

5. årsoppgave i Stadium IV
- medisinstudiet ved Universitetet i Tromsø

Med. Stud. Anna Bakke, kull-99

**SIGNIFIKANT EKSPRESJON AV IGFBP2 I
BRYSTKREFT SVULSTER
SAMMENLIKNET MED BENIGNE
BRYSTLESJONER**

Veileder: Lill- Tove Busund
Patologisk avdeling UNN / Morfologisk avdeling

Tromsø, 10.11.04

INNHOLD

Resymé	s. 3
Introduksjon	s. 4
Materiale og metode	s. 5
Resultater	s. 9
Diskusjon	s. 11
Referanser	s. 13
Tabeller	s. 16
Figurtekst og figurer	s. 19

RESYMÉ

Formålet med denne studien har vært å undersøke utbredelsen og mønsteret av ekspresjon av insulin-liknende vekstfaktor bindende protein-2 (IGFBP2) i benignt og malignt brystvev. Insulin-liknende vekstfaktorer (IGF) og insulin-liknende vekstfaktor bindende proteiner (IGFBP) spiller viktige roller i normal utvikling av brystvev, og muligens også i utviklingen av brystkreft. De ulike IGF har en mitogen effekt på brystepitelceller, IGFBP2 fungerer som en regulator av disse vekstfaktorene. Det er derfor interessant å klarlegge i hvilken grad benignt og malignt brystvev uttrykker IGFBP2.

Metoder: For å studere sammenhengen mellom uttrykking av IGFBP2 og tumor type, grad og hormonreseptorstatus ble brystvev fra 120 brystreseksjonspasienter immunhistokjemisk farget. Ekspresjon av protein ble målt kvantitativt med video fargebilde analyse og evaluert semikvantitativt. Målingene korrelerte godt (Spearman, $r = 0,92$, $p < 0,05$).

Resulater: Ved begge metoder fant man ingen signifikant ekspresjon av IGFBP2 i normale kjertelceller eller i hyperplastisk vev (gruppe I). Atypisk hyperplasi viste noe ekspresjon av IGFBP2 i cytoplasma, og carsinoma *in situ* viste en tydelig membranassosiert og cytoplasmisk ekspresjon av proteinet (gruppe II). Infiltrerende carsinomer uttrykte sterkt IGFBP2 i cytoplasma (gruppe III). Det var signifikant forskjell mellom gruppe I og II, og mellom gruppe II og III (Dunnett test). Det var ingen signifikante forskjeller mellom invasive lobulære og invasive duktale carsinomer, eller mellom grad I,II og III innen disse entitetene. Det var ingen signifikant korrelasjon mellom graden av IGFBP2 farging og østrogen- eller progesteron-reseptor positivitet i den maligne gruppen. (Mann-Whitney test).

Konklusjon: Disse data viser at IGFBP2s mitogene signaler i autokrine/parakrine regulatoriske mekanismer kan være ansvarlig for vekst av brystcarsinomer og at IGFBP2 er en selvstendig malignitetsindikator.

INTRODUKSJON

Insulin-liknende vekstfaktorer (IGF) og insulin-liknende vekstfaktorbindende protein (IGFBP) spiller viktige roller i cellevekst og utvikling av normalt og neoplastisk vev.^{1,2} IGF fremmer vekst av en rekke tumortyper, inkludert mammacarcinom, og øker proliferasjon av en rekke mammacarcinom celledinjer. IGF har også en mitogen effekt på brystepitel celler.^{1,2} På bakgrunn av dette har det vært fokusert på rollen og lokaliseringen av IGFs bindende proteiner i benigne og maligne vev. I denne studien fokuserer vi på IGFBP2 og uttrykking av dette proteinet i normalt og neoplastisk brystvev. IGFBP2 er ett av seks medlemmer i IGFBP superfamilien. IGFBP2 er ikke glykosylert og innehar en integrinreseptor gjenkjennelses sekvens som tyder på celleassosierte egenskaper³ som kan være nødvendig for dets virkning, da mutasjon av det membranbindende domenet kan blokkere IGFBP2 potensiering av IGF2 stimulert mitogenese.⁴ De cellulære virkningene av IGFBP2 ved IGF medierte funksjoner har vært rapportert å være av både inhibitorisk og stimulatorisk karakter.⁵ Homolog rekombinasjon og embryonal stamcelle teknologi har generert mus med mutert IGFBP2-gen, hvor få utviklingsabnormaliteter forekom.⁶ I lungecancer celledinjer, var ekspresjon av IGFBP2 redusert og var inhibitorisk på IGF2 virkning når det ble tilført eksogent.⁷ Forskningsgruppa har tidligere vist en økt ekspresjon av IGFBP2 i prostata intraepitelial neoplasi (PIN) og invasivt prostatacancer sammenliknet med normale prostatakjertler.⁸ Vi har også vist en signifikant korrelasjon mellom malignt potensiale i bløtvevssarkomer og ekspresjon av IGF mitogene signaler.⁹

