

## بررسی فراوانی بروز بیومارکرهای Cyclin-D1, P27 در کارسینوم داکتال پستان و ارتباط آن با متغیرهای بالینی و پاتولوژیکی و بروز گیرنده‌های استروئیدی

دکتر فرحناز نوروزی نیا<sup>۱</sup>، دکتر بهروز ایلخانی زاده<sup>۲\*</sup>، دکتر عارفه اسماعیلی<sup>۳</sup>، دکتر زهرا یکتا<sup>۴</sup>، عباس صفاری فرد<sup>۵</sup>

تاریخ دریافت: 1391/05/25 تاریخ پذیرش: 1391/07/18

### چکیده

**پیش زمینه و هدف:** سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در زنان می‌باشد و طبق مطالعات انجام شده در ایران شروع سرطان پستان حداقل یک دهه زودتر از شروع آن در کشورهای پیشرفته است. در سال‌های اخیر توجه زیادی به استفاده از بیومارکرها در پیشگویی پاسخ به درمان و پروگنوز بیماران شده است. **مواد و روش‌ها:** از فروردین ماه سال ۱۳۸۳ تا بهمن ۱۳۸۷ تعداد ۳۸ بیمار که با تشخیص کارسینوم داکتال پستان در بیمارستان امام خمینی ارومیه تحت ماستکتومی قرار گرفتند وارد این مطالعه گردیدند و بلوک‌های پارافینی موجود در آرشیو پاتولوژی بیمارستان امام خمینی جمع‌آوری و تحت رنگ آمیزی H&E و ایمنوهیستوشیمیایی Cyclin-D1, P27 و ER/PR قرار گرفتند. جمع‌آوری داده‌های بالینی نیز از طریق پرونده بیماران و آرشیو بیمارستان امام خمینی ارومیه صورت گرفته شد.

**یافته‌ها:** ۱۸ بیمار (۴۷/۴٪) p27 مثبت و ۹ بیمار (۲۳/۷٪) نیز از نظر Cyclin-D1 مثبت بودند. در خصوص بیان گیرنده‌های استروئیدی ۱۴ نفر (۳۶/۸٪) ER مثبت و ۲۴ نفر (۶۳/۲٪) ER منفی داشتند. در خصوص بیان گیرنده‌های پروژسترونی نیز ۱۴ نفر (۳۶/۸٪) PR مثبت و ۲۴ نفر (۶۳/۲٪) PR منفی داشتند. **بحث و نتیجه گیری:** طبق نتایج بدست آمده ارتباط معنی‌داری بین بیان Cyclin-D1 و P27 با متغیرهای بالینی و پاتولوژیکی سرطان پستان مانند سن بیمار، تعداد غدد لنفی درگیر زیر بغل، درجه (grade) هیستولوژیکی و سایز تومور و نیز بیان ریسپتورهای استروئیدی مشاهده نشد که در برخی از مطالعات قبلی نیز چنین نتیجه‌ای به دست آمده است.

**کلید واژگان:** سرطان مهاجم پستان، Cyclin-D1, P27، گیرنده‌های استروئیدی

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و سوم، شماره پنجم، ص ۵۶۲-۵۶۶، آذر و دی ۱۳۹۱

آدرس مکاتبه: ارومیه، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، تلفن: ۰۹۱۴۳۴۱۹۱۹۴

Email: ilkhanib@gmail.com

### مقدمه

مهم سرطان پستان شامل سن بالا در اولین زایمان، قاعدگی زودرس، یائسگی دیررس و سابقه فامیلی می‌باشد (۳،۴). یکی از مسائل مهم در انتخاب درمان مشخص نمودن سیر بیماری و تعیین پیش‌آگهی است. فاکتورهای متنوعی از قبیل اندازه تومور، درگیری گروه‌های لنفاوی زیر بغل، درجه بدخیمی، وجود متاستاز به نواحی دور دست و سن به عنوان عوامل موثر در پیش‌آگهی دراز مدت بیماران مطرح شده‌اند (۵). نقش تعیین‌کننده حضور گیرنده استروئیدی و پروژسترونی در بافت تومورال پستان و ارتباط این گیرنده‌ها با پاسخ به هورمون درمانی و

سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در زنان می‌باشد و براساس آمار سال ۲۰۰۴ حدود ۲۱۶۰۰۰ نفر زن به سرطان پستان مبتلا شده و بیش از ۴۰۰۰۰۰ نفر جان خود را از دست داده‌اند (۱). در کشور ما نیز براساس مطالعه انیستیتو کانسر سرطان پستان ۱۰/۸ درصد از کل سرطان‌ها را در ایران تشکیل می‌دهد (۲). طبق مطالعات انجام شده در ایران شروع سرطان پستان حداقل یک دهه زودتر از شروع آن در کشورهای پیشرفته است (حدود ۴۴-۳۵ ساله) (۲). ریسک فاکتورهای

<sup>۱</sup> استادیار گروه آسیب‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

<sup>۲</sup> دانشیار گروه آسیب‌شناسی، مرکز تحقیقات بهداشت باروری، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران (نویسنده مسئول)

<sup>۳</sup> متخصص آسیب‌شناسی سرجیکال و بالینی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

<sup>۴</sup> دانشیار گروه پزشکی اجتماعی، مرکز تحقیقات بهداشت باروری، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

<sup>۵</sup> دستیار تخصصی آسیب‌شناسی سرجیکال و بالینی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

بیمار دست یافت و حتی پروتکل درمانی را بر اساس مشخصات تومور تغییر داد.

### مواد و روش‌ها

مطالعه ما یک مطالعه مقطعی-تحلیلی می‌باشد. تمام بیمارانی که با تشخیص کارسینوم داکتال پستان در طی سال‌های ۱۳۸۷-۱۳۸۳ در بیمارستان امام خمینی شهرستان ارومیه تحت ماستکتومی قرار گرفته‌اند به صورت سرشماری انتخاب و مجدداً از بلوک‌های پارافینی بیمارانی که در آرشیو پاتولوژی بیمارستان بایگانی شده بود برش‌هایی تهیه شد. برای تعیین سن، اندازه تومور و تعداد لنف نودهای درگیر زیر بغل به نتایج ثبت شده اطلاعات مندرج در گزارشات موجود در آرشیو بخش پاتولوژی بیمارستان امام خمینی مراجعه گردید.

از هر بلوک پارافینی ۵ برش به قطر ۴ میکرون تهیه شد که یکی از برش‌ها برای رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین و از بقیه جهت انجام رنگ آمیزی ایمنوهیستوشیمی برای مارکرهای Cyclin-D1, ER, PR, P-27 به روش Avidin-biotin peroxidase استفاده شد.

لام‌های رنگ آمیزی شده هماتوکسیلین و ائوزین برای ارزیابی grade هیستولوژی تومور براساس سیستم درجه بندی Nottingham modification of the bloom- Richardson مورد بررسی قرار گرفتند و براساس معیارهای این سیستم که شامل سه شاخص اصلی میتوز، پلئومورفیسم هسته و تشکیل توبول است نمره دهی شده و به سه grade (I, II, III) تقسیم شدند.

سایر برش‌های تهیه شده برای رنگ آمیزی ایمنوهیستوشیمی به روش Avidin-biotin peroxidase استفاده شد. براساس این سیستم برش‌ها ابتدا توسط گزیلول دیپارافینه و سپس با الکل آب دهی شد. آنگاه ۱۵ دقیقه در ماکروویو داخل محلول target retrieval قرار گرفت و سپس در دمای اتاق خنک شده و بعد توسط بافر تریس BPS با PH=7.2 شستشو داده شدند و به آن پراکسید هیدروژن ۳ درصد اضافه و بعد از ۵ دقیقه با تریس بافر شستشو داده شدند. در مرحله بعدی آنتی بادی منوکلونال مورد نظر افزوده شد و بعد از ۳۰ دقیقه مجدداً با تریس بافر شستشو داده شدند و به آن‌ها محلول اینوزن (Envision) اضافه و بعد از ۳۰ دقیقه با تریس بافر شستشو داده شد، سپس محلول کروموزن (Chromogen) اضافه و برای رنگ زمینه از رنگ هماتوکسیلین استفاده شد. در مورد Cyclin-D1 و p27 رنگ پذیری هسته در بیش از ۵ درصد سلول‌ها و در مورد ER و PR رنگ آمیزی

