

HER2 deęerlendirmesindeki ipucu ve tuzaklar

Clues and Pitfalls in the evaluation of HER2

Glden DİNİZ¹, Çiđdem IRKKAN², Canan KELTEN³, Selver ÖZEKİNCİ⁴

¹İzmir Tepecik Eđitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Laboratuvarı

²Ankara Dr. Abdurrahman Yurtaslan Onkoloji Hastanesi, Patoloji Laboratuvarı

³İstanbul Samatya Eđitim ve Araştırma Hastanesi, Patoloji Laboratuvarı

⁴İstanbul Okmeydanı Eđitim ve Araştırma Hastanesi, Patoloji Laboratuvarı

ÖZET

İnsan epidermal büyüme faktör reseptörü 2 (HER2), tirozin kinaz aktivitesine sahip epidermal büyüme faktör reseptör ailesinin bir üyesidir. Bu reseptörün çoğalması hücre proliferasyonu ve karsinogeneze yol açan bazı sinyal yolaklarını başlatır. HER2 amplifikasyonu özellikle meme ve mide/özofagus-mide bileşke tümörlerinde saptanmaktadır.

HER2 için hedefe yönelik tedavilerin başlamasıyla HER2 pozitif kanserli hastaların klinik gidişinde dramatik iyileşme sağlanmıştır.

Günümüzde HER2 testi değişik yöntemlerle yapılmaktadır ve HER2 durumuna doğru değerlendirebilmek için bu testlerin standardizasyonu çok önemlidir. Bununla birlikte, onca yıllık deneyime karşın meme hem de mide tümörlerindeki HER2 değerlendirilmesinde hâlâ tartışılmalı noktalar vardır. Bu derlemenin amacı HER2 değerlendirmesindeki tuzakları ve ipuçlarını irdelemektir.

Anahtar kelimeler: HER2, meme kanseri, mide kanseri, İHK ve İSH

ABSTRACT

Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) is a member of the epidermal growth factor receptor family, having tyrosine kinase activity. Amplification of this receptor initiates some signaling pathways leading to cell proliferation and carcinogenesis. Amplification of HER2 is especially investigated in breast, gastric, and gastroesophageal cancers.

Introduction of targeting therapies for HER2 has dramatically influenced the outcome of patients with HER2 positive cancers.

Currently HER2 testing is realised by different methods and it is crucial to standardize testing techniques to evaluate HER2 status accurately.

Still several controversial issues related to HER2 testing are on the agenda in both breast and in gastric cancers, despite decades of experience. The aim of this review is to discuss the important pitfalls and clues for HER2 assessment.

Key words: HER2, breast cancer, gastric cancer, IHC and ISH

Alındığı tarih: 17.03.2015

Kabul tarihi: 08.04.2015

Yazışma adresi: Doç. Dr. Glden Diniz, Kıbrıs Şehitleri Cad. 51/11, Alsancak-35220-İzmir
e-mail: agdiniz@windowslive.com

GİRİŞ

On yedinci kromozomun (KR17) uzun kolunda yerleşen insan epidermal büyüme faktör reseptör 2 (HER2) geni, intrinsek tirozin kinaz aktivitesiyle hücre büyüme ve çoğalması, hücre farklılaşması, apoptoz, adhezyon, migrasyon benzeri fonksiyonlarda rol oynayan transmembran reseptör proteinini

kodlar. HER2 geninin kodladığı CerbB2 olarak da adlandırılan membranöz protein immün histokimyasal boyamalarla gösterilebilmektedir. Genle kodladığı proteinin keşfinin ve karsinogenezdeki rolünün anlaşılmasının üzerinden 30 yıla yakın süre geçmesine karşın, asıl popüleritesini, HER2 reseptör aktivitesini inhibe eden antikorların geliştirilmesi ve tedavide kullanılmaya başlamasıyla kazanmıştır. Bu anti-

korlar özellikle HER2 overekspresyonu (hücre membranında HER2 reseptörlerindeki artış) ve HER2 amplifikasyonu (HER2 gen kopya sayısında artış) olan tümörlerin tedavisinde etkilidir. Günümüzde anti-HER2 antikolarının en yaygın kullanım alanı meme ve mide tümörleridir ⁽¹⁻⁴⁾.

