

# Meme karsinomlarında HER-2 durumunun immunohistokimyasal ve moleküler analizlerle değerlendirilmesi

## Evaluation of HER-2 status with immunohistochemical and molecular analyses in breast carcinomas

Nuket ELİYATKIN<sup>1</sup>, Hakan ÖZGÜR<sup>2</sup>, Pınar ERÇETİN<sup>3</sup>, Safiye AKTAŞ<sup>3</sup>, Ali KÜPELİOğLU<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Adnan Menderes Üniversitesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı, Aydın ve Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı, İzmir

<sup>2</sup>Özel Güneş Patoloji Laboratuvarı, İzmir

<sup>3</sup>Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı, İzmir

### ÖZET

**Amaç:** Human epidermal growth factor receptor-2 (HER-2) + meme kanser hastaları, trastuzumab tedavisi için uygun hastalardır; bu nedenle HER-2 durumunun doğru bir şekilde değerlendirilmesi gereklidir. HER-2 durumunu değerlendirmek için, geçerliliği olan ve en yaygın kullanılan metotlar immunohistokimya ve in situ hibridizasyondur. Polimeraz zincir reaksiyonu temelli değerlendirmeler, HER-2' nin amplifikasyonunu (kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu) ya da aşırı ekspresyonunu (eşzamanlı polimeraz zincir reaksiyonu) gösterir, fakat rutin olarak kullanılmamaktadır. Bu çalışmada, meme kanserinde HER-2 durumunun değerlendirilmesinde; immunohistokimya, kromojenik in situ hibridizasyon ve eşzamanlı polimeraz zincir reaksiyonunun uyumu değerlendirildi.

**Yöntemler:** Primer meme karsinomu tanısı almış 76 olguyu incelendi. İn situ komponenti >%10 fazla olan bloklar çalışmaya dâhil edilmedi. Hematoksilin-eozin boyamalar, immunohistokimyasal boyamalar ve kromojenik in situ hibridizasyon, formalinle fikse parafine gömülü doku örneklerine uygulandı. Eşzamanlı polimeraz zincir reaksiyonu, invaziv karsinom içeren tümör dokusundan izole edilen RNA'da çalışıldı.

**Bulgular:** Immunohistokimyasal olarak 0/1+ ve 3+ olan alt gruptaki olgularda kromojenik in situ hibridizasyon ve eşzamanlı polimeraz zincir reaksiyonu değerlendirme sonuçları arasında uyum istatistiksel olarak anlamlı (p<0,0001) saptandı. Ancak, immunohistokimyasal olarak 2+ alt grupta kromojenik in situ hibridizasyon ve eşzamanlı polimeraz zincir reaksiyonu sonuçlarına göre diğer alt gruplarda daha heterojen bir dağılım olduğu dikkati çekti.

**Sonuç:** HER2 durumunu değerlendirmede, eşzamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ve immunohistokimya arasında uyum yüksekti. Ayrıca kromojenik in situ hibridizasyon ile immunohistokimya arasında da iyi bir uyum vardı. Eşzamanlı polimeraz zincir reaksiyonu, HER2 durumunu değerlendirmede, oldukça güvenilir kantitatif bir değerlendirme sağlar ve yeni bir yöntem olarak immunohistokimyasal yöntemle yararlı bir tamamlayıcı olabilir.

**Anahtar kelimeler:** Meme karsinomu, HER-2, immunohistokimya (İHK), kromojenik in situ hibridizasyon (KİSH), kantitatif eş zamanlı-PZR (EZ-PZR)

### ABSTRACT

**Objective:** Breast cancer patients with human epidermal growth factor receptor-2 (HER-2) are eligible for trastuzumab treatment; therefore, accurate assessment of HER2 status is essential. Immunohistochemistry and in situ hybridisation are currently the most commonly used methods to assess HER2 status. Polymerase chain reaction-based assays allow quantitative determination of HER2 amplification or overexpression, but they are not routinely used. We evaluated the relevance of immunohistochemistry, chromogenic in situ hybridisation and real time-polymerase chain reaction for HER2 status determination.

**Methods:** We analysed 76 primary breast carcinomas. Blocks of tumours with >10% in situ component were excluded from this study. Haematoxylin-eosin stainings, immunohistochemical stainings and in situ hybridisation techniques were performed on formalin-fixed paraffin-embedded tissue samples. Real time-polymerase chain reaction was performed on RNA extracted from invasive carcinoma tissue.

**Results:** We observed statistically significant correlation between chromogenic in situ hybridisation and real time-polymerase chain reaction in immunohistochemically 0/1+ and 3+ cases. But, compared with the results of in situ hybridisation and real time-polymerase chain reaction performed in cases with immunohistochemically 2 + subgroup, other subgroups demonstrated more heterogenous distribution.

**Conclusion:** Real time-polymerase chain reaction and immunohistochemistry are highly concordant methods for HER2 status assessment, and also high degree of concordance was detected between chromogenic in situ hybridisation and immunohistochemistry. Real time-polymerase chain reaction allows a highly reliable quantitative assessment and could be a useful adjunct to immunohistochemistry as a new method.

**Key words:** Breast carcinoma, HER-2, immunohistochemistry (IHC), chromogenic in situ hybridization (KISH), quantitative real-time-PCR (Q-RT-PCR)

**Alındığı tarih:** 27.02.2015

**Kabul tarihi:** 02.04.2015

**Yazışma adresi:** Yrd. Doç. Dr. Nuket Eliyatkin, Adnan Menderes Tıp Fakültesi, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı, Aydın  
**e-mail:** drnuket2003@yahoo.com

## GİRİŐ

Günümüzde, klinik onkolojik yaklaşım programlarında, sağkalım ve yaşam kalitesi açısından belirgin farklılıklar yaratan hedefe yönelik tedavi programları, etkin şekilde uygulamaya girmiştir. Bu gibi hedefe yönelik tedavi yaklaşımları arasında, meme kanseri hastalarında trastuzumab kullanımı, en bilinenlerindedir. Trastuzumab (Herceptin, F. Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland) spesifik olarak human epidermal growth factor receptor-2 (HER-2)'ye karşı geliştirilmiş bir monoklonal antikordur. Trastuzumabın, HER-2 pozitif ilerlemiş yada metastatik meme kanserinin yanı sıra HER-2 pozitif erken evre meme kanserinin tedavisinde monoterapi şeklinde ya da diğer sitotoksik ajanlarla kombine edilerek uygulanmasının, sağkalımda belirgin bir artışa neden olduğu gösterilmiştir <sup>(1-6)</sup>. Bu nedenle de tüm meme kanseri hastalarının tanısında, trastuzumab tedavisinden potansiyel yarar görecek hastaları öngörmek için, HER-2 durumunun en doğru, güvenilir ve yinelenebilir şekilde değerlendirilmesi önerilmektedir <sup>(1)</sup>.