شیمی درمانی نیز کاملاً شناخته شده است (۵،۶). از آن جا که سیر بالینی سرطان پستان در هر بیمار متفاوت از سایر مبتلایان است شناخت عواملی که بتوانند به طور مستقیم یا غیر مستقیم سرنوشت نهایی بیمارانی را پیش بینی کند در تصمیم گیری بالینی، تعیین پیش آگهی و انتخاب درمان مفید است. در سال‌های اخیر توجه زیادی به استفاده از بیومارکرها در پیشگویی پاسخ به درمان و پروگنوز بیمارانی شده است (۶). از جمله این بیومارکرها Bcl-2 از خانواده پروتئین‌های تنظیم کننده آپوپتوز است و در سرطان پستان ارتباط بین بروز این بیومارکر با بیان گیرنده‌های استروئیدی و پاسخ به هورمون تراپی اثبات شده است (۵). در مورد بعضی دیگر از این بیومارکرها بررسی‌ها هنوز ادامه دارد و به طور قطع مشخص نشده است که کدام یک از آن‌ها نسبت به پارامترهای معمول مثل ساینز، تیپ هیستولوژی، متاستاز به لنف نود و درجه هیستولوژیکی، کمک بیشتری به تعیین پروگنوز می‌کند. مهم‌ترین بیومارکرهایی که مورد مطالعه قرار گرفته‌اند به شرح زیر می‌باشد:

Her-2/neu: که یک پروتئین کوزن روی کروموزوم ۱۷ و متعلق به خانواده گیرنده‌های عامل رشد است. در مطالعات انجام شده در ایران میزان تقویت این ژن در سرطان پستان ۶۰-۵۰ درصد بوده است (۲). مطالعات ثابت شده ارتباط این ژن با رفتار تهاجمی تومور، تمایز اندک با درجه هیستولوژیکی بالا و عدم وجود ریسپتورهای هورمونی را نشان داده‌اند (۶، ۷).

P27: جزو خانواده تنظیم کنندگان سیکل سلولی و جز مهار کنندگان کیناز وابسته به سیکلین می‌باشد و با ایجاد کمپلکس پایدار با این پروتئین‌ها، سیکل سلولی را مهار می‌کند. در مطالعات اخیر ارتباط آن با رفتار تهاجمی تومورهای پستان و بروز ریسپتورهای استروئیدی مد نظر قرار گرفته است (۸، ۶).

Cyclin-D1: در توقف سیکل سلولی نقش دارد در ۷۰-۳۰ درصد از سرطان‌های پستان، محصول پروتئینی این ژن با ایمنوهیستوشیمی رد یابی شده است (۷). و در خصوص ارتباط آن با فاکتورهای پروگنوستیک تحقیقات مختلفی انجام شده است که نتایج ضد و نقیضی ارائه کرده‌اند. (۹، ۱۰).

در نهایت با توجه به بروز این سرطان در سنین پایین تر در ایران، عدم غربالگری در مراحل زودرس و مراجعه دیر هنگام بیمارانی مشکلاتی در درمان و تعیین سیر بیماری در این افراد وجود دارد. بسیاری از این بیمارانی با توجه به شاخص‌های محدود قبلی در یک درجه (یا grade) بدخیمی قرار دارند ولی با گذشت زمان روند پیشرفت بیماری در هر فرد سیر بسیار متفاوتی را در بر می‌گیرد که به طور یقین با تاکید بر روی این بیومارکرها، می‌توان به پیش بینی عینی و منحصر به فردی در مورد رفتار تومور هر

اندازه تومورها از ۱/۵ cm تا ۱۰ cm متغیر بود که از این تعداد ۵ مورد کمتر و یا مساوی ۲cm (۱۳/۱٪)، ۲۴ مورد  $2 < T \leq 5$  (۶۳/۱٪) و ۹ مورد  $5 < T$  بالاتر (۲۳/۶٪) بودند تعداد لنف نودهای درگیر ۸ مورد در حد عدم درگیری (۲۱/۱٪) ۱۲ مورد بین ۱-۳ لنف نود (۳۱/۶٪) و ۱۸ مورد درگیری ۴ لنف نود و بیشتر (۴۷/۴٪) داشتند.