Sağkalım ve yaşam kalitesi açısından belirgin farklılıklar yaratan hedefe yönelik tedaviler arasında en bilinenlerinden olan Trastuzumab (Herceptin, Roche, Basel, Switzerland) özgül olarak HER2 reseptörüne karşı geliştirilmiş bir monoklonal antikordur. İlk olarak meme kanseri tedavisinde kullanımına başlanmış olup, HER2 pozitif lokal ileri/metastatik meme kanseri yanı sıra HER2 pozitif erken evre meme kanserinin tedavisinde tek başına veya diğer sitotoksik ajanlarla kombine edilerek kullanılmasıyla sağkalımda belirgin artışa neden olduğu gösterilmiştir ^(1,3,5). Benzer şekilde dual HER1/HER2 tirozin kinaz inhibitörü olan lapatinib (Tykerb, GlaxoSmithKline, Philadelphia, USA) de kombine tedavi protokollerinde yer almaktadır ^(1,5-7). Sağkalım oranları çok düşük tümörlerden olan mide karsinomlarında HER2 pozitifliğinin belirlenmesiyle HER2'yi hedef alan ajanlar, mide tümörleri için de yeni bir tedavi seçeneği hâline gelmiştir ^(8,9). Tüm hedefe yönelik tedavilerde olduğu gibi tedaviden yararlanabilmek için ilacın hedef aldığı yapının tümörde var olması ve varlığının gösterilmesi şarttır. Bu nedenle de ilacın kullanım endikasyonu olan başta meme ve mide karsinomları olmak üzere HER2 pozitif tümörlerde, HER2 durumunun en doğru, güvenilir ve tekrarlanabilir şekilde değerlendirilmesi çok önemlidir ^(1-3,8). Geniş serilerde gerçekleştirilen randomize çalışmalarda yanlış pozitif ve yanlış negatif HER2 sonuçlarının olası olan en alt seviyeye düşürülüp, tedaviden en üst düzeyde yararlanımı sağlamak için gereken unsurların; kılavuzdaki kuralları titizlikle uygulamak, laboratuvar çalışmalarında kalitesi tescilli standart malzemeleri kullanmak ve değerlendirmeyi yapan patoloji uzmanlarının eğitimi olduğu anlaşılmıştır.

TÜMÖRDE HER2 VARLIĞINI SAPTAMAK İÇİN GELİŞTİRİLEN TESTLER

HER2 overekspresyonu immunhistokimyasal (İHK) olarak, HER2 amplifikasyonu ise in-situ hibridizasyon (İSH) yöntemi ile değerlendirilebilir. İHK'sal yöntem ile değerlendirmede, transmembran HER2 proteinine karşı geliştirilmiş primer antikolar kullanılır ve değerlendirme sonuçları, boyanma oranı ve yoğunluğuna göre semikantitatif olarak belirlenir. İSH yönteminde ise, HER2 gen kopya sayısını saptamak için işaretli problar kullanılır. Trastuzumab tedavisi uygulanacak hastaların doğru seçimini sağlayabilmek için ilk olarak 2007 yılında American Society of Clinical Oncology (ASCO) ve College of American Pathologists (CAP) çalışma grubu bir araya gelerek, HER2 protein ekspresyonunu ve gen amplifikasyonunu değerlendirirken kullanılacak algoritmayı içeren rehberi hazırlamışlardır ⁽¹⁰⁾. ASCO/CAP 2007 önerilerine göre İHK'sal yöntemle HER2 pozitifliği, invaziv tümör hücrelerinin %30'undan fazlasında komplet, uniform, membranöz boyanma olmasıdır. İSH ile pozitiflik ise invaziv tümör hücrelerinin nükleusunda HER2 gen kopya sayısının 6'nın üzerinde olması ya da HER2 gen/KR17 oranının 2,2'nin üstünde olmasıdır. HER2 değerlendirmeleri, yakın geçmişe kadar bu kılavuza göre yapılmıştır. Aynı grup 2013 yılında, güncelleme çalışması yaparak HER2 değerlendirme kriterlerini yeniden tanımlamıştır ⁽¹¹⁾. Önceki kriterler 2006 yılından başlayarak literatürde yer alan HER2 değerlendirme yöntemlerini içeren tüm çalışmalar yeniden gözden geçirilerek modifiye edilmiş; böylece önceki kılavuz rehberliğinde tanı ve tedavisi yapılan hastalarda karşılaşılan sorunların giderilmesi hedeflenmiştir. Son güncellemelerde en önemli 2 değişiklik invaziv tümör hücre oranının %30'dan %10'a, HER2 gen/KR17 oranının ise 2,2'den 2'ye düşürülmesi şeklindedir. Diğer bir önemli değişiklik ise skor 2'nin inkomplet boyanmaları da içerecek şekilde genişletilmesidir. İlk kılavuzda yalnızca komplet boyanmalar skor 2 olabilirken, 2013 tarihli güncellenmiş kılavuzda %10 üzerinde zayıf inkomplet boyanmalar da skor 2 kabul edilmiş-