HER-2 testi, immunhistokimya (İHK) ya da in situ hibridizasyon (İSH) yöntemi ile yapılabilir. İHK'sal yöntem ile değerlendirmede, HER-2 protein ekspresyon seviyelerine karşı geliştirilmiş antikolar kullanılır ve değerlendirme sonuçları, boyanma oranı ve yoğunluğuna göre yarı niceliksel olarak belirlenir <sup>(7)</sup>. İSH yönteminde ise, HER2/neu gen kopya sayısını saptamak için işaretili problemler kullanılır. Trastuzumab tedavisi uygulanacak hastaların doğru seçimini sağlayabilmek için American Society of Clinical Oncology (ASCO) ve College of American Pathologists (CAP) alışma grubu bir araya gelerek, hem HER-2 protein ekspresyonunu hem de gen amplifikasyonunu değerlendirirken belirli kriterlerin kullanıldığı bir basamaklar dizisi içeren kılavuzu ilk olarak 2007 yılında hazırlamışlardı <sup>(7)</sup>. 2007 ASCO/CAP önerilerine göre İHK'sal yöntemle tümör hücrelerinin % 30'undan fazlasında uniform, yoğun, komplet, membranöz boyanma HER-2 pozitif sonuç (skor 3) olarak değerlendirilir. İSH ile pozitif bir sonuç ise invaziv tümör hücrelerinin nükleusunda HER2 gen kopya sayısının

6'nın üzerinde olması ya da HER2 gen/ CEP17 oranının 2,2'nin üstünde olması olarak belirlenmiştir. ASCO/CAP paneline katılan uzmanlar arasında, İHK'sal değerlendirmenin, HER-2 durumunu belirlemek için yeterince doğru bir değerlendirme olmadığı görüşünü savunanlar da olmuştur <sup>(7)</sup>. Bu görüşlerini de iki büyük çalışma sonuçları ile desteklemişlerdir <sup>(8,9)</sup>. Bu çalışmalarda lokal ve merkezi olarak değerlendirilen HER2 testinde İHK ya da hem İHK hem de floresan İSH (FİSH) yöntemleri arasında uyumsuzluk oranlarının tespit edilmesi ile desteklemişlerdir. HER-2 değerlendirmeleri, yakın bir zamana kadar bu kılavuz bilgilerine göre yapılmaktaydı. Ancak, aynı grubun, 2013 yılında yayınladıkları bir yenileme çalışması ile HER-2 değerlendirme kriterleri yeniden tanımlandı. Bu kriterler, 2006 yılından itibaren literatürde yer alan HER-2 değerlendirme yöntemlerini içeren tüm çalışmaların yeniden gözden geçirilerek hazırlandığı bir kılavuz olarak sunuldu <sup>(10)</sup>. İSH yöntemi olarak öncü ve uzun süre uygulanan FİSH yöntemi, yerini kromojenik İSH (KİSH) veya gümüş İSH (GİSH)'ye bırakmaya başlamıştır. Çünkü bu yöntemler zamanla solmayan kromojenik bir sinyalin kullanıldığı, fazla zaman tüketmeyen, ayrıca standart ışık mikroskobu ile değerlendirilebilen ve daha sonra tekrar değerlendirilebilir şekilde arşivlenebilir özellikte oldukları için tercih edilmektedir <sup>(11,12)</sup>. Günümüzde, HER-2 durumunu belirlemek için tek bir "altın standart yöntem" yoktur. ASCO/CAP alışma grubu da geerli HER-2 testlerinin %20 kadarının preanalitik ve analitik değişkenlere göre doğru olmayabileceğini belirtmektedir <sup>(13)</sup>. Gerçekten de çeşitli İHK protokolleri, antikolar veya problemler nedeniyle laboratuvarlar arası değişkenliğe neden olmaktadır. Laboratuvarlar arasında HER-2 testinin yinelenebilirliğinin sağlanması çok önemli olduğu için yeni HER-2 değerlendirme test teknolojilerine gereksinim vardır. Son zamanlarda, HER-2 ekspresyonunun, formalinde fikse-parafine gömülmüş (FFPG) dokuda, m-RNA seviyesinin eşzamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (EZ-PZR) ile ölçülebileceği gösterilmiştir <sup>(14)</sup>. Bu değerlendirmeler kolay, hızlı, duyarlı, spesifik ve niceliksel yaklaşımlardır, daha da önemlisi İHK,

FISH, KISH ve GISH gibi uygulama teknikleri ve değerlendirme kriterlerinde görülebilecek değerlendirenler arası değişkenlik, PZR değerlendirmelerinde yoktur <sup>(14)</sup>. PZR uygulamaları için gerekli doku örneği küçüktür, ayrıca PZR standardize ve otomatize edilebilir bir yöntemdir.

Bu çalışmada, meme kanser hastalarında HER-2 testinde PZR temelli teknolojinin uygulanmasını değerlendirmek amacıyla, HER-2 durumunun İHK, KISH ve EZ-PZR yöntemleri ile belirlenmesi ve bu yöntemlerin arasındaki uyum değerlendirildi. Ayrıca özellikle, İHK 2 pozitif (kuşku) olgularda EZ-PZR ile değerlendirmenin, diğer yöntemlere göre güvenilir bir alternatif olabilme olasılığı saptanmaya çalışıldı.

