

# A PRELIMINARY STUDY: COMPARATIVE PROTEOMIC PROFILING OF BREAST CANCER TISSUE AND METASTATIC AXILLARY LYMPH NODE

## BİR ÖN ÇALIŞMA: MEME KANSERİ DOKUSUNUN VE AKSİLLER METASTATİK LENF NODUNUN PROTEOMİK PROFİLLENMESİ

Gürler Akpınar<sup>1</sup>, Turgay Şimşek<sup>3</sup>, Murat Kasap<sup>1,2</sup>, Nuh Zafer Cantürk<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Birimi (KABİ), Proteomiks Laboratuvarı, Kocaeli, Türkiye

<sup>2</sup>Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Kocaeli, Türkiye

<sup>3</sup>Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı, Kocaeli, Türkiye

### ABSTRACT

**Objective:** Breast cancer remains one of the most common malignancies affecting women. In breast cancer, axillary lymph node (ALN) involvement is a useful clinical parameter for decision-making. Although ALN dissection is associated with upper extremity lymphoedema and other morbidities, the presence of ALN metastasis is the most important prognostic factor predicting breast cancer patient survival. The prediction of ALN metastasis by evaluating expression of tumor-related proteins of primary breast cancer is potentially a promising approach because the primary tumor is readily assessed.

**Materials and Methods:** Proteomic analysis has become an effective tool in breast cancer research. In this preliminary study, we aimed to examine the changes in protein expression patterns between the primary tumor and its axillary lymph node (ALN) metastasis of breast cancer. A robust and highly reliable proteomics approach that is based on two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) and spot image analysis was used.

**Results:** In the light of our image analysis, we hypothesized that proteomics could predict ALN metastasis by pinpointing the alterations in protein profiles of primary breast cancer and axillary lymph node tissues. Results obtained from analysis of 2DE images revealed the presence of 24 conserved protein spots between primary breast cancer and its axillary lymph node tissue.

**Conclusion:** These candidate proteins may provide clues to the molecular mechanism of cancer spread into the lymphatic tissue and may allow early detection of this devastating disease.

**Key words:** Breast cancer, axillary, lymph node, 2D-PAGE, proteomics

### ÖZET

**Amaç:** Meme kanseri kadınlarda en sık görülen malignitelerden biri olmaya devam etmektedir. Aksiller lenf nodu (ALN) tutulumu meme kanserinde tedavi yöntemlerine karar verme aşamasında kullanışlı bir klinik parametredir. ALN diseksiyonu üst ekstremitelerde lenf ödem ve diğer morbiditelere neden olabileceği ALN'nda metastaz olması meme kanseri hastalarında sağ kalımı öngörmede en önemli prognostik faktördür. Primer meme kanserinin tümör ile ilişkili proteinlerin ekspresyonunun değerlendirilmesi ile ALN'nda metastaz öngörülmesi açısından primer tümör ile ilgili bilgimiz olduğu için potansiyel olarak yararlı bir yaklaşımdır.

**Yöntem ve Gereçler:** Proteomik analiz meme kanseri araştırmalarında kullanılan bir araçtır. Bu ön çalışmada biz primer tümör ve meme kanserinin ALN'na metastazı arasında protein ekspresyon içeriğindeki değişiklikleri araştırmak istedik. Bu amaçla iyi ve oldukça güvenilir bir proteomik yöntemi olan iki boyutlu poliakrilamid jel elektroforez (2D-PAGE) ve spot görüntüleme analizi kullanıldı.

**Bulgular:** Bizim görüntüleme analizlerimizin ışığı altında proteomik primer meme kanseri ve ALN dokusunda protein profilini tanımlamak suretiyle ALN metastazının öngörülebileceğini hipotezledik. 2DE analizinden elde edilen sonuçlar, primer meme kanseri ve ALN dokusu arasında 24 protein spotunun varlığını gösterdi.

**Sonuç:** Bu aday proteinler lenfatik dokuya kanser yayılımının arkasındaki gerekçeleri ortaya koyabilir ve bu hayatı tehdit eden hastalığın erken tanısına yardımcı olabilir.