tir ^(10,11).

İHK'sal yöntemlerde kullanılacak birçok primer antikör piyasada mevcuttur. İSH yöntemi olarak öncü ve uzun süre floresan İSH (FİSH) yöntemi kullanılmıştır. Bu testte HER2 gen ve kromozom 17'nin sentromerik bölgesini işaretleyen problar, üretici firmaya göre değişmek üzere kırmızı ve yeşil renkli florokromlarla işaretlenmiştir. İşaretleyici olarak farklı kromojenlerin kullanıldığı tek problu kromojenik İSH (KISH) ve silver İSH (SİSH) de yaygın kullanılan İSH yöntemlerindedir. Son yıllarda geliştirilen dual silver İSH (DİSH) yönteminde HER2 gen bölgesine özgü prob gümüşle işaretlenmekte, kromozom 17'nin sentromerik bölgesi ise kırmızı kromojenle görünür hâle gelmektedir. DİSH yaygın kabul görmüş ve FİSH'in tahtını sallamaya başlamıştır. Çünkü DİSH inceleme standart ışık mikroskopunda değerlendirilebilmekte, özel floresan mikroskopu gerekmemektedir. Ayrıca FİSH incelemede sinyalin zamanla solması ve bu nedenle preparatın arşivlenememesi sorunu vardır. Üstelik heterojen tümörlerde FİSH incelemede amplifiye hücre klonlarını kaçırma riski daha yüksektir. Buna karşılık eğer sentromerik bölge ko-amplifikasyonu da varsa DİSH ile yanlış pozitif sonuç olasılığı artar. Çünkü FİSH ile farklı filtrelerde yeşil ve kırmızı sinyaller ayrı ayrı değerlendirilebilirken, DISH yönteminde daha büyük olan kırmızı kromozom sinyalleri gen sinyallerini gizleyebilmektedir ⁽¹³⁾. Son zamanlarda, HER2 ekspresyonunu göstermek için parafin bloklardan elde edilen dokularda, real time polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile m-RNA seviyesi ölçülmeye başlamıştır. PCR uygulamaları için çok küçük doku örneğinin yeterli olması ve standardize edilebilmesi bu yöntemin avantajı gibi görünmektedir ⁽¹²⁾. Ancak 2013 kılavuzunda DNA dizileme ve mRNA ekspresyon analizleri tanısal amaçlı önerilmemektedir ⁽¹¹⁾.

