

MEME KARSİNOMLARINDA KONVANSİYONEL PROGNOSTİK HISTOPATOLOJİK PARAMETRELER VE HORMON RESEPTÖRLERİ İLE c-erbB-2 BOYANMA ÖZELLİĞİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Uzman Dr. Elif SELEK (*), Bölüm Şef Yrd. Ali Rıza KANDİLOĞLU (*), Bölüm Şefi Doç. Dr. Hakan POSTACI (*), Başasistan Uz. Dr. Emel DİKİCİOĞLU (*)

ÖZET: 1991-1992 yıllarında SSK İzmir Buca hastanesinde primer meme kanserini nedeniyle basit yada radikal mastektomi uygulanan 49 olguya ait 50 mastektomi piyesi incelendi. Birli bilateralite gösteren olgular çeşitli histopatolojik parametreler (histolojik tip, histolojik grade, peritümöral lenfositik yanıt, elastozis, eşlik eden lezyon, lenfatik ve kan damarı invazyonu, nekroz varlığı ve derecesi, meme başı ve deri tutulumu, lenf nodu metastazı ve perinodal yayım) açısından değerlendirildi. Bulgular östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve c-erbB-2 boyanma özelliği ile karşılaştırıldı. c-erbB-2 pozitifliği saptanan toplam 21 olgunun 12 sinde damar invazyonu mevcuttu. Ancak istatistiksel olarak bu ilişki anlamlı değildi. c-erbB-2 pozitif ve lenf nodu metastazı saptanan 16 olgunun 12'sinde metastatik lenf nodu sayısı 4 ve üzerindeydi. İstatistiksel olarak c-erbB-2 pozitifliği ve lenf nodu metastazı arasındaki ilişki anlamlı bulundu ($P<0,001$). c-erbB-2 pozitifliği saptadığımız toplam 21 olgudan 11'nin histolojik grade III olarak değerlendirilmiş olup istatistiksel olarak bu ilişki anlamlı idi ($P<0,001$).

ANAHTAR KELİMELEER: Meme kansinom, prognoz, hormon reseptörleri, c-erbB-2

GİRİŞ

Meme kanseri, kadınlarda görülen en sık malign tümör olup son yıllarda erken tanı ve tedavi yöntemleri konusundaki yoğun araştırmalara karşın, kadın ölüm nedenleri arasında ön sıralarda yer almaktadır.

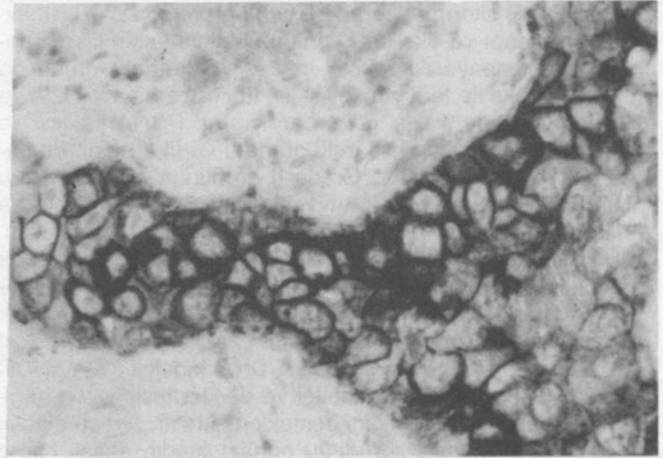
Meme kansinomlarında prognoz belirlenmesinde yaş, tümör çapı, histolojik tip, histolojik grade, tümör nekrozu, elastozis, damar invazyonu, ER ve PR yanısıra son yıllarda kullanım alanına giren proliferatif indeks ve bazı immünohistokimyasal tümör belirleyicilerinin etkili olduğu vurgulanmaktadır^{1,2,3,4,5}.

Fisher¹ ve arkadaşları meme kansinomlarını, uzun süreli takip ve tedaviye yanıt sonuçlarına göre üç prognostik gruba ayırmışlardır; invaziv duktal ve atipik medüller kansinom prognozu kötü grubu, invaziv lobüler kansinom ve medüller kansinom prognoz orta derecede iyi olan grubu oluşturmaktadır.