Det meste av vitenskapelig litteratur til nå fokuserer på IGFBP2 i malignt vev, ikke i normalt brystvev. I denne studien har vi brukt en immunohistokjemisk tilnærming for å klarlegge ekspresjon og lokalisasjon av IGFBP2 i malignt og benignt brystvev. Vi har også undersøkt om det er en sammenheng mellom ekspresjon av IGFBP2 og steroidhormonreseptorstatus (østrogen (ER) og progesteron (PGR)) i det samme brystvevet.

MATERIALE OG METODER

Utvalget

Vårt studiemateriale bestod av 120 arkiverte kirurgiske brystreseksjoner fra Patologisk avdeling, Universitetssykehuset i Nord-Norge. Histologisk klassifikasjon av brystlesjonene ble utført i henhold til Verdens Helseorganisasjons kriterier.¹⁰ Invasive duktale carcinomer ble videre delt inn i tre undergrupper i henhold til modifisert Bloom og Richardsons klassifisering.¹¹ Studiematerialet bestod av invasive lobulære carcinomer, infiltrerende duktale carcinomer grad I, II og III, duktale og lobulære carcinoma *in situ*, atypiske duktale eller lobulære hyperplasier, duktale eller lobulære hyperplasier, ikke-prolifererende fibrocystiske forandringer og brystvevsprøver fra kvinner som ikke hadde signifikante histologiske forandringer. Alle de normale brystvevsprøvene og benigne brystlesjonene var fra pasienter uten kreft. Ingen av brystvevspreparatene som ble selektert fra arkivet var mer enn fire år gamle. I denne perioden ble det ikke gjort særlige endringer i prosedyrene på laboratoriet. Det var ingen signifikante forskjeller i fargeintensiteten mellom de tidligst diagnostiserte prøvene og de sist diagnostiserte. Fra 10 til 20 prøver ble tilfeldig plukket ut fra de ulike entiteter. Hematoxylin- og eosin fargete snitt fra formaldehydfiksert og parafinstøpt brystvev ble selvstendig gjennomgått av to patologer ved avdelingen for å fastslå diagnosen.

Immunhistokjemi

For hver prosedyre ble rekken av prøver tilfeldig valgt ut fra hver av gruppene. En standard immunhistokjemisk metode ble utført. De 4- μm tykke snittene fra fosfat bufret (PBS), formalinfikserte og parafinstøpte prøvene ble rutinemessig avvokset i xylene, rehydrert i graderte serier med etanol og vasket i destillert vann. Frambringning av antigen ble utført ved å legge prøvene i 0,01 M citrat-buffer ved pH 6,0 og eksponert for gjentatt oppvarming i 10 min med mikrobølger 450W (Whirlpool). Det ble fylt på med buffer etter hvert intervall for å kompensere for fordampingen. Prøvene ble kjølt ned ved romtemperatur i 15 min, vasket i sterilt vann i 5 min og lagt i PBS ved pH 7,6 i 5 min. Endogen peroksidase og fosfatase aktivitet ble stoppet i 0,3 % $\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ (Sigma, St. Louis, MO) i 30 min, etterfulgt av blokkering av uspesifikk antistoff binding i 10 % geite serum i 30 min ved romtemperatur. Vevssnittene ble

inkubert over natta ved 4°C i fuktighetskammer med primært geite polyklonalt antistoff løst i 1 % bovint serum albumin (BSA) som gjenkjente IGFBP2 (løselighetsforhold 1 : 150) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Som negativ fargekontroll ble antistoffene byttet ut med enten 1 % BSA/PBS for å utelukke effekten av endogent peroksidase, eller isotypematchende irrelevant museimmunoglobulin for å teste spesifisitet. Antistoffets spesifisitet ble også testet ved Western blotting. Et sekundært antistoff; biotinyliserte F(ab')₂fragmenter (kanin anti geit løst 1 : 400) ble brukt. (DAKO, Carpinteria, CA). Spesifikk intracellulær immunreaktivitet ble detektert ved inkubasjon med avidin-biotin/pepperrot peroksidasekompleks (ABC) i 30 min ved romtemperatur. Etter grundig vasking i PBS ble det bundne antistoffet detektert ved en trestegs avidin-biotin-peroksidasekompleks teknikk med bruk av diaminobenzidin tetrahydroklorid (DAB) som kromogen (DAKO). Prøvene ble kontrafarget i hematoxylin, dehydrert i graderte serier av etanol, klargjort i tre runder med xylen og montert i Histokit. Passende positive og negative kontroller ble inkludert i hver antistoffrunde. Ved repetisjon av 10 % av prøvene ble det ikke observert signifikant variasjon mellom forskjellige immunhistokjemirunder.