HER2 DEĞERLENDİRMESİNİN STANDARDİZASYONU İÇİN ÖNERİLER

Günümüzde, HER2 durumunu belirlemek için tek bir "altın standart" yoktur. ASCO/CAP çalışma grubu

da geçerli HER2 testlerinin %20 kadarının preanalitik ve analitik değişkenlere göre doğru olmayabileceğini belirtmektedir. Gerçekten de çeşitli İHK protokolleri, antikörler veya problar laboratuvarlar arası değişkenliğe neden olmaktadır. Laboratuvarlar arasında HER2 testinin yinelenebilirliğinin sağlanması çok önemli olduğu için yöntem, malzeme standardizasyonu ile testi değerlendiren uzmanların bu konuda eğitimi şarttır. ASCO/CAP kılavuzlarının en doğru şekilde uygulaması ve hataların minimize edilmesi konusunda özelleşmiş referans merkezleri tarafından kurslar, toplantılar, kongreler düzenlenmektedir. Bu eğitimler sırasında özellikle vurgulanan detaylar şöyle sıralanabilir:

Uzmanlar tarafından sürekli vurgulanan en önemli konu, trastuzumab tedavisinin endike olduğu 2 ana tümör grubu olan meme ve mide kanserlerinde HER2 değerlendirmesinin çok önemli farkları olmasıdır. Değerlendiren kişide görsel ve zihinsel karışıklık oluşabileceği ve yanlış sonuçlara yol açabileceği için meme ve mide tümörlerinin ayrı değerlendirilmesi, hatta olabilirse mide ve meme tümörü olgularının farklı seanslarda değerlendirilmesi gerektiğidir ^(4,8,9,14).

HER2 değerlendirmede bir önemli nokta da değerlendirmenin hangi testle başlayacağına patoloğun karar vermesi ve tüm olgulara aynı prosedürün uygulanmasıdır. Günümüzde daha ucuz ve kolay olduğu için çoğu laboratuvarında başlangıç testi olarak İHK'sal boyama kullanılmakla birlikte, İSH ile başlamanın da hatalı olmadığı, hatta çoklu doku bloklamayla test maliyetinin de düşürülebileceği belirtilmektedir. Ancak, eğer başlangıç testi olarak İSH kullanılırsa HER2 inhibe edici tedaviden yarar görecektir polizomik olgular atlanabilir. Bu nedenle ve test maliyeti göz önüne alınarak hâlen çoğu merkezde başlangıç testi olarak HER2 (cerbB2) membranöz boyanmasının immünohistokimyasal değerlendirmesi yapılmaktadır. Öte yandan İHK'sal boyanma preanalitik süreçlerden daha fazla etkilendiği için özellikle tespit ve takip kalitesinin değerlendirilemediği konsültasyon olgularında İSH çok daha iyi sonuç verir ⁽¹¹⁾. Örneğin, HER2 test yöntemleri folmaldehitte tespitte göre

geliştirildiğinden alkolle tespit edilmiş dokularda uygulanan İHK'sal boyamalar hatalı pozitif sonuç verecektir. Benzer şekilde yetersiz tespit süresi yanlış pozitif sonuca yol açar. Bu nedenle ASCO/CAP'ın 2013 güncellemesinde olabildiğince erken (en geç 1 saat içinde) %10'luk tamponlu formol solüsyonuna alınan örneklerin en az 6 saatlik (bu süre 72 saate dek uzatılabilir) tespit süresi sonrasında işleme alınması gerektiği belirtilmektedir. Hatta 2007 kılavuzunda meme tümöründe öncelikle değerlendirilmesi istenen örnek rezeksiyon materyaliyken son güncellemede küçük olup, tespit solüsyonunun difüzyonunun daha kolay olması ve klinisyen tarafından neredeyse hemen alınır alınmaz tespite konularak gönderilmesi nedeniyle optimal örnek kor biyopsisi olarak kabul edilmektedir^(10,11).