**Anahtar sözcükler:** Meme kanseri, aksiller, lenf nodları, 2D-PAGE, proteomiks

**M**eme kanseri halen ülkemizde ve dünyada, kadınlar da en fazla ölüme sebebiyet veren kanser tipleri arasında birinciliğini korumaktadır (1). Hastalığın ilerleyişi göz önüne alındığında, meme kanserinin diğer organ ve dokulara metastazı öncelikli olarak lenfatik sistem aracılığı ile olmaktadır (2). Yakın lenf nodlarına metastazın ardından karaciğer, akciğer ve kemikler gibi uzak organ tutulumları sıklıkla görülmektedir (3, 4). Hastalığın ilerleyişini belirleyen pek çok değişken olmasına rağmen, lenf nodu metastazı tek başına evreleme de ve prognozu belirlemede en önemli faktör olduğu kadar uygulanacak tedavinin seçiminde de ilk bakılan kriterdir (5, 6).

Metastatik meme kanserlerinde aksiller lenf nodu (ALN) metastazı görülen hastaların görülmeyenlere oranla çok daha kötü prognoza sahip oldukları ve ALN tutulumunun klinik kararları etkileyen en önemli prognostik parametre olarak hala geçerliliğini koruduğu görülmektedir (7). ALN negatif hastaların ALN'si pozitif olanlara göre daha iyi prognozu olduğunu gösteren çok sayıda çalışma vardır (8, 9). Çalışmalar metastatik lenf nodu sayısının adjuvan tedavi kararını etkileyen önemli bir parametre olduğunu göstermektedir (7, 10). Bütün bu verilere rağmen ALN negatif olup yaygın metastaz ile seyreden ya da aksi durumda 10 yıllık sağ kalım analizlerinde hastalısız seyreden hastaların olması bu işlemin öneminin sorgulanmasına neden olmuştur (11, 12). Ayrıca Aksiler lenf nodu metastazını değerlendirmek için yapılan aksiler lenf nodu diseksiyonu en önemli morbidite nedenlerinden biri olduğu için sentinel lenf nodu biyopsisi (SLNB) gündeme gelmiştir. Bu gelişmeye rağmen SLNB sonrası dahi lenf ödem olabildiğinin gösterilmesi ameliyat öncesi daha az invazif yöntemler ile aksillerin değerlendirilmesi gerekliliğini ortaya koymuştur (13).

Bizler bu çalışmamızda hepsi invaziv duktal karsinom (IDK) tip olan meme kanserli hastalardaki primer tümör ve metastaz olan ALN'daki benzerlikleri iki boyutlu jel elektroforezi (2DE) tabanlı proteomiks yöntemlerle ortaya koyarak metastatik meme tümörlerine ait model geliştirmeyi amaçladık. Elde ettiğimiz protein profilleri bu yöntemin protein array profili geliştirmeye uygun olduğunun verilerini elde ettik.

## Yöntem ve Gereçler

### Doku örneklerinin toplanması

Çalışma için Kocaeli Üniversitesi İnsan Araştırmaları Etik Kurulundan etik onayı alındıktan sonra örnek toplama aşamasına geçildi.

Örnekler pre-operatif olarak herhangi bir neo-adjuvant kemoterapi veya radyoterapi almamış hastalardan Aydınlatılmış Onam formu imzalandıktan sonra cerrahi müdahale esnasında alındı (Tablo 1). Örneklerden patolojik tanıyı etkilemeyecek şekilde cerrahi sınırlar içerisinde ayrılan parça sıvı azot içerisinde Proteomiks laboratuvarına ulaştırıldı. Patolojik tanısı araştırmaya uygun olan örnekler araştırmaya dâhil edildi. Hepsı IDK ve ALN tutulumu olan altı hasta çalışmaya dahil edildi (Tablo 1).