در خصوص بیان گیرنده‌های استروژنی ۱۴ نفر (۳۶/۸٪) ER مثبت و ۲۴ نفر (۶۳/۲٪) ER منفی داشتند. در خصوص بیان گیرنده‌های پروژسترونی نیز ۱۴ نفر (۳۶/۸٪) PR مثبت و ۲۴ نفر (۶۳/۲٪) PR منفی داشتند.

از ۳۸ بیمار مطالعه شده ۴ مورد از تومورها grade هیستولوژیکی I (۱۰/۵٪) ۲۵ مورد grade II (۶۵/۸٪) و ۹ مورد grade III (۲۳/۷٪) داشتند.

۱۸ بیمار P27 مثبت (۴۷/۴٪) و ۹ بیمار نیز Cyclin-D1 مثبت (۲۳/۷٪) بودند. (شکل ۱ و ۲)

هستهای در بیش از ۱ درصد سلول‌ها به عنوان موارد مثبت در نظر گرفته شد.

پس از جمع آوری اطلاعات، نتایج در نرم افزار SPSS وارد شد. نتایج متغیرهای کیفی به صورت جداول فراوانی و نمودار ارائه شد و جهت بررسی ارتباط بین متغیرها از آزمون  $\chi^2$  استفاده شد. سطح اطمینان کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار بود. جهت بررسی متغیرهای کیفی نیز از آزمون  $\chi^2$  دو استفاده شد.

### یافته‌ها

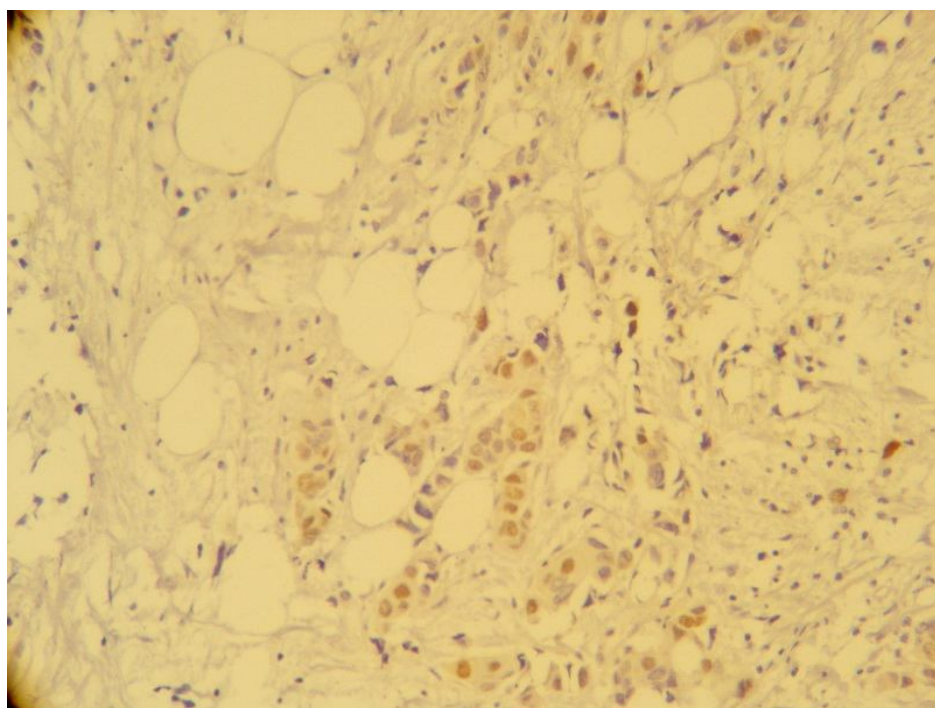
از فروردین ماه سال ۱۳۸۳ تا بهمن ۱۳۸۷ تعداد ۳۸ بیمار با تشخیص کارسینوم داکتال پستان در بیمارستان امام خمینی ارومیه تحت ماسکتومی قرار گرفتند. سن افراد مورد مطالعه از ۲۹ سال تا ۸۶ سال متغیر بود و ۶ مورد کمتر و مساوی ۳۵ سال (۱۵/۸٪) و ۳۲ مورد بیش از ۳۵ سال (۸۴/۲٪) سن داشتند.

