

BELİRGİN İNTRADUKTAL KOMPONENT İÇEREN İNVAZİV DUKTAL MEME KARSİNOMLARINDA İMMÜNHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLE ARAŞTIRILAN KATEPSİN D, SİKLIN D1 VE TİMİDİN KİNAZ 1 EKSPRESYONUNUN PROGNOSTİK ÖNEMİ

Güldal YILMAZ¹, Pınar GEYİK², Ömer ULUOĞLU¹

ÖZ

Amaç: Belirgin intraduktal komponent içeren invaziv duktal meme karsinomlarında katepsin D (KD), timidin kinaz I (TK1) ve siklin D1 (SD1) ekspresyonunun immünhistokimyasal yöntemle araştırılması ve prognostik öneminin belirlenmesi.

Gereç ve Yöntemler: 70 olguya ait Hematoksilen-Eozin boyalı preparatlar retrospektif olarak değerlendirildi. Klinik bilgilere hasta takip dosyalarından ve hastalarla temasa geçilerek ulaşıldı. İnvaziv tümör komponentinin histopatolojik derecelendirmesinde Bloom-Richardson derecelendirmesinin Nottingham modifikasyonu kullanıldı. Evrelemede American Joint Committee on Cancer tarafından önerilen sistem kullanıldı. İstatistiksel incelemede Pearson Ki-kare, Likelihood ratio, Fisher's exact testleri ve Kaplan-Meier yaşam çözümlemesi yöntemleri kullanıldı ve p<0.05 istatistiksel anlamlılık değeri olarak kabul edildi. Bulgular: KD ile tümörün intraduktal komponentinde, invaziv komponentine göre daha yüksek oranda pozitif boyanma saptandı. İnvaziv tümör derecelerindeki artış ile reaktif stromal hücrelerdeki KD ekspresyonu arasında korrelasyon izlendi. Tümör dışı alanlarda KD, TK1 ve SD1 ekspresyonu olmaması ya da yetersiz olması istatistiksel olarak anlamlı bulundu. İleri evre olgularda intraduktal komponentte ve/veya derece 3/3 invaziv tümör komponentinde SD1 ile en düşük ekspresyon saptandı SD1 ekspresyonu gösteren olguların tümünün hayatta olması nedeniyle, yığılımlı sağkalım süresi açısından anlamlı fark saptandı.

Sonuç: KD, TK1 ve SD1 antikorlarının meme lezyonlarının malign karakterini ortaya koymada yardımcı olabilecekları düşünüldü. İnaduktal komponentte ya da reaktif stromal hücrelerde KD ekspresyonunun varlığı, tümör hücrelerinin invaziv potansiyel kazanabileceğini göstermesi açısından önemli bulundu. SD1 ekspresyonunun iyi prognoz göstergesi olabileceği ve daha iyi yaşam süreleri ile ilişkili olduğu saptandı.

Anahtar Kelimeler: Meme Kanseri, Katepsin D, Siklin D1, Timidin Kinaz.

PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF IMMUNOHISTOCHEMICAL EXPRESSION OF CATHEPSIN D, CYCLIN D1, AND THYMIDINE KINASE 1 IN INVASIVE DUCTAL BREAST CARCINOMAS WITH A PREDOMINANT INTRADUCTAL COMPONENT

ABSTRACT

Aim: To evaluate the expression of cathepsin D (CD), thymidine kinase 1 (TK1), and cyclin D1 (CycD1) in invasive ductal breast carcinomas with a predominant intraductal component and to determine their prognostic value.

Materials and Methods: The examination of slides stained with Haematoxylin-Eosin of 70 patients was performed retrospectively, and clinical and prognostic data were obtained. The histopathological grading of the invasive tumour component was done using the Nottingham modification of the Bloom-Richardson grading system, and staging by using the system proposed by the American Joint Committee on Cancer. Pearson's chi-square, Likelihood ratio, Fisher's exact tests, and Kaplan-Meier survival analysis were used as statistical tests and the significance of observed differences was set at p<0.05. Results: The intraductal component showed a higher degree of staining for CD than the invasive tumour component. A correlation was found between the CD expression and the reactive stromal cells and also the increasing degrees of invasive tumour. The negativity or weak expression for CD, TK1, and CycD1 in non-tumoural areas was found to be significant. CycD1 expression is found to be lower in advanced and/or high grade carcinomas and is found to be related to better survival rates in patients with invasive ductal carcinoma.

Conclusion: The finding of significantly higher expressions of CD, TK1, and CycD1 in the tumour component compared to the non-tumoural areas raised the possibility of the use of all three antibodies in determining the malign character of breast lesions. CD expression in the intraductal component or in the reactive stromal cells may be used as an indicator of the invasive potential of the tumoural lesion. CycD1 expression may be related to a better prognosis.

Key Words: Breast Carcinoma, Eatepsin D, Cyclin D1, Thymidine Kinase.

GİRİŞ

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser türü olup, kadınlardaki kanser ölümlerinin başında gelen nedenlerdendir.¹ Mortalite oranının yüksek olması ve görülme sıklığının artması nedeniyle meme kanserinin erken tanı ve tedavisine olanak sağlayacak genetik ve moleküler çalışmalar da hız kazanmıştır.²⁻³ Son yıllarda önem kazanan modern adjuvan tedavi stratejileri arasında kemoterapötik ajanlar, hormon tedavisi, immunoterapi ajanları (ekzojen sitokinler, aşılarda ve monoklonal antikorlar) ve deneysel ajanlar yer almaktadır.⁴⁻⁵ Katepsin D (KD), asidik pH'ta lizozomlar içinde matür aktif enzim şeklinde rol oynayan; kanser hücreleri, stromal reaktif hücreler ve makrofajlar tarafından sentezlenen lizozomal aspartil proteazdır.⁶⁻⁷ Timidin kinaz (TK), proliferen olan normal ve malign hücrelerde sitozolik ve mitokondriyal olmak üzere iki farklı izoenzim formunda bulunmaktadır.⁸⁻¹⁰ Sitosolik TK (TK1), DNA metabolizmasında pirimidin sentezindeki tek basamaklı kurtarma (*salvage*) yolunda rol oynamaktadır.¹¹ Siklin D1 (SD1), 36kDa ağırlığında, siklin bağımlı kinazlar cdk4 ve cdk6 ile aktif enzim kompleksleri oluşturarak¹² hücre siklusunun G1 fazından S fazına ilerlemesini düzenleyen, G1 siklinler ailesine ait nükleer bir proteindir.¹³⁻¹⁴ İnaduktal komponenti, invaziv tümör komponentinin en az dört katından daha fazla olan meme kanserlerinin diğer invaziv meme karsinomlarından daha iyi prognoz gösterdiğinin belirlenmesi üzerine, bu grup tümörler belirgin intraduktal karsinom (İDK) komponent içeren invaziv duktal karsinomlar olarak diğer tümörlerden ayrı tutulmaktadır.¹⁵ Bu çalışmanın amacı, belirgin intraduktal komponent içeren invaziv duktal karsinomlarda histopatolojik bulguları ışık mikroskopik düzeyde yeniden gözden geçirmek ve immünhistokimyasal olarak KD, TK1 ve SD1 antikor ekspresyonlarının klinikopatolojik parametreler ile ilişkisini ortaya koymaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Belirgin intraduktal komponent içeren invaziv duktal karsinom tanısı verilmiş 70 olgu retrospektif olarak değerlendirildi. Olguların takip süresi 12 ila 81 ay arasında değişmekte idi. Olgular ile ilgili bilgilere hastaların patoloji raporlarından, klinik takip dosyalarından ve hastalarla temasa geçilerek büyük oranda ulaşıldı.