### Örneklerden protein ekstraksiyonu

Doku örnekleri çalışma başlangıcına kadar -80°C'de saklandı. Protein ekstraksiyonu öncesi örnekler buz üzerinde çözülerek soğuk fosfat tamponu (PBS) ile en az üç defa yıkanarak kandan uzaklaşması sağlandı. İyice yıkanan dokulardan görünür yağ dokusu steril bisturi aracılığı ile uzaklaştırılarak dokular ekstraksiyon için uygun olan küçük parçalara bölünerek mikrosantrifüj tüpü içerisine transfer edildi.

Protein ekstraksiyonları için ~30-50 mg primer tümör dokusu ve ALN kullanıldı. Protein ekstraksiyonun da her iki örnek tipi için de aynı metodoloji uygulandı. Mikrosantrifüj tüpü içerisinde bulunan doku parçaları üzerine 100 µl TPER (Pierce Inc. ABD) doku protein ekstraksiyon tamponu ve proteaz inhibitörü (Sigma, ABD) eklendi. Daha sonra üretici firmanın protokolüne uygun olarak (Next Advance Inc. ABD) mikrosantrifüj tüpleri içerisine dokuları parçalamak için önerilen miktarda 1.6 mm paslanmaz çelik boncuklar eklendi. Bullet Blender (Next Advance Inc. ABD) doku homojenizatörü kullanarak +4°C'de tüm primer tümör/lenf nodları aynı anda ve şartlarda homojenize edildi. Tüm çalışmalar buz üzerinde gerçekleştirildi.

Homojenize olan dokular +4°C'de ile 15 dk ilk önce 10000 rpm de santrifüj edilerek çelik boncuklardan ve doku kalıntılarından temizlendi ardından aynı şartlarda 20 000 rpm de tekrar santrifüj edildi. Santrifüj sonrası supernatant Lo-binding tüplere alındı. Protein konsantrasyonları Lowry (Bio-Rad, ABD) assay ile belirlendi ve örnekler deneylerde kullanılabilecek kadar sıvı azot içerisinde hızla dondurulup -80°C'de saklandı.

### İki boyutlu jel elektroforezi (2D-PAGE)

Protein örnekleri (100 µg) 2D rehidrasyon tamponu (8M Üre, %0.2(w/v) Bio-Lyte 3/10 ampholytes, %2 CHAPS, 50 Mm dithiothreitol (DTT) ve Bromophenol Blue) ile resuspend edildikten sonra 17 cm, linear, pH 3-10 immobilize pH gradient striplere (IPG strips,

Tablo 1. Hastalara ait klinik bulgular.

Hasta Kodu	Yaş	Evre	TÇ	ALN durumu	ER	PR	C-erb B 2	Grad	AÖ	Lokalizasyon
SB #1	55	IIla	8.5 cm	2/19	+	-	-	2	-	Sağ
HG #2	35	IIla	5.5 cm	12/17	+	+	-	2	-	Sağ
NE #3	70	IIla	2.5 cm	6/17	+	+	-	2	-	Sol
PE #4	65	IIla	2.1 cm	8/16	+	-	-	2	-	Sağ
ŞB #5	59	IIla	3.0 cm	4/13	+	-	+	2	-	Sağ
HM #6	50	IIb	2.7 cm	2/15	+	+	+	2	-	Sol

TÇ: tümör çapı, ER: östrojen reseptörü, PR: progesteron reseptörü, AÖ: aile öyküsü, ALN durumu: Metastatik ALN sayısı/Toplam ALN sayısı

