

Andrzej Kurylcio¹, Maria Mazurkiewicz²,
Wojciech P. Polkowski¹

¹ Klinika Chirurgii Onkologicznej
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie
Kierownik: prof. dr hab. n. med.
Wojciech Polkowski

² Katedra i Zakład Onkologii Uniwersy-
tetu Medycznego w Lublinie
Kierownik: prof. dr hab. n. med.
Maria Mazurkiewicz

Address for correspondence/
Adres do korespondencji:

Dr. n. med. Andrzej Kurylcio
Klinika Chirurgii Onkologicznej
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie
ul. St. Staszica 11, 20- 081 Lublin
tel. (081) 53 44 313
e-mail: andrzej.kurylcio@am.lublin.pl

Received: 05.09.2008
Accepted: 16.01.2009
Published: 02.03.2009

GABA content and GAD activity in breast tissue in women surgically treated for breast cancer

Zawartość GABA i aktywność GAD w tkankach gruczołu piersiowego u kobiet leczonych operacyjnie z powodu raka piersi

Original article/Artykuł oryginalny

Summary

Introduction: The aim of the study was to assess GABA content and GAD activity in macroscopically unchanged tissue as well as in breast cancer tissue. We assessed correlations between GABA and GAD and primary tumor size (T), presence or absence of metastases to axillary lymph nodes and patients' age.

Material and methods: The study included 54 patients treated surgically for breast cancer. The clinical characterization of examined population was performed. The following factors were assessed: age, tumor size, type of microscopic diagnosis, regional lymph nodes state. GABA content and GAD activity were measured in tissue material obtained from both tumor and macroscopically unchanged breast tissue. To assess GABA concentration and GAD activity spectrofluorometrical analysis was performed according to Lowe et al. and Sutton et al. modification.

Results: The age of examined women ranged between 37 and 85 years. The most common histological type was ductal carcinoma (*carcinoma ductale*), which constituted 77,8% of all examined tumors. The presence of metastases to axillary lymph nodes was confirmed with histopathological examination in 17 cases (31%). The obtained results were statistically analyzed. We observed, that GABA content and GAD activity were significantly higher in tumor tissue ($p < 0,005$) than in macroscopically unchanged breast tissue. Moreover, highly statistically significant positive correlation between GABA concentration and GAD activity was found in both cancer tissue ($r = 0,58$) and macroscopically unchanged breast tissue ($r = 0,5$).

Conclusions: No statistically significant correlation between GABA concentration and GAD activity in cancer tissue and breast tumor size (T) was found, however, a tendency for decrease of GABA and GAD values with increase in breast tumor size was observed. Interestingly, we found positive, statistically significant, correlation between GABA and GAD in T2 and T3+T4 tumors in both cancer tissue ($p < 0,05$) and macroscopically unchanged tissue ($p < 0,05$). Nevertheless, no correlation was found in small tumors (T1). In addition to that, we found significantly higher GABA concentration ($p < 0,05$) in tumor tissue in the group of patients with metastases to lymph nodes in comparison to patients without metastases in lymph nodes.

Key words: breast cancer, GABA, GAD

Streszczenie

Wstęp: Celem pracy była ocena zawartości GABA i aktywności GAD w tkance makroskopowo niezmienionej jak i w tkance nowotworowej gruczołu piersiowego. Oceniono zależności pomiędzy GABA i GAD a wielkością guza pierwotnego (T), obecnością bądź brakiem przerzutów w węzłach chłonnych pachowych i wiekiem chorych.

Material i metody: Badaniem objęto 54 chore leczone operacyjnie z powodu raka gruczołu piersiowego. Przeprowadzono charakterystykę kliniczną objętych badaniem kobiet. Oceniono: wiek, wielkość guza, rodzaj rozpoznania mikroskopowego, stan regionalnych węzłów chłonnych. Zawartość GABA i aktywność GAD oznaczano w materiale tkankowym pobranym zarówno z guza nowotworowego jak i z makroskopowo niezmienionej tkanki gruczołu piersiowego. Zawartość GABA i aktywność GAD oznaczono metodą spektrofлуorometryczną wg Lowe i wsp. w modyfikacji Sutton i wsp.

Wyniki: Wiek 54 objętych badaniem chorych wahał się od 37 do 85 lat. Najczęściej rozpoznawaną postacią mikroskopową raka piersi był naciekający rak przewodowy (*carcinoma ductale*), który stanowił 77,8%. Obecność przerzutów w węzłach chłonnych pachowych potwierdzono badaniem histopatologicznym w 17 (31%) przypadkach. Otrzymane wyniki badań poddano analizie statystycznej. Wykazano, że zawartość GABA i aktywność GAD była znamienne wyższa w tkance guza ($p < 0,005$) aniżeli w tkance makroskopowo niezmienionej gruczołu

STATISTIC STATYSTYKA

Word count Liczba słów	3307/3174
Tables Tabele	8
Figures Ryciny	5
References Piśmiennictwo	58

piersiowego. Stwierdzono wysoce istotną statystycznie dodatnią korelację pomiędzy zawartością GABA a aktywnością GAD zarówno w tkance nowotworowej ($r = 0,58$) i w tkance makroskopowo niezmienionej ($r = 0,5$).

Wnioski: Nie zaobserwowano istotnej statystycznie zależności pomiędzy zawartością GABA i aktywnością GAD w tkance nowotworowej a wielkością guza piersi (T), jednak zauważono tendencję do ich zmniejszania się wraz ze wzrostem średnicy guza. Stwierdzono natomiast istotną dodatnią korelację między GABA a GAD w guzach T2 i T3+T4 zarówno dla tkanki nowotworowej ($p < 0,05$) jak i tkanki makroskopowo niezmienionej ($p < 0,05$). Natomiast nie stwierdzono takiej korelacji w guzach małych T1. Wykazano istotnie wyższą ($p < 0,05$) zawartość GABA w tkance nowotworowej wśród chorych z przerzutami do węzłów chłonnych w porównaniu z chorymi bez przerzutów w węzłach.

Słowa kluczowe: rak piersi, GABA, GAD

INTRODUCTION

Breast cancer is the most common cancer among women in Europe and North America [1]. Poland is a country of medium incidence and mortality of breast cancer. In 2004 12049 new breast cancer cases were diagnosed and standard incidence rate was 40,7/100 000 population. Breast cancer is the most common cancer death cause in Polish women [1, 2, 3, 4].

Cancers constitute approximately 98% of breast malignancies. Most of invasive breast cancer, almost 70% of them, are ductal carcinomas (*carcinoma ductale*), which develop from milk ducts epithelium. Decidedly less common, diagnosed in 5-15% cases, are lobular carcinomas (*carcinoma lobulare*), which develop from epithelial structures of lobules. Apart from that other, rare form of breast cancer are diagnosed. They are usually characterized by better prognosis.

Breast cancer is highly malignant cancer, characterized by comparatively low cure rate. Standard methods for breast cancer treatment are surgery, chemotherapy, radiotherapy and hormone therapy, administered alone or in polytherapy. Choice of a proper treatment method and treatment schedule is based mainly on clinical staging of the tumor.

Although many factors increasing the risk of breast cancer development were identified, the tumor etiology is still poorly known. Breast cancer development is a multifactor process, in which numerous genetic, hormonal, ethnical and customary factors play essential role [5, 6, 7]. One of the most important mechanisms responsible for hormone-dependent cancers development is hormonal control of their growth. In breast cancer estrogens, which are specific gene expression regulators, play the key role.

Gammaaminobutyric acid (GABA) is a neurotransmitter which inhibits central and peripheral nervous system. It influences neural inhibition and stimulates electrophysiological processes by neuronal cell membrane depolarization [8, 9, 10, 11, 12, 13]. GABA concentration is up to 1000 times higher than any other neurotransmitters, e.g. noradrenalin and acetylcholine [14, 15, 16, 17].

WSTĘP

Rak gruczołu piersiowego jest najczęstszym nowotworem wśród kobiet zamieszkujących Europę i Amerykę Północną. [1]. Polska należy do krajów o średniej zapadalności i umieralności na raka gruczołu piersiowego. W roku 2004 rozpoznano 12049 nowych zachorowań na raka piersi, a standaryzowany współczynnik zapadalności wynosił 40,7/100 tys. ludności. Rak piersi jest najczęstszą przyczyną zgonów z powodu nowotworów złośliwych wśród kobiet w Polsce [1, 2, 3, 4].

Raki stanowią około 98% nowotworów złośliwych gruczołu piersiowego. Większość, bo blisko 70% inwazyjnych raków piersi stanowią raki przewodowe (*carcinoma ductale*), rozwijające się z nabłonka przewodów wyprowadzających. Zdecydowanie rzadziej, bo w 5–15% rozpoznawane są raki zrazikowe (*carcinoma lobulare*) rozwijające się z nabłonkowych struktur zrazika. Poza tym zaledwie w kilku procentach rozpoznawane są inne rzadkie postacie raka piersi cechujące się lepszym rokowaniem.

Rak piersi jest nowotworem o wysokim stopniu złośliwości i cechuje się stosunkowo niską wyleczalnością. W leczeniu raka gruczołu piersiowego uznanymi metodami są chirurgia, chemioterapia, radioterapia oraz hormonoterapia, stosowane samodzielnie lub w sposób skojarzony. Wybór odpowiedniej metody i taktyki leczenia uwarunkowany jest przede wszystkim stopniem zaawansowania klinicznego nowotworu.

Pomimo identyfikacji wielu czynników zwiększających ryzyko zachorowania na raka piersi etiologia tego nowotworu nadal jest stosunkowo mało poznana. Powstanie raka piersi jest zjawiskiem wieloprzyczynowym, w którym dużą rolę odgrywają czynniki genetyczne, hormonalne, etniczne i zwyczajowe [5, 6, 7]. Jednym z najistotniejszych mechanizmów odpowiedzialnych za powstawanie i rozwój nowotworów hormonozależnych jest kontrola wzrostu przez hormony. W przypadku raka piersi kluczową rolę odgrywają estrogeny, które są swoistym regulatorem ekspresji genów.

Kwas gamma - aminomasłowy (GABA) jest neuroprzekaźnikiem o działaniu hamującym w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym. Wpływa na zjawi-

GABA metabolism is poorly described. One of GABA metabolic pathways in central nervous system is its production during decarboxylation of glutamic acid by glutamic acid decarboxylase (GAD) [18, 19, 20].

