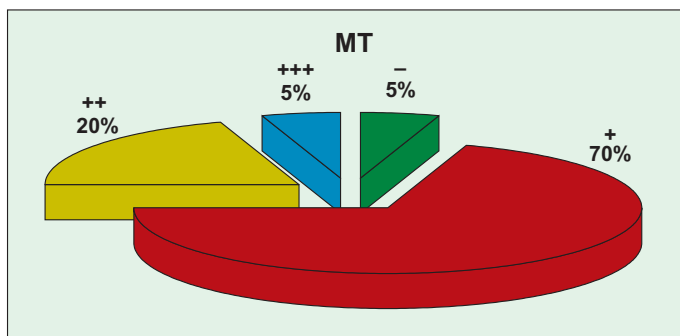


Ryc. 6. Wysoka ekspresja białka Ki-67 w gruczolakoraku gruczołu sutkowego suk. Pow. 400 ×

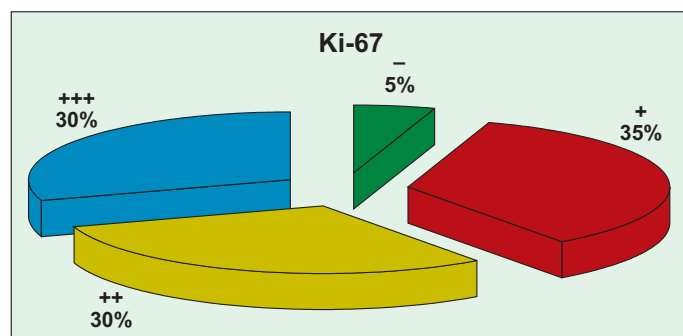
nie czasu przeżycia pacjentów z chorobą nowotworową jest najważniejszym kryterium świadczącym o agresywności, zaawansowaniu, jak również o efektywności leczenia przeciwnowotworowego. Ponadto wspomniani autorzy wykazali brak korelacji między nadekspresją MT a typem histologicznym guza oraz stopniem jego złośliwości, co jest kolejną różnicą w stosunku do wyników badań przeprowadzanych u kobiet. Podobnie Fuentealba i wsp. (14), wykrywając ekspresję MT zarówno w złośliwych, jak i niezłośliwych guzach gruczołu sutkowego suk, wskazali na dyskusyjną wartość tego markera jako czynnika prognostycznego. Także w niektórych typach nowotworów ludzi sytuacja nie jest jednoznaczna, a wielu autorów uważa, że brak jest korelacji między ekspresją MT a stopniem zaawansowania choroby oraz czasem przeżycia. Ioachim i wsp. (19) wykazali odwrotną korelację między ekspresją MT w komórkach raka jelita grubego a ekspresją antygenu CD44 będącego wskaźnikiem inwazyjności i możliwości tworzenia przerzutów. Hishikawa i wsp. (18) stwierdzili silny dodatni związek pomiędzy ekspresją MT w komórkach pierwotnego gruczolakoraka jelita grubego a czasem przeżycia i częstością przerzutów do węzłów chłonnych. Podobnie Tuccari i wsp. badając 112 przypadków pierwotnego raka żołądka nie stwierdzili żadnej korelacji z czynnikami kliniczno-patologicznymi ani też z cza-

sem przeżycia pacjentów. Również Wirigley i wsp. (36) badając guzy jajnika nie obserwowali zależności między czasem przeżycia a ilością MT w tych nowotworach. Te różnice, a niejednokrotnie sprzeczne wyniki badań dotyczących wpływu ekspresji MT na przebieg i rokowanie w chorobie nowotworowej, nie zostały do dnia dzisiejszego dokładnie wyjaśnione ani w medycynie, ani w weterynarii. Jednak wielu badaczy skłania się ku tezie, że wpływ na te rozbieżności ma duża liczba izoform MT, brak jednorodnych grup badawczych, jak również prawdopodobne różnice w indukcji genów odpowiedzialnych za syntezę poszczególnych izoform MT w różnych nowotworach (20).