Demonstrasjonen av østrogen reseptorer (ERs), ved bruk av antistoff 1D15 (DAKO), og progesteron reseptorer (PGRs), ved bruk av antistoff NCL-PGR (Abbot Laboratories, Maidenhead, UK), ble utført på parafinstøpte blokker etter en protokoll som er publisert tidligere.¹²

Semikvantitativ analyse

Graden av ekspresjon av IGFBP2 ble gradert semikvantitativt og klassifisert i en til fire graderinger. Fargingen ble scoret som 0 = ingen farging; 1 = svak farging; 2 = sterk farging av 25% tumorceller eller moderat farging av < 80%; 3 = sterk farging av 25% - 50% eller moderat farging av > 80%; 4 = sterk farging av > 50% tumorceller. I hvert snitt ble 10 synsfelt fra representative områder gradert ved stor forstørrelse. Den maksimale fargingsintensiteten var typisk høyere i de snittene hvor mange celler var positive. De fleste positive cellene viste farging i cytoplasma. I under 1 % av de svakt cytoplasmafargete cellene kunne man se en samtidig farging av membranen. Ved næyere ettersyn viste det seg at den tilsynelatende membranfargingen oppstod pga at epiteliale celler grenset tett opp mot nekrotiske lumina i carcinoma *in situ*. Denne pseudofargingen av membraner overgikk aldri nivået av cytoplasmisk farging og ble

derfor registrert som farging av cytoplasma. Snittene ble scoret uten kjennskap til annen patologisk informasjon enn den åpenbare.

Fargingen av ERs og PGRs ble estimert utifra "quick score" teknikken¹³; snittene ble scoret både for andelen fargete celler og fargeintensitet. Andelen fargete celler ble scoret som 0 = 0% fargete celler, 1 = 1-25%, 2 = 25-50%, 3 = 50-75% og 4 = 75-100% fargete celler. Intensiteten ble scoret som 0 = ingen farging, 1 = svak, 2 = moderat eller 3 = sterk farging. De to scorene ble så lagt sammen til en total score fra 0-7. Total score < 3 ble tolket som negativ.

Kvantitativ analyse (Color Video Image Analysis, digital bildeanalyse)

De immunfargete snittene ble videre undersøkt ved bruk av et Leica (Leitz Laborlux S; Leica, Wetzlar, Tyskland) mikroskop (x 400) koplet til et videokamera (Sony Hyper HAD, color CCD-IRIS/RGB, modell DXC-151AP), videre koplet til et datamaskinassistert farge videobilde analyse (VIA) system (Multi-Sync 3V, modell JC-1535VMR; NEC Corporation).¹⁴ Bilder av de ulike synsfeltene i snittene ble tatt og digitalisert til videoskjermen og videre analysert av et digitalt bildeanalyseprogram (Leica Q500MC, Microsoft Windows hosted image analysis system, Leica Australia P/L). Bildene som ble lagret i programmet bestod av opptil 512 x 512 pixler delt inn i 8-bit lysstyrke. Lysintensiteten ble standardisert ved å bruke en fiksert rheostat innstilling for mikroskopets lyskilde. Lysstabiliteten ble ofte sjekket under alle prosedyrer.

På grunn av den høye celletettheten i enkelte prøver ble synsfeltene systematisk undersøkt ved bruk av et x40 objektiv og et x10 okular innen en satt ramme på 45000 x 450 pixler (0,2025 mm²) for å øke antallet celler per synsfelt. Fargeverdier for rød, grønn og blå komponent var for hver pixel fra 1 til 255. Etter kontrafarging med Harris` hematoxylin, som gjorde at man så tydelig forskjell fra DAB farging, ble det satt en grenseverdi på 170 for den blå fargekomponenten. Dette for å ekskludere falsk eller svak positiv farging. Denne verdien ble satt etter å ha undersøkt 10 snitt (to fra hver gruppe) som i utgangspunktet ble analysert for dette formålet.