Bio-Rad, US) aktif rehidrasyon (50 µA/IPG strip, 20°C, gece boyu) ile PROTEAN IEF Cell (Bio-Rad,US) kullanılarak striplerin protein örnekleri ile rehidre olması sağlandı. Örneklerin izoelektrik fokuslanmaları (IEF) şu şekilde gerçekleştirildi: 20°C'de her bir IPG strip için lineer artış modunda 20 dk 200V, 2 saat 10000V ve 40000 V-saat'e ulaşına kadar. Fokuslanmanın ardından IPG stripler dengeleme tampon I (6M üre, 0.375M tris-HCL pH8.8, 2% SDS, 20% gliserol, 2% (w/v) DTT) ve tampon II (6M üre, 0.375M tris-HCL pH8.8, 2% SDS, 20% gliserol, 2% (w/v) iodoasetamid) içerisinde 15 dk'lık sürelerle yıkandılar. İkinci boyutta ayırım için hazırlanan 1,0 mm kalınlığındaki 12%'lik SDS poliakrilamid jellere yerleştirilerek elektroforez (35mA 30 dk, 48mA 5 saat, 16°C'de) ile moleküler büyüklüklerine (MW) göre ayırma tabii tutuldular. Bütün örnekler aynı anda 12 jel yürütme kapasiteli Protean Plus Dodeca Cell (Bio-Rad, US) kullanılarak yürütüldüler. Her örnekten üç adet tekrar yapıldı. Jeller 6 saat fiksasyon (%40 metanol, %10 asetik asid) sonrasında SYPRO Ruby (Bio-Rad, US) ile boyanarak protein spotları görünür hale getirildi.

#### 2DE jellerin analizi

Analizler için jellerin görüntüleri VersaDoc4000MP sistemi (Bio-Rad, US) kullanılarak alındı. Jel görüntülerinin ilk analizleri Quantity One (Bio-Rad, US) yazılımı ile gerçekleştirildikten sonra PDQuest Advance (Bio-Rad, US) versiyonu ile spot analizleri yapıldı. Ortak ve farklı ekspresyon gösteren protein spotları her hastaya ait primer tümör ve ALN görüntüleri kullanılarak her bir grup için hem kendi içlerinde hem de gruplar arasında karşılaştırma yapıldı. Spot analizi öncesi alınan her jel için analizde kullanılan tüm spotlarının toplam densitelerinin her bir spotun intensitelerine oranlanması ile normalizasyon yapıldı. Artan veya azalan protein ekspresyonları gösteren spotlar istatistiksel olarak iki kat kriterine uygun olanlar arasından seçilmiş ve analize dâhil edilmiştir.

#### Bulgular

Bu çalışmaya Tablo 1'de görüldüğü gibi 5 evre 3a ve 1 evre 2b meme kanseri olan kadın hasta alındı. Olguların hepsi histolojik olarak grad II ve hormon reseptör pozitif olgulardı. İki nolu olgu dışında tüm olgular postmenopozal hastalardı. Çalışmaya katılan olgulardan alınan örneklerden hazırlanan 2D jeller üzerinde görülen, meme ve lenf dokuları arasındaki protein spotlarındaki farklılıklar deneye katılmayarak, ALN metastazında rol oynayabilecek ortak protein spotlarını bulma yönüne gidildi. Karşılaştırmalı olarak gerçekleştirilen spot analizleri ile 2D jeller üzerinde her bir jel için 750±50 adet protein spotunun bulunduğunu gözlemlendi. Ancak analiz sonucunda tespit edilen bu spotların birçoğu miktar olarak analiz limitlerinden düşük ve gruplar içi (meme dokusu örneklerinin oluşturdukları; Grup 1, lenf dokusu örneklerinin oluşturdukları; Grup2, jelden jelle varyasyon gösteriyordu (Şekil 1A, B). Her bir grup içerisindeki bütün örneklerden yapılan jellerde tutarlı olarak ekspresyon edilen (Gruplar içerisinde her jelde ekspresyonu gözlenen) spotlar geçerli spot olarak analize dahil edilirken, gruplar içi spot analizi sonucunda gruplar içi jeller arasında ekspresyon farklılığı gösteren (grup içi jellerin her birisinde gözlenemeyen) protein spotları analizlerde dışarıda bırakılarak, bu spotlar gruplar arası karşılaştırmada göz önüne alınmadı. Bu yaklaşımla, jelden jelle değişiklik göstermeyen korunmuş protein spotlarını belirleyebilmek için meme dokusunu (Grup 1) ve lenf dokusunu (Grup 2) kendi içlerinde spot analizine tabii tuttuk (Şekil 1C). Her bir grup için değişmeyen ekspresyona gösteren protein spotlarını tespit ettikten

sonra meme ve lenf dokusu spot analiz sonuçlarını birbirleri ile karşılaştırarak iki grup arasında benzer protein spotlarının hangileri olduğunu belirledik. Yaptığımız bu analiz sonucunda ise toplam 24 adet protein spotunun her iki grupta da değişmediğini ve ortak olduğunu gözlemledik.

