

Meme Kanserinde Her2 Durumunu Belirlemedeki Sorunlar

Problems In Determining Her2 Status In Breast Carcinoma

Emel Ebru Pala, Ümit Bayol, Alp Özgüzer, Ülkü Küçük, Çağlar Yıldız Akdeniz, Özlem Sezer
İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Patoloji Kliniği, İzmir, Türkiye

ABSTRACT

Objective: Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) oncoprotein is overexpressed in 15-25% of breast carcinomas and associated with poor outcome. Assessment of HER2 status accurately is important to select patients who will benefit from targeted therapy.

Materials and Methods: In this study immunohistochemistry (IHC) and fluorescence in situ hybridization (FISH) were used to determine the HER2 status in 308 breast carcinoma cases of which 129 were consultation. The major problems in determining HER2 status and the reasons of discordant results between methods were discussed.

Results: HER2 expression was (-) in 124, (+) in 29, (++) in 92, (+++) in 63 cases. 25 of 76 cases consulted as (++) were evaluated as (++) and 15 of 35 cases consulted as (+++) were evaluated as (+++). HER2 amplification was found in 88 (28.6%) of 308 cases by FISH. 3 of 124 (-), 1 of 29 (+), 22 of 92 (++) , 62 of 63 (+++) cases were amplified by FISH. The relation between HER2 expression and amplification was statistically significant ($p < 0.001$). Centromere 17 (CEN 17) region amplification was noted in 11 cases of which 2 were (+++), 9 were (++) . 6 of the 11 cases showed focal low level, 1 of them showed diffuse high level amplification.

Conclusion: The concordance rate between IHC (++) cases and FISH was 95.4% for consultation cases, 100% for our cases. The final concordance rate for both case groups was 98.4%. The possible reasons of discrepancy were triple negativity, preanalytical and analytical procedures of consultation cases and trucut samples.

Keywords: Breast cancer, erbB genes, fluorescence in situ hybridization

ÖZ

Amaç: Human epidermal büyüme faktör reseptör 2 (HER2) proteini, invaziv meme kanserlerinin %15-25'inde overekspresye olan ve tümörün agresif davranışını belirleyen prognostik bir belirteçdir. Hedefe yönelik tedavilerden fayda görecekt hastaları saptamak için HER2 durumunu en doğru şekilde belirlememiz gerekmektedir.

Yöntem ve Gereçler: Dış merkezlerde tanı almış 129 konsültasyon olgusu ve birimimizde tanı almış 179 olgu olmak üzere toplam 308 meme karsinom olgusunda floresan in situ hibridizasyon (FISH) ve immunohistokimyasal (İHK) yöntem ile HER2 durumunu belirlemede öne çıkan problemleri ve uyumsuzluk nedenlerini irdeledik.

Bulgular: İHK'sal yöntemle HER2 ekspresyonu 124 olguda (-), 29 olguda (+), 92 olguda (++) , 63 olguda (+++) saptandı. Dış merkezde (++) saptanmış 76 olgunun 25'i (++) , (+++) saptanmış 35 olgunun 15'i (+++) olarak değerlendirildi. FISH yöntemi ile 308 olgunun 88'inde (%28.6) amplifikasyon izlendi. İHK (-) 124 olgunun 3'ünde amplifikasyon saptanırken, (+) 29 olgunun 1'inde amplifikasyon izlendi. 92 (++) olgunun 22'sinde ve 63 (+++) olgunun 62'sinde amplifikasyon görüldü. İHK'sal HER2 ekspresyon düzeyleri ile HER2 amplifikasyonu arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı idi ($p < 0.001$). Kromozom 17 sentromer bölge amplifikasyonu gösteren 11 olgunun 2'si (+++), 9'u (++) olup, 6'sında fokal heterojen, 1'inde difüz güçlü HER2 amplifikasyonu saptandı.

Sonuç: İmmunohistokimya (++) olgular ile FISH arasındaki uyum konsültasyon olgularında %95,4, kendi olgularımızda %100 idi. Tüm olgular ele alındığında bu uyumun %98,4 olduğu görüldü. Uyumsuz sonuçların büyük oranda İHK'sal olarak triple negatif olgular, konsültasyon olgularında preanalitik/analitik süreçler ve trucut biyopsilerden kaynaklandığı görüldü.

Anahtar sözcükler: Meme kanseri, erbB genleri, floresan in situ hibridizasyon

Giriş

Kromozom 17'nin (Kr17) uzun kolunda bulunan Human epidermal büyüme faktör reseptör 2 (HER2, cerbB2) geni, intrinsek tirozin kinaz aktivitesine sahip, transmembran yüzey reseptör proteinini kodlar (1). HER2 proteini, Epidermal büyüme faktör reseptörü (EGFR) ile yapısal benzerlik gösterir ve EGFR'ye benzer şekilde hücre proliferasyonunda görev alır (2). HER2 farklı kanser tiplerinin onkogeneğinde rol oynar. HER2 overekspresyonu (hücre membranında HER2 reseptörlerinde artış) %95 oranında gen amplifikasyonu (HER2 gen kopya sayısında artış) sonucunda gerçekleşmektedir ve meme kanserli olguların yaklaşık %15-25'inde saptanır (3, 4). İlk kez 1987 yılında Slamon ve ark.ları (5), HER2 amplifikasyonunun, lenf nodu metastazı olan meme kanserli olgularda genel sağkalım ve hastalıksız sağkalım sürelerini kısalttığı sonucuna ulaşmışlardır. HER2 durumu; kemoterapötikler, hormonal ajanlar, rekombinant human anti-HER2 antikoru olan trastuzumab

(Herceptin® Genentech, California, USA) ile ileri evre olgularda capecitabine ile kombine edildiğinde klinik gidişi olumlu yönde etkileyen dual HER1/HER2 tirozin kinaz inhibitörü lapatinib'e (Tykerb, GlaxoSmith-Kline, Philadelphia, USA) yanıt konusunda belirleyicidir (6). Trastuzumab, HER2 reseptörüne karşı üretilmiş human monoklonal antikordur. HER2 overekspresyon eden tümörlerde reseptörün ekstrasellüler parçasına bağlanarak, HER2 aracılı sinyalleri inhibe eder, antikör aracılı hücrel sitotoksisiteyi indükler ve hücre proliferasyonunu bloke eder.

