KLİNİK ÇALIŞMA

İZMİR ATATÜRK EĞİTİM HASTANESİ TIP DERGİSİ 2009: 47 (4) 131-136

MEME KANSERİNDE Bc1, Bc2 ve Bc3 BİOMARKERLARININ ERKEN TANIDAKİ ÖNEMİ

The Efficacy of Bc1, Bc2 and Bc3 in Early Diagnosis of Breast Cancer

* Dr. Hakan Küpeli
** Dr. Atilla Çökmez
**Dr. Kemal Atahan
**Dr. Ercüment Tarcan

*Doğanhisar Devlet Hastanesi
Doğanhisar – Konya
**İzmir Atatürk Eğitim ve Araştırma
Hastanesi 1.Cerrahi Kliniği

ÖZET

Erken evre meme kanserinde semptomatik hale gelmeden tanı konulması tam kür elde etme şansı vermekte ve meme kanseri mortalitesini azaltmaktadır. Küçük lezyonlar, mamografi ile bile genellikle gözden kaçırılır ve görünmeyebilir. Görüntüleme teknikleri ile görülemeyen küçük lezyonları tanımlamak için potansiyel olarak kullanılabilecek moleküler kılavuzlar, bir neoplazmayı dokuya yayılmadan önce tedavi etme fırsatı tanıyabilir.

Bu prospektif çalışma da yerel etik kurulu ve hastaların yazılı onayı alınarak genel cerrahi polikliniğine Ocak 2007- Temmuz 2008 yılları arasında başvuran 87 hasta çalışmaya dahil edildi. Bu hastalardan alınan serumlar İzmir Hıfzısıhha Enstitütüsü labaratuarlarında -30°C' de depolanmıştır. Kanser grubu 27 hastadan oluşmaktaydı. Benign meme hastalığı grubu 24 iyi huylu meme hastalıklarına sahip kadından ve kontrol grubu 37 sağlıklı kadından oluşmaktaydı. Bu 3 grup hastadan alınan kan örnekleri SELDİ-TOF analiz yöntemiyle Bc1, Bc2 ve Bc3 serum proteinleri açısından çalışıldı. Elde edilen sonuçlar her 3 grup ve her 3 biomarker (Bc1, Bc2 ve Bc3) açısından ayrı ayrı birbirleriyle karşılaştırılarak çalışıldı ve istatistiksel olarak değerlendirildi.

Bc2 hem malign olgular ile benign olguların karşılaştırılmasında hem de malign olgular ile kontrol (risk grubu kadın hastalar) grubu karşılaştırılmasında anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (p=0.002 ve p=0.003 sırasıyla).Yani tüm malign olgularda istatistiksel olarak anlamlıdır.
c2 hem malign olgular ile benign olguların karşılaştırılmasında hem de malign olgular ile kontrol (risk grubu kadın hastalar) grubu karşılaştırılmasında anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (p=0.002 ve p=0.003 sırasıyla).Yani tüm malign olgularda istatistiksel olarak anlamlıdır.

Bc1 ise malign olgular ile kontrol olguların karşılaştırılmasında

Anahtar Kelimeler:

Meme kanseri, Kanser biomarkerları, Bc1, Bc2, Bc3

Key Words:

Breast Cancer, Cancer biomarkers, Bc1, Bc2, Bc3

Yazışma Adresi:
Doç.Dr.Atilla Çökmez
İzmir Atatürk Eğitim ve Araştırma
Hastanesi 1.Cerrahi Kliniği
Tel: 0.232.2444444 /2343
E-Posta: acokmez@yahoo.com

istatistiksel olarak anlamlı bulunmasının yanında benign olgular ile kontrol grubu karşılaştırılmasında da istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0.006 ve p=0.015 sırasıyla). Bu yüzden Bc1 maligniteden çok, tumoral gelişim ya da inflamatuar yanıt açısından da incelenmelidir. Daha geniş bir grupta alt analizler yapılabilir.

Bc3 malign olgularda yüksek bulunmakla birlikte istatistiksel olarak benign ve kontrol grubu ile karşılaştırılmasında anlamlı bulunamamıştır. (p=0.098 ve p=0.134 sırasıyla) Bu marker için daha geniş bir grupta analizler yapılmalıdır.