## GEREÇ ve YÖNTEM

### Çalışma Modeli

Çalışmaya primer tümörü değerlendirilerek invaziv meme karsinomu tanısı almış 76 olgu dâhil edildi. Olguların 17'si insizyon/kalın iğne biopsisinden, kalan 59 olgu eksizyon/mastektomi materyalinden oluşmaktaydı. Olgulara ait tüm hematoksilen-eosin (H&E) boyalı preparatlar histolojik görünümleri de dikkate alınarak yeniden değerlendirildi. Her bir olgu için, in situ komponent tümör dokusunun %10'dan daha azı olacak şekilde en tanıtıcı tümör dokusu içeren bloklar seçildi. Bu bloklardan, İHK ve KISH tekniği ile HER-2 durumunu değerlendirmek amaçlı 4-5 mikrometre kalınlığında kesitler alındı. Ayrıca, tüm olgulara ait H&E kesitlerde olası olabildiğince invaziv tümör hücrelerinden zengin, stromadan fakir alan işaretlendi ve bu alana uyan tümöral doku örneği EZ-PZR değerlendirilmesi için bloktan çıkarılarak, sterilize edilmiş ependorf tüp içine alındı ve işleme kadar oda sıcaklığında saklandı.

### İmmunohistokimyasal Boyamanın Uygulanması

İmmunohistokimyasal değerlendirme için tümör içeren parafin bloklardan 4-mikronkalınlıkta kesitler lizinli lamlara alındı. Bir gece 37 °C'de etüvde deparafinize edildi. cerbB-2 için immun boyamalar

monoklonal HER-2 antikorunu (Anti-HER2/klon: 21564, Rabbit monoclonal, Bioss Antibodies, Boston, USA) streptavidin-peroksidaz metodu ile manuel yöntemle boyandı. İmmun boyama sonuçları iki ayrı patolog (AK, NE) tarafından membran boyanmaları değerlendirilerek yapıldı ve ASCO/CAP 2013 önerilerine göre skorlandı <sup>(10)</sup>.

### Kromojenik İn Situ Uygulanması

KISH uygulamak üzere seçilmiş bloklardan 4-5 mikrometre kalınlığında parafin doku kesitleri hazırlandı. KISH boyama, İnvitrogen kiti (İnvitrogen SPOT-Light® HER2 CISH Kit, Paisley, UK) kullanılarak üretici firmanın protokolüne göre uygulandı. Kromojenik sinyal durumu iki ayrı patolog (SA, NE) tarafından, 20x ve 40x objektifle yapıldı. Değerlendirme üretici firma tarafından yeni olarak güncellenmiş ve ASCO/CAP 2013 kılavuzunda önerilen skorlama sistemine göre yapıldı <sup>(10)</sup>. Bu skorlama sistemine göre: tümör hücrelerinin %50'sinden fazlasında her nükleusta 5 ve daha az HER-2 gen sinyal sayısı varsa amplifikasyon negatif (AN); tümör hücrelerinin %50'sinden fazlasında her nükleusta HER-2 geninin 6-10 sinyali ya da HER-2 geninin çoğul sinyali ve küçük kümelerin karışımı varsa amplifikasyon pozitif-düşük (AP-D); tümör hücrelerinin %50'sinden fazlasında her nükleusta HER-2 gen sinyal sayısının 10'dan fazla yada büyük kümelerin ya da çoğul sinyal ve büyük kümelerin karışımı varsa amplifikasyon pozitif-yüksek (AP-Y) şeklindedir. Çalışmada her olgu için üretici firmanın skorlama tablosuna göre 30 hücre sayıldı, ortalama sinyal sayısı 4 ile 6 arasında bir değerde bulunan olgularda 30 hücre daha sayıldı ve iki ayrı sayım ile elde edilen sonuçların ortalaması ile toplam 60 hücrede (30 hücre+30 hücre) bir sonuç değer elde edildi.

### Eşzamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Uygulanması

Tüm olgulara ait H&E kesitlerde invaziv tümör hücrelerinden zengin, stromadan fakir alana uyan doku örneği EZ-PZR değerlendirilmesi için bloktan çıkarıldı. RNA izolasyonu yapabilmek için Qiagen

miRNeasy FFPG Kiti (Qiagen, Penzberg, Germany) kullanıldı. Önerilen prosedüre göre önce dokudaki parafin kimyasal yolla uzaklaştırıldı, daha sonra sırasıyla DNA ve RNA açığa çıkarıldı. RNA izolasyonunun yeterliliği nanodropta ölçüm yapılarak (A260/A280 ve A260/A230 değerleri >10 ng/ul) değerlendirildi. m-RNA'ların, c-DNA'ya dönüştürme işleminde, içinde 4 ayrı reaktif içeren (revers transkriptaz enzimi, RNAaz inhibitörü, nükleotidler, tampon) Roche Transcriptor High Fidelity cDNA synthesis kiti (Roche, Penzberg, Germany) kullanıldı. m-RNA içeren c-DNA'ların yeterliliğinde kontrol geni olarak "beta-aktin" ile çalışıldı. Ct değerleri 20-30 arasında ise uygun, Ct değerleri >30 ise bu değer HER-2 çalışması için uygun değer olarak kabul edildi. Her tümör örneği için elde edilen m-RNA, c-DNA'ya dönüştürüldü. Hazırlanan c-DNA'lardan da Her2/referans gen konsantrasyonu EZ-PZR yöntemi ile saptandı. Bu oransal değer 2 ve üzerinde ise EZ-PZR pozitif olarak kabul edildi.