HER2 durumunu belirlemede rutinde en sık Floresan in situ hibridizasyon (FİSH), gümüş in situ hibridizasyon (SİSH), kromojenik in situ hibridizasyon (CİSH) ve immünohistokimyasal (İHK) yöntemler kullanılmaktadır. SİSH ve CİSH yöntemlerinin en önemli avantajı ışık mikroskopunda değerlendirmeye olanak sağlamalarıdır. Hangi yöntemin altın standart olduğu konusu hala tartışmalı olmakla birlikte SİSH/CİSH yöntemleri ile FİSH arasında uyum oldukça yüksektir (7).

Bu çalışmada bir bölümü konsültasyon olan toplam 308 meme kanseri olgusunda İHK'sal yöntemle HER2 protein ekspresyonu ve FİSH yöntemi ile HER2/Kromozom17 gen bölgesi değişikliklerini; bu iki yöntem arasındaki uyumsuzluk nedenlerini araştırdık. Ayrıca konsültasyon olgularında dış merkez İHK sonuçları ile kendi birimimizdeki sonuçlar arasındaki uyumsuzluk nedenlerini ve İHK'sal olarak HER2 sonuçlarını etkileyen preanalitik, analitik ve postanalitik süreçleri irdeledik.

Yöntem ve Gereçler

Dış merkezlerde İHK'sal olarak HER2 protein ekspresyon düzeyleri saptanıp birimize konsülte edilen 76'si (++) 129 olgu ve 2008-2012 yılları arasında T.E.A.H'de tanı almış 57'si (++) 179 olgu olmak üzere toplam 308 olgu çalışmaya dahil edildi. 308 olgunun ilk değerlendirme sonuçlarına göre %43'ü (++) skora sahipti. Bu çalışma birimimizdeki HER2 overekspresyon/amplifikasyon görülme sıklığını yansıtmaktan ziyade İHK, FİSH uyumunu ve İHK/FİSH sonuçlarını etkileyen nedenleri irdelemektedir.

Olguların tümünden İHK ve FİSH için tümör dokusu içeren parafin bloklardan lizinli lamlara 2 adet 4 mikron kalınlıkta kesit alındı. Olguların tamamında poliklonal rabbit anti-human HER2 antikoru (Klon A0485, Dako®, Glostrup, Denmark, dilüsyon 1/300) kullanılarak Autostainer Link 48 (Dako®, Glostrup, Denmark) tam otomatik İHK boyama cihazında HER2 protein ekspresyonunun yüzde ve şiddeti saptandı. 308 olguya HER2 DNA ve Kr 17 sentromerik PNA prob mix (DAKO, Glostrup, Denmark) ile FİSH yöntemi uygulandı. 58°C'de bir saat etüvde bekletilen lamalar deparafinizasyon için ksilol-alkol serilerinden geçirildi. Su banyosunda 95°C'de, 15 dakika pretreatment solüsyonunda bekletilen lamalar yıkama solüsyonundan sonra 37 °C'de, 4 dakika pepsin ile muamele edildi. Yıkama ve dehidratasyon işlemlerinden sonra 10µl probmix damlatıldı ve 24x24 mm lamel ve coverslip sealent ile kapatıldı. Hybridizer cihazında (Dako, Glostrup, Denmark) 82°C'de 5 dk denaturasyon; 45°C'de 12 saat hibridizasyon işlemleri gerçekleştirildi. Su banyosunda 65°C'de, 10 dakika posthibridizasyon yıkama ve dehidratasyon sonrası 15 µl DAPİ damlatılıp, 30 dakika +4°C'de bekletildi. HER2 gen bölgesini kırmızı, Kr17 sentromerik gen bölgesini yeşil sinyaller temsil etmekte idi. Değerlendirme; Olympus BX51 floresan mikroskoba monte edilmiş Texas Red, FITC ve DAPİ filtreleri ile x100 immersiyon objektifi altında yapıldı. İHK, FİSH sonuçları değerlendirilirken 'American Society of Clinical Oncology and the College of American Pathologists' (ASCO/CAP)'in 2007 yılında yayınladıkları kriterler kullanıldı (Tablo 1-2) (8). HER2/Kr17 sentromer oranı ≥5 olanlar yüksek düzeyde amplifiye, 2<HER2/Kr17<5 düşük düzeyde amplifiye kabul edildi. Olguların İHK iç ve dış değerlendirme sonuçları ve FİSH

Tablo 1. ASCO/CAP immünohistokimyasal HER2 değerlendirme protokolü (2007)

Negatif (0/+)	Boyama yok veya zayıf kesintili membranöz boyanma
Kuşkulu (++)	Zayıf-orta komplet membranöz boyanma (>%10 tümör hücresi) veya %30'dan az güçlü komplet membranöz boyanma
Pozitif (+++)	%30'dan fazla tümör hücresinde uniform güçlü komplet membranöz boyanma

ASCO/CAP; American Society of Clinical Oncology and the College of American Pathologists
HER2; Human epidermal büyüme faktör reseptör 2 onkoproteini

Tablo 2. ASCO/CAP(2007); HER2 gen amplifikasyonu değerlendirme kriterleri

	Amplifikasyon (-)	Kuşkulu Amplifikasyon	Amplifikasyon (+)
HER2 gen kopya sayısı	<4	4-6	>6
HER2/KR17 oranı	<1,8	1,8-2,2	>2,2

ASCO/CAP; American Society of Clinical Oncology and the College of American Pathologists
HER2; Human epidermal büyüme faktör reseptör 2 onkoproteini
Kr17; Kromozom 17

sonuçları yanı sıra, histolojik alt tip, tümör derecesi, östrojen ve progesteron reseptör (ER/PR) durumları da dokümanite edildi. Ayrıca İHK ve FİSH sonuçları arasındaki uyumsuzluk nedenleri tartışıldı.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirmeler SPSS version 15.0 (SPSS Inc, Chicago, Illinois, USA) ile yapıldı. p<0.05 olanlar anlamlı kabul edildi.