جدول شماره (۱): توزیع فراوانی بروز P27 و ارتباط آن با متغیرهای بالینی

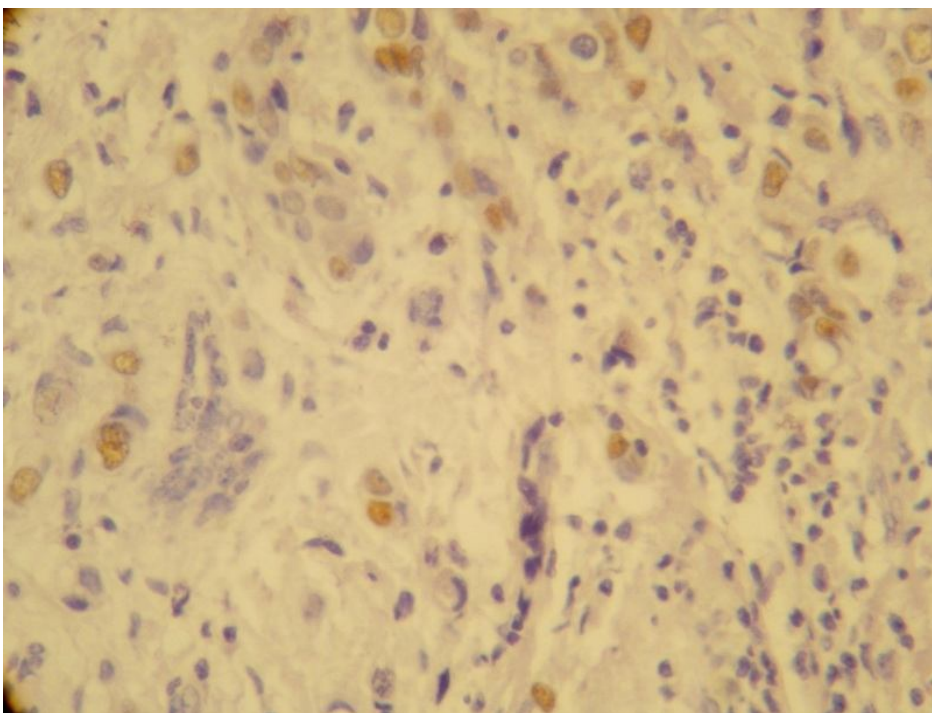
		P27 expression		
		positive	negative	Total
Age	35 years old or less	(16.7%) 3	(15%) 3	(15.8%) 6
	Above 35 years old	(83.3%) 15	(85%) 17	(84.2%) 32
Tumor size	$2\text{cm} \geq$	(22%) 4	(5%) 1	(13.8%) 5
	$2\text{cm} < T \leq 5$	(61.1%) 11	(65%) 13	(63.1%) 24
	$5\text{cm} <$	(16.6%) 3	(30%) 6	(23.6%) 8
Number of involvEd lymph nodes	0	(22.2%) 4	(20%) 4	(47.4%) 8
	1-3	(33.3%) 6	(30%) 6	(31.6%) 12
	$4 \leq$	(44.4%) 8	(50%) 10	(21.1%) 18
Estrogens receptors(ER) expression	Positive	(38.9%) 7	(35%) 11	(36.8%) 14
	Negative	(61.1%) 11	(65%) 13	(63.2%) 24
Progesterone receptors(PR) expression	Positive	(44.4%) 8	(30%) 6	(36.8%) 14
	Negative	(55.6%) 10	(70%) 14	(63.2%) 24
Histologic grade	I	(16.7%) 3	(5%) 1	(10.5%) 4
	II	(66.7%) 12	(65%) 13	(65.8%) 25
	III	(16.6%) 3	(30%) 6	(23.7%) 9