### İstatistiksel Analiz

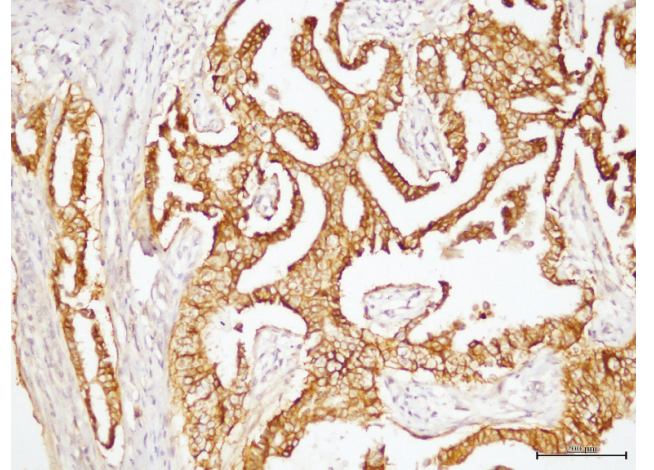
Verilerin analizi SPSS (Statistical Package for Social Sciences, Chicago, IL, USA, Windows 16.0) paket programında yapıldı. Tanımlayıcı istatistikler sürekli değişkenler için ortalama  $\pm$  standart sapma veya ortanca (minimum-maksimum) şeklinde, kalitatif değişkenler ise gözlem sayısı ve (%) olarak gösterildi. İHK, KİSH ve EZ-PZR bulguları Pearson ki-kare testi ile analiz edildi. p değeri <0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

### BULGULAR

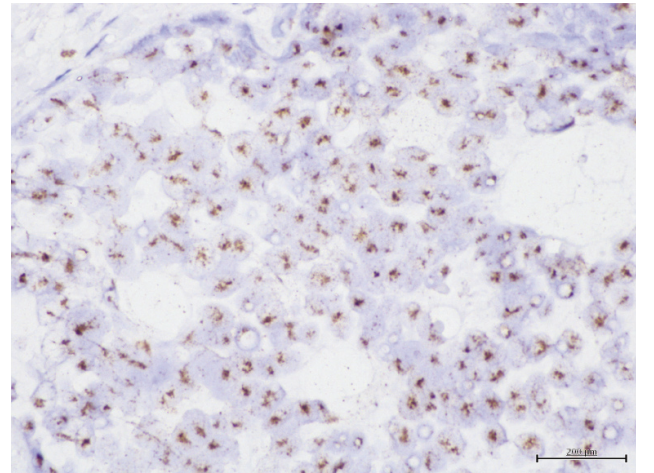
Çalışmaya dâhil edilen olguların yaş ortalaması  $53,26 \pm 12,21$  (28-81) olarak tespit edildi. Elli dokuz (%77,6) olgu eksizyon ya da mastektomi, 17 (%22,4) olgu kalın iğne ya da insizyonel biopsi niteliğindediydi. Altmış yedi (%88,2) olgu, invaziv karsinom-nonspesifik tip (invaziv duktal karsinom) morfolojisindeydi. Diğer olgular arasında medüller özellikler gösteren invaziv karsinom, müsinöz karsinom, lobüler karsinom gibi özel alt tipler vardı.

Ortalama tümör boyutu  $2,40 \pm 1,18$  (0,5-7) olarak tespit edildi. Modifiye Bloom Richardson'a göre histolojik derece (HD) dağılımı; 2 (%2,6) olgu HD 1, 54 (% 71,1) olgu HD 2, 20 (%26,3) olgu HD 3 olarak belirlendi.

İHK'sal değerlendirme sonuçlarına göre olguların 33'ü (%43,4) 3+, 23'ü (%30,3) 2+, 20'si (%26,3) 0/1+ olduğu tespit edildi (Resim 1) KİSH uygulaması tüm olgulara uygulandı. Amplifikasyon 44 (%57,9) olguda saptandı (Resim 2), 32 (%42,1) olguda amplifikasyon saptanmadı (Resim 3).

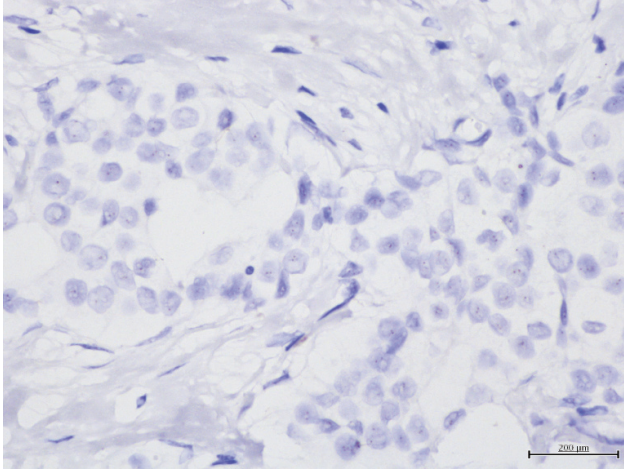


Resim 1. HER-2 durumu İHK 3+ olan invaziv meme karsinomu (Anti-HER2 antikor x100).



Resim 2. KİSH ile yüksek amplifikasyon (büyük kümeler şeklinde) (KİSH x400).

EZ-PZR ile beş olguda Her-2/neu veya referans gen ile sonuç alınamadığı için diğer yöntemler ile karşılaştırmalar yapılırken, değerlendirme dışı bira-



Resim 3. KİSH ile tümör hücre nükleuslarında amplifikasyon (KİSH x400).

kıldı. EZ-PZR ile Her2/referans gen konsantrasyonu için ortalama değer  $5,77 \pm 1,89$  (0,08-155,38) olarak saptandı. Değerlendirme kriterlerine göre 35 (%49,3) olgu pozitif, 36 (%50,7) olgu negatif olarak tespit edildi.

#### İHK ile KİSH sonuçlarının karşılaştırılması

İHK 3+ olguların 31'i (%93,9) KİSH ile amplifikasyon gösterdi. İHK 0/1+ (negatif) alt grup içinde KİSH negatif 18 (%90) olgu vardı. İHK 2+ (kuşuklu) olan 23 olgunun 11'i (%47,8) KİSH ile amplifikasyon gösterirken 12 olguda (52,2) amplifikasyon görülmedi. İHK ve KİSH sonuçları arasında uyum istatistiksel olarak anlamlı ( $p=0,0001$ ) bulundu. Tablo 1'de bu sonuçlar karşılaştırmalı olarak gösterildi.