Bulgular

Yaş ortalaması 53,7 (24-91), tümör çapı ortalama 2,84 cm (0,3-13cm) idi. Artan yaş ve HER2 amplifikasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptandı (p=0,02) (Tablo 3). Olguların 279'u (%90,7) invaziv duktal karsinom histolojisinde olup (Tablo 4), 125'i (%40,6) derece 2, 178'i (%57,8) derece 3 olarak değerlendirildi. Materyallerin %14,5'i trucut/insizyonel, %51,9'u eksizyonel, %33,6'sı mastektomi idi. Yeterli lizinli lama ulaşılamaması nedeniyle 8 olguda İHK'sal olarak ER ve PR çalışılmadı. Olguların 84'ü ER (-), 109'u PR (-) iken 216'sı ER (+), 191'i PR (+) idi. Azalan ER/PR ekspresyon şiddeti ile HER2 overekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edildi (p=0.00). Ayrıca PR yüzdesi azaldıkça HER2 amplifikasyonu görülme sıklığının arttığı görüldü (p=0.00). İHK'sal olarak HER2 ekspresyonu olguların 124'ünde (%40,3) (-), 29'unda (%9,4) (+), 92'sinde (%29,9) (++) , 63'ünde (%20,5) (+++) bulundu. Dış merkezde (++) saptanmış 76 olgunun 25'i (++) , (+++) saptanmış 35 olgunun 15'i birimimizde (++) olarak değerlendirildi. Konsültasyon olgularının dış merkez İHK sonuçları ile birimimizdeki değerlendirme sonuçları Tablo 5'de karşılaştırılmıştır. Dış merkezde (++) olarak değerlendirilen 35 olgunun sadece 17'sinde FİSH yöntemi ile amplifikasyon saptandı (Tablo 6). FİSH yöntemi ile İHK (-) 124 olgunun 1'i konsültasyon, 2'si kendi olgumuz olmak üzere 3'ünde fokal düşük düzeyde amplifikasyon (Resim 1), (+) 29 olgudan kendi olgumuz olan birinde (Resim 2) difüz amplifikasyon saptandı.

Tablo 3. Yaş ile Human epidermal büyüme faktör reseptör 2 amplifikasyon ilişkisi (p=0,02)

HER2 amplifikasyonu		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
yaş	yok	220	52,68	12,525	,844
	var	88	56,51	13,108	1,397

HER2; Human epidermal büyüme faktör reseptör 2

Tablo 4. Tümörlerin histolojik alt tiplerinin dağılımı

Histolojik alt tip	Olgu sayısı ve yüzdesi
İnvaziv Duktal Karsinom	279 (%90,7)
İnvaziv Lobüler Karsinom	7 (%2,4)
Mikst Karsinom	6 (%1,9)
İnvaziv Papiller Karsinom	5 (%1,6)
Mikropapiller Karsinom	5 (%1,6)
Metaplastik Karsinom	2 (%0,6)
Apokrin Karsinom	2 (%0,6)
Müsinöz Karsinom	2 (%0,6)

Tablo 5. Konsültasyon Human epidermal büyüme faktör reseptör 2 immunohistokimya sonuçları ile birimimizdeki sonuçların karşılaştırılması

Konsültasyon HER2 sonucu	Tepecik HER2 sonucu				Toplam
	-	+	++	+++	
-	5	1	0	0	6 (%4,6)
+	7	3	2	0	12 (%9,3)
++	36	8	25	7	76 (%59)
+++	10	2	8	15	35 (%27,1)
Toplam	58 (%45)	14 (%10,9)	35 (%27,1)	22 (%17)	129 (%100)

HER2; Human epidermal büyüme faktör reseptör 2 onkoproteini
İHK; İmmünohistokimya

Tablo 6. Konsültasyon HER2 İHK sonuçları ile birimimizdeki FISH sonuçlarının karşılaştırılması

Konsültasyon İHK sonucu	FISH ile HER2 amplifikasyonu		
	var	yok	Toplam
-	6	0	6 (%4,6)
+	11	1	12 (%9,3)
++	65	11	76 (%59)
+++	18	17	35 (%27,1)
Toplam	100 (%77,5)	29 (%22,5)	129 (%100)

FISH; Floresan in situ hibridizasyon
HER2; Human epidermal büyüme faktör reseptör 2 onkoproteini
İHK; İmmünohistokimya

92 (++) olgunun 22'sinde ve 63 (+++) olgunun 62'sinde amplifikasyon görüldü (Tablo 7). İHK (+++) olarak yorumlanan bir trucut biyopside FISH ile amplifikasyon saptanmadı (Resim 3). İHK' sal HER2 ekspres-

yon düzeyleri ile HER2 amplifikasyonu arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlıydı (p <0,001). Amplifikasyon 88 olgunun 67'sinde diffüz yüksek düzeyde, 21 inde fokal düşük düzeyde izlendi. FISH ile 11 olguda kromozom 17 sentromerik gen bölgesinde amplifikasyon görüldü (Resim 4). Bu 11 olgunun 9'u İHK'sal olarak (++) , 2'si (+++) idi. 11 olgunun birinde diffüz, 6'sında fokal HER2 amplifikasyonu dikkati çekti.

Tartışma ve Sonuçlar

American Society of Clinical Oncology and the College of American Pathologists (ASCO/CAP) rehberinde İHK'sal yöntemle HER2 değerlendirilmesi yapılamayan örneklerin özellikleri; tamponlanmış nötral formalin dışı fiksatif ile tespitlenen materyaller, 6 saatten az ya da 48 saatten fazla süre ile formalinde fikse olmuş eksizyonel biyopsi materyalleri, retraksiyon ve sıkışma artefaktı içeren kor iğne biyopsiler, normal duktus ve lobüllerde güçlü membran boyanması, kontrol vakalarda beklenmedik sonuçların alındığı dokular olarak tanımlanmıştır (8). HER2 gen ve protein ürünü arasındaki uyumsuzluk nedenleri ise kromozom 17 polizomisi, İHK'da kullanılan primer antikorun sensitivitesi ve spesifitesinin düşük olması, agresif antijen açığa çıkarma metodları ve doku tespit-takip aşamalarındaki sorunlar olarak belirtilmiştir (8).