Meme kanseri erken teşhisi için SELDİ-TOF metodu ile çalışılan proteomiklerin klinik uygulama da yararlı olabileceği gösterilmiştir. Ancak bu konuda çok daha geniş prospektif çalışmalara ve alt grup analizlerine ihtiyaç vardır. Ayrıca bu proteomiklerin değişik tümör markerları ile beraber yapılacak olan çalışmalarında faydalı olacağı kanaatindeyiz.

SUMMARY

Presymptomatic screening to detect early-stage breast cancer while it is still resectable and potentially curable can greatly reduce breast cancer–related mortality. Small lesions are frequently missed and may not be visible, even by mammography. Molecular markers that can potentially be used to identify small lesions that are invisible to imaging techniques could provide an opportunity to treat a neoplasm before it invades tissue.

In this prospective study 91 patients who admitted to our hospital between January 2007-July 2008 were included. All women provided informed consent before serum collection for this hospital ethic committee approved study. Serum samples from 87 women were stored at _30 °C until use. The cancer group included 27 cases of invasive breast cancer. The benign breast disease group included 24 women with various benign breast diseases and control group 37 age-matched apparently healthy women. Using surface enhanced laser desorption/ionization-time of flight (SELDI-TOF) identified 3 serum biomarkers, BC1 (4,3 kDa), BC2 (8,1 kDa) and BC3 (8,9 kDa), whose combination significantly detects breast cancer patients from non-cancer controls. The data obtained for these three groups of patients worked out for each serum biomarker (Bc1, Bc2, and Bc3) indivudually and compared with each other seperately and evaluated statistically.

Bc2 possesses the highest individual diagnostic power. Bc2 was statistically significant compared between malign disease group and control group as well as compared to malign group and benign disease group (p=0.003 and p=0.002 respectively). For Bc1 it was statiscally significant when malign disease group compared to control group (p=0.006) as well as benign disease group compared to control group (p=0.015). Thus for Bc1 rather than showing malign progression it shows tumoral progression or enflamatory process. Subgroup analysis is needed in wide series for Bc1. Bc3 was found upregulated in all malign cases, however it was not statistically significant compared to benign disease group or control group (p=0.098 and p=0.134 respectively). Also big series needed for his marker.

It shows that serum biomarker profiles might be useful in clinical practice to improve breast cancer diagnosis. However more additional confirmation in larger and well-designed prospective studies needed. Also we believe it would be helpful to discover and validate these biomarkers with different tumor markes.

GİRİŞ

Meme kanseri kadınlar arasındaki en yaygın kanser formudur ve olguların yaklaşık olarak %25'i 50 yaşın altındadır (1). Mamografik görüntüleme, 50 yaş sonrasındaki meme kanserlerinin teşhisi için en etkili yaklaşımdır. Çözünürlük gelişmeye devam etse de, 5mm'den küçük tümörler genellikle teşhis edilemez. Ayrıca, mamografi etkinliği genç kadınlarda yoğun meme dokusu mamografik duyarlılığı azalttığı için henüz yeterli düzeyde değildir (2). Son olarak, 1–2 yıllık düzenli mamografi görüntülemesi yüksek dereceli tümörlerin teşhisine imkân vermez. Bu nedenle, meme kanserlerinin teşhisini geliştirmek ve sonuçta meme kanseri teşhisi konulmuş hastaların kurtulma oranlarını artırmak için ek yaklaşımlar geliştirilmesi için çalışmalar devam etmektedir (3,4).

Meme kanserlerinin büyük heterojenliği, meme kanserlerinin erken teşhisi için birden fazla biomarker gerektiğini göstermektedir. Birçok çalışma, kanserde

çeşitli proteinlerin değiştiğini göstermiştir. Bu değişimler, ölçülebilir değişimlere ve kılavuz proteinlerin beden sıvılarına salgılanmasına neden olabilir. Kullanılabilir serum biomarkerları arasında en popüleri Ca-15.3 kanser antijenidir. Ca-15.3, meme kanserlerinin izlenmesinde ve meme kanseri metastazlarının erken teşhisinde kullanılır, ancak, teşhiste ve terapötik karar vermede kullanışlı değildir (5). Bu nedenle, yeni biomaekerlar ile ilgili çalışmalar sürdürülmektedir. Bunlardan biri de, karmaşık hücresel özütlerin ya da beden sıvılarındaki protein değişimlerini denetlemek için uygun bir yöntem olan SELDİ-TOF yöntemidir (6).

