

Результаты работы референс-лаборатории по HER2neu тестированию карциномы молочной железы в УрФО за 2009 г.

Сазонов С.В., д.м.н., проф., зав. референс-лабораторией, ГУЗ СО ИМКТ, г. Екатеринбург; Демидов С.М., д.м.н., проф., зав. кафедрой онкологии ГОУ ВПО УГМА Росздрави, г. Екатеринбург; Дорофеев А.В., д.м.н., проф., зам. директора по хирургии ГУЗ СО ОД, г. Екатеринбург; Бриллиант А.А., научный сотрудник референс-лаборатории ГУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий, г. Екатеринбург; Ситулина О.О., региональный координатор Roche, регион Урал, г. Екатеринбург; Арутюнян Е.В., научный сотрудник референс-лаборатории ГУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий, г. Екатеринбург

Results of reference-laboratory work on HER 2 neu testing of a mammary gland in URFR for 2009

Sazonov S.V., Dorofeev A.V., Demidov S.M., Brilliant A.A., Situlina O.O., Arutinan E.V.

Резюме

Целью исследования явилось определение результатов проводимого в 2009 г. референса (пересмотра) основных молекулярно-биологических характеристик опухолевых клеток карциномы молочной железы для определения показаний к назначению химиотерапии пациентам из разных учреждений здравоохранения УрФО. Обоснована необходимость референс-лаборатории, показаны основные результаты HER2/neu тестирования в основных иммуногистохимических лабораториях УрФО. Обозначены основные проблемы, возникающие в процессе выполнения исследований в иммуногистохимических лабораториях, а так же в дальнейшем, при проведении повторного тестирования в референс-лаборатории. Определена роль молекулярно-генетического исследования с применением FISH-метода.

Ключевые слова: карцинома молочной железы, HER2/neu тестирование, иммуногистохимия, FISH-анализ, референс-исследования

Summary

The purpose of research was definition of reference (revision) results spent in 2009 of the basic molecular-biological characteristics of tumoral cells of cancer breast for definition of indications to purpose of chemotherapy to patients from different establishments of public health services URFR. Necessity of reference-laboratory is proved, basic results HER2 neu testing in basics immunohistochemistry laboratories of URFR are shown. The basic problems arising during performance of researches in immunohistochemistry laboratories are designated, and as in the further at carrying out of repeated testing in reference-laboratory. The role of molecular-genetic research with application of a FISH-method is certain

Keywords: breast carcinoma, HER2 neu testing, immunohistochemistry, the FISH-analysis, reference-researches.

Введение

Ген Her2/neu, расположенный на длинном плече хромосомы 17 (17q12–q21), кодирует трансмембранный протеин массой 185 кДа с выраженной тирозинкиназной активностью [12]. Белковый продукт гена относится к семейству рецепторов эпидермального фактора роста, вовлеченных в активацию сигнальных путей регуляции

нормального роста и развития ткани молочной железы [2,4,21]. Гиперэкспрессия протоонкогена Her2/neu является распространенным генетическим нарушением при раке молочной железы (РМЖ), при использовании иммуногистохимического метода исследования определяется почти у 20% пациенток с РМЖ [9, 22].

Гиперэкспрессия Her2/neu относится к важным прогностическим маркерам и предопределяет более частое рецидивирование, снижение показателя выживаемости у больных с впервые выявленным РМЖ. Данные о статусе рецептора Her2/neu могут помочь принять оптимальное решение при выборе схем адьювантной терапии и прогнозировать эффективность противопухольных препаратов различных классов. Пациенты с повышен-

Ответственный за ведение переписки -

Сазонов Сергей Владимирович

620036, Екатеринбург, ул. Соболева, 25, ГУЗ СО ИМКТ

тел.: (343) 376 98 28

E-mail: Prof-SSazonov@yandex.ru

ной экспрессией Her2/neu характеризуются худшим ответом на гормональную [3, 15] и цитостатическую терапию, не включающую антрациклиновые антибиотики [8, 11, 18]. В то же время таксаны, наряду с антрациклинами, демонстрируют хорошую эффективность как при первичном, так и метастатическом Her2/neu-позитивном РМЖ [6, 12, 18, 19].