Tablo 1. İHK ve KİSH değerlendirme sonuçları ( $p=0,0001$ ).

	İHK			Toplam (n)
	0/1+	2+	3+	
KİSH				
Negatif	18	12	2	32
Pozitif	2	11	31	44
Toplam (n)	20	23	33	76

İHK: İmmunohistokimya

KİSH: Kromojenik in situ hibridizasyon

#### İHK ile PCR sonuçlarının karşılaştırılması

Yinelenen çalışmalara rağmen, toplam 5 olguda (2 olgu İHK 3+, 1 olgu İHK 2+, 2 olgu İHK 0/1+)

Her-2/neu veya referans gen ile sonuç alınamadı. İHK 3+ 31 olgunun 23'ünde (%74,1) EZ-PZR ile pozitiflik saptandı. İHK 0/1+ olan 18 (%88,9) olguda EZ-PZR negatif sonuç verdiği gözlemlendi. İHK ve EZ-PZR sonuçları arasındaki uyum istatistiksel olarak anlamlı ( $p=0,0001$ ) bulundu. Tablo 2'de bu sonuçlar karşılaştırmalı olarak gösterildi.

Tablo 2. İHK ile EZ-PZR değerlendirme sonuçları ( $p=0,0001$ ).

	İHK			Toplam (n)
	0/1+	2+	3+	
EZ-PZR				
Negatif	16	12	8	36
Pozitif	2	10	23	35
Toplam (n)	18	22	31	71

İHK: İmmunohistokimya

EZ-PZR: Eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

#### KİSH ile PCR sonuçlarının karşılaştırılması

KİSH ile amplifikasyon gösteren toplam 42 olgunun 30'unda (%71,4) EZ-PZR ile de ekspresyon saptandı. KİSH ile amplifikasyon göstermeyen toplam 29 olgunun 24'ünde (%82,7) EZ-PZR ile ekspresyon saptanmadı. KİSH ve EZ-PZR sonuçları arasındaki uyum istatistiksel olarak anlamlı ( $p=0,0001$ ) bulundu. Tablo 3'te sonuçlar karşılaştırmalı olarak gösterildi.

Tablo 3. KİSH ve EZ-PZR değerlendirme sonuçları ( $p=0,0001$ ).

	KİSH		Toplam (n)
	Negatif	Pozitif	
EZ-PZR			
Negatif	24	12	36
Pozitif	5	30	35
Toplam (n)	29	42	71

KİSH: Kromojenik in situ hibridizasyon

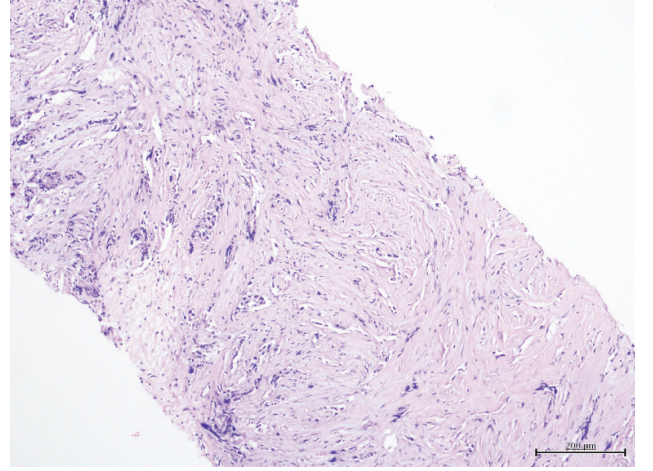
EZ-PZR: Eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

## TARTIŞMA

Trastuzumab tedavisi uygulanacak hastaların öngörülmesi için HER2 durumunu belirlemede, öncelikle önerilen ve uygulanan yöntem İHK'dır (13,16). HER2 immün boyamasının uygulanması kolaydır, patoloji laboratuvarlarında FFPG örneklerde

yaygın şekilde uygulanabilir ve güvenilir standart bir yöntemdir. Ayrıca, nispeten ucuzdur, ancak semikantitatif bir yöntemdir. Ayrıca olguların %3-15'inde, İHK kuşkuludur ve daha ileri analizler gereklidir, bu da genelde İHK'ya ek olarak FİSH uygulanmasını gerekliliğini ortaya koymaktadır <sup>(17)</sup>. FİSH de İHK gibi semikantitatif bir yöntemdir, İHK'ya göre daha yüksek maliyetli, ayrıca özelleşmiş bir deneyim ve donanım (floresan mikroskobu) gerektirir. HER2 durumunu değerlendirme yöntemleri arasında EZ-PZR'nun, bugün için geğerli olan İHK+FİSH uygulamasına yararlı bir seğernek olabileceği düşünölmüştür Çok sayıda çalışmada İHK ve EZ-PZR uygulamaları karşılaştırılmıştır <sup>(18-28)</sup>. Bu alışmalar ile frozın ve FFPG dokularla çalışıldığında, iyi bir uyum (%82-100) olduğu saptanmıştır, ancak çalışmaların çoğunda olgu sayıları sınırlıdır. Çalışmamızda, İHK ve EZ-PZR değerlendirmelerinde, İHK 0/1+ ve İHK 3+ alt grup içinde iyi uyum saptanmıştır. Ancak İHK 3+ olmasına rağmen, EZ-PZR ile pozitiflik saptanmayan 8 olguda uyumsuzluğun nedenini araştırmak amacıyla tüm parametreler yeniden değerlendirildi. Bu 8 olgunun KİSH değerlendirmesinin tümünde amplifikasyon saptandığını gördük. İki olgu dışında tümü kalın iğne ya da insizyonel biopsi niteliğindeydi. EZ-PZR değerlendirmesinde pozitiflik saptanamamasını, RNA izolasyonu için alınan doku örneğinin, yeterli tümör hücreleri içermeyen desmoplastik stromadan zengin bir doku olabileceği ve bu nedenle de m-RNA ekspresyonunun bulunmayacağı gerçeği ile açıklayabiliriz (Resim 4). ASCO/CAP 2013 kılavuzuna göre de HER2 durumunun EZ-PZR ile değerlendirmesi bu gibi nedenlerle önerilmemektedir <sup>(10)</sup>.