İşık Mikroskopik İnceleme

Olgulara ait Hematoksilen-Eozin (HE) boyalı preparatlar yeniden incelendi. Belirgin intraduktal komponent içeren invaziv duktal karsinom tanısı verilmiş olguların invaziv tümörlerinin histopatolojik derecelendirmesinde 1957 yılında Bloom ve Richardson tarafından önerilen, 1991 yılında ise Elston tarafından modifiye edilen Bloom-Richardson derecelendirmesinin Nottingham modifikasyonu kullanıldı.¹⁶ Bu derecelendirme sistemine göre tümörlerde tübül formasyonu, nükleer pleomorfizm ve mitoz sayısı

¹Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, Beşevler, Ankara

²Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı, Sıhhiye - ANKARA

göz önüne alınarak puanlama yapıldı. Toplam skor ile derece belirlendi. 1992 yılında meme kanseri için American Joint Committee on Cancer tarafından önerilen evreleme sistemine göre, tümör boyutu mikroskobik olarak ölçüldü; aksiller lenf nodu ve uzak metastaz durumu belirlendi. Materyallerin 20'si modifiye radikal mastektomi, 4'ü lampektomi, 3'ü tru-cut biyopsi ve 43'ü eksizyonel biyopsi idi.

İmmünohistokimyasal İnceleme

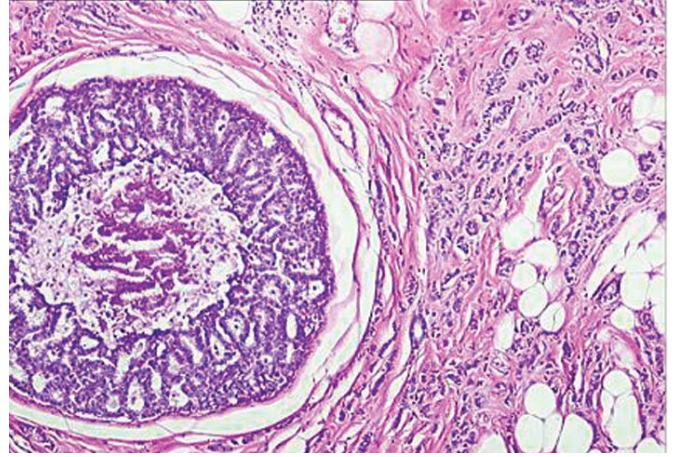
KD antikorunu IgG2b sınıfına, TK1 antikorunu IgG1 sınıfına ve SD1 antikorunu IgG2a sınıfına ait olup, her üç antikor da monoklonal idi. Antikorlar kullanılmadan önce PBS ile dilüe edildi. Biotinlenmiş bağlayıcı (sekonder) antikor, streptavidin-biotin kompleksi ve kromojen olarak kullanılan aminoetil karbazol (AEC) ticari olarak kullanıma hazır kitler şeklinde idi. Çalışmaya dahil olan tüm dokular %10'luk formalin solüsyonu ile tespit edilmişti. Olguların HE boyalı preparatlarından seçilen parafin bloklardan KD, TK1 ve SD1 ekspresyonlarını belirlemek amacıyla kesitler hazırlandı. İmmünohistokimyasal boyama streptavidin-biotin üçlü indirekt immünperoksidaz yöntemi kullanılarak yapıldı. Pozitif doku kontrolü olarak KD için karaciğer dokusu, TK1 için adenokarsinom tanısı verilmiş mide dokusu ve SD1 için 'mantle' zon lenfoma tanısı verilmiş barsak dokusu kullanıldı. Her üç antikor için de, ışık mikroskobunda en yoğun boyanan alanlarda 40x büyütmede 100 hücre sayıldı. 100 hücre içinden nükleer pozitiflik gösteren tümör hücreleri sayıldı ve boyanan nükleuslar yüzde olarak belirtildi. KD ekspresyonu için hücrelerdeki ince granüler sitoplazmik boyanma pozitif olarak kabul edildi. Reaktif stromal hücre/makrofaj sitoplazmalarındaki boyanma ayrıca değerlendirildi. Doku kesitlerinde hücrelerde hiç boyanma yoksa 0, <%10 hücrede boyanma 1+, %10-50 hücrede boyanma 2+ ve >%50 hücrede boyanma 3+ olarak değerlendirildi.¹⁷ TK1 ekspresyonu için hücrelerdeki diffüz sitoplazmik boyanma pozitif kabul edildi. Doku kesitlerinde hücrelerde hiç boyanma yok ya da <%5 hücrede boyanma var ise 0, %5-25 hücrede boyanma 1+, %25-50 hücrede boyanma 2+ ve >%50 hücrede boyanma 3+ olarak değerlendirildi.¹⁸ SD1 ekspresyonu için yalnızca nükleer boyanma pozitif kabul edildi. Doku kesitlerinde hücrelerde hiç boyanma yok ya da %10'dan az hücrede boyanma var ise 0, %10-50 hücrede boyanma var ise 1, %50'den fazla hücrede boyanma var ise 2 olarak skorlandı.¹⁹

İstatistiksel İnceleme

İstatistiksel inceleme öncesinde, uygulanan immünohistokimyasal boyaların boyanma özellikleri, tümör boyutları, tümör evresi ve prognoz ile ilgili olarak bazı düzenleyici gruplamalar yapıldı. İstatistiksel incelemede tek değişkenli düzenlerde Ki-kare testi; bağımsız gruplarda Ki-kare (Pearson Ki-kare, Likelihood ratio, Fisher's exact test) ve Kaplan-Meier yaşam çözümlenmesi yöntemleri kullanıldı ve p<0.05 istatistiksel anlamlılık değeri olarak kabul edildi.

BULGULAR

Belirgin intraduktal komponent içeren invaziv duktal karsinom (Resim 1) olgularına ait HE boyalı preparatlar yeniden değerlendirildi. Tanı sırasındaki tümör derecesi ve evresi, gerekli kriterler gözönüne alınarak belirlendi (Tablo 1). Olgulara ait kesitlere immünohistokimyasal olarak KD, TK1 ve SD1 boyaları uygulandı.



Resim 1: Belirgin İDK komponenti içeren invaziv duktal karsinom (HE, 40x).

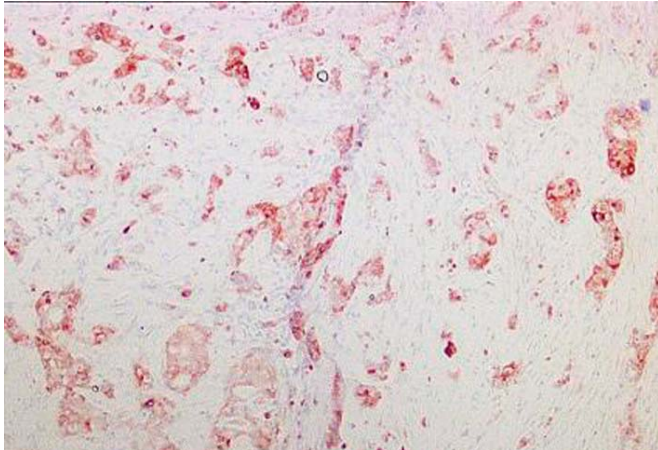
Tablo 1: Olguların klinikopatolojik özelliklerine göre dağılımı.

