

MEME KARSİNOMUNDA c-erbB-2 (HER-2/neu) EKSPRESYONUNUN DİĞER PROGNOSTİK FAKTÖRLERLE KARŞILAŞTIRILMASI

Dr. Şeyda ERDOĞAN, Dr. Melek ERGİN, Dr. İlhan TUNCER

ÖZET: Meme karsinomunda, tümörün biyolojik davranışını, tedavi ve prognozunu belirleyen çeşitli faktörler gösterilmiştir. Bunlardan biri olan c-erbB-2 (HER-2/neu), epidermal büyüme faktör reseptörüne benzeyen, hücre membranında tirozin kinaz reseptörünü kodlayan bir onkogendir. Meme karsinomlarında, c-erbB-2 onkoprotein ekspresyonunun ve gen amplifikasyonunun, tek başına ve diğer parametreler ile birlikte prognostik önemi konusunda, yayınlarda farklı sonuçlar mevcuttur. Bu çalışmada meme karsinomu tanısı almış 60 kadın hastaya ait parafin doku örnekleri incelenmiştir. Parafin kesitlerde östrojen reseptörü ve c-erbB-2 protein ekspresyonu immünohistokimyasal teknik ile değerlendirilmiştir. c-erbB-2 ekspresyonu diğer klasik prognostik faktörlerle (hasta yaşı, tümörün histolojik tipi, çapı, grade'i, lenfovasküler invazyon, lenf nodülü tutulumu ve sayısı, östrojen reseptör varlığı) karşılaştırılmıştır. Çalışmamızda, meme karsinomunda, c-erbB-2 ekspresyonu ile artmış metastatik lenf nodülü sayısı, yüksek histolojik grade, lenfovasküler invazyon arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki gösterilmiştir. Ancak, hasta yaşı, tümörün histolojik tipi, çapı ve östrojen reseptör varlığı ile anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Meme karsinomunda, c-erbB-2 ekspresyonu tek başına ve konvansiyonel prognostik faktörler ile birlikte önemli bir parametredir. Ancak diğer prognostik parametreler ile ilişkisini değerlendirmek için ileri çalışmalar gerekmektedir.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: c-erbB-2, immünohistokimya, meme karsinomu, prognostik faktörler

ABSTRACT: CORRELATION OF c-erbB-2 (HER-2/neu) EXPRESSION WITH OTHER PROGNOSTIC FACTORS IN BREAST CARCINOMA. Several factors have been identified in breast carcinoma which affect the biologic behavior, therapy and the prognosis of the tumor. Among these, c-erbB-2 (HER-2/neu) oncogene encodes a transmembrane tyrosine kinase receptor with extensive homology to the Epidermal Growth Factor receptor. In the literature, studies regarding the prognostic role of c-erbB-2 oncoprotein overexpression and gene amplification with and without other parameters are controversial.

In this study, paraffin sections from 60 female breast samples were analyzed. Immunohistochemistry was used to detect estrogen receptor status and c-erbB-2 protein expression. We compared the prognostic impact of c-erbB-2 overexpression with conventional prognostic factors (age, histologic type and size of the tumor, grade, lymphatic invasion, lymph node involvement and estrogen receptor status). Our results showed that c-erbB-2 expression in breast carcinoma is significantly related to the number of metastatic lymph nodes, poor histologic grade and lymphatic invasion. Age, histologic type, tumor size and estrogen receptor status did not correlate with c-erbB-2 status in our study.

This study confirmed the importance of c-erbB-2 overexpression as a single and combined prognostic parameter together with conventional factors. Still further studies need to show the prognostic dependency of c-erbB-2 to the other prognostic parameters.