С введением в клиническую практику трастузумаба (Герцептина) — высокоэффективного специфического гуманизированного моноклонального антитела против Her2/neu, корректная оценка статуса этого рецептора стала ключевым моментом в принятии решения о тактике лечения пациентки с РМЖ. Так как трастузумаб специфично связывается с белком Her2/neu, оценка этой молекулы предоставляет важнейшую информацию о целесообразности назначения препарата тому или иному пациенту. Обоснованное назначение трастузумаба сопровождается повышением уровня ответа, удлинением интервала до прогрессирования заболевания и улучшением общей выживаемости при лечении пациентов с метастатическим Her2/neu-позитивным раком [17]. Результаты проспективных рандомизированных клинических исследований продемонстрировали, что трастузумаб на половину снижает риск рецидивирования и на треть — смертность больных с РМЖ ранних стадий [5, 11, 14]. В то же время, терапия трастузумабом не лишена недостатков. Во-первых, это значительная стоимость препарата при необходимости длительной терапии. Во-вторых, лечение трастузумабом ассоциируется с риском кардиотоксичности. Все вместе взятое, а именно ожидаемая при Her2/neu-позитивном РМЖ высокая эффективность трастузумаба, существенная стоимость и потенциальная кардиотоксичность препарата, требует корректной оценки статуса рецептора Her2/neu. Последнее, определяет необходимость создания системы повторного тестирования наличия гиперэкспрессии HER2/neu, т.е. создание системы пересмотра результатов иммуногистохимических исследований, полученных в первой лаборатории. Лаборатория пересмотра (референс-лаборатория) создается на базе патоморфологической лаборатории, владеющей двумя методами определения гиперэкспрессии Her2/neu: иммуногистохимическим (метод позволяет определять уровень экспрессии рецептора HER2/neu на поверхности мембран опухолевых клеток) и fluorescent in situ hybridization (FISH-молекулярно-генетический метод, позволяющий определять уровень амплификации мутантного гена в ядре опухолевой клетки). Внедрение системы референса вплотную приближает лаборатории, участвующие в ней, к созданию в их работе условий, соответствующих требованиям ISO 15189:62003. Медицинские лаборатории. Частные требования к качеству и компетентности.

Материалы и методы

Существует целый ряд методов, позволяющих выявлять гиперэкспрессию HER2/neu. Уровень экспрессии белка Her2/neu можно определить с помощью Вестерн-блоттинга, методов иммунного окрашивания

in situ, в частности иммунофлуоресцентного (FISH) и иммуногистохимии (ИГХ). ИГХ метод нашел широкое применение в связи с тем, что повседневно используется для оценки экспрессии многих других протеинов и может быть выполнен на срезах парафиновых блоков ткани, фиксированной формалином. Согласно консенсуса американских патологов и управления по контролю за пищевыми продуктами и лекарственными средствами США (FDA) [20] система оценки результатов ИГХ-исследования экспрессии Her2/neu включает 4 категории (0, 1+, 2+, 3+); результат является позитивным — 3+, если более 10% клеток инвазивной опухоли демонстрируют равномерное сильное окрашивание мембраны. При несомненных достоинствах ИГХ-метода, а именно легкой воспроизводимости и относительной дешевизне, он имеет и некоторые недостатки. Возможны ложнопозитивные результаты, обусловленные техническим несовершенством метода. Кроме того, гиперэкспрессия протеина может быть и несвязанной с амплификацией гена Her2/neu. Возможны и ложноотрицательные результаты теста. В некоторых случаях, после заливки в парафин, ткани РМЖ, характеризующиеся амплификацией гена Her2/neu и гиперэкспрессией соответствующего белка, могут терять рецепторы на поверхности мембраны и утрачивать способность давать специфическое окрашивание при проведении ИГХ-исследования [16].

Более надежным методом выявления амплификации гена Her2/neu является флуоресцентная гибридизация in situ (FISH) — золотой стандарт в диагностике Her2/neu-позитивных РМЖ [7, 20]. Метод позволяет оценить количество копий гена в клетке, а более совершенный его вариант — определить количество хромосом 17. Считается, что результат теста является положительным, если соотношение среднего количества копий гена Her2/neu и среднего числа центромер хромосомы 17 в клетке превышает 2,2 [20].