Ti synsfelt i hvert snitt ble undersøkt, dette fordi tumorprøvene var innad svært heterogene. Dette antall synsfelt ble fastsatt etter å ha brukt en progressiv gjennomsnittsgraf for å oppnå et statistisk meningsfylt resultat. Hvert snitt ble først undersøkt med 10x forstørrelse for å få et overblikk over lesjonen og fargeintensitet.

Ved å gjøre dette først kunne man velge ut et område som var mest representativt, uten vevsfolding eller overlapping, og med minst mulig bakgrunnsfarging. Det ble så valgt 10 tilfeldige synsfelt fra det representative området av snittet. Graden av fargeintensitet ble estimert som middelerdi av DAB-areal farging fra et minimum på 900 celler i 10 mikroskopiske synsfelt ved x400 forstørrelse. Evaluering av fargingsreaksjonen ble utført ved å bruke en immunoreaktivitets (IR) score, som er fargeintensitet (FI) i pixler multiplisert med det fargete arealet i prosent. Data fra VIA ble delt inn i fem ulike IR grupper som liknet på graderingene i den semikvantitative evalueringen av farging. Det ble satt grenseverdier som definerte disse gruppene før analysen, for å sikre omtrentlig like mange per gruppe. IR skalaen var som følger: IR 0 = [0,1), IR 2 = [5,80), IR 3 = [80,110), IR 4 = [110,∞).

Etikk

Denne studien ble godkjent av Forskningsetisk komitè i Nord-Norge (REK, Ref.200303108-3/IAY/400).

Statistiske analyser

Data ble presentert som gjennomsnittet \pm gjennomsnittets standarfeil (SEM). Assosiasjoner mellom de semikvatitative estimater for ekspresjon av IGFBP2 og de kvantitative målingene med digital bildeanalyse ble testet med Spearmans korrelasjonskoeffisient. Parametrisk studentens *t*-test ble brukt for å sammenlikne de individuelle gruppene. Forskjellene i ekspresjon av IGFBP2 mellom gruppene ble undersøkt med Dunnetts test. Sammenhengen mellom IGFBP2 ekspresjon og reseptorstatus i malignt vev ble testet med ikke-parametrisk Mann-Whitney U-test. Alle *p*-verdier er tosidige. For alle de statistiske analysene ble en *p*-verdi på $< 0,05$ ansett som signifikant.

RESULTATER

Karakteristikk av de 120 kasus

Grupperingen og fordelingen av de histologiske diagnosene er vist i Tabell 1. Gruppe I hadde 32 kasus, gruppe II hadde 24 og 64 kasus hørte til gruppe III. Gruppe IIIs fire undergrupper hadde hver mellom 13 og 19 kasus. 53% av kasus i gruppe III var ER positiv, og 52% var PGR positiv. Gjennomsnittsalderen til pasientene i gruppe III var litt høyere enn i gruppe I og II. Denne forskjellen var ikke signifikant. Andelen postmenopausale og menopausale pasienter var noe større i gruppe III sammenliknet med gruppe II, og gruppe II sammenliknet med gruppe I. Denne forskjellen var heller ikke signifikant.

Korrelasjon mellom kvantitative og semikvantitative scoringer

De to prosedyrene semikvantitativ estimering og kvantitativ VIA, korrelerte godt for IGFBP2 (Spearman's korrelasjonskoeffisient,; $r = 0,92$, $p < 0,001$). Dette er vist i figur 1.

Ekspresjon av IGFBP2 i gruppe I, II og III.

Tabell 2 viser semikvantitative og kvantitative scoringer av ekspresjon av IGFBP2 i benignt og malignt brystvev. Ekspresjonen av IGFBP2 viste seg nærmest utelukkende i epiteliale celler. Stroma viste ingen signifikant farging. Enkelte tumorpreparater viste en heterogenitet i farging. Ulikhetene forekom intracellulært og bestod i variasjon i intensitet eller flekkete DAB farging. Det ble observert en signifikant forskjell i den immunhistokjemiske ekspresjonen av IGFBP2 i alle tre grupper ($p < 0,001$) ved både den semikvantitative og kvantitative metoden. I gruppe I ga den digitale bildeanalysen data fra 0,06 til 0,58 (semikvantitativ scoring var mellom 0,18 og 0,67). I gruppe II var kvantitativ scoring mellom 1,99 og 3,42 (semikvantitativ mellom 1,27 og 1,92). I gruppe III lå data mellom 7,33 og 11,59 (semikvantitativ mellom 2,94 og 3,58). Det var ingen signifikant forskjell mellom invasive lobulære carsinomer og invasive duktale carsinomer, ei heller mellom gradene I, II og III innen disse entitetene (Dunnet test). De høyeste scoringene ble gjort i invasive duktale carsinomer, grad II-III.