Regulatory processes in GABAergic neurons are mediated by membrane receptors GABA-A and GABA-B located in dendrites [21, 22, 23]. GABA-A receptor is an ionophoric receptor constituted with α , β and γ subunits. GABA binding site is located in γ subunit, while α and β subunits work as benzodiazepines and barbiturates binding sites [16, 24]. GABA-B receptor is localized on presynaptic ending of non-GABAergic neurons. After GABA-B receptor activation late inhibitory postsynaptic potentials are created, which cause changes in secretion of amines (serotonin, dopamine), neuropeptides, stimulating amino acids and hormones [22, 23]. The discovery of benzodiazepines receptor as a part of GABA-A receptor complex in mammary gland can be an indirect evidence for presence of the whole GABAergic system in breast cells, however its role is still not known [25, 26].

There are a few papers describing a connection between GABAergic system and tumor development process. The proven presence of GABA-A receptor complex in central nervous system was a central point for research projects indicating its presence in gliomas. It was also shown, that the concentration of GABA-A depended on tumor malignancy rate [27]. Similarly, research projects confirming presence of GABA and GAD in cancers included such malignancies as prostate cancer, gastric cancer and colon cancer. Simultaneously, GABA content and GAD activity in macroscopically unchanged tissues appeared to be significantly lower than in tumor tissues. Moreover, higher GABA concentration in cancer tissue correlated with higher tumor malignancy rate [28, 29, 30].

GABAergic system plays special role in breast cancer because it takes part in cell proliferation regulation. It was shown, that excessive expression of GABAergic receptors is present on breast cancer cell lines characterized by higher malignancy, higher mitotic activity and in cancers with high rate of cells in S phase of cell cycle [31, 32].

The above observations let us suppose that GABAergic system, apart from many functions in central and peripheral nervous system and peripheral tissues, is able to play essential role in cancerogenesis.

sko hamowania neuronalnego i depolaryzując błonę neuronalną stymuluje procesy elektrofizjologiczne [8, 9, 10, 11, 12, 13]. Stężenie GABA jest do 1000 razy większe niż innych neuroprzekaźników np. noradrenaliny czy acetylocholiny [14, 15, 16, 17].

Metabolizm GABA nie został dokładnie poznany. W ośrodkowym układzie nerwowym jedną z dróg metabolicznych GABA jest jego powstanie w wyniku dekarboksylacji kwasu glutaminowego pod wpływem jego dekarboksylazy (GAD) [18, 19, 20]. Procesy regulacyjne w neuronach GABA – ergicznych zachodzą za pośrednictwem receptorów błonowych GABA-A i GABA-B, położonych w dendrytach [21, 22, 23]. Receptor GABA-A jest receptorem jonoforowym, wchodzącym w skład kompleksu receptorowego składającego się z podjednostek α , β , γ . Obszarem dla GABA jest podjednostka γ , a podjednostki α i β są obszarami dla benzodiazepin i barbituranów [16, 24]. Receptor GABA-B jest obecny w zakończeniach presynaptycznych neuronów nie GABA – ergicznych. W wyniku aktywacji receptora GABA-B powstają późne hamujące potencjały postsynaptyczne, które wywołują zmiany w uwalnianiu: amin (serotoniny, dopaminy), neuropeptydów, aminokwasów pobudzających oraz hormonów [22, 23]. Wykrycie receptora dla benzodiazepin wchodzącego w skład kompleksu receptorowego GABA-A w gruczole piersiowym może w sposób pośredni dowodzić obecności całego układu GABA – ergicznego w komórkach gruczołu piersiowego, choć jego rola nie została jeszcze poznana [25, 26].

Istnieje niewielka ilość prac poświęconych powiązaniom układu GABA-ergicznego z procesem nowotworzenia. Udowodniona obecność kompleksu receptorowego GABA-A w ośrodkowym układzie nerwowym była punktem wyjścia badań wskazujących na jego obecność w glejakach mózgu. Wykazano ponadto, że stężenie receptora GABA-A było zależne od stopnia złośliwości nowotworu [27]. Podobne prace potwierdzające obecność GABA i GAD dotyczyły raka gruczołu krokowego, raka żołądka i raka jelita grubego. Wykazano jednocześnie, że zawartość GABA i aktywność GAD w tkankach makroskopowo niezmienionych są znacznie niższe niż w tkankach nowotworowych tych narządów. Natomiast większe stężenie GABA w tkance nowotworowej korelowało ze zwiększonym stopniem złośliwości tych nowotworów [28, 29, 30].

Szczególną rolę odgrywa układ GABA-ergiczny w raku gruczołu piersiowego poprzez regulację proliferacji komórkowej. Wykazano, że nadmierna ekspresja receptorów GABA-ergicznego występuje w liniach komórkowych raka piersi cechujących się większą złośliwością, większą aktywnością mitotyczną oraz w rakach o przewadze komórek znajdujących się w fazie syntezy (S) cyklu komórkowego [31, 32].

Powyższe spostrzeżenia pozwalają przypuszczać, że układ GABA-ergiczny oprócz wielu funkcji jakie pełni w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym oraz w tkankach obwodowych, może odgrywać pewną rolę w procesie karcinogenezy.

AIM OF THE STUDY

The aim of the study was the assessment of GABA concentration and GAD activity in macroscopically unchanged tissues and breast cancer tissue and the assessment of correlations between GABA and GAD and breast tumor extent (T), presence or absence of metastases in axillary lymph nodes and age of patients.

MATERIALS AND METHODS

The study was performed in the group of 54 patients treated surgically for breast cancer in Oncologic Surgery Ward in Centrum Onkologii Ziemi Lubelskiej from December 1999 to January 2001. Modified radical mastectomy was performed in 48 cases, simple mastectomy with lower level of axillary cavity removal in 5 women and in one case breast conservative treatment (BCT) involving tumor axillary lymph nodes removal. In all cases surgery was primary treatment, not primed with any other methods of specialized systemic treatment.

In all patients clinical cancer diagnosis was confirmed by postsurgical histopathological tissue examination.

Clinical characteristic of examined population was performed, including the following: age, tumor size, microscopical diagnosis, local lymph nodes involvement.

GABA content and GAD activity in all examined women were measured in tissues obtained from both the tumor and macroscopically unchanged breast tissue. The tissue used for tests was taken immediately after breast tumor removal. Directly after taking the sample, tissue was frozen in liquid nitrogen and next stored in -20°C . GABA content and GAD activity was measured spectrofluorometrically according to Lowe et al. [33] in Sutton et al. modification [34].

The obtained results were statistically analyzed.

Continuous variables, such as: age and tumor size, were characterized by range (min.-max.), arithmetic mean and median.

Obtained values of GABA and GAD in examined tumor tissue and macroscopically unchanged breast tissue were analyzed statistically. GABA concentration and GAD activity in examined tissues were shown as a mean and standard deviation from repeated measurements, median and range (min.-max.). Correlation coefficient between GABA and GAD values were calculated with Spearman test.

Correlations between GABA and GAD and T parameter were assessed with Kruskal-Wallis test. To assess correlation between GABA and GAD and patients' age Spearman test was used, while comparisons between GABA and GAD content in relation to the other factors were assessed using Mann-Whitney test. Admissible error was 5%.

CEL PRACY

Celem pracy była ocena zawartości GABA i aktywności GAD w tkance makroskopowo niezmiennionej oraz w raku gruczołu piersiowego oraz ocena zależności pomiędzy GABA i GAD a wielkością guza piersi (T), obecnością bądź brakiem przerzutów w węzłach chłonnych pachowych oraz wiekiem chorych.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono w grupie 54 chorych leczonych operacyjnie z powodu raka gruczołu piersiowego w Oddziale Chirurgii Onkologicznej Centrum Onkologii Ziemi Lubelskiej w okresie od grudnia 1999 roku do stycznia 2001 roku. Zmodyfikowaną mastektomię radykalną wykonano u 48 chorych, mastektomię prostą wraz z usunięciem dolnego piętra jamy pachowej u 5 kobiet i u jednej sektorowe wycięcie guza z jednoczesnym usunięciem węzłów chłonnych jamy pachowej (BCT). Leczenie chirurgiczne było leczeniem pierwotnym, nie poprzedzonym innymi metodami systemowego leczenia specjalistycznego.

U wszystkich chorych rozpoznanie kliniczne nowotworu potwierdzone zostało badaniem histopatologicznym pooperacyjnego materiału tkankowego.

Przeprowadzono charakterystykę kliniczną objętych badaniem kobiet. Oceniono: wiek, wielkość guza, rodzaj rozpoznania mikroskopowego, stan regionalnych węzłów chłonnych.

Zawartość GABA i aktywność GAD u wszystkich objętych badaniem kobiet oznaczano w materiale tkankowym pobranym zarówno z guza nowotworowego jak i z makroskopowo niezmiennionej tkanki gruczołu piersiowego. Materiał tkankowy do oznaczeń pobierano niezwłocznie po wycięciu guza piersi. Bezpośrednio po pobraniu tkankę zamrażano w ciekłym azocie, a następnie przechowywano w temperaturze -20°C . Zawartość GABA i aktywność GAD oznaczono metodą spektrofлуorometryczną wg Lowe i wsp. [33] w modyfikacji Sutton i wsp. [34].

Otrzymane wyniki badań poddano analizie statystycznej.

Zmienne ciągłe takie jak: wiek, wielkość guza określono zakresem (min. – max.), średnią arytmetyczną i medianą.

Przeprowadzono analizę statystyczną otrzymanych wartości GABA i GAD w tkance guza i tkance makroskopowo niezmiennionej gruczołu piersiowego. Zawartość GABA i aktywność GAD w badanych tkankach przedstawiono jako średnią z powtórzeń z odchyleniem standardowym, medianą i zakresem (min. – max.). Współczynniki korelacji między wartościami GABA i GAD obliczono testem Spearman'a.

Współzależności między GABA i GAD a cechą T oceniono testem Kruskala-Wallisa. Do określenia korelacji między GABA i GAD a wiekiem badanych chorych użyto testu Spearmana. Natomiast różnice zawartości GABA i GAD w badanych tkankach w zależności od pozostałych czynników określono testem Manna-Whitney'a. W pracy przyjęto 5% ryzyko błędu wnioskowania.