Olgu sayısı	70
Hasta yaşı (ortalama)	51.87 ± 10.69
<50	30 (%42.9)
≥50	40 (%57.1)
Tümör derecesi	
Derece 1/3	20 (%28.6)
Derece 2/3	22 (%31.4)
Derece 3/3	28 (40.0)
Tümör çapı	
≤2 cm	30 (%42.8)
2.1-4.9 cm	38 (%54.3)
≥5 cm	2 (%2.9)
Aksiller lenf nodu metastazı	34 (%48.6)
Evre	
I	22 (%31.4)
IIA	23 (%32.9)
IIB	18 (%25.7)
IIIA	2 (%2.9)
IIIB	4 (%5.7)
IIIC	0
IV	1 (%1.4)
Takip sonrası prognoz bilgilerine ulaşılabilen olgu sayısı	46
Lokal nüks	1 (%2.2)
Aksiller lenf nodu metastazı	1 (%2.2)
Uzak metastaz	7 (%15.2)
[Eksitus]	[3 (%6.5)]
Remisyon	37 (%80.4)

Tablo 2: Klinik evreye göre, KD'nin tümör ve tümör çevresindeki hücrelerde boyanma derecesine göre olguların dağılımı.

Belirgin intraduktal komponent içeren invaziv duktal karsinom (n:70)			KD 3+ (%)	KD 2+ (%)	KD 1+ (%)	KD 0 (%)
Evre I (n:22)	İnvaziv duktal karsinom	Derece 1/3	2 (22.2)	6 (66.7)	1 (11.1)	0
		Derece 2/3	4 (66.7)	2 (33.3)	0	0
		Derece 3/3	5 (71.4)	2 (28.6)	0	0
	IDK komponenti		17 (77.3)	5 (22.7)	0	0
	Normal TDLÜ		0	2 (9.1)	16 (72.7)	4 (18.2)
	Reaktif stromal hücreler ve histiyositler		6 (27.3)	10 (45.5)	5 (22.7)	1 (4.5)
Evre IIA (n:23)	İnvaziv duktal karsinom	Derece 1/3	5 (50.0)	5 (50.0)	0	0
		Derece 2/3	2 (28.6)	5 (71.4)	0	0
		Derece 3/3	2 (33.3)	3 (50.0)	1 (16.7)	0
	IDK komponenti		20 (87.0)	3 (13.0)	0	0
	Normal TDLÜ		0	1 (4.3)	17 (74.0)	5 (21.7)
	Reaktif stromal hücreler ve histiyositler		2 (8.8)	15 (65.2)	5 (21.7)	1 (4.3)
Evre IIB (n:18)	İnvaziv duktal karsinom	Derece 1/3	0	1 (100)	0	0
		Derece 2/3	1 (16.7)	4 (66.6)	1 (16.7)	0
		Derece 3/3	8 (72.7)	2 (18.2)	1 (9.1)	0
	IDK komponenti		14 (77.8)	4 (22.2)	0	0
	Normal TDLÜ		0	1 (5.6)	12 (66.7)	5 (27.7)
	Reaktif stromal hücreler ve histiyositler		4 (22.2)	12 (66.7)	2 (11.1)	0
Evre IIIA (n:2)	İnvaziv duktal karsinom	Derece 1/3	-	-	-	-
		Derece 2/3	1	1	0	0
		Derece 3/3	-	-	-	-
	IDK komponenti		2	0	0	0
	Normal TDLÜ		0	0	1	1
	Reaktif stromal hücreler ve histiyositler		0	2	0	0
Evre IIIB (n:4)	İnvaziv duktal karsinom	Derece 1/3	-	-	-	-
		Derece 2/3	1 (100)	0	0	0
		Derece 3/3	2 (66.7)	1 (33.3)	0	0
	IDK komponenti		3 (75.0)	1 (25.0)	0	0
	Normal TDLÜ		0	0	0	4 (100)
	Reaktif stromal hücreler ve histiyositler		1 (25.0)	2 (50.0)	1 (25.0)	0
Evre IV (n:1)	İnvaziv duktal karsinom	Derece 1/3	-	-	-	-
		Derece 2/3	-	-	-	-
		Derece 3/3	1	0	0	0
	IDK komponenti		1	0	0	0
	Normal TDLÜ		0	0	1	0
	Reaktif stromal hücreler ve histiyositler		1	0	0	0

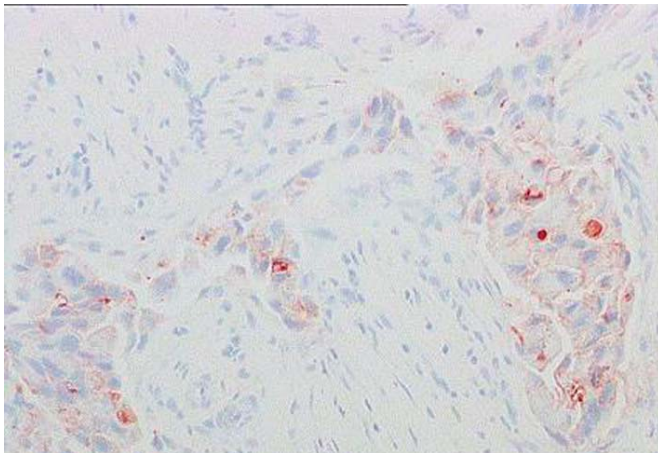
* TDLÜ: Terminal dukto-lobüler ünite.

**Resim 2:** İnvaziv duktal karsinomda sitoplazmik KD ekspresyonu (Streptavidin-biyotin peroksidaz, 100x).

KD ile, olguların tümünde hem invaziv (Resim 2) hem de intraduktal tümör komponentinde boyanma gözlemlendi. İntraduktal tümör alanlarında, invaziv komponente göre daha yüksek oranda pozitif boyanma saptandı ($p < 0.05$). İnvaziv tümör komponentinin dereceleri arasında boyanma oranları açısından anlamlı fark saptanmadı. Genel olarak tümör alanları ile non-tümöral alanlar karşılaştırıldığında, non-tümöral alanlarda hiçbir alanda KD ile $> 50\%$ hücrede boyanma saptanmadı ($p < 0.05$). Reaktif stromal hücreler ve histiyositlerdeki KD boyanma oranı tek değişkenli düzende anlamlı bulundu ($p < 0.05$). İnvaziv tümör derecelerine göre çevredeki reaktif stromal hücrelerdeki KD ekspresyonu incelendiğinde, tümör derecelerindeki artış ile reaktif stromal hücrelerdeki KD ekspresyonunun korrelasyon gösterdiği izlendi ($p = 0.002$). İnvaziv karsinomlarda, tümör evresi ilerledikçe, tümör hücrelerindeki KD ekspresyon oranında artış saptanmış olmakla birlikte, bu

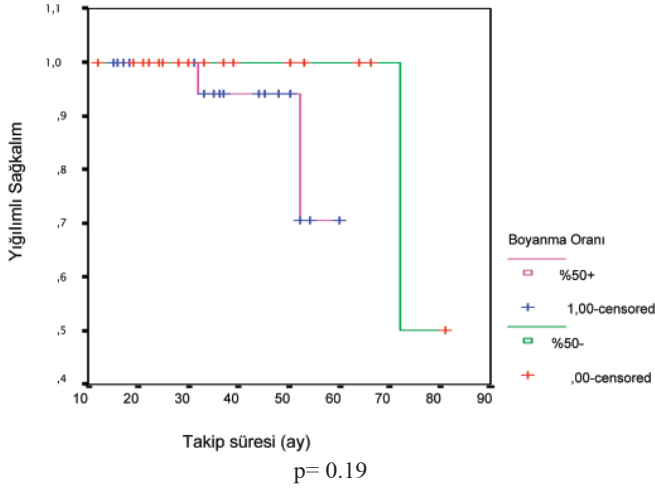
Tablo 3: Klinik evreye göre, TK1'in tümör ve tümör çevresindeki hücrelerde boyanma derecesine göre olguların dağılımı.