Bilder av immunhistokjemifargete snitt

Figur 2a) og b) viser sterk farging av IGFBP2 i cytoplasma i de neoplastiske cellene ved invasivt duktalt carsinom. Figur 2c), d) og e) viser svak flekkvis farging av IGFBP2 i duktalt carsinoma in situ. Figur 2f) viser ingen farging i normal kjertel.

Korrelasjon mellom reseptorstatus og IGFBP2

Tabell 3 viser ingen signifikant forskjell ved semikvantitativ og kvantitativ scoring av IGFBP2 i ER+ versus ER- invasive carsinomer, eller PGR+ versus PGR- invasive carsinomer (Mann-Whitney test). Ingen korrelasjon ble funnet mellom ER, PGR og IGFBP2 når disse ble betraktet som avhengige variabler (data er ikke vist).

DISKUSJON

Ekspresjon av vekstfaktorer og deres reseptorer kan være en viktig mekanisme for kreftutvikling og abnorm cellevekst. Det er funnet et høyt nivå av IGFBP2 i blod fra pasienter med prostatacarcinom sammenliknet med nivå hos pasienter med benign prostata hyperplasi. Dette antyder en sammenheng mellom dette proteinet og malignitet.¹⁵ *In vitro* studier, hvor etablerte mammacancer cellelinjer har vært brukt, antyder at svulster som uttrykker IGF1 reseptorer responderer ikke bare på sirkulerende serumnivåer med IGF produsert av leveren, men også på IGF produsert av tumoren selv som virker autokrint og/eller parakrint.^{2,16} Både IGF1 og 2 stimulerer cellevekst og uttrykkes i brystcarcinomer.^{17,18} IGFBP proteinene virker ved å enten potensierte eller inhibere virkningen av de ulike IGF.¹⁹ Den variable og rike tilstedeværelsen av de ulike IGFBP i humane brysttumores antyder at disse molekylene spiller en fysiologisk rolle som modulatorer av IGF i cancer mammae. Denne rollen kan være ulik i forskjellige tumores, ikke bare avhengig av hvilke IGFBP som uttrykkes, men også av individuelle faktorer som alder, nivå av endogene hormoner og menopausestatus.

I denne studien har vi klarlagt uttrykkningen av IGFBP2 for en kohorte på 120 reseksjonspreparater fra kvinner som var under evaluering av sin brystpatologi. Oss bekjent, har ingen tidligere immunhistokjemisk evaluert ekspresjon av IGFBP2 i brystcarcinomer. Epiteliale celler i invasive carcinomer uttrykte signifikant mer cytoplasmisk IGFBP2 enn i carcinoma *in situ*, hyperplasi eller normale kjertelceller. Dette funnet er i samsvar med tidligere rapporter som viser at IGFBP2 øker IGF1 induert mitogenisitet i cancerceller.²⁰ Både IGF1 og 2 blir foreslått syntetisert av de stromale cellene i tumor.²¹ Dette fremmer betydningen av interaksjonen mellom epiteliale og stromale celler i kontrollen av brystkreftcellers IGF-styrte proliferasjon.

Brystkreft tumorcellelinjer som er østrogen positive har vist økt sekresjon av IGFBP2 i forhold til østrogen negative cellelinjer.²² I denne studien har vi ikke funnet en slik sammenheng mellom ER status og ekspresjon av IGFBP2. Forklaringen kan være at cellepopulasjoner i humane tumores er heterogene og ved en sammenhengende kultur av cellelinjer får man fram selektive egenskaper. Ved å ekstrahere IGFBP2 protein fra brystkreftprøver viste en ligand blot analyse en positiv korrelasjon mellom mengde IGFBP2 og reseptorstatus i prøvene.²³ De ulike resultatene i disse studiene kan forklares på bakgrunn av metodiske ulikheter. Ved

immunohistokjemi måler vi kun proteinene uttrykt av de epiteliale cellene. Ved ligand blot analyse måles den totale mengde protein i tumorvevet (både stromale og epiteliale celler). Men, det var ingen signifikant forskjell i ekspresjon av IGFBP2 mellom invasive lobulære carsinomer og duktale carsinomer, eller mellom grad I, II og III i de ulike entitetene. Dette stemmer med den manglende korrelasjon mellom IGFBP2 og reseptorstatus, siden lav malignitetsgrad er positivt korrelert med ER positivitet.