Bu çalışma, meme kanserinde SELDİ-TOF analiz yöntemiyle saptanan Bc1, Bc2 ve Bc3 biomarkerlarının erken tanıdaki etkinliğini prospektif randomize bir klinik çalışmayla değerlendirmek amacıyla yapılmıştır.

MATERYAL VE METOD

Bu prospektif çalışma İzmir Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi yerel etik kurulu ve hastaların yazılı onayı alınarak 1. Genel Cerrahi Polikliniği'ne Ocak 2007- Temmuz 2008 tarihleri arasında başvuran 88 hasta üzerinde yürütüldü. Hastalar, kanser grubu, benign meme hastalığı grubu ve sağlıklı kadın grubu (kontrol) olmak üzere 3 gruba ayrıldı. Kanser grubu 27 hastadan, benign meme hastalığı grubu 24 hastadan ve kontrol grubu (sağlıklı kadın hasta grubu) ise 37 hastadan oluşmaktaydı. Deneklerden alınan serumlar İzmir Hıfzısıhha Enstitütüsü labaratuarlarında -80°C' de depolandı. Kanser grubu ve benign meme hastalığı grubunda kan alma işlemi tedavi öncesinde gerçekleştirildi. Daha sonra bu örneklerde SELDİ-TOF analiz yöntemiyle Bc1, Bc2 ve Bc3 serum proteinleri açısından çalışıldı. Elde edilen sonuçlar her 3 grup ve her 3 biomarker (Bc1, Bc2 ve Bc3) açısından ayrı ayrı birbirleriyle karşılaştırıldı ve istatistiksel olarak değerlendirildi.

Teşhisler patoloji tetkikleriyle doğrulandı. Kanser hastaları için ayrıca, hücre tipi, tümör büyüklüğü, lenf nodu durumu, östrojen ve progestron reseptör durumları da kaydedildi.

BULGULAR

Bc1, Bc2 ve Bc3 için elde edilen değerler gruplar arasında karşılaştırıldı. Benign meme hastalığı grubu ile kontrol grubu karılaştırıldığında, Bc1 değerleri benign meme hastalığı grubunda istatistiksel anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (p=0.015). Bc2 ve Bc3 değerleri için istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşmamıştır (Tablo 1).

Tablo 1. Benign Meme Hastalığı Grubu-Kontrol Grubu Karşılaştırılması.

Bio-Marker	Benign Meme Hastalığı Grubu (ort±sd)	Kontrol Grubu (ort±sd)	P değeri	ROC area
Bc1 4300kDa	217,9±137	162,44±95	0,015	0,658
Bc2 8100 kDa	31,46±23	39,93±25	0,076	0,624
Bc3 8900 kDa	148,29±58	152,93±62	0,809	0,494

Kanser grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında, Bc1 ve Bc2 değerleri kanser grubunda istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur (p=0.006, p=0.003). Bc3 değerleri için istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşmamıştır (Tablo 2).

Tablo 2. Kanser Grubu-Kontrol Grubu Karşılaştırılması.

Marker	Kanser Grubu (ort±sd)	Kontrol Grubu (ort±sd)	P değeri	ROC area
Bc1 4300kDa	250,24±167	162,44±95	0,006	0,634
Bc2 8100 kDa	97,65±101	39,93±25	0,003	0,624
Bc3 8900 kDa	185,28±95	152,93±62	0,098	0,572

Kanser grubu ile benign meme hastalığı grubu karşılaştırıldığında, Bc2 değerleri kanser grubunda istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur (p=0.002). Bc1 ve Bc3 değerleri için istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşmamıştır (Tablo 3).

Tablo 3. Kanser Grubu-Benign Meme Hastalığı Grubu Karşılaştırılması.

Marker	Kanser Grubu (ort±sd)	Benign Meme Hastalığı Grubu (ort±sd)	P değeri	ROC area
Bc1 4300kDa	250,24±167	217,9±137	0,672	0,513
Bc2 8100 kDa	97,65±101	31,46±23	0,002	0,693
Bc3 8900 kDa	185,28±95	148,29±58	0,134	0,571

Sonuç olarak; Bc2 değerleri, hem malign olgular ile benign olguların karşılaştırılmasında, hem de malign olgular ile kontrol grubu karşılaştırılmasında anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (p=0.002, p=0.003). Yani tüm malign olgularda istatistiksel olarak anlamlıdır.