Belirgin intraduktal komponent içeren invaziv duktal karsinom (n:70)			TK1 3+ (%)	TK1 2+ (%)	TK1 1+ (%)	TK1 0 (%)
Evre I (n:22)	İnvaziv duktal karsinom	Derece 1/3	1 (11.1)	5 (55.6)	2 (22.2)	1 (11.1)
		Derece 2/3	0	1 (16.7)	2 (33.3)	3 (50.0)
		Derece 3/3	1 (14.3)	0	2 (28.6)	4 (57.1)
	İDK komponenti		4 (18.2)	7 (31.8)	3 (13.6)	8 (36.4)
	Normal TDLÜ		0	0	0	22 (100)
Reaktif stromal hücreler ve histiyositler			0	4 (18.2)	12 (54.5)	6 (27.3)
Evre IIA (n:23)	İnvaziv duktal karsinom	Derece 1/3	1 (10.0)	1 (10.0)	4 (40.0)	4 (40.0)
		Derece 2/3	3 (42.8)	2 (28.6)	2 (28.6)	0
		Derece 3/3	2 (33.3)	1 (16.7)	2 (33.3)	1 (16.7)
	İDK komponenti		6 (26.1)	6 (26.1)	6 (26.1)	5 (21.7)
	Normal TDLÜ		0	0	0	23 (100)
Reaktif stromal hücreler ve histiyositler			0	5 (21.7)	10 (43.5)	8 (34.8)
Evre IIB (n:18)	İnvaziv duktal karsinom	Derece 1/3	1 (100)	0	0	0
		Derece 2/3	0	3 (50.0)	1 (16.7)	2 (33.3)
		Derece 3/3	1 (9.1)	5 (45.5)	2 (18.1)	3 (27.3)
	İDK komponenti		8 (44.4)	5 (27.8)	2 (11.1)	3 (16.7)
	Normal TDLÜ		0	0	0	18 (100)
Reaktif stromal hücreler ve histiyositler			0	5 (27.7)	3 (16.7)	10 (55.6)
Evre IIIA (n:2)	İnvaziv duktal karsinom	Derece 1/3	-	-	-	-
		Derece 2/3	0	1	1	0
		Derece 3/3	-	-	-	-
	İDK komponenti		1	0	1	0
	Normal TDLÜ		0	0	0	2
Reaktif stromal hücreler ve histiyositler			0	0	1	1
Evre IIIB (n:4)	İnvaziv duktal karsinom	Derece 1/3	-	-	-	-
		Derece 2/3	0	0	1 (100)	0
		Derece 3/3	0	2 (66.7)	1 (33.3)	0
	İDK komponenti		0	4 (100)	0	0
	Normal TDLÜ		0	0	0	4 (100)
Reaktif stromal hücreler ve histiyositler			0	0	3 (75.0)	1 (25.0)
Evre IV (n:1)	İnvaziv duktal karsinom	Derece 1/3	-	-	-	-
		Derece 2/3	-	-	-	-
		Derece 3/3	0	1	0	0
	İDK komponenti		1	0	0	0
	Normal TDLÜ		0	0	0	1
Reaktif stromal hücreler ve histiyositler			0	0	1	0

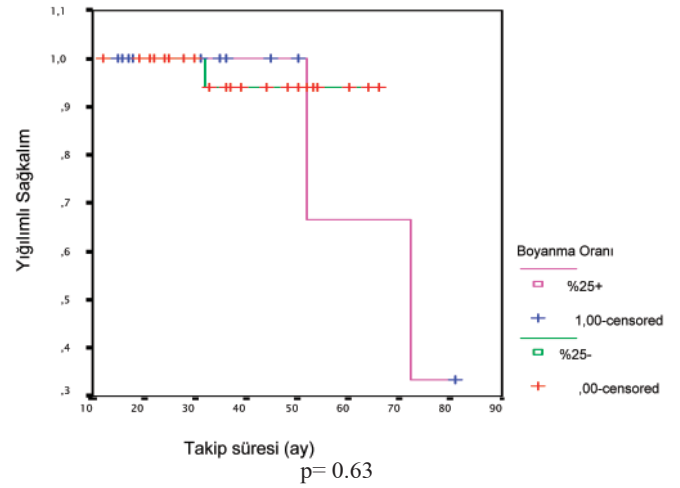
**Resim 3:** İnvaziv duktal karsinomda sitoplazmik TK1 ekspresyonu (Streptavidin-biyotin peroksidaz, 200x).

durum istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. ($p>0.05$) (Tablo 2). Takipleri sırasında uzak metastaz geliştiren hastalar ile remisyonunda olan hastaların reaktif stromal hücrelerine bakıldığında KD ekspresyonu açısından anlamlı fark bulunmadı.

TK1 ile, boyanma oranları açısından tümörün intraduktal ve invaziv (Resim 3) komponentleri arasında anlamlı fark saptanmadı. Benzer şekilde invaziv tümör komponentinin dereceleri arasında da fark bulunmadı. Genel olarak tümör alanları ile non-tümöral alanlar karşılaştırıldığında, TK1 ile non-tümöral olan hiçbir alanda >25 hücrede boyanma saptanmadı ($p<0.05$). Reaktif stromal hücreler ve histiyositlerdeki TK1 boyanma oranlarında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlendi ($p<0.05$). Tümör evreleri arasında, TK1 boyanması açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (Tablo 3). Takipleri sırasında uzak metastaz geliştiren hastalar ile remisyonunda olan hastalar TK1 boyanması açısından karşılaştı-



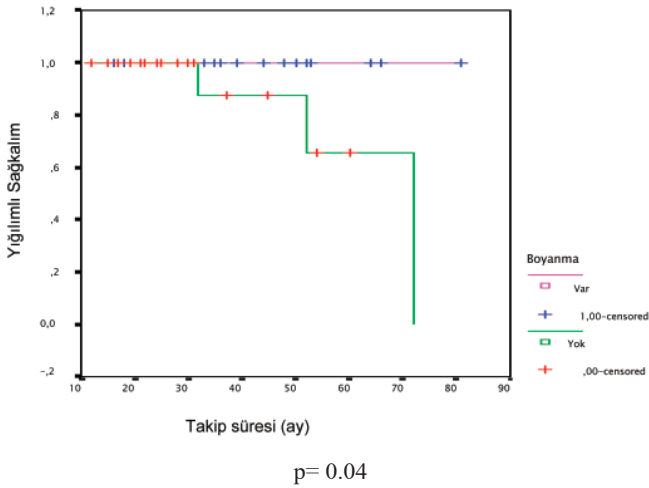
Grafik 1: İnvaziv duktal karsinomda KD ekspresyonu ile sağkalım ilişkisi.



Grafik 2: İnvaziv duktal karsinomda TK1 ekspresyonu ile sağkalım ilişkisi.