Bloom ve Richardson⁶ tarafından tanımlanan histolojik grade sisteminin prognozla iyi bir korelasyon gösterdiği ve çoğu araştırmacı tarafından en iyi prognoz belirleyicisi olduğu kabul edilmektedir^{2,7,8,9,10}. Prognozu olumsuz yönde etkilediği bilinen lenfatik ve kan damarı invazyonu, lenf nodu tutulumu ve uzak metastaz riskini artırmaktadır^{1,7,8,10,11,12}. Metastatik lenf nodu sayısı yanısıra tutulan lenf nodunun seviyesi ve perinodal yayım varlığı da önemlidir^{1,3,7,13}.

Östrojen reseptör pozitifliği perimenopozal kadınlarda daha sıktır. Reseptör pozitifliğinin düşük gradeli, iyi diferanşiyeli tümörlerle birlikte olduğu ve bu hastaların sağkalım süresinin daha fazla olduğu belirtilmektedir^{2,12,14,15}.

c-erbB-2 tyrosine kinase familyasından, epidermal growth faktör reseptör benzeri birtransmembran proteinidir. 1986 da önce insan adenokarsinomlarında rapor edildi. Meme kansinomlarında ilk kez Slamon ve arkadaşları¹⁶ çalıştılar. Daha sonra birçok araştırmacı tarafından noninvaziv ve invaziv meme kansinomunda çalışılmıştır. Hemen tüm araştırmacılar c-erbB-2 pozitifliğinin kötü prognoz ve tümör agresivitesi ile birlikte olduğunu vurgulamaktadırlar^{5,16,17,18,19}.



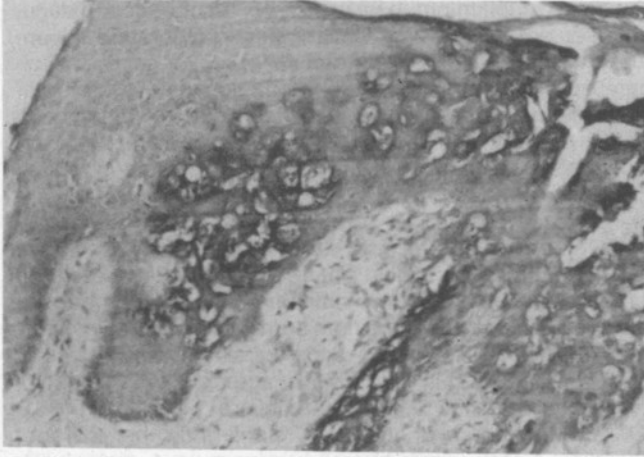
Resim 1: İnvaziv duktal kansinomda şiddetli membranöz c-erbB-2 pozitifliği (X400).

MATERYAL VE METOD

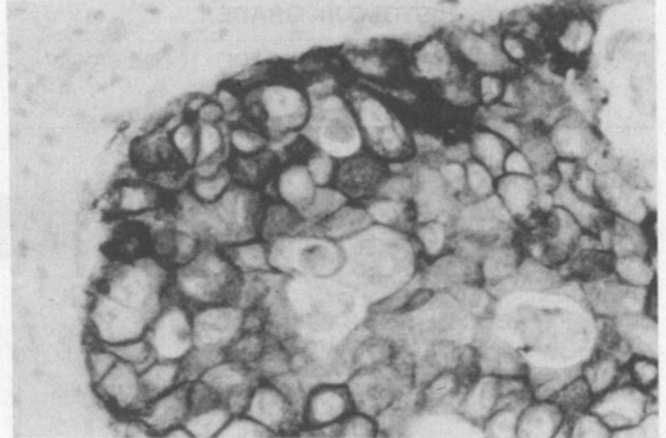
1991-1992 yıllarında SSK İzmir Buca Hastanesinde primer meme kanserini nedeniyle basit yada radikal mastektomi uygulanmış, 49 hastaya ait 50 mastektomi piyesi incelendi. Bir olgu bilateralite göstermekteydi. Olguların hangi memeye ait olduğu cerrah tarafından belirtilmiş, aksiller bölge ve tümör işaretlenmişti. Önce tümörden nekrozsuz, uygun örnek alınarak reseptör tayini için, frozen kesit amacıyla donduruldu. Makroskopik tanımlama ve parça alımında Patoloji Çalışma Grubunun (Pathology Working Group)²⁰ önerdiği yöntem uygulandı. Mastektomi materyalleri % 10 luk formalinde bir gün bekletildikten sonra, oniki kadranın her birinden lezyonlu ve lezyonsuz alanları içeren en az iki parça takibe alındı. Aksiller bölge dikkatli bir şekilde diseke edilerek her bir lenf düğümünden en büyük çapı içeren birer parça örnekleme yapıldı. Rutin takip sonrası elde edilen 5 mikron kalınlığındaki kesitler hematoxilen-eozin ile boyandı. Tüm preparatlar belirlenen histopatolojik parametreler açısından ışık mikroskobu düzeyinde değerlendirildi.