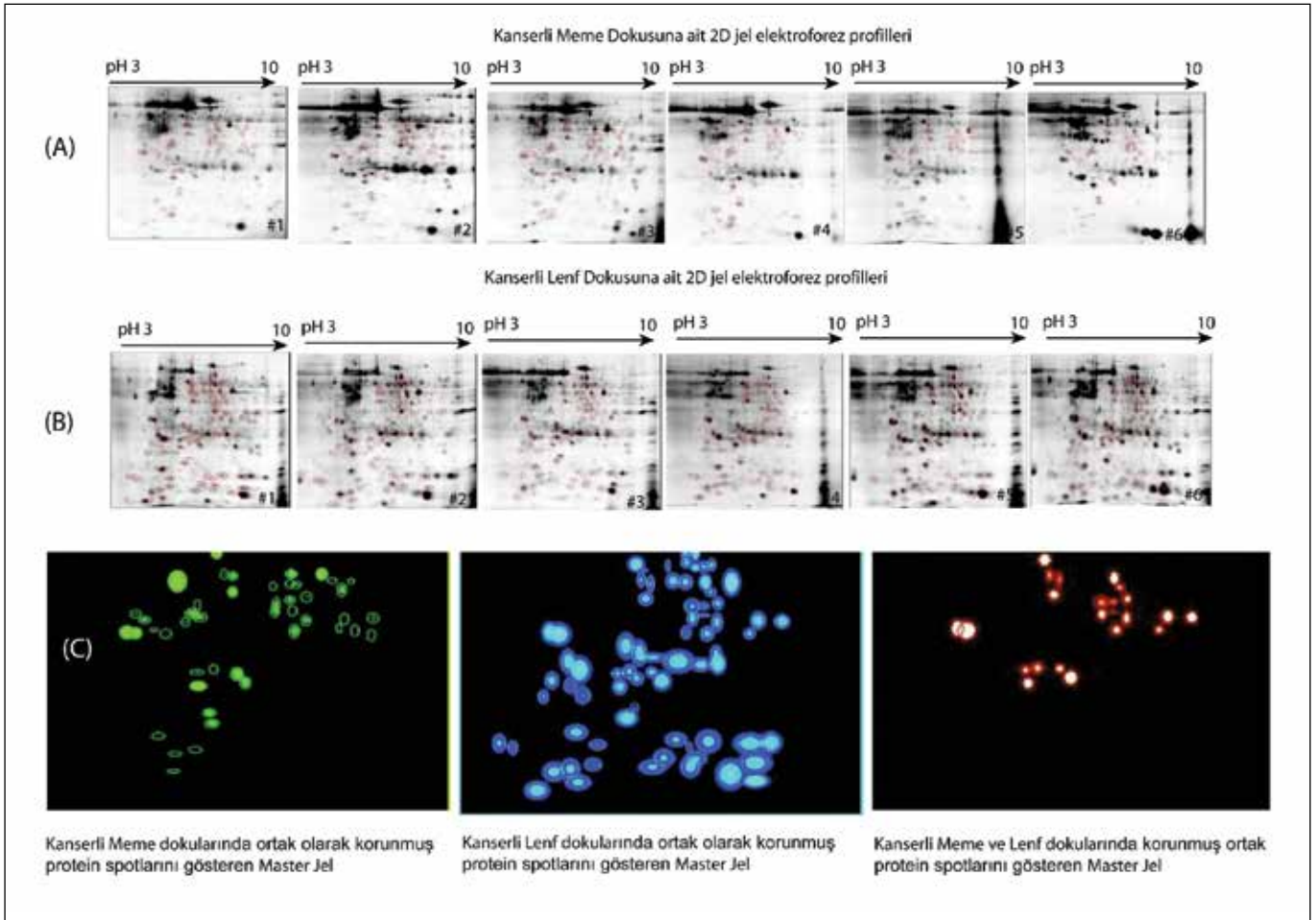
#### Tartışma ve Sonuçlar

Tümörde evreleme fizik muayene, biyopsi ve görüntüleme testlerine göre yapılır. Bu hastaların tedavilerinin planlanması ve prognoz tahmininde çok önemlidir. Meme kanserinde primer tümörden ayrılan hücreler ilk olarak aksiller lenf nodlarına giderler (14). Biz bu çalışmada meme kanseri hastalarında aksiller lenfatik metastazın preoperatif belirlenmesinde primer tümör ile lenf bezlerindeki protein ekspresyon profilinde olan değişiklikleri incelemek istedik. Lenfatik metastazın uzak organ metastazından bağımsız olarak oluştuğunu ve iki süreci birbirinden ayıran moleküler mekanizmaların da farklı olduğunu düşündüren veriler vardır (13). cDNA mikroarray yöntemi kullanılarak yapılan çalışmalarda primer meme tümörü dokusu ile onun metastaz yaptığı lenf bezinde gen ekspresyon profili incelenmiş ve bunların birbirine çok benzediği ve bilinen gen alt grupları açısından transkripsiyonel düzeyde fark olmadığı iddia edilmiştir (13). Ancak diğer bazı çalışmalarda ALN metastazının primer tümörden moleküler olarak farklı olduğu ileri sürülmüştür (15-18).

Primer meme tümörü ve lenf nodu metastazı arasındaki ilişkiyi araştıran pek çok farklı çalışma yapılmıştır. Bu anlamda primer tümör ile lenfatik metastazın histolojik ve proliferasyon çalışmalarında benzer fenotipik özelliklerinin olduğu gösterilmiş, bu durum mikroarray ekspresyon yöntemlerinin kullanıldığı transkriptomik düzeyde de teyit edilmiştir (15, 19-21). Bu arada kromozom analizleri primer tümör ve onun metastazı