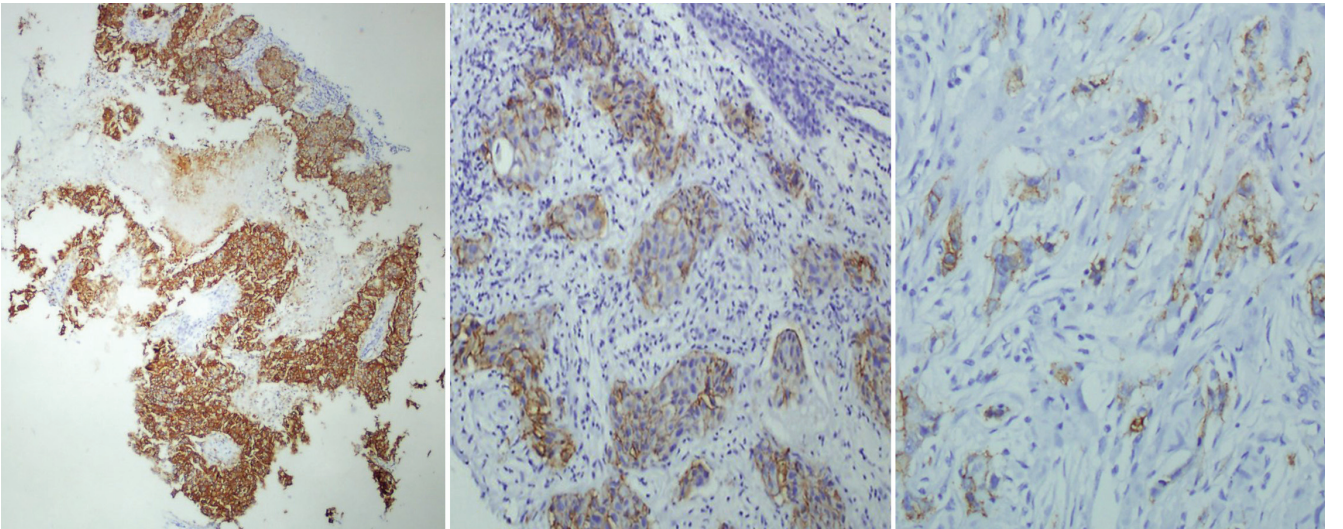
Ayrıca gen amplifikasyonu olduğu hâlde immün-histokimyasal boyamada inkomplet, bazolateral/U şeklinde boyanmanın gözleendiği mikropapiller karsinom benzeri bazı ender tümör tiplerinde ya da amplifikasyon olmadığı hâlde İHK'sal pozitiflik saptanabilen tubuler karsinom, pür müsinöz ve kribriform karsinom ile çoğu kez triple negatif olan adenoid kistik karsinomda başlangıç testi (İHK) sonucu ne olursa olsun farklı bir HER2 testi yapılması önerilmektedir⁽¹⁵⁾.

İHK'sal HER2 ekspresyon değerlendirmesinde en

temel ipucu mikroskop objektifleridir (Resim 1). Eğer komplet membranöz boyanmayı en küçük büyütmede (4X) görebiliyorsak skor 3+'dır. Eğer membranöz boyanmayı seçebilmek için 10X veya 20X büyütme gereksinim duyuyorsak skor asla 3+ olamaz, en fazla 2+ olabilir. Eğer 40X büyütmede ancak seçilebilen membranöz boyanma varsa skor en fazla 1+ olabilir⁽⁴⁾.

Özellikle son yıllarda DİSH pek çok laboratuvar-da işlem süresinin kısalığı, floresans mikroskopu gerektirmemesi benzeri nedenlerle yeğlenmektedir. Ancak kromozom 17 sentromer anormalliklerinin de eşlik ettiği olgularda FİSH değerlendirmeye göre oldukça yüksek yanlış negatiflik oranlarını dikkate almak şarttır. Sentromer amplifikasyonunun eşlik ettiği HER2 amplifikasyonlu olgularda DİSH negatif bulunmakta olup, potensiyel olarak anti HER2 tedaviden yarar görecektir olgular bu şanslarından yararlanamamaktadırlar. Öte yandan bazen monozomik tümörler hatalı olarak İSH incelemede HER2/KR17 oranı 2'nin üzerinde bulunduğu için tedavi alabilmektedir. Oysa yine çalışmalar monozomik olgularda ilacın hiçbir etkisinin olmadığını göstermiştir⁽¹³⁾.