RESULTS

Age of examined patients ranged from 37 to 85 years. Mean age was 59,7 years and median 58,0 years. The largest group, constituting more than a half of examined population, were women between 41 and 50 years and between 71 and 80 years. Breast cancer in young women, younger than 40 years, was diagnosed in only 2 cases. Age distribution in examined population of women treated surgically for breast cancer is shown in Fig. 1.

Tumor size in examined population was extremely diverse and ranged between 1 cm and 15 cm, mean size was $3,45 \text{ cm} \pm 2,39 \text{ cm}$.

In most patients (85%) breast cancer was diagnosed in early phases of local extent of tumor (T1 and T2). Locally advanced stages of cancer (T4) were diagnosed in only 11% of all breast tumors.

WYNIKI

Wiek 54 objętych badaniem chorych wahał się od 37 do 85 lat. Średnia wieku wynosiła 59,7 lat, a mediana 58,0 lat. Najliczniejszą grupę, bo znacznie ponad połowę objętych badaniem chorych stanowiły kobiety pomiędzy 41 a 50 rokiem życia oraz 71 a 80 rokiem życia. Raka piersi u kobiet młodych mających mniej jak 40 lat rozpoznano zaledwie w 2-ch przypadkach. Rozkład wieku badanych kobiet operowanych z powodu raka piersi ilustruje ryc. 1.

Wielkość guza w badanej grupie chorych była bardzo zróżnicowana i wahała się od 1 cm do 15 cm, a średnia wynosiła $3,45 \text{ cm} \pm 2,39 \text{ cm}$.

U większości objętych badaniem chorych, bo w 85% raka rozpoznawano we wczesnych T1 i T2 stopniach zaawansowania miejscowego. Raki bardzo zaawansowane miejscowo o cesze T4 stanowiły zaledwie 11% wszystkich guzów piersi.

Fig. 1. Age distribution in examined population

Ryc. 1. Rozkład wieku objętych badaniem chorych

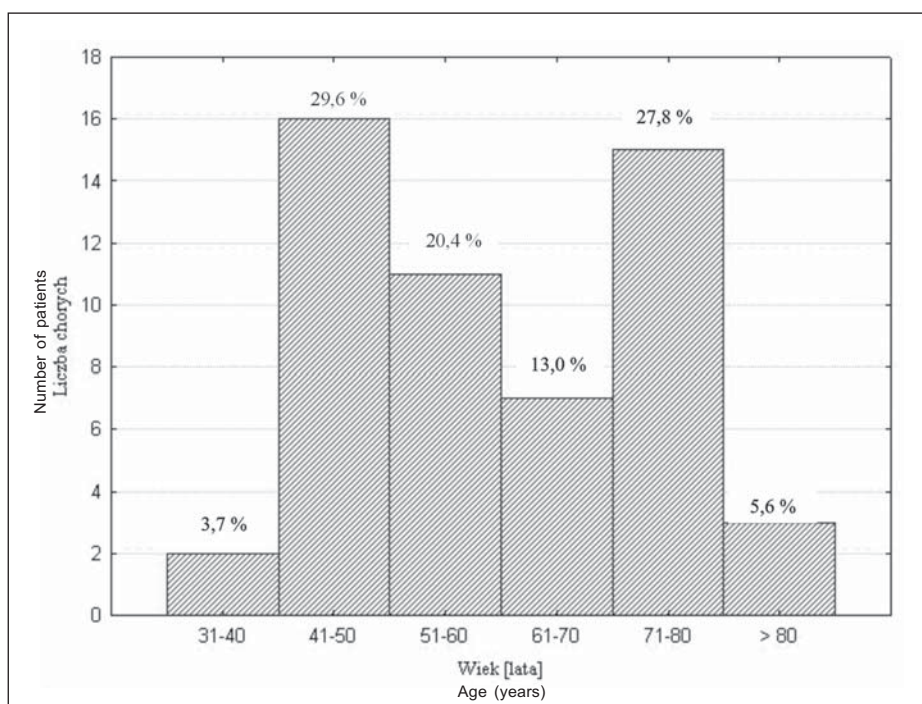
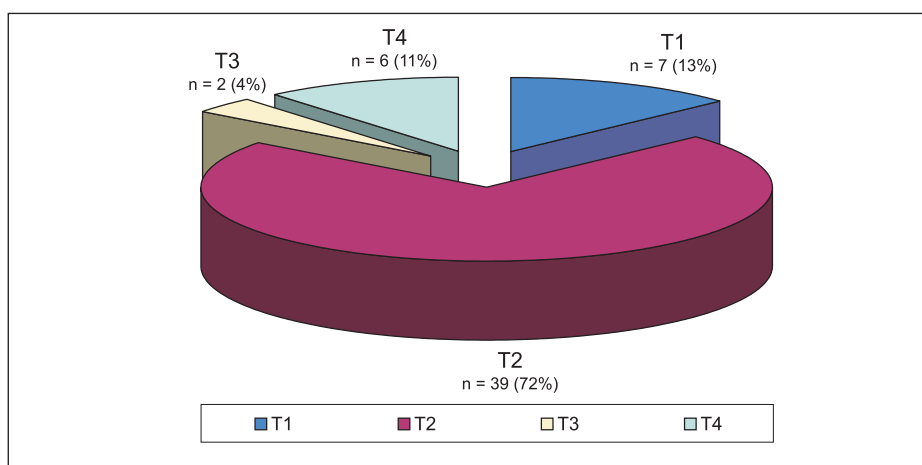


Fig. 2. Distribution of the local extent of primary tumor (T) in examined population

Ryc. 2. Rozkład stopni zaawansowania miejscowego (T) w badanej grupie chorych



The distribution of local extent of tumor is shown in Fig. 2.

The most common microscopic type of breast cancer in examined population was infiltrating ductal carcinoma (*carcinoma ductale*), which was found in 77,8% of all microscopic diagnoses.

Among 54 patients in the study, 17 (31%) had metastases in axillary lymph nodes. Mean age of patients with metastases was $58,3 \pm 15,7$ years and was not significantly different from mean age of patients without metastases in axillary lymph nodes (mean age $60,4 \pm 13,1$ years). In the group of 37 patients without metastases in axillary lymph nodes were 3 patients with non-infiltrating cancer. The presence of metastases in removed axillary lymph nodes in all studied cases was confirmed in histopathological examination of obtained material.

Mean tumor size in patients with metastases in regional lymph nodes was $4,01 \pm 2,41$ cm, while in patients without metastases was lower – $3,19 \pm 2,37$ cm. However, it was not statistically significant ($p = 0,082$).

Performed tests have shown that GABA concentration and GAD activity are significantly increased in tumor tissue in comparison to macroscopically unchanged breast tissue. It appeared that mean GABA concentration in tumor tissue was 57,7 mg/1g while in macroscopically unchanged tissue it was almost two times lower and reached 28,1 mg/1g. The difference was statistically significant ($p < 0,005$). Whereas mean GAD activity values in examined tissues were 244,6 mg/1g/1h and 115,6 mg/1g/1h respectively. In this case, mean GAD activity in tumor tissue was significantly higher ($p < 0,05$) than in macroscopically unchanged breast tissue (Table I).

We also found highly statistically significant positive correlation between GABA content and GAD activity in malignant tissue. Correlation coefficient between GABA and GAD in malignant tissue was $r = 0,58$ ($p < 0,05$) (Figure 4).

Rozkład zaawansowania miejscowego raka piersi ilustruje rycina 2.

Najczęściej rozpoznawaną postacią mikroskopową raka piersi wśród objętych badaniem chorych był naciekający rak przewodowy (*carcinoma ductale*), który stanowił 77,8% wszystkich rozpoznań mikroskopowych.

Spośród 54 objętych badaniem chorych, u 17 (31%) rozpoznano przerzuty w węzłach chłonnych pachowych. Średnia wieku chorych, u których wystąpiły przerzuty wynosiła $58,3 \pm 15,7$ lat i nie różniła się istotnie ($p = 0,612$) od średniej wieku pacjentek bez przerzutów w węzłach chłonnych pachowych. Średnia wieku wśród nich wynosiła $60,4 \pm 13,1$ lat. Wśród 37 chorych bez przerzutów w węzłach chłonnych pachy znalazły się również 3 chore, u których rozpoznano raka nienaciekającego. Obecność przerzutów w usuniętych węzłach pachowych we wszystkich przypadkach została potwierdzona badaniem histopatologicznym tkankowego materiału pooperacyjnego (Rycina 3).

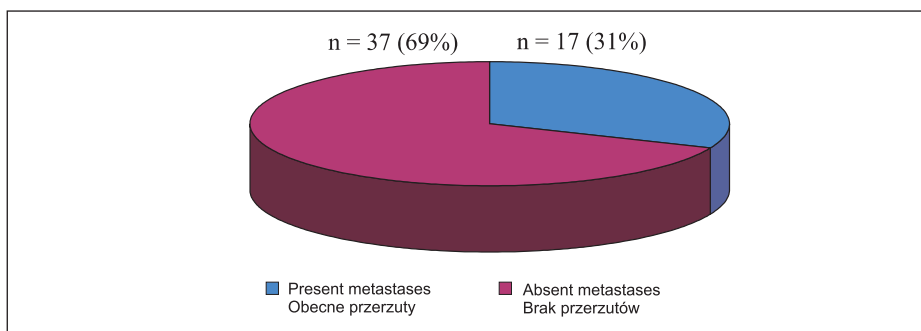
Średnia wielkości guza wśród chorych, u których rozpoznano przerzuty w regionalnych węzłach chłonnych wynosiła $4,01 \pm 2,41$ cm. Natomiast wśród chorych bez przerzutów była mniejsza i wynosiła $3,19 \pm 2,37$ cm. Niemniej jednak różnica nie była istotna statystycznie ($p = 0,082$).

Przeprowadzone badania wykazały, że zawartość GABA i aktywność GAD są znamienne wyższe w tkance guza aniżeli w tkance makroskopowo niezmienionej gruczołu piersiowego. Okazało się, że średnia wartości GABA w tkance nowotworowej wynosiła 57,7 mg/1g podczas gdy w tkance makroskopowo niezmienionej była blisko dwukrotnie niższa i wynosiła 28,1 mg/1g. Różnica była istotna statystycznie ($p < 0,005$). Natomiast średnie wartości aktywności GAD w porównywanych tkankach wynosiły odpowiednio 244,6 mg/1g/1h i 115,6 mg/1g/1h. Okazało się również, że średnia aktywność GAD w tkance nowotworowej była istotnie wyższa ($p < 0,05$) od średniej aktywności GAD w tkance makroskopowo niezmienionej gruczołu piersiowego (Tabela I).