İmmünohistokimya uygularken HER2 antijeninin diğer antijenlerden farklılıklarını iyi bilmek gerekir. HER2 termo-labil bir antijendir. Lizinli lama alınmış kesitler etüvde ($\geq 60^{\circ}\text{C}$) bir gece bekletildiğinde dokularda kuruma ve spesifik boyanma kaybı görülmektedir. HER2 İHK uygulanacak lamaların etüvde 37°C 'de bir gece veya 60°C 'de bir saat bekletilmesi önerilmektedir.

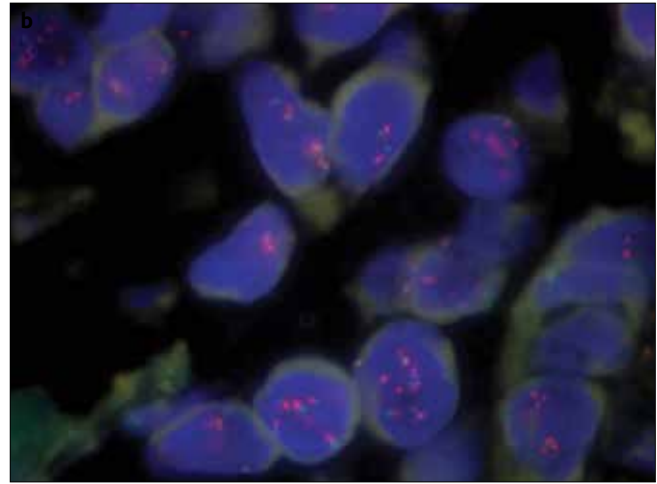
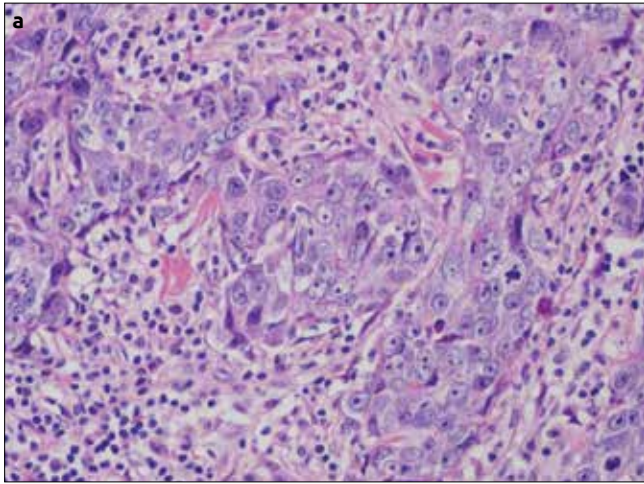
İmmünohistokimyal HER2 boyanmasını hücre membranında değerlendirdiğimiz için doku takip basamaklarının standardizasyonu ve hücre morfolojisinin korunması da çok önemlidir. Hücrelerde retraksiyon artefaktı geliştiğinde membranöz boyanmayı değerlendirmek çok güçleşir. Bu bağlamda preanalitik, analitik ve post-analitik süreçlerin standardizasyonu sağlanamamış merkezlerde HER2 skoru ile histopatolojik parametreler arasında uyumsuzluk varsa standardize bir merkezde İHK ve İSH sonucunun konfirmasyonu uygun olacaktır.

Her ne kadar uluslararası komiteler HER2'yi en doğru şekilde belirlemek için rehberler yayınlasa da, hem FISH hem de İHK'da gözlemciler ve laboratuvarlar arası değişkenler fazla olup, uyum düşüktür (9). Bizim çalışmamızda da dış merkez İHK sonuçları ile birimimizdeki İHK sonuçları karşılaştırıldı. Dış merkez İHK preparatlarına ulaşılabilen olgularda preparatlar gözden geçirildi. Konsültasyon olgularında patoloji raporundaki HER2 skoru baz alındı. Dış merkezde (++) saptanmış 76 olgunun 25'i (++) , 44'ü (-/+) olarak yorumlandı. (+++) saptanmış 35 olgunun 15'i (+++) , 12'si (-/+) olarak değerlendirildi. Dış merkezde (+++) olarak değerlendirilen 35 olgunun 18'inde amplifikasyon izlenmedi. Özellikle (++)/ (+++) skorlar ile FISH sonuçları arasındaki uyumsuzluk göz önüne alındığında, dış merkezlerde sitoplazmik ve inkomplet membranöz boyanmaların komplet membranöz boyanma olarak raporlandığı kanısına varıldı. İHK (++)/ (+++) skorlarda uyum düşük oysa dış merkezlerin (-/+) skorları ile birimimizdeki İHK ve FISH sonuçları arasındaki uyum yüksekti. Bu da temel sorunun kullanılan antikor ve

Tablo 7. Konsültasyon olguları ve kendi olgularımızda HER2 ekspresyonu ile amplifikasyon ilişkisi

	İmmunohistokimya		HER2 Amplifikasyonu		Total
			yok	var	
Tepecik	HER2 ekspresyon	(-)	64	2	66
		(+)	14	1	15
		(++)	42	15	57
		(+++)	0	41	41
Konsültasyon	HER2 ekspresyon	(-)	57	1	58
		(+)	14	0	14
		(++)	28	7	35
		(+++)	1	21	22
		Total	220	88	308

HER2; Human epidermal büyüme faktör reseptör 2 onkoproteini



Resim 1. a, b. a) Yüksek dereceli arada lenfositik infiltrat içeren solid tümör adaları (HE, 20x), b) Floresan in situ hibridizasyon (FISH) ile nonamplifiye hücreler arasında dağılmış amplifiye hücreler (100x)