Sağkalım analizi

KD, >%50 ve <%50 invaziv tümör hücresinde ekspresyona göre, iki grupta sağkalım analizine katıldı. Bu gruplardaki olgular arasında yığılımlı sağkalım süreleri açısından fark saptanmadı ($p>0.05$) (Grafik 1). TK1, >%25 ve <%25 invaziv tümör hücresinde ekspresyona göre, iki grupta sağkalım analizine katıldı. Bu gruplardaki olgular arasında yığılımlı sağkalım süreleri açısından fark saptanmadı ($p>0.05$) (Grafik 2). SD1, invaziv tümör hücrelerinde ekspresyonunun (+) ya da (-) olmasına göre, iki grupta sağkalım analizine katıldı. Bu gruplardaki olgular arasında yığılımlı sağkalım süreleri açısından anlamlı fark saptandı ($p<0.05$) (Grafik 3).



Grafik 3: İnvaziv duktal karsinomda SD1 ekspresyonu ile sağkalım ilişkisi.

rıldığında, hiçbir hüresel komponentte fark bulunmadı.

SD1 ile, boyanma yoğunlukları açısından tümörün intraduktal ve invaziv komponentleri (Resim 4) arasında anlamlı fark saptanmadı. Benzer şekilde invaziv tümör komponentinin dereceleri arasında da fark bulunmadı. Genel olarak tümör alanları ile non-tümöral alanlar karşılaştırıldığında, non-tümöral alanlarda 1 olgu dışında hiçbir olguda SD1 ile (+) boyanma saptanmaması anlamlı bulundu ($p<0.05$) (Resim 5). Tümör evreleri arasında SD1 boyanmasının karşılaştırılması sonucunda, intraduktal tümör komponentinde en yüksek düzeydeki boyanmanın ara evre (evre IIB) grubunda, en düşük düzeydeki boyanmanın ise ileri evre (evre III-IV) grubunda olduğu saptandı ($p=0.02$). Evreler açısından benzer boyanma düzeyleri derece 3/3 invaziv tümör komponentinde de izlendi ($p=0.015$) (Tablo 4). Takipleri sırasında uzak metastaz geliştiren hastalar ile remisyonda olan hastalar karşılaştırıldığında, remisyonda olan grupta intraduktal tümör komponentinde ve derece 3/3 invaziv tümör komponentinde SD1 ile daha yüksek oranda boyanma izlendi ($p<0.01$).

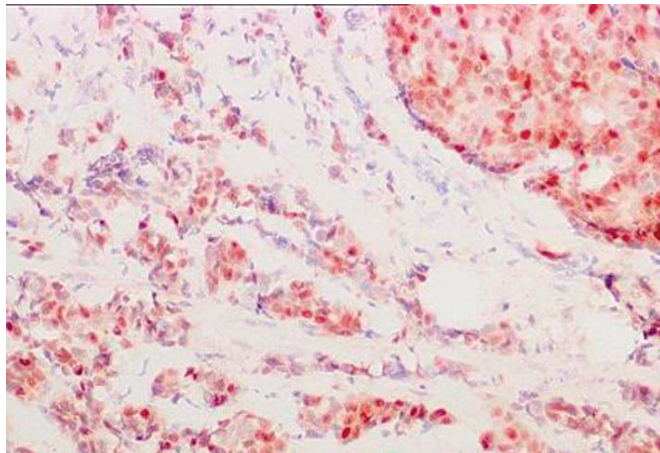
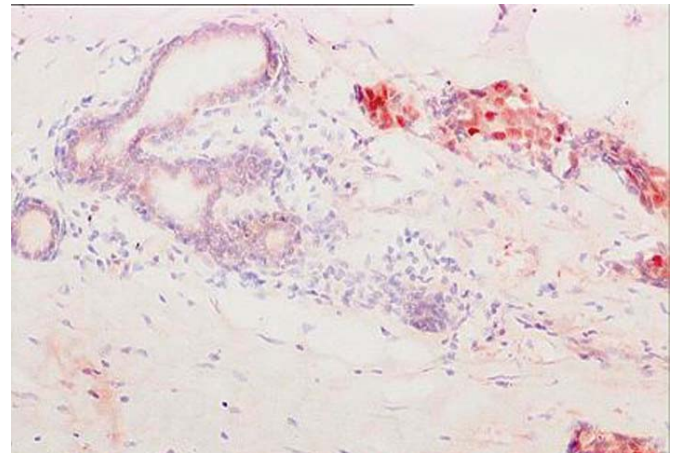
TARTIŞMA VE SONUÇ

KD, ilk olarak 1979 yılında Westly ve Rochefort tarafından metastatik meme kanseri hücre hattında (*cell line*) östrojen-ilişkili bir protein olarak tanımlanmıştır.²⁰ KD, asidik pH'ta lizozomlar içinde matür aktif enzim şeklinde rol oynayan; kanser hücreleri, stromal reaktif hücreler ve makrofajlar tarafından sentezlenen lizozomal aspartil proteazdır. Bu proteinin stromal matriks ve bazal membranda bulunan proteoglikan maddeleri parçalayarak invazyon ve sonrasında metastazlarla tümör progresyonunu kolaylaştırmasının⁶⁻⁷ yanısıra, meme kanserli hastalarda yaşam süresini belirlemede prognostik değerinin de bulunabileceğini²¹⁻²² belirten birçok çalışma mevcuttur. KD, meme kanserli hastalarda sağkalım oranını belirlemede immünohistokimyasal olarak kullanılabilir bir 'marker' olup; klinik çalışmalar, meme kanseri hücrelerinde artmış KD düzeyinin erken rekürrens ve ölüm oranları ile ilgili bağımsız bir belirleyici olduğunu göstermiştir.²³ KD düzeyinin yüksek olmasının kötü prognoz göstergesi olduğu yönünde çalışmalar bulunmaktadır. Bir kısım çalışmada ise stromal hücrelerin, tümörün lokal invazyonunda ve metastatik yayılımında anahtar rol oynadığı belirtilmektedir.²⁴⁻²⁵ Stromal hücrelerdeki KD ekspresyonunun ileri tümör evresi ile korele olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur.²⁶⁻²⁷ Ayrıca bir çalışmada, yazarlar, kanser hücreleri ile stromal hücreler arasın-

Tablo 4: Klinik evreye göre, SD1'in tümör ve tümör çevresindeki hücrelerde boyanma derecesine göre olguların dağılımı.

Belirgin intraduktal komponent içeren invaziv duktal karsinom (n:70)			SD1 2+ (%)	SD1 1+ (%)	SD1 0 (%)
Evre I (n:22)	İnvaziv duktal karsinom	Derece 1/3	0	3 (33.3)	6 (66.7)
		Derece 2/3	0	2 (33.3)	4 (66.7)
		Derece 3/3	3 (42.9)	1 (14.2)	3 (42.9)
	İDK komponenti		8 (36.4)	3 (13.6)	11 (50.0)
	Normal TDLÜ		0	0	22 (100)
Reaktif stromal hücreler ve histiyositler			2*(9.1)	0	20 (90.9)
Evre IIA (n:23)	İnvaziv duktal karsinom	Derece 1/3	4 (40.0)	2 (20.0)	4 (40.0)
		Derece 2/3	0	5 (71.4)	2 (28.6)
		Derece 3/3	0	1 (16.7)	5 (83.3)
	İDK komponenti		8 (34.8)	6 (26.1)	9 (39.1)
	Normal TDLÜ		0	0	23 (100)
Reaktif stromal hücreler ve histiyositler			2*(8.8)	0	21 (91.2)
Evre IIB (n:18)	İnvaziv duktal karsinom	Derece 1/3	0	1 (100)	0
		Derece 2/3	2 (33.3)	2 (33.3)	2 (33.3)
		Derece 3/3	2 (18.2)	6 (54.5)	3 (27.3)
	İDK komponenti		6 (33.3)	9 (50.0)	3 (16.7)
	Normal TDLÜ		0	0	18 (100)
Reaktif stromal hücreler ve histiyositler			0	0	18 (100)
Evre IIIA (n:2)	İnvaziv duktal karsinom	Derece 1/3	-	-	-
		Derece 2/3	0	1	1
		Derece 3/3	-	-	-
	İDK komponenti		0	2	0
	Normal TDLÜ		0	0	2
Reaktif stromal hücreler ve histiyositler			1*	0	1
Evre IIIB (n:4)	İnvaziv duktal karsinom	Derece 1/3	-	-	-
		Derece 2/3	0	0	1 (100)
		Derece 3/3	0	0	3 (100)
	İDK komponenti		0	0	4 (100)
	Ağır dereceli BH		0	0	4 (100)
	Normal TDLÜ		0	0	4 (100)
Reaktif stromal hücreler ve histiyositler			0	0	4 (100)
Evre IV (n:1)	İnvaziv duktal karsinom	Derece 1/3	-	-	-
		Derece 2/3	-	-	-
		Derece 3/3	0	0	1
	İDK komponenti		0	0	1
	Normal TDLÜ		0	0	1
Reaktif stromal hücreler ve histiyositler			0	0	1