При должной стандартизации методик данные ИГХ-исследования как при Her2/neu-негативном (категории 0 и 1+), так и Her2/neu-позитивном РМЖ (категория 3+) подтверждаются результатами FISH. В лаборатории LabCorp соответствие результатов двух методов отмечали у 89% проанализированных пациентов [1, 17, 19]. У 4% больных Her2/neu-позитивность по результатам ИГХ-исследования (категория 3+) не подтвердилась результатами FISH [13]. Приемлемой для стандартизированной лаборатории считается 5% частота ложнонегативных результатов. Лабораториям рекомендуется проводить параллельную оценку статуса Her2/neu с использованием ИГХ-метода и FISH до тех пор, пока у менее 5% больных, относящихся по данным ИГХ-исследования к категории 0/1+, результаты окажутся позитивными при проведении FISH-теста [21].

Большую проблему составляют случаи РМЖ, относящиеся к категории сомнительных по данным ИГХ-исследования. В 15% случаев 10 и более процентов клеток инвазивного рака демонстрируют полное, однако неравномерное окрашивание мембран очевидного радиального характера. Очень редко отмечают вариант ин-

Таблица 1. Распределение ИГХ исследований карциномы молочной железы, проведенных в лабораториях учреждений здравоохранения УрФО

Название лаборатории	Всего ИГХ	HER2neu 3+	HER2neu 2+
1. ИМКГ (г. Екатеринбург)	943	54	93
2. ОПАБ (г. Екатеринбург)	61	10	11
3. СООД (г. Екатеринбург)	95	4	9
4. ООД №2 (Н. Тагил)	60	13	15
5. ООД №3 (г. К-Уральский)	15	3	2
6. ООД (г. Тюмень)	227	43	52
7. ОПАБ (г. Челябинск)	809	64	76
8. ОД (г. Магнитогорск)	81	9	12
9. ОКБ (г. Ханты-Мансийск)	92	25	29
10. ОКБ (г. Сургут)	115	21	37
Всего по УрФО	2483	244	334

Таблица 2. Удельный вес (%) положительных HER2/neu тестирований карциномы молочной железы в лабораториях учреждений здравоохранения УрФО

Название лаборатории	Всего ИГХ	HER2neu 3+ (%)	HER2neu 2+(%)
1. ИМКГ (г. Екатеринбург)	943	16,2	11,4
2. ОПАБ (г. Екатеринбург)	61	18,0	4,0
3. СООД (г. Екатеринбург)	95	4,2	11,6
4. ООД №2 (Н. Тагил)	60	21,6	25,0
5. ООД №3 (г. К-Уральский)	0	20,0	13,3
6. ООД (г. Тюмень)	227	18,9	22,9
7. ОПАБ (г. Челябинск)	809	7,9	9,4
8. ОД (г. Магнитогорск)	81	11,1	14,8
9. ОКБ (г. Ханты-Мансийск)	92	27,2	31,5
10. ОКБ (г. Сургут)	115	18,3	32,2
Всего по УрФО	2483	15,0	19,8

тенсивного окрашивания всей мембраны в 10 и менее процентах опухолевых клеток. Эти случаи относят к категории 2+. Результаты крупных многоцентровых исследований продемонстрировали, что только в части случаев (от 12 до 24%), относящихся к категории 2+, при проведении FISH выявляют амплификацию гена и они являются в действительности Her2/neu-позитивными [1, 10, 17, 19].

В работе по проведению референсных исследований определения гиперэкспрессии HER2/neu в 2009 г. приняло участие 10 патоморфологических лабораторий учреждений здравоохранения УрФО: ГУЗ СО ИМКГ, ГУЗ СО ОПАБ, ГУЗ СООД (г. Екатеринбург), ГУЗ СО ООД №2 (Н. Тагил), ГУЗ СО ООД №3 (г. К-Уральский), ГУЗ ТО ООД (г. Тюмень), ГУЗ ЧО ОПАБ (г. Челябинск), ГУЗ ОД (г. Магнитогорск), ГУЗ ОКБ (г. Ханты-Мансийск) ГУЗ ОКБ (г. Сургут). Для работы в референс-лабораторию поступали готовые парафиновые блоки и стекла с проведенной иммуногистохимической реакцией. Референс проводили для каждого случая с уровнем экспрессии HER2 neu 2+ и каждого 10 случая иммуногистохимического исследования, проведенного в первичной лаборатории. Всего иммуногистохимические исследования проведены 2483 пациенткам.