KEY WORDS: c-erbB-2, immunohistochemistry, breast carcinoma, prognostic factors

GİRİŞ

Meme kanserinde çok sayıda klinik, patolojik özellikleri temel alan, hastanın tedavi ve biyolojik davranışını etkileyen prognostik faktörler tanımlanmıştır. Bunlardan en önemlileri, tümör çapı, aksiller lenf nodülü metastazı, grade, östrojen reseptör varlığı ve c-erbB-2 onkogeninin aşırı ekspresyonudur (1,2).

c-erbB-2 (HER-2/neu) geni, büyüme faktör reseptör tirozin kinaz ailesinden 185-kD ağırlığındaki transmembran proteinini kodlar (2-5). Artmış reseptör ekspresyonu, genin amplifikasyonuna ve bunu takiben, c-erbB-2 mRNA ve P185 proteinin aşırı ekspresyonuna yol açar. Artmış lenf bu protein ekspresyonu immünohistokimyasal yöntemle, tümör hücre membranının yoğun boyanması şeklinde izlenir (4,5).

İnsan meme karsinomlarının %30'unda, c-erbB-2'nin aşırı ekspresyonu (2 kat veya daha fazla) bulunur. Bu aşırı ekspresyon, prognoz ve lenf nodülü metastazlı olgulardaki relaps ile ilişkilidir. c-erbB-2 ekspresyonu; kötü histolojik grade, aksiller lenf nodüllerinin tutulumu ve tutulan lenf nodülü sayısı ile doğru orantılı, östrojen ve progesteron reseptörü ile ters orantılıdır (2). c-erbB-2 anormallikleri, uygulanan çeşitli yöntemlerle tespit edilmektedir. Bunlar gene dayalı teknikler, "Southern ve Slot blot" testi, PCR, FISH, "nonfluorescent" teknikleridir. Kalitatif ve kantitatif c-erbB-2 ölçümleri, frozen kesitler ve formalinle tespitli parafin bloklardan hazırlanan örneklerde immünohistokimyasal yöntemlerle, "Western blot" testi ve ELISA ile yapılır (5,6).

c-erbB-2'nin aşırı ekspresyonu, yalnız meme karsinomlarında değil, mide, prostat, böbrek, over ve serviks karsinomlarında da gösterilmiştir (7-9).

Çalışmamızda, meme karsinomunda, c-erbB-2 ekspresyonunu tespit edip, yaş, tümör histolojik tip, tümör boyutu, grade, lenf nodülü metastaz varlığı, metastatik lenf nodülü sayısı, lenfovasküler invazyon ve östrojen reseptör varlığı ile arasındaki ilişkiyi değerlendirmeyi hedefledik.

MATERYAL VE METOD

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda 1996-2001 yılları arasında tanı almış, 60 adet meme kanseri olgusu; 30 invaziv duktal, 30 invaziv lobüler karsinom çalışma grubuna alınmıştır. İnvaziv duktal ve invaziv lobüler karsinom olgularından toplam 30 olguda aksiller lenf nodülü metastazı mevcuttur. Mastektomi materyalleri %10'luk formaldehit de tespit edildikten sonra, rutin takip işlemlerinden geçirildi. Parafin doku bloklarından yapılan 5 mikron (µ) kalınlıktaki kesitler Hematoksiilen-Eozin (H+E) ile boyandı. Çalışma grubuna alınan olguların (60 invaziv meme kanseri, 2 kontrol) parafin bloklarından hazırlanan kesitlere Avidin-Biotin kompleks immünperoksidaz yöntemi ile c-erbB-2 (Dako, A0485), Östrojen reseptörü (Novacastra, NCL-ER-6F11) uygulandı. Hazırlanan örnekler ışık mikroskopunda değerlendirildi.

Değerlendirme: Östrojen reseptörü için, tümör hücrelerinde nükleer boyanma, c-erbB-2 için membranöz boyanma pozitif olarak değerlendirildi. Membranöz boyanma paterni, şiddeti ve membranda devamlılığına göre 0,

TABLO 1: MEME KARSİNOMUNDA KONVANSİYONEL PROGNOSTİK FAKTÖRLER (60 OLGU)

	n	%
Yaş		
50<	29	48,3
50≥	31	51,7
Histolojik tip		
Duktal	30	50,0
Lobüler	30	50,0
Grade		
Grade I	12	20,0
Grade II	32	53,4
Grade III	16	26,6
Tümör boyutu		
<3	17	28,3
≥3	43	71,7
Lenf nodülü metastazı		
Var	30	50,0
Yok	30	50,0
Lenfovasküler invazyon		
Var	24	40,0
Yok	36	60,0

1+, 2+, 3+ olarak sınıflandırıldı. Ayrıca, tek başına veya membranöz boyanma ile birlikte sitoplazmik boyanma gösteren olgular da kaydedildi.