Uzyskana w badaniach własnych średnia korelacja między ekspresją Ki-67 a MT, w świetle potwierdzonej wieloma badaniami dużej wartości indeksu antygenu Ki-67 jako czynnika prognostycznego, pozwala wnioskować, że obecność metalotioneiny w komórkach gruczolakoraka gruczołu sutkowego suk nie wykazuje jednoznacznego związku (koekspresji) ze zwiększonym potencjałem proliferacyjnym komórek nowotworowych, jak ma to miejsce w przypadku guzów sutka u kobiet. Może mieć to związek z innymi mechanizmami indukcji genów odpowiedzialnych za syntezę metalotioneiny, jak również zróżnicowanym biologicznym behawiorem poszczególnych izoform tego białka u zwierząt.



Ryc. 7. Nasilenie ekspresji metalotioneiny (MT) w gruczolakorakach gruczołu sutkowego suk



Ryc. 8. Nasilenie ekspresji antygenu (Ki-67) w gruczolakorakach gruczołu sutkowego suk

Piśmiennictwo

1. Arnesen K., Gamlem H., Glatte E., Moe L., Nordstoga K.: Registration of canine cancer. Tidsskr Nor Laegeforen 1995, 115, 714-717.
2. Barnard N. J., Hall P. A., Lemoine N. R., Kadarr N.: Proliferative index in breast carcinoma determined in situ by Ki-67 immunostaining and its relationship to clinical and pathological variables. J. Path. 1987, 152, 287-295.
3. Beyersman D., Haase H.: Functions of zinc in signaling, proliferation and differentiation of mammalian cells. Bio Metals 2001, 14, 331-341.
4. Boon-Haut B., Jin R., Jayasura A.: Analysis of metallothionein expression in human cancers. Acta Histochem. Cytochem. 2001, 34, 171-176.
5. Brown D. C., Gatter K. C.: Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. Histopathology 1990, 17, 489-503.
6. Cai L., Koropatnick J., Cherian M. G.: Metallothionein products DNA from copper – induced but not iron – induced cleavage in vitro. Chemico-Biol. Interact 1995, 96, 143-155.
7. Cardoso S. V., Caliri M. V., de Aguiar M. C., Cassali G. D.: Immunohistochemical staining of metallothionein in canine mammary tumors: better survival with higher expression. Oncol. Rep. 2004, 12, 1317-1321.
8. Cherian M. G., Apostolova M. D.: Nuclear localization of metallothionein during cell proliferation and differentiation. Cell Mol. Biol. 2000, 46, 347-356.
9. Coyle P., Philcox J. C., Carey L. C., Rofe A. M.: Metallothionein: The multipurpose protein. Cell Mol Life Sci. 2002, 59, 627-647.
10. Destexhe E., Lespagnard L., Degeyter M., Heymann R., Coignoul F.: Immunohistochemical identification of myoepithelial, epithelial, and connective tissue cells in canine mammary tumors. Vet. Path. 1993, 30, 146-154.
11. Dincer Z., Jasani B., Haywood S., Mullins J. E., Funtealba I. C.: Metallothionein expression in canine and feline mammary and melanotic tumours. J. Comp. Path. 2001, 125, 130-136.
12. Dziegiel P.: Expression of Metallothioneins in Tumor Cells. Pol. J. Path. 2004, 55, 3-12.
13. Ellis O., Pinder S. E., Lee A. S., Elston C. W.: Tumors of the breast, [w:] Fletcher C. D. M.: Diagnostic Histopathology of Tumors. Churchill, Livingstone, London 2000, 865-930.
14. Funtealba I. C., Mullins J. E.: Immunohistochemical demonstration of metallothionein in benign and malignant canine mammary tumours. Histol. Histopathol. 1999, 14, 51-61.
15. Gerdes J., Shwab U., Lemke H., Baisch H., Wacker H. H.: Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. Int. J. Canc. 1983, 31, 13-20.
16. Giziński S., Boryczko Z., Katkiewicz M., Bostedt H.: Białko Ki-67 jako wskaźnik prognostyczny w nowotworach gruczołu mlekowego u suk. Medycyna Wet. 2003, 59, 888-891.