Имуногистохимические референс-исследования проводились на базе ГУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий». Выявление экспрессии рецепторов HER2 neu осуществлялись в автостейнере «DAKO» (США) с использованием набора Herceptest производства «DAKO» (Дания). Предварительно гистологиче-

ские срезы обрабатывались в барокамере «Paskal DAKO Cytomation» в течении 10 мин. при давлении 22Р и температуре 127° С. Оценку реакции осуществляли на световом микроскопе «Zeiss Ymager M» (Германия). Уровень экспрессии HER2 neu определялся по шкале от 0 до 3+. Референс препаратов на амплификацию гена HER2 neu проводился на базе Патологоанатомического отделения ФГУ Московский научно-исследовательский институт им. П.А.Герцена Росмедтехнологий, г. Москва (зав. отделением: член-корреспондент РАМН, профессор Г.А. Франк). По результатам исследования формировались базы данных с использованием программы Microsoft Office Excel 2003. Статистические исследования выполнены с использованием набора программ описательной статистики и матриц корреляций в программном пакете «Statistica 6.0.».

Результаты и обсуждение

Всего иммуногистохимические исследования проведены 2483 пациенткам с карциномой молочной железы, что составляет 53% от всех заболевших. Количество проведенных Her2/neu тестирований в учреждениях здравоохранения УрФО, а так же их результаты представлены в Табл. 1. Необходимо отметить, что охват пациенток с карциномой молочной железы тестированием осуществляется неравномерно. Если в крупных онкологических центрах (г. Екатеринбург, г. Челябинск) процент охвата достигает до 90% всех пациенток, то в учреждениях с меньшим кочным фондом % обследованных колеблется от 15 до 38.

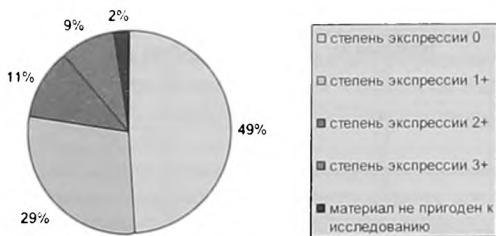


Рис. 1. Распределение результатов ИГХ уровней экспрессии HER2/neu в материале пациенток из ГУЗ СООД (г.Екатеринбург)

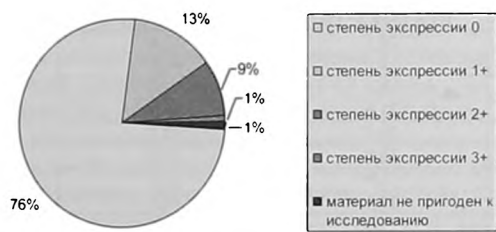


Рис. 2. Распределение результатов ИГХ уровней экспрессии HER2/neu в материале пациенток из МУЗ ГКБ40 (г. Екатеринбург)

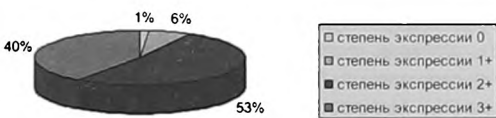


Рис.3. Распределение материала пациенток с карциномой молочной железы по уровню экспрессии Her2/neu, отобранных для проведения референса в НИИ им. П.А.Герцена