Stwierdzono ponadto wysoce istotną statystycznie dodatnią korelację pomiędzy zawartością GABA a aktywnością GAD w tkance nowotworowej. Współczynnik korelacji pomiędzy GABA a GAD w tkance nowotworowej wynosił $r = 0,58$ ($p < 0,05$) (Rycina 4).

Fig. 3. Distribution of presence or absence of metastases in axillary lymph nodes in examined population

Ryc. 3. Rozkład chorych w zależności od obecności bądź braku przerzutów w węzłach chłonnych pachowych



Moreover, in macroscopically unchanged breast tissue there is also high positive correlation between GABA concentration and GAD activity. Correlation coefficient $r = 0,51$ ($p < 0,05$) (Figure 5).

No relationship between GABA content and GAD activity in tumor tissue and hormonal status of examined women was found. As it turned out, GABA concentration in women younger and older than 50 years were almost identical, and was 58,9mg/1g and 57,2 mg/1g respectively, while GAD activity was 213,8 mg/1g/1h and 260,0 mg/1g/1h respectively. The differences were not significant (Table II).

Furthermore, no similar correlation for GABA and GAD in macroscopically unchanged breast tissue was found. Similarly, GABA and GAD concentration in women younger and older than 50 years were almost identical and the difference was not significant (Table III).

Okazało się, że w tkance makroskopowo niezmienionej również istnieje silna dodatnia korelacja między wartościami GABA i GAD. Współczynnik korelacji wyniósł $r = 0,51$ ($p < 0,05$) (Rycina 5).

Nie wykazano aby zawartość GABA i aktywność GAD w tkance nowotworowej zależała od statusu hormonalnego badanych kobiet. Okazało się bowiem, że zawartość GABA, u kobiet przed i po 50 roku życia była prawie identyczna i wynosiła odpowiednio 58,9mg/1g i 57,2 mg/1g natomiast aktywność GAD 213,8 mg/1g/1h i 260,0 mg/1g/1h. Różnice nie były istotne statystycznie (Tabela II).

Również nie stwierdzono takich zależności dla GABA i GAD tkanki makroskopowo niezmienionej. Okazało się bowiem, że wartości GABA i GAD w tkance makroskopowo niezmienionej między kobietami mającymi mniej jak 50 lat oraz starszymi nie różniły się istotnie (Tabela III).

Tab. I. GABA content and GAD activity in examined breast tissues

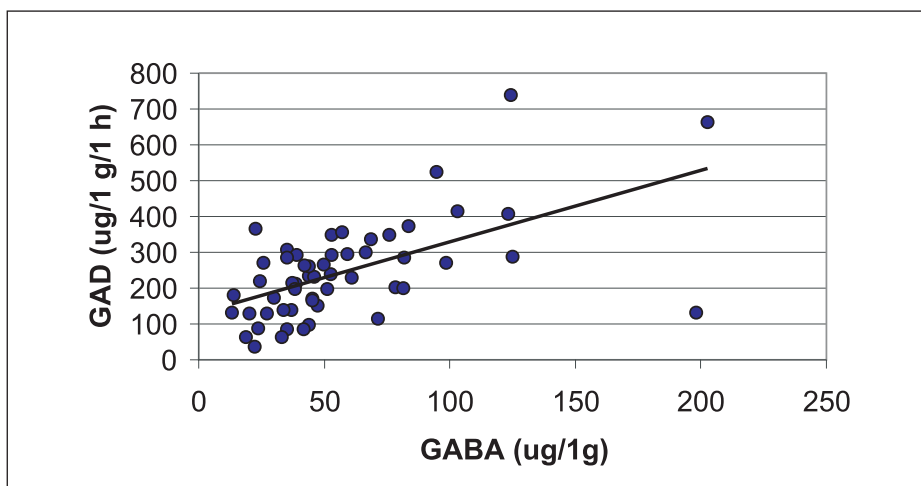
	Type of tissue	Mean $\pm$ SD	Median	Range	p value
GABA ($\mu\text{g}/1\text{g}$)	cancer tissue	$57,7 \pm 39,5$	45,3	13,2-202,8	< 0,05
	macroscopically unchanged	$28,1 \pm 20,6$	25,0	1,6-120,7	
GAD ($\mu\text{g}/1\text{g}/1\text{h}$)	cancer tissue	$244,6 \pm 136,4$	229,9	35,8-739,5	< 0,05
	macroscopically unchanged	$115,6 \pm 83,4$	104,4	8,6-547,9	

Tab. I. Zawartość GABA i aktywność GAD w badanych tkankach gruczołu piersiowego

	Rodzaj tkanki	Średnia $\pm$ SD	Mediana	Zakres	p
GABA ($\mu\text{g}/1\text{g}$)	nowotworowa	$57,7 \pm 39,5$	45,3	13,2-202,8	< 0,05
	makroskopowo niezmieniona	$28,1 \pm 20,6$	25,0	1,6-120,7	
GAD ($\mu\text{g}/1\text{g}/1\text{h}$)	nowotworowa	$244,6 \pm 136,4$	229,9	35,8-739,5	< 0,05
	makroskopowo niezmieniona	$115,6 \pm 83,4$	104,4	8,6-547,9	

Fig. 4. Correlation between GABA content and GAD activity in cancer tissue

Ryc. 4. Korelacja między zawartością GABA a aktywnością GAD w tkance nowotworowej



Afterwards we assessed the correlation between GABA and GAD and breast tumor size. Because the distribution of mean values of these features was not normal to compare standard deviations and medians we use Kruskal-Wallis test. We counted groups T3 and T4 as one group.

We did not observe statistical correlation between GABA concentration and GAD activity in cancer tissue and the size of breast tumor. However, GABA and GAD values were decreasing while tumor size increased (Table IV).

Similarly, in macroscopically unchanged breast tissues correlations between GABA and GAD values and tumor size were not statistically significant (Table V).

The correlations between GABA and GAD dependent on T parameter were assessed in the following groups: T1, T2 and T3+T4 using Spearman test.

Positive correlation between GABA and GAD values and T parameter was found in T2 and T3+T4 groups. Similar correlation was found in macroscopically unchanged breast tissue obtained from tumor surroundings. Whereas, what should be highlighted, no correlation

Przeprowadzono ocenę zależności wartości GABA i GAD od wielkości guza piersi. Ze względu na duże odchylenia rozkładów od rozkładu normalnego średnie wartości badanych związków, odchylenia standardowe (SD) i mediany zostały porównane testem Kruskala – Wallisa, po połączeniu w całość grup T3 i T4.

Nie zaobserwowano istotnej statystycznie zależności pomiędzy zawartością GABA i aktywnością GAD w tkance nowotworowej a wielkością guza piersi. Niemniej jednak zauważono tendencję do ich zmniejszania się wraz ze wzrostem średnicy guza piersi (Tabela IV).

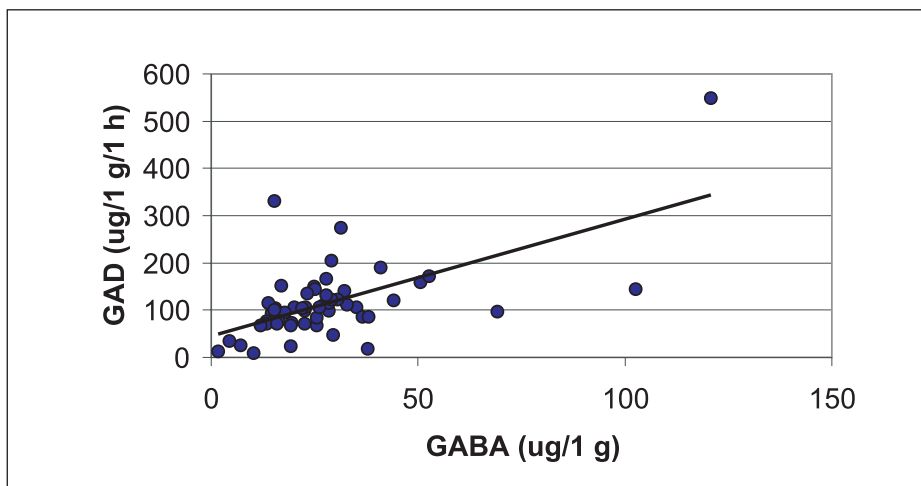
Podobnie w tkance makroskopowo niezmienionej zależności wartości GABA i GAD od wielkości guza nie były istotne statystycznie (Tabela V).

Korelacje pomiędzy GABA a GAD w zależności od cechy T oceniono w grupach: T1, T2 oraz T3 + T4 testem Spearmana.

Stwierdzono istotną dodatnią korelację między wartościami GABA a GAD zarówno w guzach T2 i T3+T4. Zależność taką stwierdzono również w tkance makroskopowo niezmienionej pobranej z otoczenia tych guzów. Natomiast, co warto podkreślić nie stwierdzono korela-

Fig. 5. Correlation between GABA content and GAD activity in macroscopically unchanged breast tissue

Ryc. 5. Korelacja między zawartością GABA a aktywnością GAD w tkance makroskopowo niezmienionej gruczołu piersiowego



Tab. II. Correlations between GABA content and GAD activity in cancer tissue and hormonal state of examined women

Hormonal status	GABA ($\mu\text{g}/1\text{g}$)		GAD ($\mu\text{g}/1\text{g}/1\text{h}$)	
	mean $\pm$ SD	median	mean $\pm$ SD	median
premenopausal	58,9 $\pm$ 44,6	42,2	213,8 $\pm$ 114,6	189,1
postmenopausal	57,2 $\pm$ 37,4	45,6	260,0 $\pm$ 145,1	249,9
	p = 0,8329		p = 0,2189	

Tab. II. Zależności między wartościami GABA i GAD w tkance nowotworowej a stanem hormonalnym badanych kobiet

Status hormonalny	GABA ($\mu\text{g}/1\text{g}$)		GAD ($\mu\text{g}/1\text{g}/1\text{h}$)	
	średnia $\pm$ SD	mediana	średnia $\pm$ SD	mediana
przedmenopauzalny	58,9 $\pm$ 44,6	42,2	213,8 $\pm$ 114,6	189,1
pomenopauzalny	57,2 $\pm$ 37,4	45,6	260,0 $\pm$ 145,1	249,9
	p = 0,8329		p = 0,2189	

between GABA and GAD values in tumors measuring more than 2 cm was found (Table VI).