İHK 2+ alt grubunda ise EZ-PZR +'liği bulunan olgularda Her2/referans gen konsantrasyonu değerinin yalnızca bir olgu hariç 2'ye çok yakın bir değer olması, olguların yarısının KİSH ile amplifikasyon göstermemesi, amplifikasyon gösteren 3 olgunun 2'sinin düşük amplifikasyon göstermesi bu alt grup olgularda, KİSH yerine EZ-PZR ile değerlendirmenin uygunluğunu göstermesi açısından anlamlı olabileceği düşünöldü. Lehmann-Che ve ark. <sup>(29)</sup> tarafından



Resim 4. Desmoplastik stromadan zengin tümör dokusu (H&E x100).

İHK ve EZ-PZR'ın uygulandığı ve uyumsuz ya da kuşkulu sonuç elde edilen olgulara ek olarak farklı yöntemlerin uygulandığı çalışmada, HER2 durumu için bir nihai sonuç elde edilmiştir. Uyumsuz olgularda, EZ-PZR'nun nihai sonucu belirlemede İHK kadar güçlü olmadığı, ancak kuşkulu olguların değerlendirilmesinde EZ-PZR ile nihai sonuç arasında yüksek oranda bir uyum sağlanmışır ve böylece bu çalışma ile İHK +2 olgular için FİSH'e alternatif olabileceği kabul edilmiştir. Nihai sonuca göre yanlış negatif olguların bir kısmında, EZ-PZR değerini çalışmada kabul edilen EZ-PZR sınır değerine çok yakın olması da dikkat çekicidir. Çalışmamızda, İHK 2+ olgularda, KİSH ve EZ-PZR yanı sıra ek değerlendirmeler yapılmamış olmasına rağmen, EZ-PZR ile pozitif olanlarında değerinin 2'ye çok yakın olması, Lehmann-Che ve ark. <sup>(29)</sup> alışmalarına benzer bir özellik olduğu düşünölmüştür. Bu gibi EZ-PZR yönteminde sınırlılık olarak kabul edebileceğimiz durum, basitçe tümör hücrelerinin dilüsyonu ile açıklanabilir ya da gerçekten bu alt gruptaki olgular heterojendir, EZ-PZR gibi nesnel uygulamalar gereklidir. EZ-PZR hızlı, uygulanması kolay, kantitatif bir yöntemdir, gözlemciler arası değişkenlik yoktur. Ancak, nonneoplastik doku ya da in situ komponentin varlığı nedeniyle tümör genomik materyalinin dilüsyonu EZ-PZR da iyi bilenen bir kıstlılık durumudur, bu nedenle moleküler çalışmalar öncesi, örneğin mikroskobik kontrolü çok önemlidir.

Çalışmamızda İHK ve KİSH değerlendirmelerinin karşılaştırılmasında, İHK 0/1+ alt grup içinde iyi bir uyum (%90) gözlemlendi. Ancak, İHK 3+ alt grup içinde ise KİSH pozitifliği, daha çok yüksek amplifikasyon niteliğinde olduğu görüldü. Buna karşın İHK 2+ alt grup KİSH pozitifliği daha çok düşük amplifikasyon niteliğinde olduğu görüldü. İHK 3+ alt grup için İHK ile KİSH değerlendirmelerindeki uyumsuz olgular, aynı KİSH kitinin kullanıldığı farklı bir seans uygulaması ile yineleme olarak değerlendirildi. Buna rağmen, amplifikasyon saptanmadı. KİSH uygulamanın hassas, kitin içeriğindeki reaktif ve ortam sıcaklığından ya da ortam neminden etkilenebilen nispeten öznel bir yöntem olması ve elle uygulamamız ile açıklanabilir. KİSH pozitif ve EZ-PZR negatif olgular incelendiğinde yalnızca iki olgu yüksek amplifikasyon göstermekteydi ve diğer olgularda düşük amplifikasyon görüldü. İHK 2+ olguların EZ-PZR sonuçlarına bakıldığında negatif olan 12 olgunun yalnızca 2'sinde m-RNA ekspresyon düzeyi 1'e yakın iken, diğer tüm olgularda sınır değer olan 2'ye çok yakın olduğu gözlemlendi. EZ-PZR ile HER2 mRNA seviyelerinin, başarılı şekilde değerlendirildiği ve maliyet analizlerinin yapıldığı çalışmalar, EZ-PZR'nun spesifik, yüksek duyarlılıkta, güvenilir ve uygun maliyetli bir yöntem olduğunu göstermiştir <sup>(21,24,30-32)</sup>. Vinatzer ve ark. <sup>(24)</sup> yaptıkları çalışmada, HER2 durumunu, İHK ve EZ-PZR ile değerlendirmenin, İHK ve FİSH ile değerlendirmeden daha ekonomik olduğunu saptamışlardır. İHK ve EZ-PZR kullanımı, birbirini tamamlayan ve kontrol eden durum gibi düşünülebilir. EZ-PZR ile HER2 durumunun değerlendirilmesi, nesnel ve yinelenebilir sonuçların elde edilmesi yanı sıra maliyet analiz çalışmalarının desteklemesi durumunda gelecekte ilk sırada yer alabilecek bir yöntem olabilir. Ancak bu konuda çok merkezli, doğrulanmış EZ-PZR çalışmalarının gerekliliği unutulmamalıdır.

HER2 durumunu değerlendirmede ender fakat önemli bir konu kromozom 17 polizomimidir, çünkü HER2 durumunu değerlendirmeyi zorlaştırır. İHK 3+ ve KİSH ile amplifikasyon göstermeyen 6 olgunun, 2'si KİSH ile polizomi gösterdi ve EZ-PZR ile pozitif. Polizomi durumunu değerlendirmede dual KİSH

uygulaması bu sorunu ortadan kaldırabilir. Biz dual KİSH ile çalışmadık, ancak iki ayrı kişi tarafından KİSH değerlendirmesini yaptık ve düşük amplifikasyon gösteren olgularda farklı zamanlarda sayma işlemini yineledik.