جدول شماره (۲): توزیع فراوانی بروز P27 و ارتباط آن با متغیرهای بالینی

		Cyclin D1 expression		
		Positive	Negative	Total
Age	35 years old or less	(22. 2%) 2	(13. 8%) 4	(15. 8%) 6
	Above 35 years old	(77. 8%) 7	(86. 2%) 25	(84. 2%) 32
Tumor size	$2\text{cm} \geq$	(22. 2%) 2	(10. 3%) 3	(13. 1%) 5
	$2\text{cm} < T \leq 5$	(66. 7%) 6	(62%) 18	(93. 1%) 24
	$5\text{ cm} <$	(11. 1%) 1	(27. 5%) 8	(23. 6%) 9
Number of involvEd lymph nodes	0	0	(27. 6%) 8	(21. 1%) 8
	1-3	(33. 3%) 3	(31%) 9	(31. 6%) 12
	$4 \leq$	(66. 7%) 6	(41. 4%) 12	(47. 4%) 18
Estrogens receptors(ER) expression	positive	(44. 4%) 4	(34. 5%) 10	(36. 8%) 14
	Negative	(55. 6%) 5	(65. 5%) 19	(63. 2%) 24
Progesterone receptors(PR) expression	Positive	(44. 4%) 4	(34. 5%) 10	(36. 8%) 14
	Negative	(55. 6%) 5	(65. 5%) 19	(63. 2%) 24
Histologic grade	I	0	(13. 8%) 4	(10. 5%) 4
	II	(77. 8%) 7	(62. 1%) 18	(65. 8%) 25
	III	(22. 2%) 2	(24. 1%) 7	(23. 7%) 9



شکل شماره (۱): رنگ آمیزی p27



شکل شماره (۲): رنگ آمیزی Cyclin-D1

### بحث و نتیجه گیری

طبق نتایج بدست آمده ارتباط معنی داری بین بیان P27 و Cyclin-D1 با متغیرهای بالینی و پاتولوژیکی سرطان پستان مانند سن بیمار، تعداد غدد لنفی درگیر زیر بغل، grade هیستولوژیکی و سایز تومور و نیز بیان رسپتورهای استروئیدی مشاهده نشد که در برخی از مطالعات قبلی نیز چنین نتیجه‌ای به دست آورده شده است.

در مطالعه‌ای که توسط Oh'yl و همکاران در سال ۲۰۰۱ صورت گرفت روی ۴۹ بیمار دچار کارسینوم داکتال پستان، ارتباط P21 و P27 و Cyclin-D1 با مشخصات کلینیکی و پاتولوژیکی تومور مانند سن بیمار، سایز تومور، مشخصات ماکروسکوپی، تیپ هیستولوژیکی تومور، درجه بدخیمی، نکروز و بروز رسپتورهای استروژن بررسی گردید و بیان Cyclin-D1 در ۵۹/۲ درصد تومورها و بیان P27 در ۴۶/۹ درصد تومورها مشاهده شد. در این مطالعه مشخص گردید که بین بروز Cyclin-D1 و P27 با هیچ‌کدام از پارامترهای ذکر شده ارتباطی وجود ندارد (۸).

در مطالعه‌ای دیگر که توسط Engin و همکاران در سال ۲۰۰۶ انجام گرفت ارتباط بروز Cyclin-D1 و P27 با پارامترهای پاتولوژیک و بالینی بررسی شد و مشخص گردید که بین بروز P27 و پارامترهای پاتولوژیک و بالینی ارتباطی وجود ندارد، ولی بین

بروز Cyclin-D1 و سایز تومور و درجه هیستولوژی آن ارتباط وجود دارد. البته تاکید شده است که باید اهمیت پروگنوستیک بیان Cyclin-D1 بیشتر مورد بررسی قرار گیرد (۱۱). در مطالعه‌ای که توسط Milar و همکاران در سال ۲۰۰۷ صورت گرفت بروز P27 و Cyclin-D1 در سرطان پستان و ارتباط آن با رسپتورهای هورمونی بررسی شد و مشخص شد که P27 با بروز رسپتورهای هورمونی ارتباط مثبت دارد ولی با درجه هیستولوژی تومور ارتباطی ندارد. در مورد Cyclin-D1 هیچ ارتباطی بین بروز آن و بروز رسپتورهای هورمونی، درجه بدخیمی و بقای بیماران یافت نشد (۱۲).