Bc1 ise malign olgular ile kontrol olgularının

karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı bulunmasının yanında, benign olgular ile kontrol grubu karşılaştırılmasında da istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0.006, p=0.015). Bu yüzden Bc1 maligniteden çok, tümoral gelişim ya da inflamatuar yanıt açısından incelenmelidir. Bunun için daha geniş hasta gruplarında alt analizler yapılabilir.

Bc3 tüm malign olgularda yüksek bulunmakla birlikte bu yükseklik, benign ve kontrol grupları ile yapılan karşılaştırmalarda istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p=0.098, p=0.134). Bu marker için de daha geniş hasta gruplarında analizler yapılmalıdır.

TARTIŞMA

Erken evre meme kanserinde semptomatik hale gelmeden tanı konulması tam kür elde etme şansı vermekte ve meme kanseri mortalitesini azaltmaktadır. Ancak, 1992-1999 yılları arasında, Amerika Birleşik Devletleri'nde toplanan veriler, meme kanserlerinin %63'üne erken evrede tanı konulamadığını göstermektedir (7). Küçük lezyonlar, mamografi ile bile genellikle gözden kaçırılır ve özellikle genç kadınlarda ye yoğun meme dokusu olan kadınlarda görünmeyebilir (8). Görüntüleme teknikleri ile görülemeyen küçük lezyonları tanımlamak için potansiyel olarak kullanılabilecek moleküler kılavuzlar, bir neoplazmı dokuya yayılmadan önce tedavi etme fırsatı tanıyabilir. Ductal karsinoma in situ (DCIS) evresinde teşhis edebilecek kılavuzlar bilhassa değerli olabilir; çünkü meme kanserinin erken evrelerinde teşhis konulmuş kadınların %100'ü tedavi edilebilmektedir.

Meme kanserinin erken teşhisini araştıran moleküler temelli yaklaşımların çoğunun, onkojenler, tümör süpresör genleri, büyüme faktörleri, tümör antijenleri ve diğer gen ürünleri gibi özel hedefleri vardır. Ancak bunların hiçbirinin tek başına meme kanserlerinin büyük çoğunluğu için işe yaramaması nedeniyle ve kansere ya da meme dokularına spesifik olmadığı için bu gibi yaklaşımların düşük sensitivite ve spesifitesi bulunmaktadır. Bu güne kadar, meme kenserinin erken teşhisi için hiçbir biomarker önerilmemiştir (9). CA-15-3 ve Ca-27.29 gibi FDA tarafından onaylanan tümör kılavuzları yalnız ilerlemiş ya da tekrarlayan meme kanserlerinin görüntüleme tedavisi için tavsiye edilmektedir (10).

Meme kanseri erken teşhisi konusunda proteomikleri araştıran, gelişimini sağlayan ve bu konuda ilk klinik çalışmayı yapan John Hopkins Hastanesi'nden Jinang Li'dir (11). Li ve arkadaşlarının 2002 yılındaki ilk çalışmasında SELDİ-TOF teknolojisini kullanarak 3 serum biomarkerını Bc1 (4,3 kDa), Bc2 (8,1 kDa) ve Bc3 (8,9 kDa) meme kanseri ve kanser olmayan kontrol grubunda araştırdılar. Bu çalışmada Bc1 çok anlamlı bir sonuç vermezken Bc2 ve Bc3 yükselen değerlerde bulundu. Bc3 en yüksek bağımsız teşhis gücüne sahip idi (11). Ancak Li ve arkadaşlarının çalışmasında hastalar malign ve kontrol grubu olarak ayrılmıştı. Kontrol grubunda ise benign meme hastalığı olan kadınlar ve sağlıklı kadınlar aynı grupta idi. Bu çalışmada istatistiksel olarak alt grup çalışmaları yapılmamıştı.