* Sitoplazmik boyanma

**Resim 4:** İnvaziv duktal karsinom ve İDK komponentinde nükleer SD1 ekspresyonu (Streptavidin-biyotin peroksidaz, 100x).**Resim 5:** İnvaziv duktal karsinomda nükleer SD1 ekspresyonu ve çevresinde ekspresyon göstermeyen normal meme dokusu (Streptavidin-biyotin peroksidaz, 100x).

daki katepsin D ekspresyonunda nedenini açıklayamadıkları ters korelasyon saptamışlar.²⁶ Literatürde tümör çevresindeki reaktif stromal hücrelerde KD pozitifliği %35-81.4 arasında değişen oranlarda bildirilmiştir.²⁸⁻²⁹ Bizim çalışmamızda KD ile, %>10 reaktif stromal hücre ve histiyositte boyanma oranı invaziv tümör çevresinde %78.6 bulunmuştur. İnvaziv duktal karsinomda tümör derecelerinin artışı ile stromal hücrelerde KD ekspresyon oranının arttığını gösteren çalışmalar mevcuttur.²⁸⁻²⁹ Bizim çalışmamızda da tümör derecesi arttıkça stromal hücrelerde KD ekspresyonunun arttığı saptanmıştır ($p<0.05$). Birçok çalışmada tümör hücrelerinde değil de, reaktif stromal hücrelerdeki KD ekspresyonunun meme kanseri prognozunu etkilediği bildirilmiştir.^{17,30} Stromal hücrelerin tümörün lokal invazyonunda ve metastatik yayılımında mikrodamar yoğunluğu ile birlikte³¹ anahtar rol oynadığı düşünülmektedir.^{24-25,30} Bu çalışmada, belirgin intraduktal komponent içeren invaziv duktal karsinom olgularında, KD ile, intraduktal alanlarda invaziv komponente göre daha yüksek oranda ekspresyon saptanmıştır. Ulaşılabilen literatürde bu konu ile ilgili ayrıntılı bilgiye rastlanmamış olmakla birlikte, tümörün invaziv karakter kazanması ile KD ekspresyonunun azalabileceği olasılığı tartışılmalıdır. Literatürde immünohistokimyasal olarak tümör hücrelerindeki KD ekspresyonu ile meme kanseri hastalarının yaşam süreleri arasında pozitif korelasyon saptayan bir çalışmanın yanısıra,³² birçok çalışmada negatif korelasyon³³⁻³⁶ bulunduğu bildirilmiştir. Bizim de çalışmamızda izlediğimiz gibi, tümör hücrelerindeki KD ekspresyonu ile bu hastaların yaşam süreleri arasında korelasyon bulunmadığını^{17,32,37} gösteren çalışmalar da mevcuttur. Çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmesinin, hasta popülasyonunda heterojenite ve metodolojideki farklılıklar ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.¹⁷

TK, proliferen olan normal ve malign hücrelerde iki farklı izoenzim formunda bulunmaktadır:⁸⁻¹⁰ (1) Sitolizik (sitoplazmik, fetal, TK1) ve (2) mitokondriyal (erişkin, TK2).⁸ Sitolizik TK (TK1), DNA metabolizmasında pirimidin sentezindeki tek basamaklı kurtarma (*salvage*) yolunda rol oynamaktadır.¹¹ TK1, DNA sentezleyen hücrelerin bir göstergesi niteliğindedir.⁹⁻¹⁰ Prolifere olmayan hücrelerde ise yalnızca TK2 bulunmaktadır.⁹⁻¹⁰ TK2 aktivitesi tüm hücre siklusu süresince sabit bir düzeyde kalmaktadır.³⁸ Son yıllarda yapılan araştırmalar, TK1'in tümörün proliferatif aktivitesi ile korelasyon gösteren bir enzim olduğunu ortaya koymuştur.¹⁸ Literatürde, TK1 ekspresyonuna yönelik çok az sayıda immünohistokimyasal çalışma bulunmaktadır.^{18,39} TK1'in meme kanseri hastalarında tümör agresivitesine ilişkin, immünohistokimyasal olarak kullanışlı bir tümör 'marker'ı olabileceği belirtilmektedir.¹⁸ Literatürde, immünohistokimyasal olarak TK1 ekspresyonuna yönelik çok az sayıda çalışma bulunmaktadır.^{18,39} Bir çalışmada TK1 ile invaziv karsinom alanında olguların %79'unda pozitif boyanma bildirilmiştir.¹⁸ Bizim çalışmamızda da literatürdeki bu bulgu ile uyumlu olarak invaziv karsinom alanında, olguların %77.1'inde TK1 ekspresyonu saptanmıştır. Literatürde TK1 ekspresyonu açısından malign ve benign meme lezyonlarını birlikte inceleyen az sayıda çalışma mevcuttur. Mao et al'ın çalışmasında¹⁸ invaziv tümör alanı çevresindeki normal meme dokusunda olguların %19'unda TK1 ile boyanma izlendiği

belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda olguların hiçbirinde normal meme alanlarında TK1 ekspresyonu saptanmamıştır. TK1'in meme kanseri hastalarında tümör agresivitesine ilişkin kullanışlı bir tümör 'marker'ı olabileceği belirtilmektedir.¹⁸ Literatürde de vurgulandığı üzere,⁴⁰ gelecekte TK1 antikorunun meme kanserinin erken teşhisinde ve daha doğru tanıya ulaşmada yardımcı olabileceği düşünülmektedir.