در مطالعه‌ای که توسط Pelson P و همکاران در سال ۱۹۹۶ در دانشگاه میلان ایتالیا روی ۱۸۰ بیمار دچار سرطان پستان صورت گرفت اهمیت بالینی بیان Cyclin-D1 در بیماران دچار سرطان پستان درمان شده با ادجوانت کموتراپی بررسی شد و مشخص گردید که بروز Cyclin-D1 با بقای بدون عود، پاسخ درگیری لنف نودها همراه است و این بیماران از درمان کموتراپی ادجوانت بعد از جراحی بیشتر سود می‌برند (۱۳).

در مطالعه‌ای که توسط Chiarle و همکاران در سال ۲۰۰۱ در دپارتمان پاتولوژی نیویورک آمریکا صورت گرفت نقش

در مطالعه ما ارتباط معنی داری بین بیان P27 و Cyclin-D1 و بروز رسپتورهای استروئیدی مشاهده نشد که با مطالعه Engin همخوانی دارد.

بدین ترتیب، در مطالعه ما هیچ‌گونه همراهی بین بیان P27 و Cyclin-D1 با متغیرهای بالینی و پاتولوژیکی سرطان پستان مشاهده نشد و بنابراین طبق این مطالعه استفاده از این دو مارکرها نمی‌تواند در پیشگویی رفتار بالینی کارسینوم داکتال پستان مفید باشد ولی با توجه به این که در مطالعات انجام شده قبلی نتایج ضد و نقیضی گزارش شده است شاید تفاوت‌های اقلیمی و نژادی و ژنتیکی در رفتار بیولوژیکی تومور پستان تأثیر گذار باشند. چنان که حتی در سن بروز این سرطان و بروز رسپتورهای استروئیدی تفاوت‌هایی در مناطق مختلف گزارش شده است. همچنان که مطالعه انجام شده توسط Kakarala در سال ۲۰۱۰ در دانشگاه میشیگان امریکا نشان داد که شیوع سرطان پستان در زنان هندی پاکستانی بیشتر از زنان قفقازی است و میزان منفی بودن رسپتورهای استروئیدی نیز در آن‌ها بیشتر است (۱۷).

#### پیشنهادات

توصیه می‌شود که نمونه‌های بیشتری بررسی گردد تا نتایج قابل اعتمادتری حاصل گردد و همچنین مارکرهای دیگری نیز به مطالعات اضافه شوند تا در صورت امکان این مارکرها بتوانند نتایج ثابت تری برای تعیین پیش آگهی بیماران بدست آورند.

پروگنوستیک P27 در سرطان پستان مورد مطالعه گرفت و نشان داد که P27 با بروز گیرنده‌های استروئیدی و Cyclin-D1 مرتبط است و نتیجه گرفتند که P27 در تومورهایی که پارامترهای بقاء معمول در آن‌ها مفید نیست (مثل تومورهای کوچک و بدون متاستاز به لنف نودها) دارای ارزش پیش بینی کننده است (۱۴).

در مطالعه انجام شده توسط Nicholas P Tobin و همکاران در سال ۲۰۱۱ در دانشگاه منچستر صورت گرفت همراهی بین بروز پایین Cyclin-D1 و وجود پارامترهای تهاجمی در انواع زیر گروه‌های سرطان پستان مطرح شد (۱۵).

در مطالعه انجام گرفته توسط Nehad MR و همکاران در سال ۲۰۱۰ در دانشگاه مینیا در مصر، ارتباط بروز Cyclin-D1 با پارامترهای بالینی و پاتولوژیکی و بروز رسپتورهای استروئیدی بررسی گردید و ارتباط مستقیم بین بروز Cyclin-D1 و ورسپتورهای استروئیدی و همچنین Low histologic grade و اندازه کوچک‌تر تومور نشان داده شد (۱۶).

در مطالعه ما بیان P27 ۴۷/۴ درصد بود که با مطالعه انجام شده توسط Oh<sup>'</sup>yl (۴۶/۹٪) همخوانی داشت. بیان گیرنده پروژسترون (۳۵، ۷٪) با مطالعه انجام شده توسط نقش وار همخوانی داشت. در مطالعه ما بیان P27 و Cyclin-D1 با هیچ یک از پارامترهای بالینی و هیستولوژیکی در کارسینوم داکتال پستان ارتباط نداشت که با مطالعات Oh<sup>'</sup>yl و همکارانش، مطالعه Engin و همکارانش و همچنین مطالعه Millar هماهنگی داشت.