Bizim çalışmamızda ise malign hastalığa sahip kadınlar, benign meme hastalığı olan kadınlar ve sağlıklı kadınlar arasında Bc1, Bc2 ve Bc3 ayrı ayrı olarak tüm gruplar arasında istatistiksel olarak çalışıldı. Bizim sonuçlarımızda Bc2 en yüksek bağımsız teşhis gücüne sahipti. Malign olgular ile benign olguların karşılaştırılmasında ayrıca malign olgular ile kontrol grubu (sağlıklı kadınlar) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardı (p=0.002 ve p=0.003 sırasıyla). Bc3 ise tüm malign olgularda yüksek bulunmasına rağmen malign olguların ayrı ayrı olarak benign hastalığı olan ve sağlıklı kadınlar ile karşılaştırılmasında anlamlı fark bulunmamıştır (p=0.134 ve p=0.098 sırasıyla). Çalışmamızda şu ana kadar bu alanda yapılan mevcut üç çalışmadan farklı olarak en ilginç sonuç Bc1 için çıkmıştır. Bc1 malign ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı iken (p=0.006), aynı şekilde benign hastalığı olan kadınlar ve kontrol grubu arasında da anlamlı idi (p=0.015). Bunun önemi bu biokılvuzlar için ilk defa alt grup analizleri yapılıyor olması idi. Bu yüzden Bc1 maligniteden çok tümöral gelişim ya da inflamatuar yanıt açısından incelenmelidir.

Mathelin ve arkadaşlarının yaptığı bir diğer çalışma da ise toplam 89 hasta yer almaktaydı. Onların tanımladığı Bc1a ve Bc1b, Li'nin Bc1'ine Bc3a ve Bc3b ise Li'nin Bc3'üne karşılık geldiğini gördüler. Ancak Mathelin ve arkadaşlarının çalışmasında etkinlik sırası; Bc1a>Bc1b>Bc3b>Bc3a şeklinde idi (12).

Li ve arkadaşları 2005 yılında John Hopkins hastanesi Milan Ulusal Kanser Enstitüsü (National Cancer Institute) ile beraber yaptığı 176 hastanın dâhil edildiği yeni bir çalışma yaptılar. İlk çalışmalarına

benzer şekilde Bc3 ve Bc2 açısından anlamlı buldular (13).

Bizim çalışmamız da dâhil bu dört çalışmada mevcut 3 biomarkerın tümörün ilerlemesinden ziyade tümörün malign doğasını yansıttığı söylenebilir. Zira lenf nodu yayılmasıyla, metastazların varlığı ya da tümör çapı sonuçları etkilememekte idi.

Bizim çalışmamız ile beraber diğer üç çalışmanın sonuçları birbirlerini tamamen doğrulamadı. Birçok hipotez bu farklılıkları açıklamak için ortaya konabilir. İlki Li'nin çalışması retrospektif idi. Bu nedenle örnekler çeşitli şekillerde hazırlanmış ve dönüştürülmüş olabilirdi. Bizim çalışmamızda da aynı şekilde muameleye tutuldu, işlendi ve toplamadan en fazla 1 saat süre içerisinde dondurulduu. Li'nin de kendi sonuçlarını değerlendirirken özeleştirisini yaptığı gibi (13) serumların uzun süre dondurulmasının veya uzun süre bekletilmesinin protein içeriğinde değişikliğe yol açıp özellikle Bc1 için sonuçları etkilemiş olabileceği idi. Bizim ve Mathelin ve arkadaşlarının çalışmaları (12) göstermiştir ki bir saatten uzun dondurma zamanı çeşitli protein tepelerinin modifikasyonuna yol açmaktadır. Dahası bizim serumlar sadece bir kere dondurulmuştu. Belki de daha önemli bir şekilde bizim örneklerimiz hemoliz olmamışlardı; çünkü hemolizin protein profillerini büyük oranda bozduğunu bilmekteyiz. Diğer bir neden de istatistiksel analizlerdeki farklılıklardan kaynaklanıyor olabilir. Bizim ve Mathelin ve arkadaşlarının (12) yaptığı çalışmada lineer veri üzerinden doğrudan analiz uygulandı. Oysa Li ve arkadaşları tepe yoğunluğunun logaritmik dönüşümü yoluyla işlem basamağı uyguladı (11).

En önemli nokta ise biz alt grup analizleri uygularken gerek Li ve arkadaşları gerek Mathelin ve arkadaşları (12) alt grup analizleri uygulamadı. Kontrol grubu olarak hem benign meme hastalıkları olan kadınları hem de sağlıklı kadınları beraber aldılar. Oysa biz bu üç grubu ayrı ayrı olarak ele aldık. Nitekim Bc1 için hem malign olgular ile kontrol grubunda hem de benign hastalığı olan kadınlar ile kontrol (sağlıklı kadınlar) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulduk (p=0.006 ve p=0.015 sırasıyla). Bu yüzden Bc1 sadece malignite açısından değil tümöral gelişim ve inflamatuar yanıt açısından da incelenmelidir.