Tümör çapı; 0,1-2cm, 2,1-4cm, 4cm'nin üstü olmak üzere üç grupta incelendi. Tümörlerin histolojik tiplendirmesinin

* SSK Buca Eğitim Hastanesi Patoloji Bölümü, İZMİR



Resim 2 : Paget hastalığında cerbB-2 pozitif Paget hücreleri (X400).



Resim 3 : Komedokarsinom alanında şiddetli membranöz cerbB-2 pozitifliği (X400)

de Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) klasifikasyonu esas alındı. Histolojik dercelendirme için 1957 de Bloom ve Richardson⁶ tarafından önerilen ve daha sonra Ellston ve Ellis²¹ tarafından modifiye edilen yöntem uygulandı. Fisher²² ve arkadaşları tarafından belirtildiği şekilde, lümen içinde tümör hücreleri ile birlikte fibrin, pıhtı ve trombus varlığı yanı sıra tek sıralı endotelle döşeli olması damar invazyonu kanıtı olarak kabul edildi. Ayrıca lümende eritrositlerin varlığı kan damarı invazyonunu destekleyici bir bulgu olarak değerlendirildi. Metastatik lenf nodu sayısına göre olgular 4'ün altı ve 4'ün üstünde metastatik noda sahip olmak üzere iki grupta incelendi. Ek olarak perinodal yayım araştırıldı.

Yeterli tümör içerdiği belirlenen frozen bloklardan, Dandlike VB²⁴ ve Fisher B²⁴ ve arkadaşları tarafından tanımlanan fluoresan işaretleme yöntemi ile ER ve PR tayini yapıldı. Sigma Chemical Company'nin 10mg lık (E-6507) ve (P-8779) nolu fluorescein isothiocyanate ile işaretli conjugate'ı kullanıldı. Fluoresan mikroskobu altında her preparatta toplam 500 hücre sayıldı. Boyanan hücre sayısı %10 ve üzerinde olan olgular pozitif olarak değerlendirildi.

İmmünohistokimyasal çalışma için antikorlar (StrAvigen Supper Sensitive) ve kromojen bio-Genex firmasından alındı. Fareden elde edilen c-erbB-2 ye karşı geliştirilmiş, dilüsyona gerek duyulmayan, kullanıma hazır, monoklonal primer antikor (AM134-5M) kullanıldı. Negatif kontrol için negatif kontrol serumu (HK119-7M), pozitif kontrol için ise komedo karsinom alanlarının yaygın olduğu bir preparat kullanıldı. Kromojen olarak Fast Red, zıt boya olarak Mayer'in hematoksileni uygulandı. Basamaklar arasında kesitler fosfat tamponlu solüsyon (PBS, pH 7,6) ile yıkandı. c-erbB-2 pozitifliği boyanma şiddetine göre, SOOMRO ve arkadaşlarının²⁵ belirttiği şekilde üç grupta değerlendirildi. Boyanma yok, boyanan hücre sayısı % 33 ün altında ise hafif, %33-%66 arasında orta şiddetli, %66 nın üzerinde ise şiddetli olarak değerlendirildi. Her bir olgu, veriler, histopatolojik parametreler ve bulgular arası ilişkiler açısından araştırıldı. İstatistiksel olarak anlamlılıklarının değerlendirilmesinde X² (CHI-SQUARE) testi kullanıldı.

BULGULAR

En genç olgu 29, en yaşlı olgu 81 yaşında olup ortalama yaş 52,26 dir. 27 Olguda (%54) primer tümör sağ meme, 23 olguda (%46) sol meme yerleşimlidir. Tümör 12 olguda (%24) multisentrik, 11 olguda (% 22) üst dış periferik kadranda lokalizasyonludur. 5 olguda primer tümör çapı 2cm