SD1, 36kDa ağırlığında, siklin bağımlı kinazlar cdk4 ve cdk6 ile aktif enzim kompleksleri oluşturarak¹² hücre siklusunun G1 fazından S fazına ilerlemesini düzenleyen, G1 siklinler ailesine ait nükleer bir proteindir.¹³⁻¹⁴ SD1 proteininin hücre siklusunun ilerlemesinde kritik bir rolü vardır. Bu proteinin ekspresyonunun regülasyonunun bozulması, meme kanserini de içeren birçok malign tümöral gelişimden sorumlu tutulmaktadır.⁴¹⁻⁴² SD1 aşırı-ekspresyonu ile prognoz arasındaki ilişki tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır.⁴³ Bazı çalışmalarda primer meme kanseri ile SD1 aşırı-ekspresyonu arasında ilişki saptanırken,⁴⁴ bir kısım çalışmada ise bu iki antite arasında bağlantı bulunamamıştır.⁴⁵ SD1 aşırı-ekspresyonunun kötü prognoz, daha agresif ve metastatik tümör davranışı ile ilişkili⁴⁶ olduğu belirtilmekle birlikte, iyi prognoz göstergesi olan iyi differansiye karsinomlar ve östrojen pozitifliği ile ilişkili bulunduğu çalışmalar da mevcuttur.⁴⁷ SD1'in majör insan onkogeni olması ve birçok meme kanserinde patojenik bir köşetaşı rolü oynaması nedeniyle, seçilmiş uygun tümörlerin gelecekte anti-SD1 tedavisinden yarar göreceği öngörülmektedir.⁴⁸ Literatürde invaziv duktal karsinom olgularında SD1 ekspresyonu %20-81 arasında değişmektedir.^{2,44,49-50} Düşük dereceli invaziv karsinomlarda SD1 ekspresyonunun daha sık olduğu bildirilmiştir.^{44,50} Bizim çalışmamızda invaziv duktal karsinomlarda SD1 boyanma oranı %60 olarak bulunurken, intraduktal ve invaziv tümör komponentleri arasında anlamlı fark saptanmamıştır. Ancak, genel olarak tümör alanları ile non-tümöral alanlar karşılaştırıldığında, non-tümöral alanlarda 1 olgu dışında hiçbir olguda SD1 ile (+) boyanma saptanmaması, anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Literatür⁵¹⁻⁵² ile uyumlu olarak, bizim çalışmamızda da normal meme dokusunda SD1 ekspresyonu saptanmamıştır. Literatürde, SD1 aşırı-ekspresyonunun, kanser progresyonu ya da prognoz ile korelasyonunun gösterilemediği çalışmalar çoğunluktadır.⁴⁴ SD1 ve prognoz ilişkisi ile ilgili ilk çalışmalarda, SD1 amplifikasyonunun kötü prognoz göstergesi olduğu bildirilmiştir.⁴⁶ Bu sonuç, ekspresyondaki artışın hücre büyümesine yol açıp, özellikle tümör hücrelerinin selektif bir şekilde büyümesini sağlayacağı fikrini desteklemekte idi. Ancak daha sonraki immünohistokimyasal çalışmalarda, bizim de bu çalışmamızda saptadığımız gibi, tümör hücrelerindeki SD1 ekspresyonunun daha iyi yaşam süreleri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.⁴⁷ Bu durum, SD1'in yüksek düzeylerde hücrelere toksik etki gösterebileceği ve apoptotik hücre ölümüne yol açabileceği görüşü ile açıklanmaya çalışılmıştır. Bizim çalışmamızda, takipleri sırasında uzak metastaz geliştiren hastalar ile remisyonda olan hastalar karşılaştırıldığında, remisyonda olan grupta bazı tümör komponentlerinde yüksek oranda ($p<0.05$) SD1 ekspresyonu saptanmış; bu durum SD1'in iyi prognoz göstergesi olabileceği yönündeki literatürle de uyumlu olarak değerlendirilmiştir.⁴⁷

Sonuç olarak, bu çalışmada, literatürde prognostik önemi olduğu yönünde tartışmalı sonuçlar bulunan KD ile SD1 antikorları ve üzerinde çok az immünohistokimyasal çalışma yapılmış TK antikorunun, belirgin intraduktal komponent içeren invaziv duktal karsinom olgularına ait meme dokularındaki ekspresyon özellikleri değerlendirilmiştir. Sonuç olarak KD, TK1 ve SD1 antikorlarının benign ve malign hücrelerdeki ekspresyon oranları karşılaştırıldığında, malign hücrelerde artmış ekspresyon göstermeleri ($p < 0.05$), her üç antikorun da lezyonun malign karakterini ortaya koymada yardımcı olabileceğini ortaya koymaktadır. KD ekspresyonunun, tümör hücrelerinin invaziv potansiyel kazanmasında etkili olabileceğini göstermesi açısından tümörün biyolojik davranışını belirlemede önemli rol oynadığı düşünülmüştür. SD1 ekspresyonunun iyi prognoz göstergesi olabileceği ve daha iyi yaşam süreleri ile ilişkili olduğu saptanmıştır.