Breast cancer metastases to regional lymph nodes were found in 17 (31%) patients from 54 examined in the study. Because the distribution of mean values of these features was not normal to compare standard deviations, mean values and medians of GABA and GAD we use Mann-Whitney test.

We found that mean GABA and GAD values in tumor tissue among women with metastases in axillary lymph nodes were 80,0 mg/1g and 270,6 mg/1g/1h respectively and were higher than in women with no metastases to the lymph nodes. Mean GABA value in this

cji między GABA a GAD w guzach o średnicy nieprzekraczającej 2 cm (Tabela VI).

Przerzuty raka piersi do regionalnych węzłów chłonnych rozpoznano u 17 (31%) spośród 54 objętych badaniem chorych. Ze względu na duże odchylenia rozkładów od rozkładu normalnego porównanie średnich wartości, odchyleń standardowych oraz median wartości GABA i GAD określono za pomocą testu Manna – Whitney’a.

Okazało się, że średnie wartości GABA i GAD w tkance guza wśród kobiet, u których rozpoznano przerzuty w węzłach pachowych wynosiły odpowiednio 80,0 mg/1g i 270,6 mg/1g/1h i były wyższe aniżeli wśród kobiet bez przerzutów w węzłach. Średnia wartość

Tab. III. Correlations between GABA content and GAD activity in macroscopically unchanged breast tissue and hormonal state of examined women

Hormonal status	GABA (μg/1g)		GAD (μg/1g/1h)	
	mean ± SD	median	mean ± SD	median
premenopausal	33,4 ± 24,9	27,4	137,4 ± 114,8	101,4
postmenopausal	25,5 ± 17,9	22,6	104,6 ± 61,3	104,9
	p = 0,1104		p = 0,5883	

Tab. III. Zależność pomiędzy wartościami GABA i GAD w tkance makroskopowo niezmięnionej a statusem hormonalnym badanych kobiet

Status hormonalny	GABA (μg/1g)		GAD (μg/1g/1h)	
	średnia ± SD	mediana	średnia ± SD	mediana
przedmenopauzalny	33,4 ± 24,9	27,4	137,4 ± 114,8	101,4
pomenopauzalny	25,5 ± 17,9	22,6	104,6 ± 61,3	104,9
	p = 0,1104		p = 0,5883	

Tab. IV. Correlations between GABA content and GAD activity in cancer tissue and tumor extent (T)

Breast cancer tissue					
T parameter	Number of patients (N)	GABA (μg/1g)		GAD (μg/1g/1h)	
		mean ± SD	median	mean ± SD	median
T1	7	73,1 ± 61,0	45,9	240,9 ± 98,6	230,9
T2	39	54,5 ± 29,5	45,4	232,2 ± 135,8	214,7
T3+T4	8	60,2 ± 60,2	40,2	308,3 ± 163,9	296,4
		p = 0,7771		p = 0,3411	

Tab. IV. Zależność średniej zawartości GABA i aktywności GAD w tkance nowotworowej od wielkości guza (T)

Tkanka nowotworowa					
Cecha T	Liczba chorych (N)	GABA (μg/1g)		GAD (μg/1g/1h)	
		średnia ± SD	mediana	średnia ± SD	mediana
T1	7	73,1 ± 61,0	45,9	240,9 ± 98,6	230,9
T2	39	54,5 ± 29,5	45,4	232,2 ± 135,8	214,7
T3+T4	8	60,2 ± 60,2	40,2	308,3 ± 163,9	296,4
		p = 0,7771		p = 0,3411	

group was 47,5 mg/1g, while GAD 232,7 mg/1g/1h. However, only difference for GABA was statistically significant ($p < 0,05$) (Table VII).

However, no significant differences between GABA and GAD values in macroscopically unchanged breast tissue and absence or presence of breast cancer metastases to axillary lymph nodes were found (Table VIII).

GABA wynosiła, u nich 47,5 mg/1g, a GAD 232,7 mg/1g/1h. Nie mniej jednak tylko dla GABA różnica okazała się istotna statystycznie ($p < 0,05$) (Tabela VII).

Natomiast nie wykazano, aby wartości GABA i GAD w tkance makroskopowo niezmiennionej różniły się istotnie w zależności od braku bądź obecności przerzutów raka piersi w węzłach pachowych (Tabela VIII).

Tab. V. Correlations between GABA content and GAD activity macroscopically unchanged breast tissues and tumor extent (T)

Macroscopically unchanged breast tissue					
T parameter	Number of patients (N)	GABA ($\mu\text{g}/1\text{g}$)		GAD ($\mu\text{g}/1\text{g}/1\text{h}$)	
		mean $\pm$ SD	median	mean $\pm$ SD	median
T1	7	36,2 $\pm$ 18,3	29,0	156,4 $\pm$ 65,5	132,2
T2	39	26,0 $\pm$ 18,9	23,2	109,9 $\pm$ 92,4	97,9
T3+T4	8	31,2 $\pm$ 29,6	21,0	107,4 $\pm$ 25,8	105,4
		$p = 0,1944$		$p = 0,0855$	

Tab. V. Zależność średniej zawartości GABA i aktywności GAD w tkance makroskopowo niezmiennionej od wielkości guza (T)

Tkanka makroskopowo niezmienniona					
Cecha T	Liczba chorych (N)	GABA ($\mu\text{g}/1\text{g}$)		GAD ($\mu\text{g}/1\text{g}/1\text{h}$)	
		średnia $\pm$ SD	mediana	średnia $\pm$ SD	mediana
T1	7	36,2 $\pm$ 18,3	29,0	156,4 $\pm$ 65,5	132,2
T2	39	26,0 $\pm$ 18,9	23,2	109,9 $\pm$ 92,4	97,9
T3+T4	8	31,2 $\pm$ 29,6	21,0	107,4 $\pm$ 25,8	105,4
		$p = 0,1944$		$p = 0,0855$	

Tab. VI. Correlations between GABA content and GAD activity in examined tissue and tumor extent (T)

T parameter	Number of patients	Correlation coefficient (r) / p value (p)	
		Cancer tissue	Macroscopically unchanged tissue
T1	7	$r = 0,04 / p = 0,9394$	$r = 0,32 / p = 0,48$
T2	39	$r = 0,65 / p < 0,05$	$r = 0,48 / p < 0,05$
T3 + T4	8	$r = 0,83 / p < 0,05$	$r = 0,81 / p < 0,05$

Tab. VI. Korelacja między zawartością GABA a aktywnością GAD w badanych tkankach w zależności od wielkości guza (T)

Cecha T	Liczba chorych	Współczynnik korelacji (r) / prawdopodobieństwo (p)	
		Tkanka nowotworowa	Tkanka makroskopowo niezmienniona
T1	7	$r = 0,04 / p = 0,9394$	$r = 0,32 / p = 0,48$
T2	39	$r = 0,65 / p < 0,05$	$r = 0,48 / p < 0,05$
T3 + T4	8	$r = 0,83 / p < 0,05$	$r = 0,81 / p < 0,05$

DISCUSSION

Gammaaminobutyric acid (GABA) is produced mainly through decarboxylation of glutamic acid by glutamic acid decarboxylase (GAD) and is major inhibitory neurotransmitter in central and peripheral nervous system. The highest GABA concentration was found in brain [19,

DYSKUSJA

Kwas gamma-aminomasłowy (GABA), powstający głównie w wyniku dekarboksylacji kwasu glutaminowego pod wpływem jego dekarboksylazy (GAD) jest głównym neuroprzekaźnikiem o działaniu hamującym w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym. Największe

Tab. VII. The comparison of GABA content and GAD activity in cancer tissue in relation to presence or absence of metastases in local lymph nodes

Breast cancer tissue				
Local lymph nodes	GABA (µg/1g)		GAD (µg/1g/1h)	
	mean ± SD	median	mean ± SD	median
No metastases N=37	47,5 ± 26,9	43,7	232,7 ± 130,6	229,0
Metastases present N=17	80,0 ± 52,7	68,5	270,6 ± 148,8	271,6
Comparison	p < 0,05		p = 0,3375	

N - number of patients

Tab. VII. Porównanie zawartości GABA i aktywności GAD w tkance nowotworowej w zależności od stanu regionalnych węzłów chłonnych

Tkanka nowotworowa				
Stan węzłów chłonnych	GABA (µg/1g)		GAD (µg/1g/1h)	
	średnia ± SD	mediana	średnia ± SD	mediana
Brak przerzutów N=37	47,5 ± 26,9	43,7	232,7 ± 130,6	229,0
Obecne przerzuty N=17	80,0 ± 52,7	68,5	270,6 ± 148,8	271,6
Porównanie	p < 0,05		p = 0,3375	

N- liczba chorych

Tab. VIII. The comparison of GABA content and GAD activity in macroscopically unchanged breast tissue in relation to presence or absence of metastases in local lymph nodes

Macroscopically unchanged breast tissue				
Local lymph nodes	GABA (µg/1g)		GAD (µg/1g/1h)	
	mean ± SD	median	mean ± SD	median
No metastases N=37	28,0 ± 20,5	23,2	117,8 ± 94,5	99,7
Present metastases N=17	28,4 ± 21,3	25,5	110,6 ± 53,8	106,8
Comparison	p = 0,9258		p = 0,6348	

N – number of patients

Tab. VIII. Porównanie zawartości GABA i aktywności GAD w tkance makroskopowo niezmięnionej w zależności od stanu regionalnych węzłów chłonnych

Tkanka makroskopowo niezmięciona				
Stan węzłów chłonnych	GABA (µg/1g)		GAD (µg/1g/1h)	
	średnia ± SD	mediana	średnia ± SD	mediana
Brak przerzutów N=37	28,0 ± 20,5	23,2	117,8 ± 94,5	99,7
Obecne przerzuty N=17	28,4 ± 21,3	25,5	110,6 ± 53,8	106,8
Porównanie	p = 0,9258		p = 0,6348	

N – liczba chorych

20]. Apart from nervous system, GABA and its receptors were found in gall bladder, urine bladder, heart muscle, blood vessels, lungs, liver, kidneys, sympathetic ganglia, uterus, fallopian tube, ovaries, suprarenal glands, thyroid gland, pancreas and intestines [13, 29, 35, 36, 37, 38]. It is assumed that GABAergic system in the above organs takes part in muscle tone regulation and influences hormonal turnover [39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46].