Verilerin analizinde, iki ordinal kategorize değişken arasındaki uyum, ki kare test istatistiği ile ve uyumun derecesi Gamma ölçütü ile saptanmıştır. Gamma=0,58 (p= 0,018).

İki kategorize değişken arasındaki ilişki veya birbirinden bağımsızlıklarında ki-kare testi uygulanmıştır. Sürekli değişkenler arasındaki fark Mann-Whitney U testi ile analiz edilmiştir. p değerinin 0,05'den küçük değerleri istatistiksel olarak önemli ilişkiyi veya iki faktör arasındaki bağımsızlığı göstermektedir.

SONUÇLAR

Hastaların yaş ortalaması 50,30±12,37'dir. En genç hasta 25, en yaşlı hasta yaşı ise 86 yaşındadır. Olguların hepsi kadın hastalardır. Olgulara ait prognostik parametreler, Tablo 1'de gösterilmiştir.

c-erbB-2 ekspresyonu

Olgularda, parafin dokuda immünohistokimya ile değerlendirilen c-erbB-2 ekspresyonu, 60 örneğin 33'ünde negatif (0, +1), 27'sinde pozitif (+2, +3) saptanmıştır (Resim 1, 2). İmmünohistokimyasal yöntemle tespit edilen, c-erbB-2'nin membranöz boyanması esas alınmıştır. Ancak, tümörde tek başına veya membranöz boyanma ile olan sitoplazmik boyanmalar da değerlendirilmiştir. Olgularımızın 19'unda sadece sitoplazmik boyanma, 12'sinde sitoplazmik+membranöz boyanma saptanmıştır. Membranöz boyanma olmaksızın sitoplazmik boyanma gösteren bu 19 olgu negatif olarak kabul edilmiştir ve istatistiksel değerlendirmeye alınmamıştır.

Çalışmamızda, infiltratif duktal karsinom olguları Bloom-Richardson sistemi, infiltratif lobüler karsinom olguları ise nükleer grade sistemine göre grade'lendirilmiştir (1). Tümörün histolojik grade'i arttıkça, c-erbB-2 ekspresyon ve amplifikasyonunun arttığı görülmüş sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0,001) (Tablo 2).

Hasta yaşı ile c-erbB-2 ekspresyonu ve histolojik tip ile c-erbB-2 ekspresyonu karşılaştırıldığında sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p>0,05) (Tablo 2).

Tümör boyutu ve c-erbB-2 ekspresyonu arasındaki ilişki de istatistiksel olarak anlamsızdır (p>0,05) (Tablo 2).

Aksiler lenf nodülü metastazı olmayan olgularda c-erbB-2 ekspresyonu %33,3 pozitif, %66,7 negatif bulunmuştur. Lenf nodülü metastazı olan hastalarda % 56,7 pozitif, %43,3 negatif izlenmiştir. Metastaz varlığı ile c-erbB-2 ekspresyonunun arttığı izlenmiştir, ancak sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p=0,1). Metastatik lenf nodülü sayısı ile c-erbB-2 ekspresyonu değerlendirildiğinde aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmuştur (p<0,001) (Tablo 2).

Lenfovasküler invazyon ile c-erbB-2 ekspresyonu arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlıdır (p=0,006) (Tablo 2).

Tümör hücrelerinde östrojen reseptör varlığı ile c-erbB-2 ekspresyonu arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptanmamıştır (p=0,4) (Tablo 2) (Resim 3).