Både semikvantitativ og kvantitativ analyse viste signifikante forskjeller i den immunohistokjemiske ekspresjon av IGFBP2 i de ulike histologiske gruppene. Digital bildeanalyse (VIA) av immunohistokjemifarging og vevsegenskaper gir et objektivt kvantitativt mål med høy sensitivitet og spesifisitet.¹⁴ Det var god korrelasjon mellom farge VIA og den semikvantitative analyse, trass i subjektiviteten i den sistnevnte.

Våre data viser at IGFBP2 signaler i auto/paracrine regulatoriske mekanismer er påvirket vekst av brystcarsinomer og at IGFBP2 er en uavhengig malignitetsindikator. De ulike IGF og IGFBP er direkte involvert i endringen av de proliferative og apoptotiske mekanismene i malignt vev. Videre forskning på forholdet mellom IGF aksene og tumorogene prosesser vil ikke bare gi ny innsikt i de intracellulære mekanismene for kontroll av cellevekst, men også gi muligheten for kreftbehandling som retter seg direkte inn mot komponenter i IGF systemet.

REFERANSER

1. Zapf J, Froesch ER. Pathophysiological and clinical aspects of the insulin-like growth factors. *Horm Res* 24: 160-165, 1986
2. Daughaday WH. The possible autocrine/paracrine and endocrine roles of insulin-like growth factor of human tumors. *Endocrinology* 127: 1-4, 1990
3. Delhanty PJ, Han VK. The characterization and expression of bovine insulin-like growth factor-binding protein-2. *J Mol Endocrinol* 9: 31-38, 1992
4. Delhanty PJ, Han VK. The expression of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-2 and IGF-II genes in the tissues of the developing bovine fetus. *Endocrinology* 132: 41-52, 1993
5. Bourner MJ, Busby WH Jr, Siegel NR, Krivi GG, McCusker RH, Clemmons DR. Cloning and sequence determination of bovine insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2): comparison of its structural and functional properties with IGFBP-1. *J Cell Biochem* 48: 215-26, 1992
6. Wood TL, Rogler L, Streck RD, Cerro J, Green B, Grewal A, Pintar JE. Targeted disruption of IGFBP-2 gene. *Growth Regul.* 3: 5-8, 1993
7. Reeve JG, Schwander J, Bleehen NM. IGFBP-2: an important regulator of insulin-like growth factor action in human lung tumours? *Growth Regul.* 3_ 82-84, 1993
8. Richardsen E, Ukkonen T, Bjørnsen T, Mortensen E, Egevad L, Busch C. Overexpression of IGFBP2 is a marker for malignant transformation in prostate epithelium. *Virchows Arch* 442: 329-335, 2003
9. Busund LT, Ow KT, Russell P, Crowe PJ, Yang JL. Expression of insulin-like growth factor mitogenic signals in adult soft-tissue sarcomas: significant correlation with malignant potential. *Virchows Arch* 444: 142-8, 2004
10. Tavassoli FA and Devilee P. World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumors of the Breast and Female Genital Organs. IARC Press. 69008 Lyon, France, 2003. ISBN 9283224124.

11. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 19: 403-410, 1991
12. Shousa S and Peston D. Immunohistochemical demonstration of estrogen and progesterone receptors in paraffin sections of breast carcinoma. *Current Diagnostic Pathol* 4: 176-180, 1997
13. Barnes DM, Harris WH, Smith P, Millis RR, Rubens RD. Immunohistochemical determination of estrogen receptor: comparison of different methods of assessment of staining and correlation with clinical outcome of breast cancer patients. *Br J Cancer* 74: 1445-1451, 1996
14. Skinner JM, Zhao Y, Coventry B, Bradley J: Video image analysis in pathology. *Dis markers* 11: 53-70, 1993
15. Ho JP, Baxter RC. Insulin-like growth factor-binding protein-2 in patients with prostate carcinoma and benign prostatic hyperplasia. *Clin Endocrinol* 46: 145-154, 1997
16. El-badry OM, Minniti C, Kohn EC, Houghton PJ, Daughaday WH, Helman LJ. Insulin-like growth factor II acts as an autocrine growth and motility factor in human rhabdomyosarcoma tumors. *Cell Growth Differ* 1: 325-331, 1990
17. Cullen KJ, Allison A, Martire I, Ellis M, Singer C. Insulin-like growth factor expression in breast cancer epithelium and stroma. *Breast Cancer Res Treat* 22: 21-29, 1992
18. Yee D, Paik S, Lebovic GS, Marcus RR, Favoni RE, Cullen KJ, Lippman ME, Rosen N. Analysis of insulin-like growth factor I gene expression in malignancy: evidence for a paracrine role in human breast cancer. *Mol Endocrinol* 3: 509-517, 1989
19. DeMellow JSM and Baxter RC. Growth hormone dependent insulin-like growth factor binding protein both inhibits and potentiates IGF stimulated DNA synthesis in skin fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 156: 199-204, 1988
20. Yee D, Favoni RE, Lupu R, Cullen KJ, Lebovic GS, Huff KK, Lee PDK, Lee YL, Powell DR, Dickson RB, Rosen N, Lippman ME. The insulin-like growth factor binding protein BP25 is expressed by human breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 158: 38-44, 1989

21. Manni A, Badger B, Wei L, Zaenglein A, Grove R, Khin S, Heitjan D, Shimasaki S, Ling N. Hormonal regulation of insulin-like growth factor binding protein expression by breast cancer cells *in vivo*: evidence for stromal epithelial interactions. *Cancer Res* 11: 2934-2942, 1984
22. Clemmons DR, Camacho- Hubner C, Coronado E, Osborne CK. Insulin-like growth factor binding protein secretion by breast carcinoma cell lines: correlation with estrogen receptor status. *Endocrinology* 127: 2679-2686, 1990
23. Yee D, Sharma J, Hilsenbeck SG. Prognostic significance of insulin-like growth factor-binding protein expression in axillary lymph node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 23: 1785-1789,1994

TABELL 1. Fordeling og gruppering av histologiske diagnoser, hormonreseptorstatus hos maligne kasus og pasientalder.

Karakteristikk		Antall	%
Gruppe I	Normal (N)	11	9
	Ikke-proliferativ fibrocystisk forandring	12	10
	Duktal eller lobulær hyperplasi	9	8
Gruppe II	Atypisk duktal eller lobulær hyperplasi	11	9
	Duktal/lobulær carcinoma <i>in situ</i>	13	11
Gruppe III	Duktalt carcinom, grad I	17	14
	Duktalt carcinom, grad II	19	16
	Duktalt carcinom, grad III	15	12
	Lobulært carcinom, grad I-III	13	11
Total		120	100
Reseptorstatus i gruppe III:			
Reseptorstatus i gruppe III:	ER +	34	53
	ER –	30	47
	PGR +	33	52
	PGR –	31	48
Gjennomsnittlig alder:			
Gjennomsnittlig alder:	Gruppe I	54 år (rang 22-68)	
	Gruppe II	52 år (rang 29-62)	
	Gruppe III	59 år (rang 32-90)	
Menopausal/postmenopusal:			
Menopausal/postmenopusal:	Gruppe I	25	78
	Gruppe II	20	83
	Gruppe III	60	92

TABELL 2. Semikvantitativ og kvantitativ scoring av ekspressjon av IGFBP2 (gjennomsnitt \pm SEM) i benignt og malignt humant brystvev.

	Semikvantitativ	Kvantitativ
Gruppe I:		
Normalt brystvev	0,18 (\pm 0,12)	0,06 (\pm 0,03)
Ikke-proliferativ fibrocystisk forandring	0,17 (\pm 0,11)	0,09 (\pm 0,05)
Hyperplasi	0,67 (\pm 0,17)	0,58 (\pm 0,15)
Gruppe II:		
Atypisk hyperplasi	1,27 (\pm 0,19)	1,99 (\pm 0,45)
Carcinoma <i>in situ</i>	1,92 (\pm 0,18)	3,42 (\pm 0,49)
Gruppe III:		
Duktalt carcinom, grad I	2,94 (\pm 0,18)	7,33 (\pm 0,96)
Duktalt carcinom, grad II	3,58 (\pm 0,14)	11,59 (\pm 0,93)
Duktalt carcinom, grad III	3,33 (\pm 0,16)	11,52 (\pm 0,97)
Lobulært carcinom	3,15 (\pm 0,19)	9,56 (\pm 1,08)
Dunnett test		
Gruppe I versus gruppe II	$p < 0,001$	$p < 0,001$
Gruppe II versus gruppe III	$p < 0,001$	$p < 0,001$
Gruppe I versus gruppe III	$p < 0,001$	$p < 0,001$

TABELL 3. Ekspresjon av IGFBP2 (gjennomsnitt \pm SEM) i invasive brystcarcinomer og reseptorstatus.