Yazışma Adresi

Güldal Yılmaz

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi

Patoloji Anabilim Dalı, Beşevler, Ankara

Tel: 0312 202 54 89

e-posta: drguldal@yahoo.com

KAYNAKLAR

- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer* 2001; 94: 153-156.
- Gillett C, Fantl V, Smith R, et al. Amplification and overexpression of cyclin D1 in breast cancer detected by immunohistochemical staining. *Cancer Res* 1994; 54: 1812-1817.
- Romain S, Spyrtatos F, Descotes F, et al. Prognostic of DNA-synthesizing enzyme activities (thymidine kinase and thymidilate synthase) in 908 T1-T2, N0-N1, M0 breast cancers: A retrospective multicenter study. *Int J Cancer* 2000; 67: 860-868.
- Carson WE 3rd, Liang MI. Current immunotherapeutic strategies in breast cancer. *Surg Oncol Clin N Am* 2007; 16: 841-860.
- McArthur HL, Hudis CA. Breast cancer chemotherapy. *Cancer J* 2007; 13: 141-147.
- Ferrandina G, Scambia G, Bardelli F, et al. Relationship between cathepsin D content and disease-free survival in node-negative breast cancer patients: a meta-analysis. *Br J Cancer* 1997; 76: 661-666.
- Rocheffort H. Biological and clinical significance of cathepsin D in breast cancer. *Acta Oncol* 1992; 31: 125-130.
- Greco S, Marsigliante S, Leo G, et al. Co-expression of thymidine kinase and cathepsin D in 200 primary breast carcinomas. *Cancer Letters* 2000; 160: 13-19.
- Hengstschläger M, Knöfler M, Müllner EW, et al. Different regulation of thymidine kinase during the cell cycle of normal versus DNA tumor virus-transformed cells. *J Biol Chem* 1994; 269: 13836-13842.
- Sherr CJ. G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* 1994; 79: 551-555.
- Broët P, Romain S, Daver A, et al. Thymidine kinase as a proliferative marker: Clinical relevance in 1,692 primary breast cancer patients. *J Clin Oncol* 2001; 19: 2778-2787.
- Otterbach F, Bankfalvi A, Bergner S, et al. Cytokeratin 5/6 immunohistochemistry assists the differential diagnosis of atypical proliferations of the breast. *Histopathology* 2000; 37: 232-240.
- Baldin V, Lukas J, Marcote MJ, et al. Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev* 1993; 7: 812-821.
- Shoker BS, Sloane JP. DCIS grading schemes and clinical implications. *Histopathology* 1999; 35: 393-400.
- Sobin LH. *Histological Typing of Breast Tumours*. 2nd ed. World Health Organization, Geneva, 1981.
- Connolly JL, Fechner RE, Kempson RL, et al. Recommendations for the reporting of breast carcinoma. *Hum Pathol* 1996; 27: 220-224.
- Armas OA, Gerald WL, Lesser ML, et al. Immunohistochemical detection of cathepsin D in T2N0M0 breast carcinoma. *Am J Surg Pathol* 1994; 18: 158-166.
- Marsh KL, Varley JM. Frequent alterations of cell cycle regulators in early-stage breast lesions as detected by immunohistochemistry. *Br J Cancer* 1998; 77: 1460-1468.
- Gillett CE, Lee AHS, Millis RR, et al. Cyclin D1 and associated proteins in mammary ductal carcinoma in situ and atypical ductal hyperplasia. *J Pathol* 1998; 184: 395-400.
- Westley B, Rochefort H. Estradiol induced proteins in the MCF7 human breast cancer cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 1979; 90: 410-416.
- Foekens JA, Look MP, Bolt-de Vries J, et al. Cathepsin-D in primary breast cancer: Prognostic evaluation involving 2810 patients. *Br J Cancer* 1999; 79: 300-307.
- Robertson JFR, O'Neill KL, Thomas MW, et al. Thymidine kinase in breast cancer. *Br J Cancer* 1990; 62: 663-667.
- Duffy MJ, Brouillet JP, Reilly D, et al. Cathepsin D concentration in breast cancer cytosols: correlation with biochemical, histological and clinical findings. *Clin Chem* 1991; 37: 101-104.
- Kandalaf PL, Chang KL, Ahn CW, et al. Prognostic significance of immunohistochemical analysis of cathepsin D in low-stage breast cancer. *Cancer* 1993; 71: 2756-2763.
- Razumovic JJ, Stojkovic RR, Petroveci M, et al. Correlation of two methods for determination of cathepsin D in breast carcinoma (immunohistochemistry and ELISA in cytosol). *Breast Cancer Res Treat* 1997; 43: 117-122.
- Zhang Y, Du J, Tian X, et al. Expression of E-cadherin, beta-catenin, cathepsin D, gelatinases and their inhibitors in invasive ductal breast carcinomas. *Chin Med J* 2007; 120: 1597-1605.
- Korkolis DP, Tsoli E, Fouskakis D, et al. Tumor histology and stage but not p53, her2-neu or cathepsin-D expression are independent prognostic factors in breast cancer patients. *Anticancer Res* 2004; 24: 2061-2068.
- Zheng W-Q, Looi L-M, Cheah P-L. A comparison of the pattern of cathepsin D expression in fibroadenoma, fibrocystic disease, pre-invasive and invasive ductal breast carcinoma. *Pathology* 1999; 34: 247-251.
- Tetu B, Brisson J, Wang CS, et al. Expression of cathepsin D, stromelysin-3, and urokinase by reactive stromal cells on breast carcinoma prognosis. *Cancer* 2001; 92: 2957-2964.
- Tetu B, Brisson J, Cote C, et al. Prognostic significance of cathepsin D expression in node-positive breast carcinoma: an immunohistochemical study. *Int J Cancer* 1993; 55: 429-435.
- Gonzales-Vela MC, Garijo MF, Fernandez F, et al. Cathepsin D in host stromal cells is associated with more highly vascular and aggressive breast carcinoma. *Histopathology* 1999; 34: 35-42.
- Henry JA, McCarthy AL, Angus B, et al. Prognostic significance of the estrogen-regulated protein, cathepsin D, in breast cancer: an immunohistochemical study. *Cancer* 1990; 65: 265-271.
- Raju U, Crissman JD, Zarbo RJ, et al. Epitheliosis of the breast: an immunohistochemical characterization and comparison to malignant intraductal proliferations of the breast. *Am J Surg Pathol* 1990; 14: 939-947.
- Isola J, Weitz S, Visakorpi T, et al. Cathepsin D expression detected by immunohistochemistry has independent prognostic value in axillary node-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 1993; 11: 36-43.
- Tavassoli FA, Hoefler H, Rosai J, Holland R, Ellis IO, Schnitt SJ, Boecker W, Heywang-Köbrunner SH, Moynihan F, Lakhani SR: Intraductal proliferative lesions. In Tavassoli FA, Devilee P (Eds.): *In World Health Organization Classification of Tumours. Pathology & Genetics. Tumours of the Breast and Female Genital Organs*. IARC Press: Lyon 2003, pp 63-73.

- 36- Winstanley JHR, Leinster SJ, Cooke TG, et al. Prognostic significance of cathepsin-D in patients with breast cancer. *Br J Cancer* 1993; 67: 767-772.
- 37- Castiglioni T, Merino MJ, Elsner B, et al. Immunohistochemical analysis of cathepsins D, B, and L in human breast cancer. *Hum Pathol* 1994; 25: 857-862.
- 38- Arner ESJ, Spasokoukotskaja T, Eriksson S. Selective assays for thymidine kinase 1 and 2 and deoxycytidine kinase and their activities in extracts from human cells and tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 188: 712-718.
- 39- Wo J, Mao Y, He L, et al. A new cell proliferating marker: Cytosolic thymidine kinase as compared to proliferating cell nuclear antigen in patients with colorectal carcinoma. *Anticancer Res* 2000; 20: 4815-4820.
- 40- Zhang F, Shao X, Li H, et al. A monoclonal antibody specific for human thymidine kinase 1. *Hybridoma* 2001; 20:25-34
- 41- Fantl V, Richardson MA, Smith R, et al. Gene amplification on chromosome band 11q13 and oestrogen receptor status in breast cancer. *Int J Cancer* 1990; 26: 423-429.
- 42- Leong ACK, Hanby AM, Potts HWW, et al. Cell cycle proteins do not predict outcome in grade I infiltrating ductal carcinoma of the breast. *Int J Cancer (Pred Oncol)* 2000; 89: 26-31.
- 43- Umekita Y, Ohi Y, Sagara Y, et al. Overexpression of cyclin D1 predicts for poor prognosis in estrogen receptor-negative breast cancer patients. *Int J Cancer* 2002; 98: 415-418.
- 44- van Diest PJ, Michalides RJAM, Jannink I, et al. Cyclin D1 expression in invasive breast cancer: correlations and prognostic value. *Am J Pathol* 1997; 150: 705-711.
- 45- Moinfar F, Man YG, Lininger RA, et al. Use of keratin 34+E12 as an adjunct in the diagnosis of mammary intraepithelial neoplasia-ductal type-benign and malignant intraductal proliferations. *Am J Surg Pathol* 1999; 23: 1048-1058.
- 46- Henry JA, Hennessy C, Levet DL, et al. Int-2 amplification in breast cancer: Association with decreased survival and relationship to amplification of c-erbB2 and c-myc. *Int J Cancer* 1993; 53: 774-780.
- 47- Hwang TS, Han HS, Hong YC, et al. Prognostic value of combined analysis of cyclin D1 and estrogen receptor status in breast cancer patients. *Pathol Int* 2003; 53: 74-80.
- 48- Arnold A, Papanikolaou A. Cyclin D1 in breast cancer pathogenesis. *J Clin Oncol* 2005; 23: 4215-4224.
- 49- Michalides R, Hageman P, van Tinteren H, et al. A clinicopathological study on overexpression of cyclin D1 and of p53 in a series of 248 patients with operable breast cancer. *Br J Cancer* 1996; 73: 728-734.
- 50- Nomura AMY, Lee J, Kolonel LN, et al. Breast cancer in two populations with different levels of risk for the disease. *Am J Epidemiol* 1984; 119: 496-502.
- 51- Heffelfinger SC, Yassin R, Miller MA, et al. Cyclin D1, retinoblastoma, p53 and Her2/neu protein expression in preinvasive breast pathologies: correlation with vascularity. *Pathobiology* 2000; 68: 129-136.
- 52- Umekita Y, Yoshida H. Cyclin D1 expression in ductal carcinoma in situ, atypical ductal hyperplasia and usual ductal hyperplasia: an immunohistochemical study. *Pathol Int* 2000; 50: 527-530.