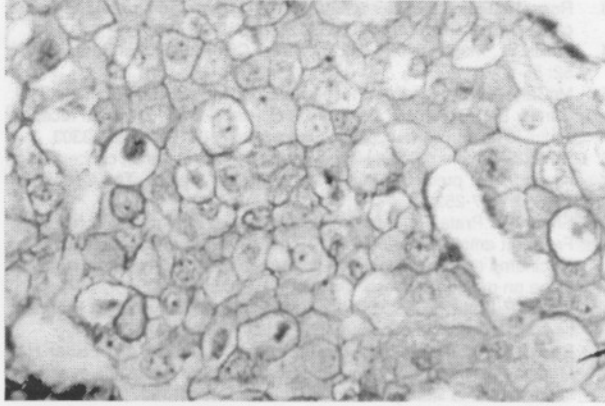
TARTIŞMA

Meme karsinomlarında, hastalığın seyrini ve tedavisini etkileyen çeşitli prognostik faktörler bildirilmiştir. Prognostik faktörlerden birisi c-erbB-2 (Her-2/neu) onkogenidir. İlk kez 1987 yılında Slamon ve arkadaşları, c-erbB-2 amplifikasyonunun, meme karsinomlu olgularda kötü prognozla olan ilişkisini göstermiştir (10). Genin amplifikasyonu, c-erbB-2 mRNA ve p185 proteinin aşırı ekspres-

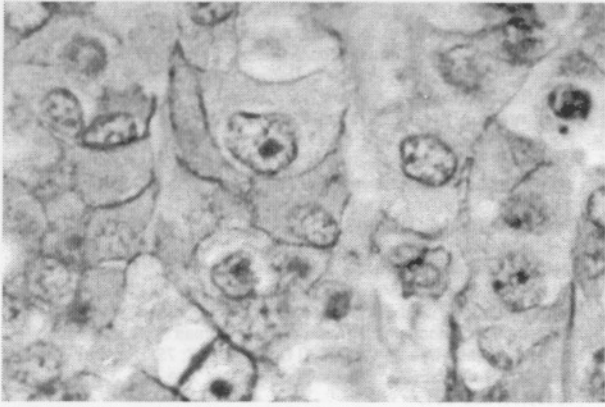
TABLO 2: c-erbB-2 EKSPRESYONU VE PROGNOSTİK PARAMETRELERİN KARŞILAŞTIRILMASI

	c-erbB-2 ekspresyonu				p
	Negatif N	%	Pozitif n	%	
Yaş					
<50	19	(65,5)	10	(34,5)	0,1
≥50	14	(45,2)	17	(54,8)	
Tip					
Duktal	15	(50,0)	15	(50,0)	0,6
Lobüler	18	(60,0)	12	(40,0)	
Tümör boyutu					
<3	12	(70,6)	5	(29,4)	0,1
≥3	21	(48,8)	22	(51,2)	
Grade*					
I	12	(100)	-	-	0,000
II	20	(62,5)	12	(37,5)	
III	1	(6,3)	15	(93,8)	
Lenfovasküler invazyon*					
Var	8	(33,3)	16	(66,7)	0,006
Yok	25	(69,4)	11	(30,6)	
Lenf nodu metastazı					
Var	13	(43,3)	17	(56,7)	0,1
Yok	20	(66,7)	10	(33,3)	
Metastatik lenf nodu sayısı*					
1-3	11	(84,6)	2	(15,4)	0,000
4†	2	(11,8)	15	(88,2)	
Östrojen reseptörü					
Var	17	(50,0)	17	(50,0)	0,4
Yok	16	(61,5)	10	(38,5)	

*c-erbB-2 ekspresyonu ile istatistiksel olarak anlamlı ilişkisi olan prognostik faktörler