olan lenf nodunun kromozomlarının karşılaştırmalı genomik hibridizasyon yöntemi ile incelendiğinde farklılıklar olduğu gösterilmiştir, fakat yapılmış olan bütün bu çalışmalara rağmen elde edilen sonuçlar ortaya tutarlı bir profil koyamamıştır (13, 22).

İlgi çekici bir diğer yaklaşım ise Lee ve arkadaşlarının 2012 yılında gerçekleştirmiş oldukları çalışmadır. İki boyutlu jel elektroforezi tabanlı proteomik yaklaşım kullanarak yaptıkları bu çalışmada lenf nodu (N0, N1 ve N2) evrelerine göre sınıflandırdıkları meme kanseri hastalarında protein profilindeki değişimi incelemişlerdir. Jel analizleri sonucunda 12 tanesi up regule ve bir tanesi down regule olan 13 protein spotu tespit etmişlerdir. LC-MS/MS analizi calreticulin ve tropomyosin alpha 3 zinciri proteinlerinin N0,N1 ve N2 evrelerinin üçünde de ortak olarak upregule olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca evre N0 için HSP70, evre N1 için 80k protein H prekürsörü ve protein disülfid izomeraz (PDI), evre N2 içinse 78 kDa glukoz regule proteini potansiyel biyobelirteçler olarak kullanılabilir bulmuşlardır (23).

Meme kanseri hastalarında primer tümör ile ALN'nu protein profillerini çıkarıp, karşılaştırmak ve benzerliklerden yararlanarak lenf noduna metastazı preoperatif tanılamamıza yardımcı olacak bir yöntem bulmak için yaptığımız bu çalışmada hem primer tümörde hemde aksillada değişmeyen ekspresyon gösteren protein spotlarını birbirleri ile karşılaştırarak iki grup arasında 24 adet protein spotunun her iki grupta da değişmediğini ve ortak olduğunu