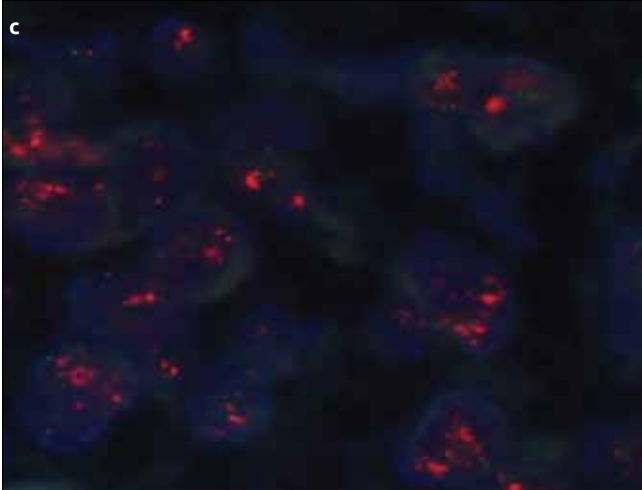
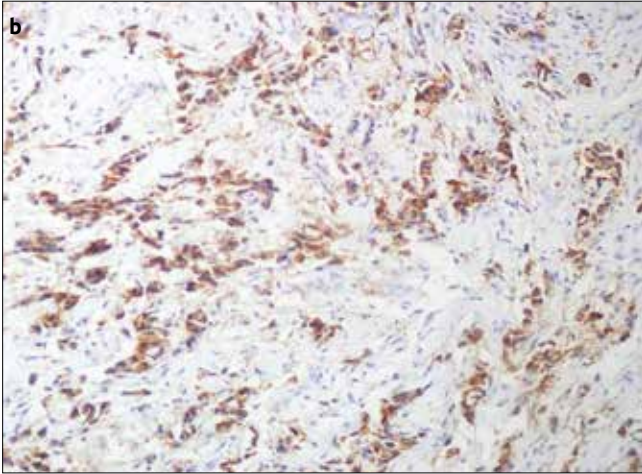
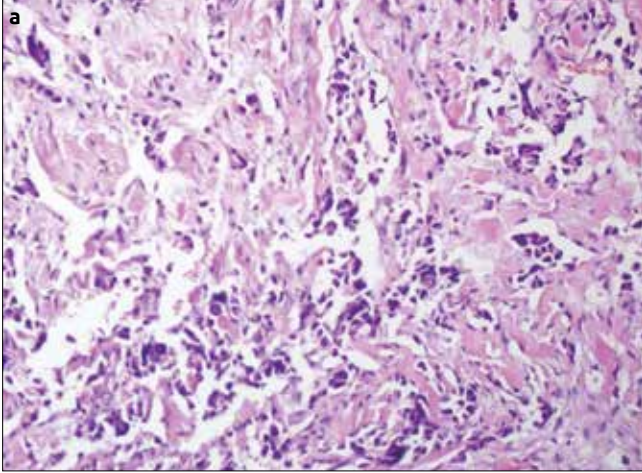
yöntemden ziyade standardize olmamış preanalitik ve post analitik süreçlere bağlı olabileceğini düşündürdü.

Literatürde İHK (++) olgularda amplifikasyon görülme sıklığı %6-25 aralığında bildirilmiştir (10, 11). ASCO/CAP ise bu oranı %23,9 olarak belirtmiştir (8). Bizim çalışmamızda İHK (++) 92 olgunun 22'sinde (%23,9) amplifikasyon izlenmiş olup, İHK ile FISH arasındaki uyum %98,4 bulunmuştur.

Birimimizde İHK (+) saptanan bir konsültasyon olgusunda FISH ile amplifikasyon saptandı. Bu olguya ait hematoksilin-eosin boyalı tümör kesitleri tekrar değerlendirildiğinde preanalitik süreçlerdeki aksaklıklar nedeniyle tümör morfolojisinin de optimal olmadığı dikkati çekti. Tespit sorunu olan örnekte HER2 İHK sonucu (+) olarak değerlendirildi. Bu olguda FISH yöntemi ile amplifikasyon saptandı. FISH preanalitik süreçlerden en az etkilenen ve dokuya en az hasar veren yöntemdir. HER2 durumunu belirlemede FISH altın standart kabul edilmektedir (12). FISH yönteminin dezavantajları ise uzun teknik prosedürleri, sinyallerin zamanla solması ve lamların uzun süreli arşivlenememesi, floresan mikroskop ve değerlendirme konusunda tecrübe gereksinimidir. Floresan mikroskop altında histomorfolojiyi değerlendirmek çok zordur. Bu nedenle ışık mikroskopunda değerlendirmeye olanak sağla-

yan SİSH ve CİSH yöntemleri geliştirilmiştir. Bu yöntemler ile morfolojiyi değerlendirmek ve lamları uzun süreli arşivlemek mümkündür.

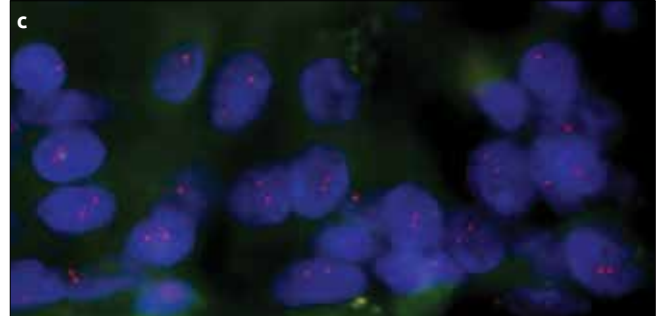
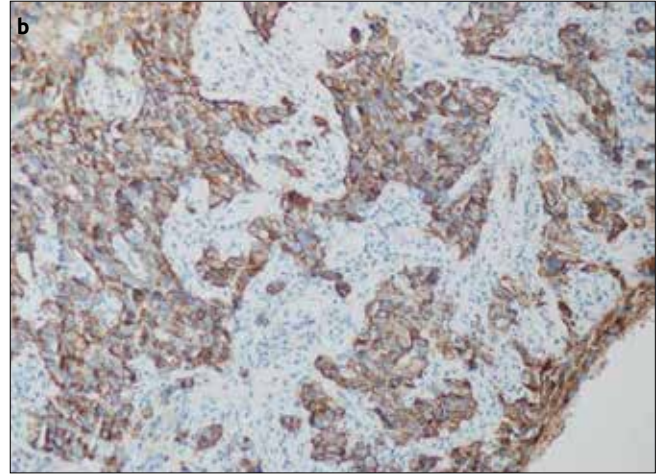
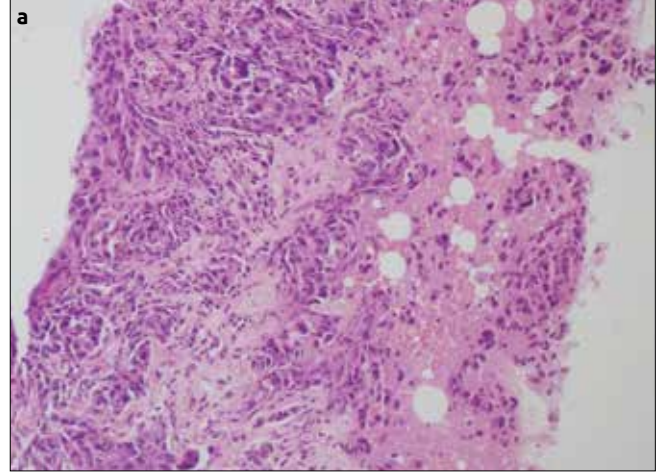
Adjuvan randomize trastuzumab çalışmalarının prospektif subgrup çalışmasında HER2 protein ekspresyon düzeylerinin yaklaşık %20 oranında yanlış değerlendirildiği ortaya konmuştur (13, 14). Bu çalışmada biz de İHK ve FISH sonuçları uyumsuz kendi olgularımızı tekrar gözden geçirdik. İHK (+++) olup, amplifikasyon izlemediğimiz bir olgunun trucut biyopsi olduğunu gördük. Günümüzde artık hem tanısal amaçlı hem de tedaviye yön vermesi için trucut meme biyopsileri sıkça kullanılmaktadır. Bu sayede neoadjuvan kemoterapi alacak olgularda hormon reseptör durumu ve HER2 ekspresyon düzeyleri belirlenebilmektedir. Literatürde trucut biyopsiler ile eksizyonel biyopsilerde HER2 İHK değerlendirme sonuçları arasında uyum %87-98,8 olarak bildirilmiştir (15, 16). Hatta Chivukula ve ark.'larının (17) görüşü, trucut biyopsilerin fiksasyon sorunu olmadığı için İHK ve İSH'da daha güvelli kullanılabilirliği yönündedir. Ancak trucut iğne biyopsiler, tümörün küçük bir alanını örneklediği için heterojenite gösteren olgularda yanlış (-) sonuçlara neden olabilmektedir. Olgularımıza ait trucut biyopsiler tekrar gözden geçirildiğinde son derece ince olup, yoğun sıkışma artefaktı içerdikleri görüldü. Bu nedenle nonspesifik sitoplazmik ve granüler boyanma, komplet membranöz pozitiflik olarak yorumlanmıştır. Trucut biyopsiler