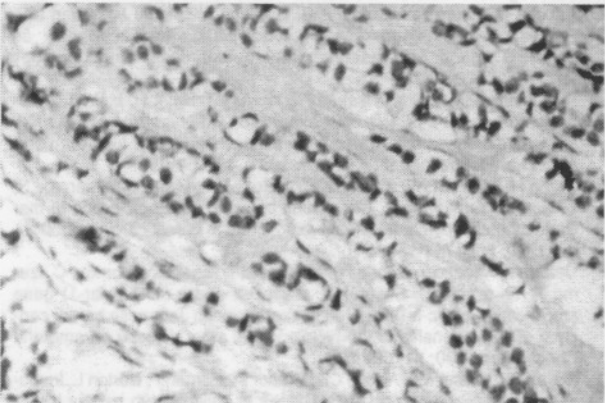


Resim 1: İnfiltratif duktal karsinomda, c-erbB-2 ekspresyonunun, kuvvetli (+++) membranöz boyanması (İmmünohistokimyasal yöntem, x200)



Resim 2: İnfiltratif lobüler karsinomda, orta şiddette (++) membranöz c-erbB-2 ekspresyonu (İmmünohistokimyasal yöntem, x400)

yonuna yol açar. Artmış olan bu proteini tespit etmek için en sık kullanılan yöntem, immünohistokimyasal boyama yöntemidir. Bu teknik, artmış olan protein tümör hücrelerinde yoğun hücre membranının boyanması şeklinde izlenir (4,5). İmmünohistokimyasal yöntem ile saptanan boyanma şiddeti ile genin kopya sayısı arasında doğru ilişki olduğunu gösteren, çeşitli çalışmalar vardır (4,6,11-18).



Resim 3: İnfiltratif duktal karsinomda, pozitif nükleer boyanma gösteren östrojen reseptörü (İmmünohistokimyasal yöntem, x100)

Slamon ve arkadaşları (10), ilk kez 1987 yılında c-erbB-2'nin aksiller lenf nodülü metastazı olan hastalardaki prognostik önemini tanımlamıştır. Bunu takiben yayınlanmış makalelerde, 15000'in üzerindeki olgu sayılarıyla yapılan çalışmalarda, aksiller lenf nodülü metastazı olan hastalarda c-erbB-2'nin kötü prognoz göstergesi olduğu doğrulanmıştır (4,19-21). Birçok çalışmada c-erbB-2 amplifikasyonu ile metastatik lenf nodülü sayısı arasında pozitif yönde bir korelasyon olduğu gösterilmiştir (4,6,19-21).

Çalışmamızda, aksiller lenf nodülü metastazı bulunan olguların %56,7'sinde, metastazı olmayanların ise %33,3'ünde c-erbB-2 ekspresyonu saptadık. Metastazlı olgularda, ekspresyonun artma eğiliminde olduğu, ancak farkın istatistiksel olarak anlamlı bulunmadığı görüldü ($p=0,1$). Ancak metastatik lenf nodülü sayısını ve ekspresyonu karşılaştırdığımızda, lenf nodülü sayısı arttıkça ekspresyonun da arttığı tespit edilmiş, sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,01$). Bu bulgu, metastatik lenf nodülü sayısı arttıkça, bir anlamda hastalık ilerledikçe, c-erbB-2 ekspresyonunun arttığını ve iki parametrenin birbiriyle bağımlı prognostik faktörler olduğunu göstermektedir. Tümörün lenfovasküler invazyonu ile c-erbB-2 ekspresyonu arasında ilişki olup olmadığına baktığımızda, lenfovasküler invazyon arttıkça ekspresyonun da arttığını tespit ettik. Sonuç istatistiksel olarak anlamlı idi ($p=0,006$). Aksiller lenf nodülü tespit edilmemiş fakat gen ekspresyonu olan 4 hastada lenfovasküler tümör invazyonu saptandı. Bu bulgu, bu hastaların, metastazı olmasa da risk altında olduklarını, c-erbB-2 pozitifliğinin hastalarda kötü prognoz göstergesi olduğunu düşündürmektedir. Rilke ve arkadaşlarının çalışmasında, gen amplifikasyonu ile lenf nodülü metastazı arasında istatistiksel anlamlı ilişki görülmemiş iken amplifikasyon ve lenfovasküler invazyon arasında anlamlı bir bağıntı saptanmıştır (22).