nin altında, 19 olguda 2,1-4 cm, 26 olguda 4cm nin üzerindedir. Yaş ortalaması yükseldikçe primer tümör çapı artmaktadır. En sık görülen histolojik tip invaziv duktal karsinom (%44) dur. Sonra sırasıyla atipik medüller karsinom (%8), intraduktal komponenti belirgin İDK (%6), invaziv lobüler karsinom (%6), invaziv papiller karsinom (%4), Paget hastalığı (%4), tübüler karsinom (%2), müsinöz karsinom (%2), taşlı yüzük hücreli karsinom (%2), metaplastik karsinom (%2) histolojisi izlenirken, 8 olguda İDK + İLK kombinasyonu, 2 olguda (%4) İLK + müsinöz karsinom morfolojisi saptandı. 38 olguda tümöre değişik lezyonlar eşlik etmekteydi. En sık eşlik eden lezyon memenin kistik hastalığı (%40) olup yaş ilerledikçe duktal hiperplazi ve atipik duktal hiperplazi birliktelik gösteriyordu. Elastosis mevcut olan toplam 25 olgunun 8 inde ER pozitifliği saptandı. Peritümöral lenfosit infiltrasyonu 10 olguda izlenmezken, 30 olguda hafif, 9 olguda orta şiddetde, 1 olguda şiddetli olarak izlendi. Lenfatik ve kan damarı invazyonu saptanan toplam 26 olgunun 24'ünde primer tümör çapı 2cm'nin üzerindeydi. Nekroz saptanan toplam 34 olguda, nekroz varlığı ve derecesinin histolojik grade yükseldikçe arttığı görüldü. Paget hastalığını da içeren 7 olguda meme başı, 6 olguda da deri tutulumu izlendi. Bu olguların tamamında primer tümör çapı 2cm'nin üzerindeydi. Lenf düğümü metastazı saptanan toplam 27 olgunun 8'inde metastatik nod sayısı 4'ün altında iken, 19'unda 4'ün üzerindeydi. 9 olguda ek olarak perinodal yayım saptandı. Bu olguların 7'sinde lenfatik ve kan damarı invazyonu mevcuttu. Lenf nodu metastazına sahip tüm olgularda primer tümör çapı 2 cm nin üzerinde olup, HG 2 ve HG 3 id. Olguların % 68'inde izlenen nekroz varlığının histolojik grade yükseldikçe arttığı görüldü.

ER pozitifliği saptanan 13 olgu perimenopozal ileri yaş grubu hastalardı. 19 olguda progesteron pozitifliği saptandı. Toplam 50 olgunun 21 inde (%42) c-erbB-2 pozitifliği saptandı. 13 olguda c-erbB-2 pozitifliği hafif, 5 olguda orta şiddetde, 3 olguda da şiddetli idi (Resim 1). Pozitiflik saptadığımız 21 olgunun 7 si İDK, 6'sı kombine (İDK+İLK), 2 si Paget hastalığı (Resim 2), 2'si atipik medüller karsinom, 1'i intraduktal komponenti belirgin İDK (Resim 3), 1'i taşlı yüzük hücreli karsinom, 1'i metaplastik karsinom histolojisine sahipti. Atipik medüller karsinom, kombine karsinom ve metaplastik karsinomda c-erbB-2 pozitifliği İDK alanlarına sınırlıydı. Pozitiflik saptanan 21 olgudan 19'nun HG 2 ve HG 3 olarak değerlendirildi (Tablo 1). İstatistiksel olarak bu ilişki anlamlılık sınırında (P=0,055) olup, c-erbB-2 pozitif HG'si 3

TABLO 1 : c-erbB-2 POZİTİFLİĞİ VE HİSTOLOJİK GRADE

c-erbB-2 ŞİDDETİ	HİSTOLOJİK GRADE			OLGU SAYISI
	1	2	3	
YOK	4	22	3	29
HAFİF	0	8	5	13
ORTA	1	1	3	5
ŞİDDETLİ	1	2	0	3
TOPLAM	6	33	11	30

TABLO 2 : c-erbB-2 POZİTİFLİĞİ VE DAMAR İNVAZYONU

c-erbB-2 ŞİDDETİ	DAMAR İNVAZYONU		OLGU SAYISI
	YOK	VAR	
YOK	15	14	29
HAFİF	6	7	13
ORTA	2	3	5
ŞİDDETLİ	1	2	3
TOPLAM	24	26	50