Resim 2. a-c. a) Preanalitik sorunlar içeren tümör hücreleri (HE, 10x), b) İmmunohistokimyasal (İHK)olarak HER2 (+) (DAB, 10x), c) FİSH ile difüz amplifikasyon (100x)

her ne kadar daha az tespit sorunu içerse de sıkışma artefaktı mevcutsa İHK skorunu yorumlamak güçtür. Bu olgularda İHK'nın herhangi bir İSH yöntemi ile doğrulanması uygun olacaktır.

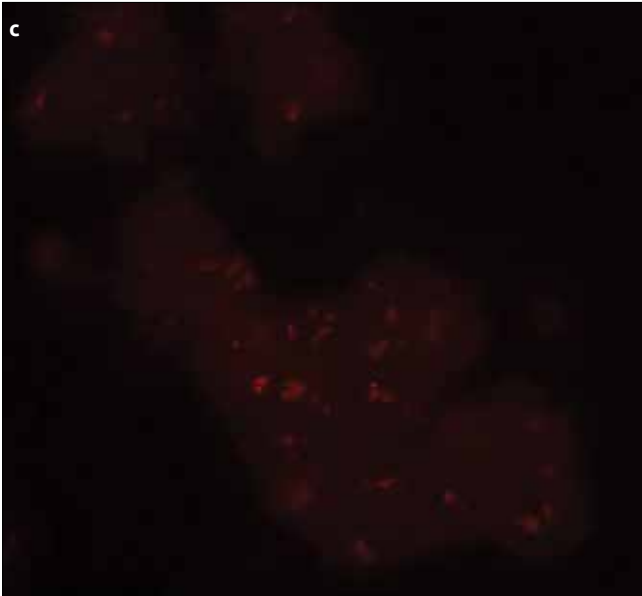
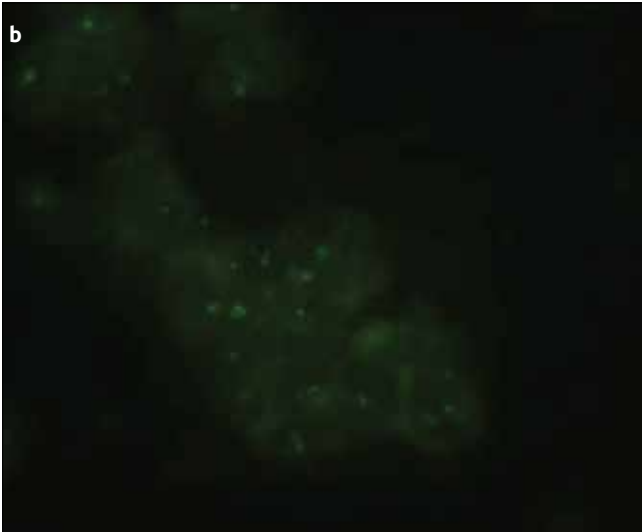
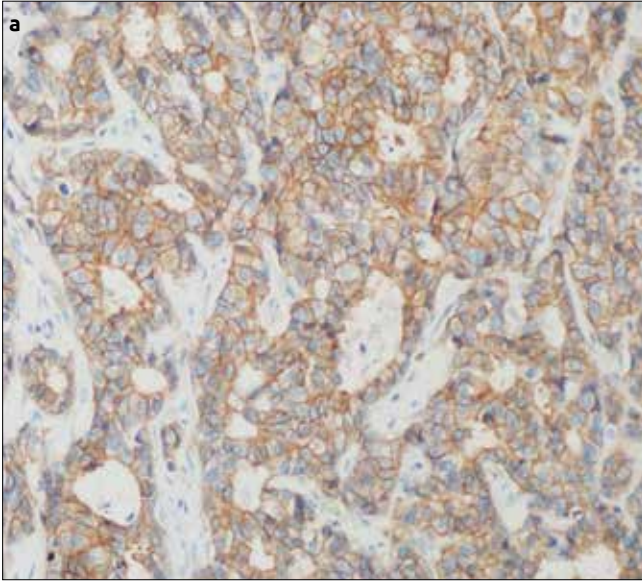
HER2 amplifikasyonunu değerlendirirken kromozomun sentromerik bölgesini de içeren miks problemler önerilmektedir. Çünkü her iki gen bölgesi de amplifiye olduğunda HER2/KR17 oranı amplifikasyon sınırının altında kalabilir. Bu durumun ise tedavi yanıtını nasıl etkilediği hala tar-