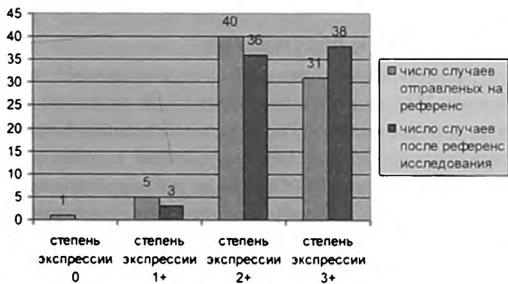


Рис. 4. Результаты референса случаев, проведенных в НИИ им. П.А.Герцена

Значительно колеблется и процент положительных результатов Her2/neu тестирования (Табл. 2). Так, средний % протестированных и расцененных: как 3+ колеблется от 4 до 27 в разных лабораториях. Не меньшая разница отмечается и при анализе выявленных случаев с уровнем экспрессии 2+ - от 4 до 32%. Это при том, что средние уровни изучаемых показателей по данным референс-лаборатории патологоанатомического отделения ФГУ Московский научно-исследовательский институт им. П.А.Герцена Росмедтехнологий, г. Москва должны составлять около 20 и 10% соответственно. Этот факт говорит об отсутствии в иммуногистохимических лабораториях системы стандартизации проводимых исследований. На результаты исследования могут влиять особенности фиксации, проводки материала, использование реагентов для иммуногистохимических исследований от разных производителей, разный методический уровень проведения исследований (автоматизированный или ручной), разный уровень квалификации и опыт персонала. Наглядным является пример, когда при исключении всех прочих условий, различие в технологии проведения иммуногистохимических исследований ограничивается только фиксацией и проводкой материала. Так, при анализе структуры уровней экспрессии Her2/neu получаемых в ГУЗ СО ИМКТ на материале из СООД и ГКБ №40 (г.Екатеринбург) была обнаружена существенная разница в количестве 1+, 2+ и 3+ случаев (рис. 1, рис.2). Причем, если в материале пациенток из СООД в 3 раза, по сравнению с контрольными показателями, преобладают Her2/neu 1+ случаи и в 2 раза меньше карцином, экспрессирующих Her2/neu 3+, то в материале из ГКБ №40 количество Her2/neu 3+ случаев снижено почти в 20 раз. Такая существенная разница может быть объяснена только различием в фиксации и проводке материала: в СООД процесс осуществляется в автоматизированном, а в ГКБ 40 – ручном варианте.

Для осуществления контроля проведенных в ИМКТ иммуногистохимических исследований уровней экспрессии Her2/neu, а так же проведения молекулярно-генетических исследований для выявления амплификации гена в случаях с уровнем экспрессии Her2/neu 2+ методом FISH, было отобрано 77 блоков пациенток с карциномой молочной железы, что составило всего 12% от всех проведенных исследований. Структура по уровню экспрессии Her2/neu представлена на рис. 3.

Более половины случаев референса составили карциномы с уровнем экспрессии Her2/neu 2+. Не менее важным являлось проведение референса для 40% случаев Her2/neu 3+, так как таким пациентам не проводятся дополнительные исследования, и решение о назначении им химиотерапии принимается по результатам иммуногистохимического исследования. В результате проведенного референса, как видно на рис. 4, несколько изменилась структура в уровне экспрессии Her2/neu в сторону приближения показателей к контрольным значениям. Так, часть случаев, при повторном иммуногистохимическом исследовании перешла из группы с экспрессией Her2/neu 2+ в Her2/neu 3+, а из Her2/neu 1+ в Her2/

neu2+. В целом, по всей группе, в 95% случаев иммуногистохимических исследований карциномы молочной железы результат направляемых уровней экспрессии был подтвержден, что позволяет говорить о эффективности работы референс-лаборатории первого пересмотра, хотя и указывает на сохраняющиеся некоторые различия в оценке получаемых результатов ИГХ исследований.

Проведенные дальнейшие молекулярно-генетические исследования материала пациентов с уровнем экспрессии Her2/neu 2+, показали обоснованность и необходимость более глубокого обследования этой группы больных (рис5). Так, в 43% случаев у таких пациентов в материале карциномы была обнаружена амплификация, увеличение среднего количества копий гена Her2/neu хромосомы 17 в ядрах опухолевых клеток. Причем использование метода FISH позволяет не только выявлять амплификацию гена, но и исключать полисомию хромосомы 17, которая не сопровождается значительным увеличением количества копий Her2/neu, как в случае амплификации гена, и не приводит к достаточному для целенаправленной терапии моноклональным антителом повышению уровня экспрессии белка Her2/neu [15, 22].

Выводы

1. показаны существенные различия в получаемых результатах иммуногистохимических исследований уровней экспрессии при оценке статуса Her2/neu, связанные в основном с различными методическими особенностями работы ИГХ лабораторий,

2. показана необходимость проведения молекулярно-генетических исследований при получении иммуногистохимическим методом уровня экспрессии статуса Her2/neu 2+.