There are more and more reports on connections between GABAergic system and many types of cancer development including: breast, liver, ovary, colon and rectum, brain, cervical and endometrial cancers [28, 47]. Moreover, it was shown that concentration of GABA and its receptor in cancer tissue is significantly increased in comparison to healthy tissues, from which the cancer derived [48].

The role of GABAergic system in breast tissue is special, because it seems to regulate cell proliferation through regulation of hormonal turnover, and due to that it takes part in breast cancer development and growth. The presence of GABA and GAD was found in normal tissue and both benign and malignant breast tumors in women [45]. GABA content and GAD activity in cancer tissue were significantly higher in comparison to benign tumors and normal breast tissue [32].

The performed tests in the examined group of 54 women surgically treated for breast cancer confirmed presence of GABA and GAD in both tumor tissues and macroscopically unchanged breast tissues. Mean GABA concentration in those tissues were 57,7 $\mu\text{g}/\text{lg}$ and 28,1 $\mu\text{g}/\text{lg}$ respectively, while GAD activity 244,6 $\mu\text{g}/\text{lg}/\text{lh}$ and 115,6 $\mu\text{g}/\text{lg}/\text{lh}$ respectively. We also found that GABA concentration and GAD activity in cancer tissues were significantly higher ($p < 0,05$) in comparison to normal breast tissue. Increased GABA concentration in tumor, in comparison to surrounding tissue, were described also by Badyopadhyay et al. in breast, rectal, ovary, cervical and uterine cancers [48]. Our results shown statistically significant, positive correlation between GABA concentration and GAD activity in both cancer and normal breast tissue. Correlation coefficient between GABA and GAD in examined tissues were $r = 0,58$ ($p < 0,05$) and $r = 0,51$ ($p < 0,05$) respectively.

The presence of GABA in cancer tissue and macroscopically unchanged breast tissue accompanied by high GAD activity, a key enzyme in GABA synthesis, proves that GABA is not only a substrate in metabolism but is synthesized directly in examined tissues. It is not possible to determine whether increase in GABA concentration in tumor tissue in comparison to normal breast tissue is caused by hypoxia, which is often present in cancer tissue. Hypoxia influences oxygen-dependent GABA-transaminase (GABA-T) activity, which is responsible for GABA degradation [44].

jego ilości stwierdzono w mózgu [19, 20]. Poza układem nerwowym obecność GABA i jego receptorów potwierdzono m.in. w: pęcherzyku żółciowym, pęcherzu moczowym, sercu, naczyniach krwionośnych, płucach, wątrobie, nerkach, zwojach współczulnych, macicy, jajowodzie, jajnikach, nadnerczach, tarczycy, trzustce i jelicie [13, 29, 35, 36, 37, 38]. Przyjmuje się, że układ GABA-ergiczny w tych narządach bierze udział w regulacji napięcia mięśniowego i wpływa na gospodarkę hormonalną [39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46].

Coraz liczniej w literaturze pojawiają się doniesienia na temat powiązania układu GABA-ergicznego z rozwojem wielu nowotworów w tym: piersi, wątroby, jajnika, jelita grubego i odbytnicy, mózgu, szyjki macicy i endometrium [28, 47]. Co więcej wykazano, że poziom GABA i jego receptorów w tkance nowotworowej jest istotnie podwyższony w porównaniu z tkankami prawidłowymi, z których się one wywodzą [48].

Szczególną rolę układ GABA-ergiczny odgrywa w tkance gruczołu piersiowego, gdzie jak się wydaje poprzez wpływ na gospodarkę hormonalną pełni istotną rolę w regulacji proliferacji komórkowej, a tym samym w powstawaniu i rozwoju raka piersi. Obecność GABA i GAD stwierdzono zarówno w tkance prawidłowej jak i w zmianach łagodnych i złośliwych gruczołu piersiowego kobiet [45]. Przy czym zawartość GABA i aktywność GAD w tkance nowotworowej okazały się istotnie wyższe w porównaniu zarówno ze zmianami łagodnymi jak i prawidłową tkanką gruczołu piersiowego [32].

Przeprowadzone badania w grupie 54 chorych leczonych operacyjnie z powodu raka gruczołu piersiowego potwierdziły obecność GABA i aktywność GAD zarówno w guzie jak i w makroskopowo niezmiennionej tkance gruczołu piersiowego. Średnia zawartość GABA w badanych tkankach wynosiła odpowiednio 57,7 $\mu\text{g}/\text{lg}$ i 28,1 $\mu\text{g}/\text{lg}$, a średnia aktywność GAD 244,6 $\mu\text{g}/\text{lg}/\text{lh}$ i 115,6 $\mu\text{g}/\text{lg}/\text{lh}$. Stwierdzono również, że zarówno zawartość GABA jak i aktywność GAD w komórkach raka były istotnie wyższe ($p < 0,05$) w porównaniu z prawidłową tkanką gruczołu piersiowego. Podwyższone wartości GABA w guzie, w stosunku do otaczającej go tkanki prawidłowej, opisał także Badyopadhyay i wsp. w rakach: piersi, odbytnicy, jajnika, szyjki i trzonu macicy [48]. Wyniki badań własnych wykazały wysoce istotną statystycznie dodatnią korelację pomiędzy zawartością GABA a aktywnością GAD zarówno w komórkach raka jak i tkance makroskopowo niezmiennionej gruczołu piersiowego. Współczynniki korelacji pomiędzy GABA a GAD w badanych tkankach wynosiły odpowiednio $r = 0,58$ ($p < 0,05$) i $r = 0,51$ ($p < 0,05$).

Stwierdzenie obecności GABA w tkance nowotworowej i makroskopowo niezmiennionej gruczołu piersiowego, której towarzyszy odpowiednio wysoka aktywność GAD, kluczowego enzymu biorącego udział w jego syntezie, świadczy o tym, że GABA jest syntetyzowany bezpośrednio w badanych tkankach, a nie pozostaje tylko substratem w przemianie materii. Nie można wykluczyć, że wzrost stężenia GABA w guzie w porównaniu

Cancer cell hypoxia was found in experimental animals [53]. Some authors demonstrated that a significant group of cancer cells is in hypoxia state. Many observations confirm this phenomenon. Venous blood partial pressure in tumors is usually lower than blood pressure in normal tissues, what is confirmed by observation of glycolysis in tumors [50]. In many cancer cases histological features of necrosis were found. Moreover, pO_2 level measured with oxygen electrode was lower in tumors than in normal tissues [51, 52], and in hypoxia sites in tumor tissues small and inefficient (sinusoid) blood vessels were found [61]. The rate and the number of hypoxic cells are proportional to the size of the tumor. Consequently, if the only reason of increased GABA concentration in cancer tissue was tumor cells hypoxia, we should expect positive correlation between GABA concentration, GAD activity and tumor size.

In contrast to other authors [44] our study did not confirm any significant correlation between GABA concentration ($p=0,78$) and GAD activity ($p = 0,34$) and breast tumor size (T). Similarly, in macroscopically unchanged tissue obtained from tumor surroundings no statistically significant correlation between GABA and GAD values were found ($p = 0,19$ and $p = 0,09$ respectively).

Interestingly, we demonstrated that tumor size determines presence or lack of correlation between GABA and GAD. While we were looking for correlation between GABA and GAD with reference to T parameter, we calculated correlation coefficient in the following groups: T1, T2 and T3 + T4. We did not observe any correlation between GABA and GAD in small tumors (diameter less than 2 cm). No correlation was found in macroscopically unchanged breast tissue surrounding the tumor.

Lack of correlation between GABA concentration and GAD activity in these tumors can be caused by better oxygenation of tissue. The phenomenon can be driven by higher GABA-T activity in GABA metabolism. Indeed, main GABA-degrading enzyme is active only in the presence of oxygen [44]. In extensive tumors (T2, T3 + T4), larger than 2 cm in diameter, GABA and GAD values were correlated significantly. Correlation coefficients between GABA and GAD for T2 and T3+T4 tumors were $r = 0,65$ ($p < 0,05$) and $r = 0,83$ ($p < 0,05$) respectively, while for the surrounding, normal breast tissue $r = 0,48$ ($p < 0,05$) and $r = 0,81$ ($p < 0,05$) respectively.

z tkanką prawidłową gruczołu piersiowego może być powodowany hipoksją, która często towarzyszy tkance nowotworowej. Hipoksja wpływa na aktywność działającej w warunkach tlenowych transaminazy GABA-T, odpowiedzialnej za rozkład GABA [44].

Hipoksję komórek nowotworowych wykazano u zwierząt eksperymentalnych przy użyciu różnych metod [53]. Ustalono, że część komórek w guzach nowotworowych zwierząt doświadczalnych znajduje się w stanie hipoksji. Liczne spostrzeżenia potwierdzają to zjawisko. Ciśnienie parcjale krwi żyłnej w nowotworach jest zwykle niższe niż ciśnienie krwi w tkankach prawidłowych, co potwierdza występowanie procesu glikolizy beztlenowej w guzach [50]. W wielu guzach nowotworowych stwierdzano histologicznie istnienie martwicy. Wykazano również, że poziom pO_2 mierzony elektrodami tlenowymi jest niższy w guzach niż w tkankach prawidłowych [51, 52], a w obszarach hipoksji w nowotworach stwierdzono obecność rzadkich i niewydolnych (sinusoidalnych) naczyń krwionośnych [61]. Wiadomo, że stopień i ilość niedotlenowanych komórek są proporcjonalne do wielkości guza nowotworowego. Zatem gdyby jedynym powodem podwyższonej zawartości GABA w tkance nowotworowej miała być hipoksja komórek nowotworowych, można byłoby oczekiwać dodatniej korelacji pomiędzy zawartością GABA i aktywnością GAD a wielkością guza nowotworowego.

W przeciwieństwie do innych autorów [44] badania własne nie potwierdziły istotnej zależności wartości GABA ($p=0,78$) i GAD ($p = 0,34$) od wielkości guza piersi (T). Podobnie w tkance makroskopowo niezmięnionej pobranej z otoczenia guza zależności wartości GABA i GAD od wielkości guza nie były istotne statystycznie ($p = 0,19$ i $p = 0,09$).