Östrojen reseptörü ve c-erbB-2 ekspresyonu çeşitli araştırmalarda değerlendirilmiştir. Bazı araştırmacılar, östrojen reseptörü ve c-erbB-2 arasında kuvvetli bir ters ilişki bulmuşlardır (5,20,21). Östrojen reseptörü pozitif olup, c-erbB-2'yi aşırı eksprese eden hastalarda, Tamoxifen tedavisine karşı direnç geliştiği izlenmiştir (23). Saceda ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, c-erbB-2 reseptörünün aktive olmasıyla, östrojen reseptör aktivitesinin kaybolduğu öne sürülmüştür. Buna neden olarak da c-erbB-2 ligandları olan heregulin'in ve gp-30'un östrojen reseptör aktivitesini bloke ettiğini göstermişlerdir (23). Bunun yanında, c-erbB-2 ekspresyonu ile östrojen reseptörünün arasında, istatistiksel olarak anlamlı ilişki gösteremeyen çalışmalar da kaynaklarda yer almaktadır. Bu araştırmacılar, c-erbB-2 +/-östrojen - hastaların diğer gruplara göre daha kötü prognoza sahip bulunduğunu ancak bunların birbirinden bağımsız iki parametre oldukları görüşünde birleşmişlerdir (21,24).

Çalışmamızda, c-erbB-2 ekspresyonu ve östrojen reseptörü arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı. Bu bulgu, literatürün bir kısmı ile uyumludur (21, 24).

Bloom-Richardson histolojik grade'leme sistemi, meme karsinomlu hastalarda prognozla yakın ilişkilidir (2, 25). Hücresel pleomorfizm, mitoz sayısı ve tübül oluşumu esas alınarak uygulanır. Histolojik grade'in diğer bir prognostik faktör olan, c-erbB-2 ile ilişkisini değerlendiren Tsuda ve arkadaşları (25) 176 vakalılık retrospektif çalışmasında, c-erbB-2 ve histolojik grade arasında anlamlı bir ilişki bulmuştur. Histolojik grade arttıkça, c-erbB-2 ekspresyonu da artmaktadır. Bu da tümörün, agresifliğini göstermektedir (25). Çeşitli araştır-

malar da histolojik grade ile c-erbB-2 ekspresyonunun doğru oranda arttığını ve kötü prognostik faktörler olduğunu göstermiştir (3,19). Press ve arkadaşları ise, yaptıkları 140 olgulu retrospektif bir çalışmada, "fluorescence insitu hybridization" ile tespit ettikleri genin, tümör grade'inden ilişkisiz olduğunu göstermişler ve bunların birbirinden bağımsız, prognostik parametreler olduğunu savunmuşlardır (18).

Bu çalışmada, tümörün histolojik grade'i ile c-erbB-2 ekspresyonu arasındaki ilişkiyi araştırdık. İnfiltratif duktal karsinom ve infiltratif lobüler karsinomlarda tümör grade'i yükselirken c-erbB-2 ekspresyonunun arttığını saptadık. Aralarındaki bu ilişki istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0,000$). Bu sonuç, tümörün agresif davranışını gösteren grade ve c-erbB-2 ekspresyonunun birbirine bağımlı, kötü prognostik faktörler olduğu görüşünü desteklemektedir (3,19).

Tümör çapı ve c-erbB-2 arasında anlamlı ilişki olduğunun savunma yayınları yanı sıra, ilişkisiz olduğunu da gösteren birçok çalışma vardır (5,20,21,24). Çalışmamızda, c-erbB-2 ekspresyonu ile tümör çapı arasındaki ilişkiyi değerlendirdik, ancak aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptamadık.

Histolojik tip ile c-erbB-2'yi karşılaştıran az sayıdaki çalışmadan biri olan Rilke ve arkadaşlarının (22) 1210 vakada yaptıkları çalışmada, ekspresyonun histolojik tipte ilişkisi olmadığını gösterilmiştir. Başka bir çalışmada, Tetu ve arkadaşları (19), infiltratif duktal karsinomda, diğer tiplere göre daha fazla ekspresyon saptamış, fakat istatistiksel olarak bir anlam gösterememişlerdir. Uehara ve arkadaşları da (26) histolojik tip ile c-erbB-2 arasında ilişki bulamamışlardır.