3. полученные результаты двух методов оценки статуса Her2/neu продемонстрировали высокую сопоставимость данных ИГХ- и FISH-методов в отношении случаев РМЖ категории 0, 1+ и 3+.

4. работа лабораторий, относящихся к системе пересмотра (референса) результатов ИГХ исследований должна осуществляться в соответствии со следующим алгоритмом:



Рис. 9. Алгоритм тестирования HER2 neu карциномы молочной железы

на первом этапе проводится скрининг с использованием ИГХ-метода: ИГХ 3+ случаев рассматривают как позитивные, ИГХ 0/1+ - как негативные. В отношении Her2/neu 2+ случаев проводится повторное тестирование с использованием метода ИГХ, при подтверждении результата - с использованием метода FISH, позволяющего оценить количество копий гена Her2/neu и наличие полисомии по хромосоме 17

*Работа выполнена при поддержке
EPIDEMIOLOGIC PROGRAM OF SCREENING
OF HER2 STATUS FOR BREAST CANCER PATIENTS
(ML 19870), F. HOFFMANN – LA ROCHE LTD.*

Литература:

1. Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, et al. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol* 1997; 17: 2639–48.
2. Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC, et al. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGC receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science* 2005; 230: 1132–9.
3. De Placido S, Carlomagno C, De Laurentiis M, Bianco AR. C-erbB2 expression predicts tamoxifen efficacy in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 1998, 52: 55–64.
4. Di Augustine RP, Richards RG, Sebastian J. EGF-related peptides and their receptors in mammary gland development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2009, 2: 109–17.
5. Joensuu H, Kellokumpu-Lehtinen P-L, Bono P, et al. Adjuvant docetaxel or vinorelbine with or without trastuzumab for breast cancer. *N Engl J Med* 2006; 354: 809–20.
6. Konecny GE, Thomssen C, Luck HJ, et al. Her-2/neu gene amplification and response to paclitaxel in patients with metastatic breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 1141–51.
7. Ma Y, Lespagnard L, Durbecq V, et al. Polysomy 17 in HER-2/neu status elaboration in breast cancer: effect on daily practice. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 4393–9.
8. Menard S, Valagussa P, Pilotti S, et al. Response to cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil

- in lymph node-positive breast cancer according to HER2 overexpression and other tumor biologic variables. *J Clin Oncol* 2001; 19: 329-35.
9. Owens MA, Horten BC, Da Silva MM. HER2 amplification ratios by fluorescence in situ hybridization and correlation with immunohistochemistry in a cohort of 6556 breast cancer tissues. *Clin Breast Cancer* 2004; 5: 63-9.
 10. Perez EA, Roche PC, Jenkins RB, et al. HER2 testing in patients with breast cancer: Poor correlation between weak positivity by immunohistochemistry and gene amplification by fluorescence in situ hybridization. *Mayo Clin Proc* 2002; 77: 148-54.
 11. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005; 353: 1659-72.
 12. Pritchard KI, Shepherd LE, O'Malley FP, et al. HER2 and responsiveness of breast cancer to adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med* 2006; 354: 2103-11.
 13. Reddy JC, Reimann JD, Anderson SM, et al. Concordance between central and local laboratory HER2 testing from a community-based clinical study. *Clin Breast Cancer* 2006; 7: 153-7.
 14. Romond EH, Perez EA, Bryant J, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005; 353: 1673-84.
 15. Ross JS, Fletcher JA. The Her-2/neu oncogene: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. *Semin Cancer Biol* 1999; 9: 125-38.
 16. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989; 244: 707-12.
 17. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001; 344: 783-92.
 18. Thor AD, Berry DA, Budman DR, et al. ErbB-2, p53, and efficacy of adjuvant therapy in lymph node-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 1346-60.
 19. Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2002; 20: 719-26. prognostic factors in invasive breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 77: 109-14.
 20. Wolff AC, Hammond MEH, Schwartz JN, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25: 118-45.
 21. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signaling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 127-37.
 22. Yaziji H, Goldstein LC, Barry TS, et al. HER-2 testing in breast cancer using parallel tissue-based methods. *JAMA* 2004; 291: 1972-7.
 21. Zarbo RJ, Hammond ME. Her-2/neu testing of breast cancer patients in clinical practice. *Arch Pathol Lab Med* 2003; 127: 549-53.