TABLO 3 : c-erbB-2 POZİTİFLİĞİ VE LENF NODU METASTAZI

c-erbB-2 ŞİDDETİ	LENF NODU METASTAZI			OLGU SAYISI
	YOK	1-3	4 VE ÜZERİ	
YOK	17	5	7	29
HAFİF	1	2	10	13
ORTA	4	0	1	5
ŞİDDETLİ	0	2	1	3
TOPLAM	22	9	19	50

olan 11 olguda ise ilişki anlamlı bulundu ($P<0,001$). Pozitiflik izlediğimiz 21 olgunun 12 sinde (%57,14) damar invazyonu mevcuttu (Tablo 2). Pozitif boyanma izlenen 21 olgunun 16'sında (%76,2) lenf düğümü metastazı izlendi. (Tablo 3). İstatistiksel olarak bu ilişki anlamlı idi ($P<0,001$). 12 olguda metastatik lenf nodu sayısı 4 ve üzeriye idi.

TARTIŞMA

Çalışmaya alınan 48 i modifiye radikal, 2 si basit mastektomi materyalinden oluşan 50 olgunun %54 ünde tümör sağ memede lokalizeydi. Kaynaklarda vurgulanan sol meme üstünlüğünden farklı sonuç elde etmemiz çalışma içine taze, tesbitsiz olarak gönderilmiş, ER çalışabildiğimiz örneklerin alınmasına bağlandı. Bir olgumuz her iki memede eş zamanlı tümöre sahipti. Sağ memedeki tümör İDK iken, sol memedeki tümör İLK morfolojisindeydi. Ayrıca bu tümörler aynı memede in situ karsinom formlarını bulundurmaktaydı. Bu nedenle olgu, bir memeden diğerine metastaz değil, bu konudaki bilgilerle uyumlu olarak eş zamanlı bilateral tümör gelişimi olarak kabul edildi^{12,26,27}.

Çalışmalarda, meme karsinomlarında c-erbB-2 pozitifliğinin kötü prognostik işaret olduğu vurgulanmakta ve değişik serilerde invaziv karsinomlarda %17-44, in situ duktal karsinomlarda % 44-46 oranında pozitif boyanma saptandığı bildirilmektedir^{17,18,19,28}. Çalışmamızda da bildirilen sınırlar içerisinde 21 olguda (%42) pozitif boyanma saptanmıştır.

Boyanma dağılımının baskın olarak membranöz olduğu, bazı serilerde sitoplazmik boyanmanın membranöz boyanmaya eşlik ettiği belirtilmektedir^{17,18,19,28}. Benzer şekilde 14 olgumuzda (%28) pozitiflik membranöz boyanmaya eşlik ettiği belirtilmektedir^{17,18,19,28}. Benzer şekilde 14 olgumuzda (%28) pozitiflik membranöz boyanmaya eşlik etmekteydi. Gusterson²⁸ ve arkadaşlarının çalışmalarında da izledikleri gibi 1 olgumuzda apokrin metaplazi alanında pozitif boyanma görüldü. Ancak diğer olgularda ve alanlarda tümör dışı boyanma görülmeydi. Pozitif boyanmanın histolojik tiplere dağılımının farklı olduğu, in situ ve invaziv lobüler karsinomlarda boyanmanın yok ya da hafif derecede olması nedeniyle c-erbB-2 nin lobüler karsinomlarda anlamlı olmadığı belirtilmektedir. Özellikle in situ duktal karsinom, İDK ve Paget hastalığında anlamlı olup tümör agresivitesini belirlediği vurgulanmaktadır^{17,18,19,28,29,30}. Bu bilgilere paralel olarak 8 İDK, 6 kombine karsinomun İDK alanlarında, her 2 Paget hastalığı, 1 taşlı yüzük hücreli karsinom ve 1 metaplastik karsinom un İDK alanında pozitif boyanma izlenmiş olup, İLK- tübüler karsinom, papiller karsinom ve müsinöz karsinomda boyanma görülmeydi.

c-erbB-2 pozitifliği sptadığımız toplam 21 olgudan 16'sının histolojik grade nin 2 ve 3, 8'inin olması istatistiksel olarak anlamlı olup c-erbB-2 nin kötü prognostik işaret olduğunu destekler niteliktedir^{17,18,19,28,29,31,32}. c-erbB-2 pozitifliği izlediğimiz 21 olgunun 12 sinde damar invazyonu izlendi. Ancak bu ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Bazı araştırmacılar tarafından c-erbB-2 pozitifliğinin ER negatifliği ile birlikte olduğu belirtilmektedir³³. Çalışmamızda ER pozitifliği izlediğimiz 13 olgunun 8'inde c-erbB-2 boyanması izlenmedi.