Değerlendirmeyi zorlaştırdığı bilinen diğer durum da uygunsuz fiksasyondur. Bu durum yalnızca İHK 2+ olgularımızda KİSH pozitifliği ve EZ-PZR pozitifliği durumunda söz konusu olabilir. Çünkü İHK 0/1+ ve KİSH negatif, buna karşılık EZ-PZR pozitif olgumuz yoktu. Uyumsuz olgularda bir diğer olası neden, gerçek borderline HER2 durumu olabilir ve yalnızca hafif teknik duyarlılık değişiklikleri negatif ya da pozitif olarak sonuçlanabilir. Uyumsuz olguların bir kısmı, intratümör heterojenitesi ile açıklanabilir. Bu durum uygulanan değerlendirmelerin birbirine çok yakın tümör dokusunda yapıldığında bile söz konusudur.

Çalışmamızdaki İHK uygulama ve değerlendirmeleri için kısıtlılıklar, kişiler arası uyumsuzluk gibi genel öznel değerlendirmeye bağlı ortaya çıkan durum olarak söylenebilir. Bu durumu önlemek için farklı zamanlarda iki ayrı değerlendirme yapıldı ve uyumsuz olgularda bir üçüncü değerlendirme yapıldı. EZ-PZR uygulama ve değerlendirmeler, tüm EZ-PZR çalışma prensiplerine göre nükleik asitlerin optimal nitelikte (uygun miktar ve sürede formalin fiksasyonu, doku enzimleri, depolanma süresi ve sıcaklığı) olması gerekliliği sağlanarak yapıldı. KİSH uygulaması, laboratuvarın şartlarına uygun olarak manuel şekilde ve hibridizasyon fırını kullanmaksızın yapıldı. Ayrıca, dual KİSH kullanmamış olmamızın polizomi olgularını değerlendirmede bir eksiklik yarattığı düşünülebilir.

Çalışmamızın olası bir başka sınırlılığı ise tümör hücre komponentinin stromal, inflamatuvar ve normal epitelyal hücreler ile dilüe olması ve sonuçta tümöre ait HER2 m-RNA seviyelerinin düşük seviyede saptanmasıdır. Bu durum İHK 3+ ve EZ-PZR – olgular için geçerlidir ve yukarıda açıklanmıştır. İHK2+ alt grup diğer çalışmalarda olduğu gibi diğer alt gruplardan daha heterojen nitelik göstermekteydi. Bu nedenle özellikle İHK 2+ alt grup için dual KİSH,

FISH, SISH yanı sıra alternatif İHK değerlendirmeler de yapılması uygun olacaktır.

Meme kanserinde HER-2 durumunun değerlendirilmesinde, İHK, KİSH ve EZ-PZR gibi yöntemler birbirinin yerine geğen değil, birbirlerini tamamlayan ve henüz klinik sonuçlarla ilişkileri tam olarak ortaya konamamış tetkiklerdir. Bu konuda geniş kapsamlı ve çok merkezli doğrulanmış çalışmalara gereksinim vardır.

## KAYNAKLAR

- 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>
- Marty M, Cognetti F, Maraninchi D, Snyder R, Mauriac L, Tubiana-Hulin M, et al. Randomized phase II trial of the efficacy and safety of trastuzumab combined with docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2–positive metastatic breast cancer administered as first-line treatment: the M77001 study group. *J Clin Oncol* 2005; 23:4265-4274. <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2005.04.173>
- Joensuu H, Kellokumpu-Lehtinen P-L, Bono P, Alanko T, Kataja V, Asola J, et al. Adjuvant docetaxel or vinorelbine with or without trastuzumab for breast cancer. *N Engl J Med* 2006;354:809-820. PMID:16495393 <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa053028>
- Perez EA, Romond EH, Suman VJ, Jeong J, Davidson NE, Geyer CE, et al. Updated results of the combined analysis of NCCTG N9831 and NSABP B-31 adjuvant chemotherapy with/without trastuzumab in patients with HER2-positive breast cancer. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* 2007; 25(suppl 6):512.
- Slamon D, Eiermann W, Robert N. Phase III trial comparing AC-T with AC-TH and with TCH in the adjuvant treatment of HER2 positive early breast cancer patients: second interim efficacy analysis. Oral presentation at the 29th San Antonio Breast Cancer Symposium, San Antonio, 14-17 Dec 2006.
- Smith I, Procter M, Gelber RD, Smith I, Procter M, Gelber RD, et al. 2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: a randomised controlled trial. *Lancet* 2007;369:29-36. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60028-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60028-2)
- 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/JOP.0718501>
- Paik S, Bryant J, Tan-Chiu E, Romond E, Hiller W, Park K, et al. Real-world performance of HER2 testing-National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project experience. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:852-854. PMID:12048273 <http://dx.doi.org/10.1093/jnci/94.11.852>
- Perez EA, Suman VJ, Davidson NE, Martino S, Kaufman PA, Lingle WL, et al. HER2 testing by local, central, and reference laboratories in specimens from the North Central Cancer Treatment Group N9831 intergroup adjuvant trial. *J Clin Oncol* 2006;24:3032-3038. PMID:16809727 <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2005.03.4744>
- Wolff AC, Hammond MEH, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, et al. 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. *Arch Pathol Lab Med* <http://dx.doi.org/10.5858/arpa.2013-0953-SA>
- Laakso M, Tanner M, Isola J. Dual-colour chromogenic in situ hybridization for testing of HER-2 oncogene amplification in archival breast tumours. *J Pathol* 2006;210:3-9. PMID:16823892 <http://dx.doi.org/10.1002/path.2022>
- Papouchado BG, Myles J, Lloyd RV, Stoler M, Oliveira AM, Downs-Kelly E, et al. Silver in situ hybridization (SISH) for determination of HER2 gene status in breast carcinoma: comparison with FISH and assessment of interobserver reproducibility. *Am J Surg Pathol* 2010;34:767-776. PMID:20421783 <http://dx.doi.org/10.1097/PAS.0b013e3181d96231>
- Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, 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. *Arch Pathol Lab Med* 2007;131:18-43. PMID:19548375
- Paik S, Kim C, Wolmark N. HER2 status and benefit from adjuvant trastuzumab in breast cancer. *N Engl J Med* 2008; 358:1409-1411. PMID: 18367751. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMc0801440>
- 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>
- Birner P, Oberhuber G, Stani J, Reithofer C, Samonigg H, Hausmaninger H, et al. Evaluation of the United States Food and Drug Administration-approved scoring and test system of HER-2 protein expression in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2001;7:1669-1675. PMID:11410505
- Dendukuri N, Khetani K, McIsaac M, Brophy J. Testing for HER2-positive breast cancer: a systematic review and cost-effectiveness analysis. *CMAJ* 2007;176:1429-1434. PMID:17485695 <http://dx.doi.org/10.1503/cmaj.061011>
- Cronin M, Pho M, Dutta D, Stephens JC, Shak S, Kiefer MC, Esteban JM, Baker JB. Measurement of gene expression in archival paraffinembedded tissues: development and performance of a 92-gene reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay. *Am J Pathol* 2004;164:35-42. PMID:14695316 [http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63093-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63093-3)
- Ginestier C, Charafe-Jauffret E, Penault-Llorca F, Geneix J, Adelaide J, Chaffanet M, Mozziconacci MJ, Hassoun J, Viens P, Birnbaum D, Jacquemier J. Comparative multi-methodological measurement of ERBB2 status in breast