Resim 3. a-c. a) Sıkışma artefaktı içeren ince trucut biyopsi (HE, 10x), b) Artefaktlara bağlı İHK'sal olarak HER2 ekspresyonu (+++) olarak değerlendirilen tümör hücreleri (DAB, 20x), c) FİSH ile HER2 amplifikasyonu izlenmeyen tümör hücreleri (100x)

tışmalıdır. Hofmann ve ark.'larının (18) çalışmasında Kr17 sentromer bölgesinde amplifikasyon izlenen İHK (+++) 2 olgu da FİSH (-) saptanmış olup, bu olgularda Trastuzumab yanıtı pozitif olarak değerlendirilmiştir. Sonuçta Trastuzumab yanıtını belirlemede HER2 gen kopya sayısının, orandan daha önemli olabileceği görüşü ortaya konmuştur. ASCO/CAP kriterlerinin handikaplarından biri her iki gen bölgesinin amplifiye olduğu durumlardır. Sadece HER2 kopya sayısına baktığımızda amplifiye sayılabilecek olgular, oran göz önüne alındığında amplifikasyon sınırının altında kalmaktadır. Dolayısıyla ASCO/CAP kriterlerinin de modifikasyonu önerilmektedir.

Önceleri sentromerik gen bölgesinin amplifiye olması Kr17 polizomisi olarak yorumlanırken, günümüzde comparative genomic hibridizasyon



Resim 4. a-c. a) İHK'sal olarak HER2 (++) tümör (DAB, 20x), b) FISH ile Kromozom17 (Kr17) sentromer bölgesi (yeşil filtre) ve c) HER2 gen bölgesinde amplifikasyon (kırmızı filtre) (100x)

(CGH) yöntemi ile Kr17 üzerinde birçok gen bölgesi eş zamanlı irdelenmiş ve gerçek polizominin son derece nadir olduğu görülmüştür (19). Oysa ki HER2 (-) ve (+) olgularda perisentromerik gen bölgelerinde amplifikasyon sık görülmektedir. Perisentromerik rearanjmanların olduğu Kr17 aneusomisinde sentromerik bölgede izlenen aberan paternler (kümeler) HER2/Kr17 oranının yanlış değerlendirilmesine yol açmaktadır (20). Bu durumda HER2 ve sentromer bölgesinde izlenen sinyal sayılarının tek tek belirtilmesi uygun olacaktır. Biz de 11 olguda Kr 17 sentromer bölge amplifikasyonu izledik. Bu olguların 9'u (++) , 2'si (+++) olarak değerlendirildi. Bu olguların 6'sında fokal düşük düzeyde, 1'inde difüz yüksek düzeyde amplifikasyon izlendi. Bu olgularda amplifikasyon değerlendirilirken HER2/Kr17 oranı yanı sıra, bu gen bölgelerinin tek tek sinyal sayıları göz önüne alındı.

Bu çalışmada dikkatimizi çeken hususlardan biri de İHK'sal olarak triple (-) (ER, PR, cerbB2 (-)) saptadığımız 3 olguda FISH yöntemi ile fokal heterojen düşük düzeyde amplifikasyon saptanması oldu. Bütün vakalarda amplifikasyon küçük amplifiye klonlar (\leq 5% neoplastik hücrede amplifikasyon) şeklinde izlendi. Bernasconi ve ark. (21) 291 olguluk serilerinde 27 olguda küçük amplifiye klonlar izlemiştir. Bu 27 olgunun ikisi İHK negatif olup, biri İHK'sal olarak triple negatif saptanmıştır. Triple negatif olgularda fokal düşük düzeyde HER2 amplifikasyonunun varlığı ve anlamı daha geniş serilerde irdelenmelidir.

Son dönemde yapılan çalışmalar meme tümörlerinin de genetik heterojenite içerdiğini göstermektedir (21). Her geçen gün rutinde kullanımı artan tru-cut biyopsilerde genetik heterojenite ve sıkışma artefaktları nedeniyle İHK yetersiz kalabilmektedir. Bu olgularda bir İSH yönteminin İHK'ya eklenmesi HER2 durumunun doğru belirlenmesine katkıda bulunacaktır. Ayrıca her tür materyalde İSH yöntemini raporlarken amplifiye hücrelerin dağılımı ve sayısı, amplifikasyonun tipi (düşük-yüksek/ diffüz-fokal) , kromozom 17 sentromer bölge amplifikasyonunun eşlik edip etmediği belirtilmelidir. Preanalitik, analitik, postanalitik süreçlerin standardizasyonuna yönelik meslek içi eğitimler yoğunlaştırılmalıdır.

Ethics Committee Approval: Due to the retrospective design of the study, ethics committee approval was not taken.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - E.E.P, Ü.B.; Design - E.E.P; Supervision - Ü.B.; Data Collection and/or Processing - E.E.P, Ç.Y.A., Ö.S., Ü.K.; Analysis and/or Interpretation - E.E.P, A.Ö.; Literature Review - E.E.P; Writer - E.E.P; Critical Review - Ü.B.

Financial Disclosure: The authors declared that this study has received no financial support.

Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the authors.

Etik Komite Onayı: Yazımız retrospektif bir çalışma olduğu için etik kurul onayı alınmamıştır.