Natomiast okazało się, że wielkość guza determinuje obecność lub brak korelacji pomiędzy GABA i GAD. W poszukiwaniu zależności pomiędzy GABA a GAD w odniesieniu do cechy T, obliczono współczynniki korelacji w grupach: T1, T2 oraz T3 + T4. Stwierdzono brak korelacji między GABA a GAD w guzach małych o średnicy nie przekraczającej 2 cm. Korelacji również nie stwierdzono w tkance makroskopowo niezmięnionej otaczającej te zmiany.

Brak korelacji między zawartością GABA i aktywnością GAD w tych guzach może być powodowany lepszym ich utlenowaniem. Powodem może być większy udział w metabolizmie GABA aminotransferazy aminomaślanej (GABA-T). Bowiem GABA-T, główny enzym rozkładający GABA działa w obecności tlenu [44]. Natomiast okazało się, że w guzach większych (T2, T3 + T4) o średnicy powyżej 2 cm. wartości GABA i GAD były ze sobą istotnie skorelowane. Współczynniki korelacji między GABA a GAD dla guzów T2 i T3+T4 wynosiły odpowiednio $r = 0,65$ ($p < 0,05$) i $r = 0,83$ ($p < 0,05$), a dla otaczającej je tkanki makroskopowo niezmięnionej $r = 0,48$ ($p < 0,05$) i $r = 0,81$ ($p < 0,05$).

Kolejną opisywaną w literaturze przyczyną wzrostu stężenia GABA w tkance nowotworowej jest aktywacja

The other reason of GABA concentration increase in cancer tissue described in literature is glutamic (stimulating) system activation in hypoxia. It is broadly known, that in dynamic equilibrium between both systems, glutaminergic and GABAergic, the increase in stimulating amino acid lead to GABA concentration increase. Hypoxia caused by tumor development, because of increased stimulating amino acid biosynthesis, leads to GABA concentration increase in cancer tissue [32, 44]. On the other hand, GABA concentration increase can be caused by cell reaction for malignant processes and protect it from cancer development as Zhang et al. described that in liver cancer GABA-ergic system is able to inhibit cell proliferation rate [54].

While breast tumor is growing larger and larger its malignancy, described as metastases formation in regional lymph nodes, increases. In tumors in T1 and T2 groups the probability of metastases formation in lymph nodes is 30% and 50% respectively, while in larger tumors (diameter more than 5 cm) (T3) it reaches up to 70% [55, 56].

In our study, regional lymph nodes metastases were present in 17 cases (31%) from 54 examined women.

Interestingly, mean GABA and GAD values in tumor tissue in women with axillary lymph nodes metastases were 80,0 mg/1g and 270,6 mg/1g/1h respectively and were higher than in women without metastases in lymph nodes, where mean GABA and GAD values reached 47,5 mg/1g and 232,7 mg/1g/1h respectively. The difference was statistically significant only for GABA concentration ($p < 0,05$).

It is a well known fact that neurotransmitters and chemokines induce cancer cells migration to blood and lymphatic vessels that promote dissemination of cancer cell to chemokine and neurotransmitters producing sites, especially to some selected internal organs. One of such neurotransmitters, which play a key role in breast cancer development, is norepinephrine. It was shown that it is able to activate breast cancer cells and colon cancer cells. Knowing that, we cannot eliminate the hypothesis, that GABA concentration can be only one marker of metastases development and, what is tightly connected, malignancy rate of the tumor. High GABA concentrations can correlate with poor prognosis. On the other hand, it was proven that GABA is able to inhibit norepinephrine-induced breast cancer and colon cancer cells migration [57, 58].

In the examined population age of patients ranged from 37 to 85 years. Mean age was 59,7 years, while median 58,0 years. More than 50% of patients consisted of women between 41 and 50 or 71 and 80 years old. GABA concentration in women before and after 50 years old was almost identical and reached 58,9 mg/1g and 57,2 mg/1g respectively; while GAD activity was 213,8 mg/1g/1h and 260,0 mg/1g/1h. Moreover, no such correlation between GABA and GAD were found in macroscopically unchanged tissues.

w niedotlenieniu układu glutaminergicznego (pobudzającego). Wiadomo, bowiem, że przy istniejącej równowadze dynamicznej między oboma układami, glutaminergicznym i GABA-ergicznym, wzrostowi stężenia aminokwasów pobudzających towarzyszy wzrost stężenia GABA. Spowodowana rozwojem nowotworu hipoksja, poprzez zwiększoną syntezę aminokwasów pobudzających prowadzi do zwiększenia stężenia GABA w tkance guza [32, 44]. Z drugiej zaś strony wzrost zawartości GABA może być reakcją komórki na proces nowotworowy i czynnikiem chroniącym przed rozwojem nowotworu, bowiem Zhang w badaniu na tkance raka wątroby wykazał, że poprzez układ GABA - ergiczny dochodzi do hamowania proliferacji komórkowej [54].

Wraz ze zwiększającą się wielkością guza piersi wzrasta jego złośliwość objawiająca się między innymi możliwością wystąpienia przerzutów nowotworowych w regionalnych węzłach chłonnych. Ocenia się, że w guzach T1 i T2 prawdopodobieństwo przerzutów do węzłów chłonnych wynosi odpowiednio 30% i 50%. Zaś dla guzów o średnicy powyżej 5 cm (T3) wzrasta aż do 70% [55, 56].

W przeprowadzonym badaniu obecność przerzutów raka piersi do regionalnych węzłów chłonnych rozpoznano u 17 (31%) spośród 54 objętych badaniem chorych.

Okazało się, że średnie wartości GABA i GAD w badanej tkance guza wśród kobiet, u których rozpoznano przerzuty w węzłach pachowych wynosiły odpowiednio 80,0 mg/1g i 270,6 mg/1g/1h i były wyższe aniżeli wśród kobiet bez przerzutów w węzłach chłonnych, u których średnie wartości GABA wynosiły 47,5 mg/1g, a GAD 232,7 mg/1g/1h. Dla GABA, co należy podkreślić różnica okazała się istotna statystycznie ($p < 0,05$).

Wiadomo, że neurotransmitery i chemokiny indukują migrację komórek nowotworu do naczyń krwionośnych i chłonnych, co sprzyja rozsiewowi tych komórek do miejsc tworzenia chemokin i neurotransmiterów, często do wyselekcjonowanych narządów. Jednym z neurotransmiterów, który odgrywa największą rolę w rozwoju raka piersi jest norepinefryna. Wykazano, że aktywuje ona migrację komórek raka piersi i jelita grubego. Nie można, zatem wykluczyć, że poziom GABA może być jednym z wykładników możliwości przerzutowania guza, a co za tym idzie złośliwości nowotworu. Wysokie jego wartości mogą wiązać się z gorszym rokowaniem. Z drugiej zaś strony udowodniono, że GABA hamuje wydudowaną norepinefryną migrację komórek raka piersi i jelita grubego [57, 58].

W grupie chorych objętych badaniem, wiek wahał się od 37 do 85 lat. Średnia wieku wynosiła 59,7 lat, a mediana 58,0 lat. Ponad połowę chorych stanowiły kobiety pomiędzy 41 a 50 oraz 71 a 80 rokiem życia. Zawartość GABA, u kobiet przed i po 50 roku życia była prawie identyczna i wynosiła odpowiednio 58,9mg/1g i 57,2 mg/1g natomiast aktywność GAD 213,8 mg/1g/1h i 260,0 mg/1g/1h. Również nie stwierdzono takich zależności dla wartości GABA i GAD w tkance makroskopowo niezmiennionej.

Our study results confirmed observations of other authors concerning dynamic equilibrium between GABA content and GAD activity in both tumor and macroscopically unchanged breast tissue. Correlation coefficient between GABA and GAD in examined tissues were $r = 0,58$ ($p < 0,05$) and $r = 0,51$ ($p < 0,05$) respectively.

Although lot of research was performed on the topic, the process of initiation and development of breast cancer is still unclear. Nowadays, many factors taking part in development of breast cancer are known, but GABAergic system influence on that issue seems extremely interesting for us.

CONCLUSIONS

1. We confirmed significantly increased GABA concentration and GAD activity in cancer tissue in comparison to macroscopically unchanged breast tissue.
2. We found correlation between GABA concentration and GAD activity and axillary lymph nodes involvement. GABA concentration in tumor tissue in patients with metastases was significantly higher than in patients without metastases.

Wyniki badań własnych potwierdziły doniesienia innych autorów dotyczące istnienia dynamicznej równowagi pomiędzy zawartością GABA a aktywnością GAD zarówno w guzie jak i tkance makroskopowo niezmienionej gruczołu piersiowego. Współczynniki korelacji między GABA a GAD w badanych tkankach wynosiły odpowiednio $r = 0,58$ ($p < 0,05$) i $r = 0,51$ ($p < 0,05$).

Mimo dotychczasowych badań, nadal niejasny jest proces inicjacji i rozwoju procesu nowotworowego. Wśród wielu poznanych czynników mających wpływ na powstawanie i rozwój raka piersi niezmiennie interesująca wydaje się rola układu GABA-ergicznego [44].

WNIOSKI

1. Potwierdzono istotnie wyższą zawartość GABA i aktywność GAD w tkance nowotworowej w porównaniu z makroskopowo niezmienioną tkanką gruczołu piersiowego.
2. Stwierdzono korelację pomiędzy zawartością GABA i aktywnością GAD a stanem pachowych węzłów chłonnych. Zawartość GABA w tkance guza wśród chorych z przerzutami w węzłach chłonnych była istotnie wyższa aniżeli wśród chorych bez przerzutów.