**Şekil 1.** Primer meme kanseri, Grup 1 (A) ve ALN, Grup 2 (B) dokularının 2D-jel analizi. Primer meme kanseri ve ALN dokularında elde edilen jellerin analizi sonucu tutarlı ekspresyon gösteren spotların karşılaştırılması ile elde edilen korunmuş 24 spot (C) belki meme kanserinin lenf noduna yayılımının arkasındaki mekanizmayı açıklamada yardımcı olabilir.

gözlemledik. Ortaklık gösteren ve göstermeyen proteinler lenfatik dokuya olan primer kaynaklı metastazın gelişiminin arkasındaki ipuçlarını verebilir ve preoperatif lenfatik metastazın varlığının saptanmasında antijen-antikor ilişkisi kullanılarak işe yarayabilir. Burada ön çalışma verilerini sunduğumuz çalışmamızın bundan sonraki basamaklarında her iki grup içinde örnek sayısının artırılmasının yanında metastatik ve metastatik olmayan lenf bezlerindeki farklılıklarında ortaya konulmasına çalışılacaktır. Ayrıca meme kanseri alt gruplarında yani triple negatif, hormon pozitif yada Her 2 pozitif olanlarda karşılaştırma yapılacaktır. Elde edilen protein spotları laboratuvarımızda bulunan MALDI TOF/TOF cihazı ile ana-

liz edilerek (pozitif iyon modunda, 400-3000 m/z arasında) protein spotlarının isimlendirmesi yapılacaktır. Protein isimlendirmesinin ardından elde ettiğimiz proteinlerin eğer piyasada varsa antikorları alınarak elde ettiğimiz proteinlerin verifikasyonları yapılacaktır. Verifikasyonun ardından bu proteinlerin hangi hücresel yollarda rol aldıklarını anlayabilmek için Ingenuity Pathway Analysis (IPA) gerçekleştirilecektir.

#### Çıkar Çatışması

Bu çalışma Kocaeli Üniversitesi BAP Birimine ait 2012/018 nolu proje tarafından desteklenmektedir.

#### Kaynaklar

1. Ozmen V. Breast cancer in the world and Turkey. Meme Sağlığı Dergisi 2008; 4: 7-12.
2. Cunnick GH, Jiang WG, Douglas-Jones T, Watkins G, Gomez KF, Morgan MJ, et al. Lymphangiogenesis and lymph node metastasis in breast cancer. Mol Cancer 2008; 6: 23. (PMID: 18325094) [CrossRef]
3. Kohn EC, Liotta LA. Molecular Insights into Cancer Invasion: Strategies for Prevention and Intervention. Cancer Res 1995; 55: 1856-62. (PMID: 7728753)
4. Alitalo A, Detmar M. Interaction of tumor cells and lymphatic vessels in cancer progression. Oncogene 2012; 31: 4499-508. (PMID: 22179834) [CrossRef]