17. Haq F., Mahoney M., Koropatnick J.: Signalling events for metallothionein induction. Mutat. Res. 2003, 533, 211-226.
18. Hishikawa Y., Kohno H., Ueda S., Kimoto T., Dhar D. K., Kubota H., Tachibana M., Koji T., Nagasue N.: Expression of metallothionein in colorectal cancers and synchronous liver metastases. Oncology 2001, 61, 162-167.
19. Ioachim E., Goussia A. C., Agnantis N. J., Machera M., Tsianos E. V., Kappas A. M.: Prognostic evaluation of metallothionein expression in human colorectal neoplasms. J. Clin. Path. 1999, 52, 876-879.
20. Jasani B., Schmid K. W.: Significance of metallothionein overexpression in human tumors. Histopathology 1997, 31, 211-214.
21. Jin R., Chow V. T., Tan P. H., Dheen S. T., Duan W., Bay B. H.: Metallothionein 2 A expression is associated with cell proliferation in breast cancer. Carcinogenesis 2002, 23, 81-86.
22. Jin R., Bay B. H., Chow V. T., Tan P. H.: Metallothionein 1F mRNA expression correlates with histological grade in breast carcinoma. Breast Cancer Res. Treat 2001, 66, 265-272.
23. Kagi J. H. R., Himmelhoch S. R.: Equine hepatic and renal metallothionein. J. Biol. Chem. 1974, 249, 3537-3542.
24. Kloth D. M., Chin J. L., Cherian M. G.: Induction of hepatic metallothionein I in tumour-bearing mice. Br. J. Cancer 1995, 71, 712-716.
25. Madej J., Milnerowicz H., Dzimira S.: Immunohistochemiczna lokalizacja metalotioneiny (MT) w nowotworach nabłonkowych u zwierząt. Medycyna Wet. 1999, 55, 806-808.
26. Palmiter R. D.: Molecular biology of metallothionein gene expression. Experientia Suppl. 1987, 52, 63-80.
27. Remmele W., Stegner H. E.: Vorschlag zur einheitlichen Definition eines immunoreaktiven Score (IRS) für den immunohistochemischen Östrogenrezeptor-Nachweis (ER-ICA) im Mammakarzinomgewebe. Pathologie 1987, 8, 138-140.
28. Romero-Isart N., Vasak M.: Advances in the structure and chemistry of metallothioneins. J. Inorg. Biochem. 2002, 88, 388-396.
29. Sato M., Bremner I.: Oxygen free radicals and metallothionein. Free Rad. Biol. Med. 1993, 14, 325-337.
30. Satoh M., Naganuma A., Imura N.: Modulation of adriamycin toxicity by tissue-specific induction of metallothionein synthesis in mice. Life Sci. 2000, 67, 627-634.
31. Simpkins C. O.: Metallothionein in human disease. Cell Mol. Biol. 2000, 46, 465-488.
32. Sone T., Koizumi S., Kimura M.: Cadmium – induced synthesis of metallothionein in human lymphocytes and monocytes. Chem. Biol. Interact 1988, 66, 61-70.
33. Szilagyi Z., Fenselau C.: Molecular dynamics simulation of metallothionein – drug complexes. Drug Metab. Dispos. 2000, 2, 174-179.
34. Vasak M., Hasler D. W.: Metallothioneins: new functional and structural insights. Curr Opin. Chem. Biol. 2000, 4, 177-183.
35. Vazquez-Ramirez F. J., Gonzalez-Campora J. J., Hevia-Alvarez E., Fernandez-Santos J. M., Rios-Martin J. J., Otal-Salaverri C., Gonzalez-Campora R.: P-glycoprotein, metallothionein and NM23 protein expression in breast carcinoma. Path. Res. Pract. 2000, 196, 553-559.
36. Wirigley E., Verspaget H. W., Jayson G. C., McGown A. T.: Metallothionein expression in epithelial ovarian cancer: effect of chemotherapy and prognostic significance. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 2000, 126, 717-721.
37. Zhang R., Wei H., Luo X.: Expression of metallothionein in invasive ductal breast cancer in relation to prognosis. J. Environ. Path. 2000, 19, 95-97.

Adres autora: dr Marcin Nowak, ul. Bończyka 6/1, 51-138 Wrocław;
e-mail: martin75@ozi.ar.wroc.pl