Hakem değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - E.E.P, Ü.B.; Tasarım - E.E.P; Denetleme - Ü.B.; Veri toplanması ve/veya işleme - E.E.P, Ç.Y.A., Ö.S., Ü.K.; Analiz ve/veya yorum - E.E.P, A.Ö.; Literatür taraması - E.E.P; Yazıyı yazan - E.E.P; Eleştirel İnceleme - Ü.B.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar bu çalışma için finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

Kaynaklar

1. Popescu NC, King CR, Kraus MH. Localization of the human erbB-2 gene on normal and rearranged chromosomes 17 to bands q12-21.32. *Genomics* 1989; 4:362-366. (PMID: 2565881) [\[CrossRef\]](#)
2. Bargmann CI, Hung MC, Weinberg RA: The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. *Nature* 1986; 319:226-230. (PMID: 3945311) [\[CrossRef\]](#)
3. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989; 244:707-712. (PMID: 2470152) [\[CrossRef\]](#)
4. Pauletti G, Godolphin W, Press MF, 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. (PMID: 8700555)
5. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987; 235:177-182. (PMID: 3798106) [\[CrossRef\]](#)
6. Geyer CE, Forster J, Lindquist D, Chan S, Romieu CG, Pienkowski T, Jagiello-Gruszfeld A, Crown J, Chan A, Kaufman B, Skarlos D, Campone M, Davidson N, Berger M, Oliva C, Rubin SD, Stein S, Cameron D. Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* 2006; 355:2733-2743. (PMID: 17192538) [\[CrossRef\]](#)
7. Dietel M, Ellis IO, Höfler H, Kreipe H, Moch H, Dankof A, Kölbl K, Kristiansen G. Comparison of automated silver enhanced in situ hybridization (SISH) and fluorescence ISH (FISH) for the validation of HER2 gene status in breast carcinoma according to the guidelines 11 of the American Society of Clinical Oncology and the College of American Pathologists. *Virchows Arch* 2007; 451:19-25. (PMID: 17562074) [\[CrossRef\]](#)
8. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, Dowsett M, Fitzgibbons PL, Hanna WM, Langer A, McShane LM, Paik S, Pegram MD, Perez EA, Press MF, Rhodes A, Sturgeon C, Taube SE, Tubbs R, Vance GH, van de Vijver M, Wheeler TM, Hayes DF. 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. (PMID: 17159189) [\[CrossRef\]](#)
9. Cell Markers and Cytogenetics Committees College Of American Pathologists. Clinical laboratory assays for HER-2/neu amplification and overexpression: quality assurance, standardization, and proficiency testing. *Arch Pathol Lab Med* 2002; 126:803-808. (PMID: 2088449)
10. Tsuda H, Akiyama F, Terasaki H, Hasegawa T, Kurosumi M, Shimadzu M, Yamamori S, Sakamoto G. Detection of HER-2/neu (c-erbB-2) DNA amplification in primary breast carcinoma: interobserver reproducibility and correlation with immunohistochemical HER-2 overexpression. *Cancer* 2001; 92:2965-2974. (PMID:11753973) [\[CrossRef\]](#)
11. Zhang H, Ren G, Wang X, Zhao J, Yao H, Bai Y, Bo W. HER-2 gene amplification by fluorescence in situ hybridization (FISH) compared with immunohistochemistry (IHC) in breast cancer: a study of 528 equivocal cases. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 134:743-749. (PMID: 22678158) [\[CrossRef\]](#)
12. Schiavon BN, Jasani B, de Brot L, Vassallo J, Damascena A, Cirullo-Neto J, Ivanildo Neves J, Augusto Soares F, Gobbi H, Malagoli Rocha R. Evaluation of reliability of FISH versus brightfield dual-probe in situ hybridization (BDISH) for frontline assessment of HER2 status in breast cancer samples in a community setting: influence of poor tissue preservation. *Am J Surg Pathol* 2012; 36:1489-1496. (PMID: 22982892) [\[CrossRef\]](#)
13. Paik S, Bryant J, Tan-Chiu E, Romond E, Hiller W, Park K, Brown A, Yothers G, Anderson S, Smith R, Wickerham DL, Wolmark N. Real-world performance of HER2 testing--National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project experience. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94:852-854. (PMID: 12048273) [\[CrossRef\]](#)
14. Roche PC, Suman VJ, Jenkins RB, Davidson NE, Martino S, Kaufman PA, Addo FK, Murphy B, Ingle JN, Perez EA. Concordance between local and central laboratory HER2 testing in the breast intergroup trial N9831. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94:855-7. (PMID: 12048274) [\[CrossRef\]](#)
15. Tsuda H, Kurosumi M, Umemura S, Yamamoto S, Kobayashi T, Osamura RY. HER2 testing on core needle biopsy specimens from primary breast cancers: interobserver reproducibility and concordance with surgically resected specimens. *BMC Cancer* 2010; 10:534. (PMID: 20925963) [\[CrossRef\]](#)
16. Usami S, Moriya T, Amari M, Suzuki A, Ishida T, Sasano H, Ohuchi N. Reliability of prognostic factors in breast carcinoma determined by core needle biopsy. *Jpn J Clin Oncol* 2007; 37:250-255. (PMID: 17485439) [\[CrossRef\]](#)
17. Chivukula M, Bhargava R, Brufsky A, Surti U, Dabbs DJ. Clinical importance of HER2 immunohistologic heterogeneous expression in core-needle biopsies vs resection specimens for equivocal (immunohistochemical score 2+) cases. *Mod Pathol* 2008; 21:363-368. (PMID: 18246053) [\[CrossRef\]](#)
18. Hofmann M, Stoss O, Gaiser T, Kneitz H, Heinmüller P, Gutjahr T, Kaufmann M, Henkel T, Rüschoff J. 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; 61:89-94. (PMID: 17412870) [\[CrossRef\]](#)
19. Yeh IT, Martin MA, Robertorye RS, Bolla AR, McCaskill C, Shah RK, Gorre ME, Mohammed MS, Gunn SR. Clinical validation of an array CGH test for HER2 status in breast cancer reveals that polysomy 17 is a rare event. *Mod Pathol* 2009; 22:1169-1175. (PMID: 19448591) [\[CrossRef\]](#)
20. Gunn S, Yeh IT, Lytvak I, Tirtorahardjo B, Dzidic N, Zadeh S, Kim J, McCaskill C, Lim L, Gorre M, Mohammed M. Clinical array-based karyotyping of breast cancer with equivocal HER2 status resolves gene copy number and reveals chromosome 17 complexity. *BMC Cancer* 2010; 10:396. (PMID: 20667129) [\[CrossRef\]](#)
21. Bernasconi B, Chiaravalli AM, Finzi G, Milani K, Tibiletti MG. Genetic heterogeneity in HER2 testing may influence therapy eligibility. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 133: 161-168. (PMID: 21901388) [\[CrossRef\]](#)