Meme karsinomlarında HER2 değerlendirmesi çok daha uzun süredir uygulandığından ve tedavi sonuçlarının araştırıldığı geniş serili çalışmalar bulunduğundan bu konudaki kılavuzlar daha güvenilirlerdir. Örneğin, yapılan araştırmalar meme kanserinde orta-



Resim 1. İnvaziv duktal karsinom örneklerinde solda en küçük büyütmede bile değerlendirilebilen 3+ CerbB2 boyanması (40XDAB), ortada daha büyük büyütme gerektiren 2+ boyanma (100XDAB) ve sağda en büyük büyütmede hafif (1+) boyanma (400XDAB).

lama HER2 pozitifliği oranının %15-20 civarında olduğunu ve heterojenite riskinin düşük (%1-2) olduğunu göstermiştir. Apokrin diferansiyasyon gösteren meme tümörlerinde de HER2 pozitifliği daha yüksek orandadır. Benzer şekilde yüksek dereceli-yüksek evreli tümörlerde ve daha genç hastalarda HER2 pozitiflik oranı yükselmektedir. Çoğu seride, 80 yaş üzeri hasta grubunda HER2 ekspresyon düzeyi %10 civarındayken, 40 yaş altı hasta grubunda bu oran %28, 30 yaş altındaki popülasyonda ise %40 civarında bildirilmiştir. Histolojik derecesi düşük tümörlerde HER2 pozitifliği %3,4 düzeyinde iken, yüksek dereceli tümörlerde bu oran %27,6'dır. Benzer şekilde, HER2 pozitifliği ileri tümör evresi ile de ilişkilidir. Tersine, tümörde hormon reseptör (ER/PR) ekspresyon pozitifliği, HER2 pozitifliği ile negatif korelasyon göstermektedir. Ancak, meme tümöründe bile bazı noktalara dikkat şarttır. Özellikle FISH incelemede patoloğun amplifikasyon gözlediği alandaki hücrelerin in-situ karsinom hücreleri olmadığını ayırt etmesi ve örneklemeyi sadece invaziv tümör alanından yapması şarttır⁽¹⁶⁻¹⁸⁾.

Gastrik karsinomlar; sağkalım süresi çok kısa, tedavi başarısı düşük ve taramaların yapılmadığı ülkelerde tanı anında ileri evrede olan tümörlerdir. Son yıllarda ileri evre HER2 pozitif mide kanserlerinde trastuzumab tedavisi ile ortalama sağkalım sürelerinde göreceli olarak anlamlı artış saptanmıştır. Bu nedenle mide kanserlerinde HER2 değerlendirilmesi de önem kazanmıştır. Mide tümörlerinde HER2 değerlendirmesinde ciddi farklılıklar vardır. Öncelikle memedekinin aksine midede genellikle iyi diferansiyasyonlu intestinal tipte pozitiflik oranı %30'lara ulaşmışken, diffüz tipte bu oran %5 civarındadır. Ayrıca hücrelerde komplet membranöz değil bazolateral boyanma (U şeklinde boyanma) izlenir. Ayrıca mide kanserinde heterojenite oranı farklı çalışmalarda %50'lere ulaşan oranlarda bildirilmiştir. Bu nedenle de biyopsi örneklerinde %10 oranı kaldırılmış, 5 hücre topluluğu ve üzerinde amplifikasyon gözlenmesi pozitif kabul edilmiştir. Özellikle FISH incelemede heterojenite nedeniyle çok küçük amplifiye grupların gözden kaçabileceği unutulmamalı ve bu

risk daha az olduğundan DİSH yeğlenmelidir. Ayrıca bazı antikorlarla foveoler epitel ve intestinal metaplazi alanları pozitif olabileceğinden İHK'sal değerlendirmede hatalar yapılabilir. Benzer şekilde tümöre sıklıkla eşlik edebilen makrofaj ve mast hücrelerinin deneyimsiz biri tarafından FISH incelemede rahatlıkla amplifikasyon olarak yorumlanabilecek sinyaller oluşturabileceğini göz önünde tutmak gerekir^(4,8,14).