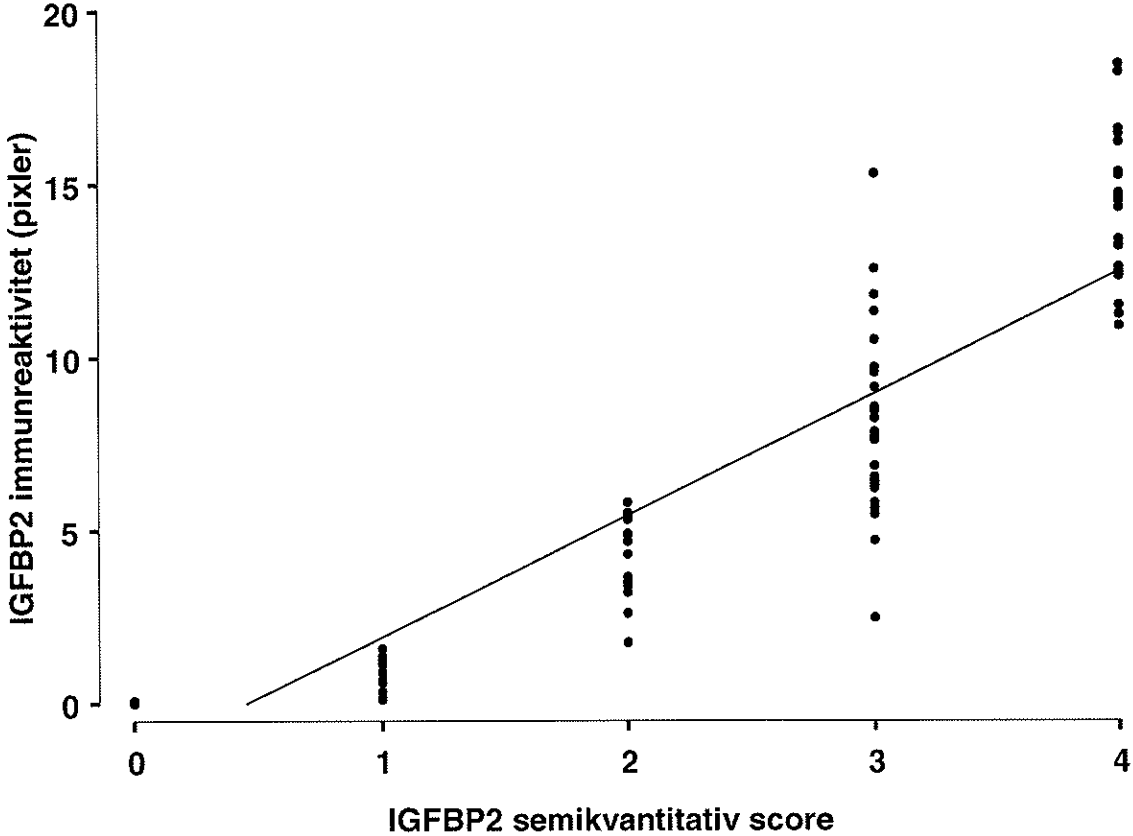
	Semikvantitativ	Kvantitativ
ER +	3,18 (\pm 0,13)	9,74 (\pm 0,74)
ER –	3,37 (\pm 0,11)	10,35 (\pm 0,75)
PGR +	3,36 (\pm 0,12)	10,37 (\pm 0,72)
PGR –	3,16 (\pm 0,12)	9,66 (\pm 0,78)
Mann-Whitney test		
ER + versus ER–	IS	IS
PGR + versus PGR –	IS	IS

IS = ikke signifikant

FIGURTEKST

- FIGUR 1. De to prosedyrene kvantitativ farge VIA og semikvantitativ estimering korrelerte bra for IGFBP2 (Spearman's korrelasjonskoeffisient, $r = 0,92$, $p < 0,001$).
- FIGUR 2. Det sees sterk farging i cytoplasma i de neoplastiske cellene ved invasivt duktalt carsinom i a) og b). Bilde c), d) og e) viser svak, punktvis farging av IGFBP2 i duktalt carsinoma *in situ*. Normal kjertel viser ingen farging i f).

FIGUR 1



FIGUR 2