5. Nemoto T, Natarajan N, Bedwani R, Vana J, Murphy GP. Breast cancer in the medial half. Results of 1978 National Survey of the American College of Surgeons. *Cancer* 1983; 51: 1333-8. (PMID: 6825053) [\[CrossRef\]](#)
6. Rakha EA, Morgan D, Macmillan D. The prognostic significance of early stage lymph node positivity in operable invasive breast carcinoma: number or stage. *J Clin Pathol* 2012; 65: 624-30. (PMID: 22523340) [\[CrossRef\]](#)
7. Dent DM. Axillary lymphadenectomy for breast cancer. Paradigm shifts and pragmatic surgeons. *Arch Surg* 1996; 131: 1125-7. (PMID: 8911250) [\[CrossRef\]](#)
8. Mirza A N, Mirza NQ, Vlastos G, Singletary SE. Prognostic factors in node-negative breast cancer: a review of studies with sample size more than 200 and follow-up more than 5 years. *Annals Surg* 2002; 235: 10-26. (PMID: 11753038) [\[CrossRef\]](#)
9. Rack B, Janni W, Gerber B, Strobl B, Schindlbeck C, Klanner E, et al. Patients with recurrent breast cancer: does the primary axillary lymph node status predict more aggressive tumor progression? *Breast Cancer Res Treat* 2003; 82: 83-92. (PMID: 14692652) [\[CrossRef\]](#)
10. Woodward WA, Vinh-Hung V, Ueno NT, Cheng YC, Royce M, Tai P, et al. Prognostic value of nodal ratios in node-positive breast cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24: 2910-6. (PMID: 16782931) [\[CrossRef\]](#)
11. Rosen PR, Groshen S, Saigo P E, Kinne DW, Hellman S. A long-term follow-up study of survival in stage I (T1N0M0) and stage II (T1N1M0) breast carcinoma. *J Clin Oncol* 1989; 7: 355-66. (PMID: 2918331)
12. Hellman S. Karnofsky Memorial Lecture. Natural history of small breast cancers. *J Clin Oncol* 1994; 12: 2229-34. (PMID: 7931493)
13. Weigelt B, Wessels LF, Bosma AJ, Glas AM, Nuyten DS, He YD, et al. No common denominator for breast cancer lymph node metastasis. *Br J. cancer* 2005; 93: 924-32. (PMID: 16189523) [\[CrossRef\]](#)
14. Stacker SA, Achen MG, Jussila L, Baldwin ME, Alitalo K. Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 573-83. (PMID: 12154350) [\[CrossRef\]](#)
15. Feng Y, Sun B, Li X, Zhang L, Niu Y, Xiao C, et al. Differentially expressed genes between primary cancer and paired lymph node metastases predict clinical outcome of node-positive breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2007; 103: 319-29. (PMID: 17123152) [\[CrossRef\]](#)
16. Suzuki M, Tarin D. Gene expression profiling of human lymph node metastases and matched primary breast carcinomas : clinical implications. *Mol Oncol* 2007; 1:172-80. (PMID: 19383293) [\[CrossRef\]](#)
17. Vecchi M, Confalonieri S, Nuciforo P, Viganò MA, Capra M, Bianchi M, et al. Breast cancer metastases are molecularly distinct from their primary tumors. *Oncogene* 2008; 27: 2148-58. (PMID: 17952122) [\[CrossRef\]](#)
18. Li J, Gromov P, Gromova I, Moreira JM, Timmermans-Wielenga V, Rank F, et al. Omics-based profiling of carcinoma of the breast and matched regional lymph node metastasis. *Proteomics* 2008; 8: 5038-52. (PMID: 19003862) [\[CrossRef\]](#)
19. Daidone MG, Silvestrini R, Valentini B, Persici P, Mezzanotte G, Squicciarini P, et al. Proliferative activity of primary breast cancer and of synchronous lymph node metastases evaluated by [3H]-thymidine labelling index. *Cell Tissue Kinetics* 1990; 23: 401-8. (PMID: 2245439)
20. Goodson WH, Ljung BM, Moore DH, Mayall B, Waldman FM, Chew K, et al. Tumor labeling indices of primary breast cancers and their regional lymph node metastases. *Cancer* 1993; 71: 3914-9. (PMID: 8508357) [\[CrossRef\]](#)
21. Lähdesmäki H, Hao X, Sun B, Hu L, Yli-Harja O, Shmulevich I, et al. Distinguishing key biological pathways between primary breast cancers and their lymph node metastases by gene function-based clustering analysis. *Int J Oncol* 2004; 24: 1589-96. (PMID: 15138604)
22. Nishizaki T, DeVries S, Chew K, Goodson WH 3rd, Ljung BM, Thor A, et al. Genetic alterations in primary breast cancers and their metastases: direct comparison using modified comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 1997; 19: 267-72. (PMID: 9258662) [\[CrossRef\]](#)
23. Lee HH, Lim CA, Cheong YT, Singh M, Gam LH. Comparison of Protein Expression Profiles of Different Stages of Lymph Nodes Metastasis in Breast Cancer. *Int J Biol Sci* 2012; 8: 353-62. (PMID: 22393307) [\[CrossRef\]](#)

---

**Correspondence / Yazışma Adresi**

Nuh Zafer Cantürk  
Phone : +90 (262) 303 74 15  
E-Mail : canturkz@yahoo.com