Sonuç olarak; bizim çalışmamızda Bc2 en yüksek bağımsız teşhis gücüne sahipti. Bc1 ise malign olgular ile kontrol olguların karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı bulunmasının yanında benign olgular ile kontrol grubu karşılaştırılmasında da istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu yüzden Bc1 maligniteden çok, tumoral gelişim ya da inflamatuar yanıt açısından da incelenmelidir. Bc3 tüm malign olgularda yüksek bulunmakla birlikte istatistiksel olarak benign ve kontrol grubu ile karşılaştırılmasında anlamlı bulunamamıştır.
Meme kanseri erken teşhisi için SELDİ-TOF metodu ile çalışılan proteomiklerin klinik uygulama da yararlı olabileceği gösterilmiştir. Ancak bu konuda çok daha geniş prospektif çalışmalara ve alt grup analizlerine ihtiyaç vardır. Ayrıca bu proteomiklerle değişik tümör markerların birlikte kullanılarak yapılacak olan çalışmaların da faydalı olacağı kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Li J, Zhang Z, Rosenzweig J, Wang YY, Chan DW: Proteomics and bioinformatics approaches for identification of serum biomarkers to detect breast cancer. Clin Chem 48(8): 1296–1304, 2002

.2. Rosenberg RD, Hunt WC, Williamson MR, Gilliland FD, Wiest PW, Kelsey CA, Key CR, Linver MN: Effects of age, breast density, ethnicity, and estrogen replacement therapy on screening mammographic sensitivity and cancer stage at diagnosis: review of 183,134 screening mammograms in Albuquerque, New Mexico. Radiology 209(2): 511–518, 1998.

3. Ugnat AM, Xie L, Morriss J, Semenciw R, Mao Y: Survival of women with breast cancer in Ottawa, Canada: variation with age, stage, histology, grade and treatment. Br J Cancer 90(6): 1138–43, 2004.

4. Sant M, Allemani C, Capocaccia R, Hakulinen T, Aareleid T, Coebergh JW, Coleman MP, Grosclaude P, Martinez C, Bell J, Youngson J, Berrino F: Stage at diagnosis is a key explanation of differences in breast cancer survival across Europe. Int J Cancer 106(3): 416–422, 2003.

5. Lumachi F, Basso SM, Brandes AA, Pagano D, Ermani M: Relationship between tumor markers CEA and CA 15–3, TNM staging, estrogen receptor rate and MIB–1 index in patients with pT1–2 breast cancer. Anticancer Res 24(5B): 3221–3224, 2004.

6. Issaq HJ, Veenstra TD, Conrads TP, Felschow D: The SELDITOF MS approach to proteomics: protein profiling and biomarker identification. Biochem Biophys Res Commun 292(3): 587–592, 2002.

7. Jemal A. Tiwari RC, Murray T, Ghafoor A, Samuels A, Ward E, et al. Cancer statistics, 2004. CA Cancer J Clin 2004;54,8–29.

8. Antman K, Shea S. Screening mammography under age 50. JAMA 1999;281:1470–2.
9. Smith RA, Cokkinides V, Eyre HJ. American Cancer Society guidelines for the early detection of cancer, 2004. CA Cancer J Clin 2004;54.41–52.

10. Chan DW, Sell S. Tumor markers. In: Burtis CA, Ashwood ER, eds. Tietz textbook of clinical chemistry, 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders, 1999:390–413.

11. Li J, Zhang Z, Rosenzweig J, Wang YY, Chan DW: Proteomics and bioinformatics approaches for identification of serum biomarkers to detect breast cancer. Clin Chem 48(8): 1296–1304, 2002.

12. Mathelin C. Cromer A, Wendling C, Tomasetto C, Rio MC: Serum biomarkers for detection of breast cancers: a prospective study. Breast Cancer Research and Treatment (2006) 96: 83–90.

13. Li J, Orlandi R, White CN, Rosenzweig J, Zhao J, Seregni E, Morelli D, Yu Y, Meng X-Y, Zhang Z, Davidson NE, Fung ET, ChanDW: Independent Validation of Candidate Breast Cancer Serum Biomarkers Identified by Mass Spectrometry. *Clinical Chemistry* 2005; 51: 2229–2235.