Hem meme hem de mide kanserleriyle ilgili çalışmalarda bir başka tartışmalı konu da polizomidir. Bazı çalışmalar HER2 gen bölgesinde artış olmasa da gen sayısında artış olan olguların tedaviden yarar sağladığını göstermiştir. Ancak eskiden uygulanan, kromozom 17 sentromerik bölge sinyallerinin artışının (3 ve üzeri) polizomi olarak kabul edilmesi uygulaması tartışmalı hal almıştır. Çünkü polizomik kabul edilerek anti HER2 tedavisi verilen bu olgularda tedavi yanıtının beklenen düzeyde olmaması üzerine daha sofistike yöntemlerle gen analizi yapılmış ve bu olguların yalnızca %14-15 kadarının gerçek polizomik olduğu, diğerlerinin sentromerik bölge amplifikasyonu olduğu gözlenmiştir⁽¹⁹⁾. Genetik incelemelerde polizomi gösterilememiş olguların irdelendiği çalışmalarda tedavi yanıtıyla ilgili çelişkili sonuçlar alınmıştır. Tüm bu bulgular ışığında son karar HER2 sinyal sayısı nükleus başına 6'nın üzerinde olan olguları HER2/Kr17 oranına bakmaksızın pozitif kabul etmek şeklindedir. Yalnız 6 sinyal sayarken bir noktadan daha yakın, neredeyse yapışık HER2 sinyallerini tek sinyal olarak saymak gerekmektedir. Çünkü kromozom katlanmaları tek sinyalin çok sinyal gibi algılanmasına yol açar⁽¹⁵⁻²⁰⁾.

Sonuç olarak, HER2 değerlendirmesi; son güncellenen ASCO/CAP 2013 kılavuzuna göre, kalitesi onaylanmış kitlerle ve HER2 değerlendirmesi konusunda eğitilmiş patologlar tarafından yapılmalıdır. Göz ve zihin yanılısamlarından kaçınmak için olabildiğince meme ve mide kanser örnekleri ayrı değerlendirilmelidir. Pre-analitik hataların azaltılabilmesi için birden fazla yöntem denenmeli ve laboratuvarın iç ve dış kalite kontrolleri yapılmalıdır. Test sonuçlarının yıllık değerlendirilmesi ihmal edilmemelidir. Özellikle yıllık dökümlerde HER2 pozitif olgu oranı

%10'un altında veya %25'in üzerinde ise hatalı deęerlendirme olabileceđini dūřünerek HER2 deęerlendirme sūrecinin her ařaması yeniden gözden geęirilmelidir ⁽¹⁶⁻²⁰⁾.

Teřekkūr: HER2 deęerlendirmede patolođlar için eđitim kursları dūzenleyen Targos Referans Laboratuvarından Prof. Dr. Rūschoff'a ve Roche Mūstahzarları A.ř. řirketine teřekkūrlerimizi sunarız.