Çalışmamıza alınan 60 hastada duktal karsinomların %50'sinde, lobüler karsinomların ise %40'ında c-erbB-2 ekspresyonu saptanmıştır. İnfiltratif lobüler karsinomda gen ekspresyonunun daha az olduğu izlenmiş, ancak sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,6$). Serimizde infiltratif lobüler karsinomda c-erbB-2 ekspresyonunu yüksek tespit ettik. Bu bulgumuz bir kısım literatür bilgileri ile uyumludur. Rosen ve ark. da lobüler karsinomda c-erbB-2 ekspresyonunu %43 oranında bulmuşlardır (27). Çalışmamızda mevcut olgu sayısının, bu konuda kesin yorum yapmak için yeterli olmadığı kanısına varılmıştır.

Hasta yaşı ve gen amplifikasyonu, birçok araştırmacı tarafından çalışılmış ve istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (19,25). Ancak Rilke ve arkadaşları (22) c-erbB-2 gen amplifikasyonu ile artan hasta yaşı arasındaki anlamlı ilişkiyi göstermişlerdir.

Bizim olgularımızın yaş ortalaması $50,30 \pm 12,37$ 'dir. 50 yaş altı ve 50 yaş üstü olarak iki grupta değerlendirildiğinde c-erbB-2 ekspresyonu ve hasta yaşı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p=0,1$). Bu bulgumuz kaynaklardaki çalışmalarla uyumludur (19, 24,25).

Sonuç olarak, çalışmamızda elde edilen veriler doğrultusunda, c-erbB-2'nin meme karsinomunda önemli bir prognostik faktör olduğu, tümör grade'i, metastatik lenf nodülü sayısı ve lenfovasküler tümör invazyonu ile bağımlı, ancak hasta yaşı, tümör çapı, histolojik tipi ve östrojen reseptör varlığı gibi prognostik parametrelerden bağımsız olduğu kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR

- Rosai J. Ackerman's Surgical Pathology. 8th .Ed., Missouri: Mosby-year book inc., 1996.
- Tavassoli FA. Pathology of the Breast. 2nd. Ed., Hong Kong: Mc Graw-Hill Company, 1999.
- Ross JS, Fletcher J. Her-2/neu (c-erbB-2) gene and protein in breast cancer. *Am J Clin Pathol* 1999; 112(Suppl):53-67.
- Wallis YL, Macdonald F. Oncogenes. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 1999; 52: 55-63.
- McCann AH, Dervan PA, O'Regan M, Codd MB, Gullick WJ, Tobin BMJ, Carney DN. Prognostic significance of c-erbB-2 and estrogen receptor status in human breast cancer. *Cancer Res* 1991; 51: 3296-3303.
- Ross JS, Fletcher J. The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor and target for therapy. *The Oncologist* 1998; 3: 237-252.
- Sharma A, Pratap M, Sawhney VM, Khan IU, Bhamhani S, Mitra AB. Frequent amplification of c-erbB-2 (HER-2/Neu) oncogene in cervical carcinoma as detected by non-fluorescence in situ hybridization technique on paraffin sections. *Oncology* 1999; 56: 83-87.
- Brien TP, Depowski PL, Sheehan CE, Ross JS, McKenna B. Prognostic factors in gastric cancer. *Mod Pathol* 1998; 11(9): 870-877.
- Ross JS, Sheehan C, Hayner-Buchan AM, Ambros AR, Fisher HA, Muraca PJ. HER-2/neu gene amplification status in prostate cancer by fluorescence in situ hybridization. *Human Pathol* 1997; 28: 827-833.
- Slamon DJ, Clark GM, Wong SG. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987;235: 177-182.
- Jacobs T, Gown AM, Yaziji H, Barnes M, Schnitt SJ. Comparison of fluorescence insitu hybridization and immunohistochemistry for the evaluation of HER-2/neu in breast cancer. *J Clin Oncol* 1999;7:1974-1982.
- Jennings BA, Hadfield JE, Worsley SD, Girling A, Willis G. A differential PCR assay for the detection of c-erbB-2 amplification used in a prospective study of breast cancer. *J Clin Pathol* 1997;50:254-256.
- Gramlich TL, Cohen C, Fritsch C, Derose PB, Gansler T. Evaluation of c-erbB-2 Amplification in breast carcinoma by differential polymerase chain reaction. *Am J Clin Pathol* 1994;101: 493-499.
- Pauletti G, Godolphin W, Press M, Slamon DJ. Detection and quantitation of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridization. *Oncogene* 1996; 13: 63-72.
- Venter DJ, Tuzi NL, Kumar S, Gullick W. Overexpression of the c-erbB-2 oncoprotein in human breast carcinomas: Immunohistochemical assessment correlates with gene amplification. *Lancet* 1987; 11:69-71.
- Charpin C, Garcia S, Bouvier C, Martini F, Lavaud MN, Allasia C, Bonnier P, Andrac L. c-erbB-2 oncoprotein detected by automated quantitative immunocytochemistry in breast carcinomas correlates with overall and disease-free survival. *B J Cancer* 1997; 75(11): 1667-1673.
- Wisecarver JL. HER-2/neu testing comes of age. *Am J Clin Pathol* 1999;111: 299-301.
- Press MF, Hung G, Godolphin W, Slamon D. Sensitivity of HER-2/neu Antibodies in archival tissue samples: Potential source of error in immunohistochemical studies of oncogene expression. *Cancer Res* 1994;54:2771-2777.
- Tetu B, Brisson J. Prognostic significance of HER-2/neu oncoprotein expression in node-positive breast cancer. *Cancer* 1994; 73:2361-65.
- Berger MS, Locher GW, Saurer S, Gullick WJ, Waterfield MD, Groner B, Hynes NE. Correlation of c-erbB-2 gene amplification and protein expression in human breast carcinoma with nodal status and nuclear grading. *Cancer Res* 1988; 48: 1238-1243.
- Perren TJ. c-erbB-2 oncogene as a prognostic marker in breast cancer. *Br J Cancer* 1991; 63: 328-332.
- Rilke F, Colnaghi MI, Cascinelli N, Andreola S, Baldini MT, Bufalino R, Della Porta G, Menard S, Pierotti MA, Testori A. Prognostic significance of HER-2/neu expression in breast cancer and its relationship to other prognostic factors. *Int J Cancer* 1991; 49: 44-49.
- Saceda M, Grunt TW, Colomer R, Lippman ME, Lupu R, Martin MB. Regulation of estrogen receptor concentration and activity by an erbB/HER ligand in breast carcinoma cell lines. *Endocrinology* 1996;137:4322-4330.
- Kallioniemi OP, Holli K, Visakorpi T, Koivula T, Helin H, Isola J. Association of c-erbB-2 protein over-expression with high rate of cell proliferation, increased risk of visceral metastasis and poor long-term survival in breast cancer. *Int J Cancer* 1991; 49: 650-655.
- Tsuda H, Hirohashi S, Shimamoto Y, Hirota T, Tsugane S, Watanabe S, Terada M, Yamamoto H. Correlation between histologic grade of malignancy and copy number of c-erbB-2 gene in breast carcinoma. *Cancer* 1990; 65: 1794-1800.
- Uehara T, Kaneko Y, Kanda N, Yamamoto T, Higashi Y, Nomoto C, Izumo T, Takayama S, Sakurai M. C-erbB-2 and c-erbB-1(ear-1) gene amplification and c-erbB-2 protein expression in Japanese breast cancers: their relationship to the histology and other disease parameters. *Cancer Res* 1990; 51: 620-624.
- Rosen PP, Lesser ML, Arroyo CD, Cranor M, Borgen P, Norton L. Immunohistochemical detection of HER2/neu in patients with axillary lymph node negative breast carcinoma. A study of epidemiologic risk factors, histologic features and prognosis. *Cancer* 1995; 75: 1320-1326.