Çalışmalarda modifiye radikal mastektomi materyalinden diseke edilmesi gereken en az lenf nodu sayısının 10 olması gerektiği belirtilmektedir. Çalışmamızda disseke edilen en az lenf nodu 5, en fazla 65 olup ortalama lenf nodu sayısı 22 dir. Metastatik lenf nodu sayısı ve perinodal yayılımın prognozu belirlemede en önemli histopatolojik parametre olduğu bilinmektedir. Fisher¹⁶ ve arkadaşları tarafından 5 yıllık sağ kalımı belirlemede lenf nodu metastazının primer rol oynadığı vurgulanmaktadır. Çalışmamızda metastatik lenf noduna sahip 27 olgunun tamamının tümör çapı 2cm nin üzerinde ve 6 sında damar invazyonu mevcuttur. c-erbB-2 pozitifliğinde lenf nodu metastazı ile iyi bir korelasyon gösterdiğine dikkat çekilmektedir^{33,34}. Bu bilgilerle uyumlu olarak c-erbB2 pozitifliği saptanan 21 olgunun 16'sında lenf nodu metastazı mevcut olup istatistiksel olarak bu ilişki anlamlıdır ($P<0,001$). Olgulardan 16'sında metastatik lenf nodu sayısı 4 ve üzerindedir. Sonuç olarak, olgularımız yeni olup, izlem süresi yetersiz olması nedeniyle prognoz ve sağ kalım süresi ile ilgili sonuçlar verilememektedir. Bulgularımız c-erbB-2 pozitifliğinin, in situ duktal karsinom, İDK ve Paget hastalığında, prognoz belirlemede önemli olduğu bilinen histopatolojik bazı parametrelerle (histolojik grade, ER pozitifliği ve lenf nodu metastazı) ile ilişkili olup tümörün agresivitesini belirlediği sonucunu desteklemektedir.

KAYNAKLAR

1. Fisher ER, Redmond C, Fisher B, bass G and contributing NSABP investigators: pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) : prognostic discriminants for 8 - year survival for node negative invasive breast cancer patients. Cancer 1990; 65: 2121-2128.
2. Page DL; Prognosis and breast cancer, recognition of lethal and favorable prognostic types. Am J Surg Pathol 1991; 15 (4): 334-339.
3. millis RR, Girling AC. Diagnostic Surgical Pathology ed Stenberg New