KAYNAKLAR

1. Pala EE, Bayol Ū, Őzgūzer A, Kūuk Ū, Yıldız Akdeniz , Sezer Ő. Meme kanserinde Her2 durumunu belirlemedeki sorunlar. *J Breast Health* 2015;11:10-16. <http://dx.doi.org/10.5152/tjbh.2014.2103>
2. Maguire HC, Greene MI. The neu (c-erbB-2) oncogene. *Semin Oncol* 1989;16(2):148-55.
3. 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(4785):177-82. <http://dx.doi.org/10.1126/science.3798106>
4. Irkkan S. Mide kanserlerinde HER2 değerlendirmesi. *Acta Oncologica Turcica* 2014;47(3):42-51. <http://dx.doi.org/10.5505/aot.2014.24633>
5. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fucks H, Paton V, Bajamonde A, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001;344:783-792. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM200103153441101>
6. Paik S, Kim C, Wolmark N. Her2 status and benefit from adjuvant trastuzumab in breast cancer. *N Engl J Med* 2008;358:1409-1411. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMc0801440>
7. Geyer CE, Forster J, Lindquist D, Chan S, Romieu CG, Pienkowski T, et al. Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* 2006;355(26):2733-43. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa064320>
8. Rūschoff J, Hanna W, Bilous M, Hofmann M, Osamura RY, Penault-Lorca F, et al. HER2 testing in gastric cancer: a practical approach. *Mod Pathol* 2012;25(5):637-50. <http://dx.doi.org/10.1038/modpathol.2011.198>
9. Gown AM: Current issues in ER and HER2 testing by IHC in breast cancer. *Mod Pathol* 2008;21(2):8-15. PMID:18437174. <http://dx.doi.org/10.1038/modpathol.2008.34>
10. Wolff AC, Hammond MEH, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DJ, Cote RJ, 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;25:118-145. <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2006.09.2775>
11. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, et al. American Society of Clinical Oncology; College of American Pathologists. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol* 2013;31(31):3997-4013. <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2013.50.9984>
12. Mansfield AS, Sukov WR, Eckel-Passow JE, Sakai Y, Walsh FJ, Lonzo M, et al. Comparison of fluorescence in situ hybridization (FISH) and dual-ISH (DISH) in the determination of HER2 status in breast cancer. *Am J Clin Pathol* 2013;139(2):144-50. <http://dx.doi.org/10.1309/AJCP13GJAOJAYJMW>
13. Pazhoomand R, Keyhani E, Banan M, Najmabadi H, Khodadadi F, Iraniparast A, et al. Detection of HER2 status in breast cancer: comparison of current methods with MLPA and real-time RT-PCR. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013;14(12):7621-8. <http://dx.doi.org/10.7314/APJCP.2013.14.12.7621>
14. Rūschoff J, Dietel M, Baretton G, Arbogast S, Walch A, Monges G, et al. HER2 diagnostics in gastric cancer-guideline validation and development of standardized immunohistochemical testing. *Virchows Arch* 2010;457(3):299-307. <http://dx.doi.org/10.1007/s00428-010-0952-2>
15. Weigelt B, Geyer FC, Reis-Filho JS. Histological types of breast cancer: how special are they? *Mol Oncol* 2010;4(3):192-208. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molonc.2010.04.004>
16. Hofmann M, Stoss O, Gaiser T, Kneitz H, Heinmōller P, Gutjahr T, et al. Central HER2 IHC and FISH analysis in a trastuzumab (Herceptin) phase II monotherapy study: assessment of test sensitivity and impact of chromosome 17 polysomy. *J Clin Pathol* 2008;61(1):89-94. <http://dx.doi.org/10.1136/jcp.2006.043562>
17. Seidman AD, Berry D, Cirincione C, Harris L, Muss H, Marcom PK, et al. Randomized phase III trial of weekly compared with every-3-weeks paclitaxel for metastatic breast cancer, with trastuzumab for all HER-2 overexpressors and random assignment to trastuzumab or not in HER-2 nonoverexpressors: final results of Cancer and Leukemia Group B protocol 9840. *J Clin Oncol* 2008;26(10):1642-9. <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2007.11.6699>
18. Dowsett M, Procter M, McCaskill-Stevens W, de Azambuja E, Dafni U, Rueschoff J, et al. Disease-free survival according to degree of HER2 amplification for patients treated with adjuvant chemotherapy with or without 1 year of trastuzumab: the HERA Trial. *J Clin Oncol* 2009;27(18):2962-9. <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2008.19.7939>
19. Hanna WM, Rūschoff J, Bilous M, Coudry RA, Dowsett M, Osamura RY, et al. HER2 in situ hybridization in breast cancer: clinical implications of polysomy 17 and genetic heterogeneity. *Mod Pathol* 2014;27(1):4-18. <http://dx.doi.org/10.1038/modpathol.2013.103>
20. Marcio C, Lambros MB, Gugliotta P, Di Contogno LV, Botta C, Pasini B, et al. Does chromosome 17 centromere copy number predict polysomy in breast cancer? A fluorescence in situ hybridization and microarray-based CGH analysis. *J Pathol* 2009;219:16-24. <http://dx.doi.org/10.1002/path.2574>