References/Piśmiennictwo:

1. Parkin DM., Bray F, Ferlay J, Pisani P: Dane statystyczne dotyczące nowotworów złośliwych na świecie w 2002 r. *Onkologia po dyplomie* 2005, 2, 3, 7-44.
2. Didkowska J, Wojciechowska U, Tarkowski W, Zatoński W: Nowotwory złośliwe w Polsce w 2000 roku. Krajowy rejestr nowotworów, Warszawa 2003.
3. Wojciechowska U, Didkowska J, Tarkowski W, Zatoński W: Nowotwory złośliwe w Polsce w 2004 roku. Cancer in Poland in 2004. Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie Warszawa 2006
4. Zatoński W, Tyczyński J, red.: Epidemiologia nowotworów złośliwych w Polsce w piętnastolecie 1980-1994. Warszawa, 1997.
5. Black DM: The genetics of breast cancer. *Eur J Cancer* 1994, 30A, 1957
6. Owe GR, Hirokata T, Hishop G et al.: Dietary factors and risk of breast cancer : combined analysis of 12 case-control studies. *J Natl Cancer Inst* 1990, 82, 56.
7. McPherson K, Steel CM, Dixon JM: Breast cancer epidemiology, risk factors and genetics. *BMJ* 1994, 309, 1003.
8. Assai SY, Fan S, Iversen LL et al.: Continuous measurement of the release of endogenous aminobutyric acid from transverse slices of rat hippocampus. *J Physiol* 1980, 4P, 308-311.
9. Curtis DR, Johnston GA: Amino acid transmitters in the mammalian central nervous system. *Ergeb Physiol* 1974, 64, 98-103.
10. Erdö SL, Wolff JR: g-Aminobutyric acid in the mammalian brain. *J Neurochem* 1990, 54, 368-372.
11. Iadarola JM, Gale K: Substantia Nigra: site of anticonvulsant activity mediated by gamma-aminobutyric acid. *Science* 1982, 218, 1237-1240.
12. McGeer PL, Eccles JC, McGeer EG: Synaptic transmission in the central nervous system. W McGeer PL, Eccles JC, McGeer EG (red.): *Molecular Neurobiology of the Mammalian Brain*. New York and London: Plenum Press, 1987, 109-147.
13. Tanaka C: g-Aminobutyric acid in peripheral tissues. *Life Sci* 1985, 37, 2221-2235.
14. Cooper IR, Bloom FE, Roth RH: g-Aminobutyric acid, glycine, and glutamic acid. The biochemical basis of neuropharmacology. London, Toronto, New York, Oxford University Press, 1970, 165.
15. Guidotti A, Corda MG, Wise BC et al.: GABA-ergic synapses, supramolecular organization and biochemical regulation. *Neuropharmacol*, 1983, 22, 1471-1479.
16. Sieghart W: Multiplicity of GABA-A benzodiazepine receptors. *TIPS* 1989, 10, 407-411.
17. Squires RF: Introduction. In *GABA and Benzodiazepine Receptors*. Vol.1. Florida: CRC Press Inc., 1988, 3-5.
18. Roberts E, Frankel S: Further studies of glutamic acid decarboxylase in brain. *J Biol Chem*, 1951, 190, 505-512.
19. Roberts E, Frankel S: Glutamic acid decarboxylase in brain. *J Biol Chem*, 1951, 188, 789-795.
20. Roberts E, Frankel S: γ -Aminobutyric acid in brains its formation from glutamic acid. *J Biol Chem*, 1950, 187, 55-63.
21. Alford S, Grr S: The involvement of GABA-B receptors and coupled G-proteins in spinal GABA-ergics presynaptic inhibition. *J Neurosci* 1991, 11, 3718-3726.
22. Bowers NG, Hill RD, Hudson AL et al.: GABA-B receptors. In *Squires RF (red.): GABA and Benzodiazepine Receptors*. Vol.1. Florida: CRC Press Inc., 1988, 107-122.
23. Bowers NG: GABA-B receptors and their significance in mammalian pharmacology. *TIPS* 1989, 10, 401-407.
24. Zezula J, Fuchs K, Sieghart W: Separation of $\bar{U}$ -1, $\bar{U}$ -2 and $\bar{U}$ -3 subunit of the GABA-A-benzodiazepine receptor complex by immunoaffinity chromatography. *Brain Res* 1991, 563, 325-328.

25. Pine MJ, Kim U, Ip C: Free amino acid pools of rodent mammary tumors. *J Natl Cancer Inst* 1982, 69, 729-735.
26. Tong Y, Rheume E, Simard J et al.: Localization of peripheral benzodiazepine binding sites and diazepam-binding inhibitor (DBI)mRNA in mammary glands and dimethylbenz(a)anthracene (DMBA)-induced mammary tumors in the rat. *Regul Pept* 1991, 33, 263-273.
27. Jussofie A, Reinhard V, Kallf R: GABA binding sites: their density, their affinity to muscimol and their behaviour against neuroactive steroids in human gliomas of different degrees of malignancy. *J Neural Transm Gen Sect* 1994, 96, 233-241.
28. Batra S, Alenfall J: Characterization of peripheral benzodiazepine receptors in rat prostatic adenocarcinoma. *Prostate* 1994, 24, 269-278.
29. Kleinrok Z, Matuszek M, Matuszek B i wsp.: GABA kontent and GAD activity In colon tumors taken from patients with colon cancer or from xenografted human colon cancer cells growing as s.c. tumors in athymic nu/nu mice. *J Physiol Pharmacol* 1998.
30. Matuszek M, Jesipowicz M, Kleinrok Z: GABA kontent and GAD activity In gastric cancer. *Med Sci Monit* 2001, 7, 377-381.
31. Mazurkiewicz M, Opolski A, Wietrzyk J i wsp.: GABA level and activity in humane and mouse normal and neoplastic mammary gland. *J Exp Clin Cancer Res* 1999, 18, 247-253.
32. Opolski A, Mazurkiewicz M, Wietrzyk J, i wsp.: The role of GABA-ergic system in human mammary gland pathology and In growth of transplantable murine mammary cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2000, 19, 383-390.
33. Lowe JP, Robins E, Eyerma GS: The fluorimetric measurement of glutaminic decarboxylase and distribution in brain. *J Neurochem* 1958, 3, 8-18.
34. Sutton J, Simmonds MA: Effects of acute and chronic pentobarbitone on the α -aminobutyric acid system in rat brain. *Bioch Pharmacol* 1974, 23, 1801-1808.
35. Davanger S, Ottersen OP, Strom-Mathisen J: GABA immunoreactive cells in rat gastrointestinal epithelium. *Anat. Embryol* 1989, 179, 221-226.
36. Gerber JC, Hare TA: GABA in peripheral tissues, presence, and action in endocrine pancreatic function. *Brain Res Bull* 1980, 5, 341-346.
37. Martin del Rio R, Latorre Caballero A: Presence of gamma-aminobutyric acid in rat ovary. *J Neurochem* 1980, 34, 1584-1586.
38. Tillakavante NJ, Erlander MG, Collard MW et al.: Glutamate decarboxylase in non neural cells of rat testis and oviduct: differential expression of GAD 65 and GAD 67. *J Neurochem* 1992, 58, 618-627. 152
39. Akema T, Kimura F: Differential effects of GABA-A and GABA-B receptor agonists on NMDA-induced and noradrenaline-induced luteinizing hormone release in the ovariectomized estrogen-promoted rat. *Neuroendocrinology* 1993, 57, 28-33.
40. Celotti F, Apud JA, Rovescalli AC et al.: Possible involvement of ovarian mechanisms other than estrogen-progesterone secretion in the regulation of glutamic acid decarboxylase activity of the rat fallopian tubes. *Endocrinology* 1987, 120, 700-706.
41. Jarry H, Leonhardt S, Wuttke W: The inhibitory effect of beta-endorphin on LH release in ovariectomized rats does not involve the preoptic GABAergic system. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1995, 103, 317-323.
42. Kataoka Y, Gutman Y, Guidotti A: Intrinsic GABA-ergic system of adrenal chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci* 1984, 81, 3218-3222.
43. Makinen M, Ahee L, Rosenquist K et al.: Effects of intraventricular taurine, homotaurine and GABA on serum prolactin and thyrotropin levels in female and male rats. *J Neural Transm Gen Sect* 1993, 94, 155-163.
44. Mazurkiewicz M, Kleinrok Z: Zawartość GABA i aktywność GAD w tkance gruczołu piersiowego w zależności od wieku kobiet, rodzaju rozpoznania mikroskopowego i stopnia złośliwości histologicznej (G) nowotworu. *Nowotwory* 1999, 4, 398-403.
45. Miguez I, Aldegunde MA: Effect of gamma-aminobutyric acid on corticosterone secretion: involvement of the noradrenergic system. *Life Sci* 1990, 46, 875-880.
46. Rage F, Jalaguiere S, Rougeot C et al.: GABA inhibition of somatostatin gene expression in cultured hypothalamic neurons. *Neuroreport* 1993, 4, 320-322.
47. Venturini I, Alho H, Podkietkova I i wsp.: Increased expression of peripheral benzodiazepine receptors and diazepam inhibitor in human tumors sited in the liver. *Life Sci* 1999; 65 (21):2223-31.
48. Bandyopadhyay M, Changa R, Ganguly A i wsp.: Putrescine GABA profile in human breast, rectal, ovarian, cervical, and endometrial carcinoma. *Medical Science Research* 1999; 27(1):49-51.
49. Withers HR: Biologiczne podstawy radioterapii. Znaczenie hipoksji w radioterapii klinicznej. Kraków: Instytut Fizyki Jądrowej, 1991: 82-3.
50. Wittliff JL: Steroid-hormone receptors in breast cancer. *Cancer* 1984; 53: 630-6.
51. Yamasaki K, Goto Y: Direct evidence for central action of baclofen to stimulate gastric acid secretion by intracisternal inspection. *Jap J Pharmacol* 1990; 54: 7-12.
52. Yanagimachi R: In vitro capacitation of golden hamster spermatozoa by homologous blood sera. *J Reprod Fertil* 1970; 3: 147-53.
53. Zatoński WA: Nowotwory złośliwe w Polsce. Warszawa: Centrum Onkologii, 1993.
54. Zhang M, Gong Y, Minuk GY: Increased GABAergic activity inhibits alpha-fetoprotein mRNA expression and the proliferative activity of the HepG2 human hepatocellular carcinoma cell line. *J Hepatol* 2000; 32(1):85-91.
55. van der Waal BC, Butzelaar RM, van der Meij i wsp.: Axillary lymph node ratio and total number of removed lymph nodes: predictors of survival in stages I and II breast cancer. *Eur J Surg Oncol* 2002, 28(5): 481-489.
56. Veronesi U, Goldhirsh A, Yarnold J: Breast cancer. w: Peckham M, Pinedo HM, Veronesi U (red.): Oxford textbook of oncology. Oxford University Press, Oxford, 1995, 1243
57. Joseph J, Niggemann B, Zaenker KS i wsp.: The neurotransmitter gamma-aminobutyric acid is an inhibitory regulator for the migration of SW 480 colon carcinoma cells. *Cancer Res* 2002; 62:6467-9.
58. Ortega A: A new role for GABA: inhibition of tumor cell migration. *Trends Pharmacol Sci* 2003; 24:151-4.