- York 1994, vol 1, pp 328-330
4. Leong AS-Y, Raymond WA. Prognostic parameters in breast cancer. *Pathology* 1989; 21 : 169-175.
 5. Barnes DM, Lammie GA, Millis RR, Gullick WL et al. An immunohistochemical evaluation of c-erbB-2 expression in human breast carcinoma. *Br J Cancer* 1988; 58:448-452.
 6. Bloom HJG, Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer. A study of 1409 cases of which 359 have been followed 15 years. *Br J Cancer* 1957; 11: 359-377.
 7. Pinder SE, Ellis IO, Galea M, Rouke SO, Blamey RW, Elston CW. Pathological prognostic factors in breast cancer. 3. vascular invasion : relation ship with recurrence and survival in a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1994; 24: 41-47.
 8. Henson DE, Ries L, Freedman LS, Carriaga M. Relationship among outcome, stage of disease and histologic grade for 22,616 cases of breast cancer, the basis for a prognostic index. *Cancer* 1991;68:2142-2149.
 9. Baak JPA, Dop HW, Kurver PHJ, Hermans J. The value of morphometry to classic prognosticators in breast cancer. *Cancer* 1985; 56: 374-382.
 10. Davis BW, Gelber RD, Goldhirsch A, Hartmann WH et al. Prognostic significans of tumor grade in clinical trials of adjuvant therapy for breast cancer with axillary lymph node metastasis. *Cancer* 1986; 58: 26662-2670.
 11. Rosai J : *Breast. Ackerman's Surgical Pathology*, 7. Edition (Ed : Juan Rosai)'da Washington, The C.V.Mosby Company, 1989, 1193-1267.
 12. Page DL, Anderson TJ: *Diagnostic histopathology of the breast*, Churchill Livingstone, Edinburgh London Melbourne and New York, 1987
 13. Fisher B, Baver M, Wickerham L, Redmond CK et al. Relation of number of positive axillary nodes to the prognosis of patient with primary breast cancer, An NSABP update. *Cancer* 1983; 52: 1551-1557.
 14. Fisher ER, Sass R, Fisher B and collaborating NSABP investigators : Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Project for breast cancers (protocol no 4) : X. Discriminanst for ten year treatment failure. *Cancer* 1984; 53: 712-723.
 15. Roses D, Bell DA, Flotte TJ, Taylor R et al. Pathologic predictors of recurrence in stage 1 (T₁N₀M₀) breast cancer. *Am J Clin Pathol* 1982; 78: 817-820.
 16. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987;235: 177-182.
 17. Gusterson BA, Machin LA, Gullick WJ, Gibbs NM et al. Immunohistochemical distribution of c-erbB-2 in infiltrating and in situ breast cancer. *Int J Cancer* 1988; 42: 842-845.
 18. Somerville JE, Clarke L, Biggart JD. c-erbB-2 overexpression and histological type of insitu and invasive breast carcinoma. *J Clin Pathol* 1992; 45: 16-20.
 19. Mccann A, Dervan PA, Johnston PA, Gullick WJ et al. c-erbB-2 oncoprotein expression in primary human tumours. *Cancer* 1990; 65: 88-92.
 20. Pathology Working Group, Breast Cancer Task Force: Standardized management of breast specimens. *Am J Clin Pathol* 1973; 60: 789-798.
 21. 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* 1991; 19: 403-410.
 22. Fisher ER, Gregorio RM, Fisher B, with THE ASISTANCE OF Redmond c, Vellios F, Sommer SC and cooperating investigators: The pathology of invasive breast cancer. A syllabus derived from findings of the National Surgical Adjuvant Breast Project (protocol no:4) *Cancer* 1975; 36: 1-85.
 23. Dandliker WB, Brawn RJ, Hsu ML, Brawn P et al. Investigation of hormone-receptor interactions by means of fluorescence labeling. *Can Res* 1978; 38: 4212-4224.
 24. Fisher B, Gündüz N, Zheng S, Saffer EA. Floresceinated Estrone binding by human and mouse breastcancer cells. *Can Res* 198; 42: 540-49.
 25. Soomro S, Shousha S, Taylor P, Shepard HM, Fldman M. C-erbB-2 expression in different histologic types o invasive breast carcinoma. *J Clin Pathol* 1991; 44: 211-214.
 26. Lesser ML, Rosen PP, Kinne DW. Multicentricity and bilaterality in invasive breast carcinoma. *Surgery* 1982; 91 (2): 234-240.
 27. Fisher ER, Fisher B, Sass R, Wickerhaml and collaborating NSABP investigators: Pathologic findings from the national Surgical Adjuvant Breast Project (protocol no 4) XI. bilateral breast cancer. *Cancer* 1984; 54: 3002-3011.
 28. Gusterson BA, Machin LG, Gullick WJ, Gibbs NM et al. c-erbB-2 expression in benign and malignant breast disease. *Br J Cancer* 1988; 58: 453-457.
 29. Kestings L, Sinclair j, Wright C, Corbett IP et al. C-erb-2 oncoprotein expression in mammary and extramammary Paget's disease, an immunohistochemical study. *Histopathology* 1990; 17: 243-247.
 30. Ramachandra S, Machin L, Ashley S, Monaghan P, Gsterson BA. Immunohistochemical distribution of c-erbB-2 in situ breast carcinoma, a detailed morfological analysis. *J of Pathology* 1990; 161: 7-14.
 31. Tsuda H, Hirohashi S, Shimamoto Y, Hirota T et al. Correlation between histologic grade of malignancy and copy number of c-erbB-2 gene in breast carcinoma. *Cancer* 1990; 65: 1794-1800.
 32. Tavassoli M, Quirke P, Farzaneh F, Lock NJ et al. c-erbB-2/c-erbA co-amplification indicative of lymph node metastasis, and c-myc amplification of high tumor grade, in human breast carcinoma. *Br J Cancer* 1989; 60: 505-510.
 33. Wright C, Angus B, Nicholson S, Sainsbury JRC et al. Expression of c-erbB-2 oncoprotein, a prognostic indicator in human breast cancer. *Cancer Research* 1989; 49:2087-2090.
 34. Berger MS, Locher GW, Saurr S, Gullick WJ et al. Correlation of c-erbB-2 gene amplification and protein expression in human breast carcinoma with nodal status and nuclear grading. *KCancer Research* 1988; 48: 1238-1243.