#### References:

1. Kaspar DL, Fauci As, Longo DL, Braunwald E, Hauser SL, Jamenson JL. Harison's principle of internal medicine. 16<sup>th</sup> Ed. Newyork: McGraw-Hill; 2005. p. 516
2. Naghshvar F, Torabizadeh Zh, Emadian O, Zare A, Ghahremani M. Status of estrogene, progesterone receptors and HER-2/neu expression in invasive breast cancer. J Gorgan Univ Med Sci 2007;8(4):64-7. (Persian)
3. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Pathologic basis of disease. 7<sup>th</sup> Ed. philadelphia: Elsevier Saunders; 2005.
4. Jalali MR, Jaseb K, Valaie N. Relationship between age, histological malignancy and prognosis of patients with breast cancer. Feyz 2001;5(4): 68-73. (Persian)
5. Rosai J. Rosai and Ackermen's Surgical Pathology. 9<sup>th</sup> Ed. Edinbargh: Mosby; 2004. P. 1824-7.
6. Sharifi-Systani N, Sadeghian MH, Homaei F, Haghghi F. Immunohistochemical study of cell proliferation marker (Ki-67), estrogen, and progesterone receptors expression in breast carcinoma. J Birjand Univ Med Sci 2006; 13 (3):9-15. (Persian)
7. Weidner N, Cote RJ, Suster S, Weiss LM. Modern surgical Pathology. 1<sup>st</sup> Ed. Philadelphia: Saunders; 2003.
8. Cho EY, Choi YL, Har JJ, Kim KM, Oh YL. Expression and amplification of Her2, EGR and cyclin D1 in breast cancer: immunohistochemistry and chromogenic insituhybridization. Pathol Intern 2008; 58: 17-25.

9. Oh YL , Cho JS , Song SY , KO YH , Han BK , Nam SJ , et al. Expression of P21 , P27 and cyclin D1 proteins in breast ductal carcinoma insitu: Relation with clinico. pathologic characteristics and with p53 expression and estrogen receptor status. *Pathol Intern* 2001; 51(2): 94-9.
10. Bilalovic N, Vranic S, Basic H, Tatarevic A, Sellak I. Immunohistochemical evaluation of Cyclin D1 in breast cancer. *Croat Med J* 2005; 46(3): 382-8.
11. Engin H, Baltali E, Guler N, Guler G, Tekazman G, Uner A. Expression of PTEN, cyclin D1, P27 /kip1 in invasive ductal carcinomas of the breast and correlation with clinnicopathological parameters. *Bull Cancer* 2006; 93(2): 21-6.
12. Millar EK, Tran K, Marr P, Graham PH. P27, cyclin A and cyclin D1 Protein expression in ductal carcinoma insitu of the breast: P27 correlates with hormone receptor status but not with local recurrence. *Pathol Inthol Intern* 2007; 57: 183-9.
13. Pelosio P, Barbareschi M, Bonoldi E, Marchetti A, Verderio P, Caffo O, et al. Clinical significance of cyclin D1 expression in patients with node positive breast carcinoma treated with adjuant therapy. *Ann Oncol* 1996; 7(7): 695-703.
14. Chiarle R, Pagano M, Inghirami G. The cyclin dependent kinase inhibitor P27 and its prognostic role in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2001; 3: 91-4.
15. Tobin NP, Sims AH, Lundgern KL, Lehn S, Landberg G. Cyclin D1, ld1 and EMT in breast cancer. *BMC Cancer* 2011; 11: 417.
16. Nehad MR, Abde El-Maqsoud and Moatasem M. Aly. Significance of cyclin d1 overexpression and amplification in ductal hyperplasia, carcinoma in situ and invasive carcinoma in egyptian female breast. *Intern J Cancer Res* 2010; 6 (4): 202-19.
17. Kakarala M, Rozek L, Cote M, Liyanage S, Brenner DE. Breast cancer histology and receptors status characterization in Asian Indian and Pakistani women in the US: a SEER analysis. *BMC Cancer* 2010; 10: 191.