- cancer. *J Pathol* 2004;202:286-298.  
PMID:14991893  
<http://dx.doi.org/10.1002/path.1523>
20. Gjerdrum LM, Sorensen BS, Kjeldsen E, Sorensen FB, Nexø E, Hamilton-Dutoit S. Real-time quantitative PCR of microdissected paraffinembedded breast carcinoma: an alternative method for HER-2/neu analysis. *J Mol Diagn* 2004;6:42-51.  
PMID:14736826  
[http://dx.doi.org/10.1016/S1525-1578\(10\)60490-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1525-1578(10)60490-4)
  21. Bossard C, Bieche I, Le Doussal V, Lidereau R, Sabourin JC. Real-time RT-PCR: a complementary method to detect HER-2 status in breast carcinoma. *Anticancer Res* 2005;25:4679-4683.  
PMID:16334160
  22. Esteva FJ, Sahin AA, Cristofanilli M, Coombes K, Lee SJ, Baker J, et al. Prognostic role of a multigene reverse transcriptase-PCR assay in patients with node-negative breast cancer not receiving adjuvant systemic therapy. *Clin Cancer Res* 2005;11:3315-3319.  
PMID:15867229  
<http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-1707>
  23. Vanden Bempt I, Vanhentenrijk V, Drijkoningen M, Wlodarska I, Vandenberghe P, De Wolf-Peeters C. Real-time reverse transcription-PCR and fluorescence in-situ hybridization are complementary to understand the mechanisms involved in HER-2/neu overexpression in human breast carcinomas. *Histopathology* 2005;46:431-441.  
PMID:15810955  
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2559.2005.02112.x>
  24. Vinatzer U, Dampier B, Streubel B, Pacher M, Seewald MJ, Stratowa C, et al. Expression of HER2 and the coamplified genes GRB7 and MLN64 in human breast cancer: quantitative real-time reverse transcription-PCR as a diagnostic alternative to immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. *Clin Cancer Res* 2005;11:8348-8357.  
PMID:16322295  
<http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-0841>
  25. Bergqvist J, Ohd JF, Smeds J, Klaar S, Isola J, Nordgren H, et al. Quantitative real-time PCR analysis and microarray-based RNA expression of HER2 in relation to outcome. *Ann Oncol* 2007;18:845-850.  
PMID:17351254  
<http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdm059>
  26. Kostopoulou E, Vageli D, Kaisaridou D, Nakou M, Netsika M, Vladica N, et al. Comparative evaluation of noninformative HER-2 immunoreactions (2+) in breast carcinomas with FISH, CISH and QRT-PCR. *Breast* 2007;16:615-624.  
PMID:17606374  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.breast.2007.05.008>
  27. Barberis M, Pellegrini C, Cannone M, Arizzi C, Coggi G, Bosari S. Quantitative PCR and HER2 testing in breast cancer: a technical and cost-effectiveness analysis. *Am J Clin Pathol* 2008;129:563-570.  
PMID:18343783  
<http://dx.doi.org/10.1309/1AKQDQ057PQT9AKX>
  29. Lehmann-Che J, Amira-Bouhidel F, Turpin E, Antoine M, Soliman H, Legres L, et al. Immunohistochemical and molecular analyses of HER2 status in breast cancers are highly concordant and complementary approaches. *British Journal of Cancer* 2011;104:1739-1746.  
<http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2011.135>  
PMID:21540864
  30. Bièche I, Onody P, Laurendeau I, Olivi M, Vidaud D, Lidereau R, Vidaud M. Real-time reverse transcription PCR assay for future management of ERBB2-based clinical applications. *Clin Chem* 1999;45:1148-1156.  
PMID:10430778
  31. Mrhalova M, Kodet R, Kalinova M, Hilská I. Relative quantification of ERBB2 mRNA in invasive duct carcinoma of the breast: correlation with ERBB2 protein expression and ERBB2 gene copy number. *Pathol Res Pract* 2003;199:453-461.  
PMID:14521261  
<http://dx.doi.org/10.1078/0344-0338-00445>
  32. Potemski P, Pluciennik E, Bednarek AK, Kusińska R, Pasz-Walczak G, Jesionek-Kupnicka D, et al. A comparative assessment of HER2 status in operable breast cancer by real-time RT-PCR and by immunohistochemistry. *Med Sci Monit* 2006;12:MT57-MT61.  
PMID:17136015