

# Meme kanseri olgularında HER2/neu tespitinde IHC ve FISH yöntemlerinin karşılaştırılması

Comparison of IHC and FISH methods for the detection of HER2/neu in patients with breast cancer

Sıdıka Fındık, Hatice Toy

Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, Konya

**Yazışma adresi:**

Sıdıka Fındık, Seydişehir Devlet Hastanesi B-Blok Patoloji Bölümü, Seydişehir, Konya, drpatolog78@hotmail.com, Tel: 0 332 5823011.

## Özet

**Amaç:** Bu çalışmanın amacı, meme kanserinde HER2/neu geninin saptanmasında immunohistokimya (IHC) ve Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) yöntemleriyle elde edilen sonuçları karşılaştırmaktır.

**Materyal ve metod:** Bu çalışmada aksilla metastazı 14'ünde negatif, 36'sında pozitif, toplam 50 adet invaziv meme karsinomlu hasta incelendi. Elli meme kanserli hastanın parafin bloklarından Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim dalında immunohistokimyasal çalışma yapıllı, aynı olgularda İstanbul Alman Hastanesi'nde FISH yöntemi çalışıldı. IHC ile elde edilen sonuçlar 3 gruba ayrıldı (0 ve 1+, 2+, 3+). FISH test yöntemiyle elde edilen sonuçlar ise negatif ve pozitif olmak üzere iki ana kategorije ayrıldı.

**Bulgular:** IHC ile +3 olarak tanımlanan hastaların yaklaşık %83, 3'ü HER2/neu gen amplifikasyonu sergilemiştir. Geride kalan hastalar IHC metodu ile pozitif sonuç vermiştir, ancak gen amplifikasyonu sergilememiştir. IHC 2+ olarak sınıflandırılan hastaların büyük bir çoğunluğu da FISH ile negatif bulunmuştur (%70, 6). IHC 2+ tümörlerin %29, 4'ünde gen amplifikasyonu tespit edilmiştir. Geride kalan hastalarda ise, kromozom 17 ile ilgili anoploldi ile birlikte HER2/neu geniyle ilgili herhangi bir amplifikasyon tespit edilmemiştir. IHC ile 0 ve +1 bulunan hastaların %20'si FISH metodu ile pozitif olarak tanımlanmıştır.

**Sonuç:** Meme kanserinde HER2/neu geninin değerlendirilmesinde IHC metodu çok iyi bilinen bir yöntemdir. Bununla beraber, 0 - 1+ ve 2+ olarak değerlendirilen bir grup hasta için ayrıca FISH yöntemiyle inceleme yapılmalıdır. HER2/neu geninin değerlendirilmesinde doğruluğu artırmak ve en yüksek kaliteye ulaşmak için 0, 1+ ve 2+ hastalara her iki yöntem de uygulanmalıdır.

**Anahtar kelimeler:** meme karsinoma, HER-2/neu geni, immünohistokimya, fluoresan in situ hibridizasyon, прогноз.

**Background:** The aim of this study is comparison of the results which are obtained by IHC and FISH methods for the detection of HER2/neu gene status in breast cancer.

**Methods:** In this study, 14 negatively and 36 positively axillary metastasis of a total 50 patients with invasive breast cancer were investigated. Paraffin blocks of 50 breast cancer patients were studied by IHC method in Meram School of Medicine of Selcuk University and by FISH method in Istanbul Alman Hospital. IHC results were divided into 3 groups (0, 1+, 2+, 3+). The other results which were obtained by FISH method were divided into two main categories as positive and negative.

**Results:** Approximately 83, 3% of patients described by IHC as +3 exhibited amplification of HER2/neu gene. Remaining of the other cases were found positive by IHC method, but exhibited no gene amplification. The majority of cases classed by IHC as 2+ were found also negative by FISH (70, 6%). Gene amplification was detected 29, 4% of IHC 2+ tumors. There was no amplification of HER2/neu gene associated with chromosome 17 was detected remaining of the other patients. Twenty percent of patients who were found 0 and +1 by IHC were described HER2/neu positive by FISH method.

**Conclusions:** IHC evaluation of HER2/neu gene in breast cancer is very well-known method. At the same time, a group of patients who were described as 0 and 1+ and 2+ should be examined by FISH method. Both methods should be performed for increasing the accuracy and achieving the highest quality for the detection of HER2/neu gene in 0, +1 and 2+ patients.

**Key words:** breast carcinoma, her2/neu gene, immunohistochemistry, fluorescence in situ hybridization, prognosis

## Giriş

Meme kanseri, kadınlarda en yaygın görülen kanserlerden biridir (1). Artan insidansı ve mortalite oranlarındaki artış yeni terapötik ilaçların ve özellikle h  
m  
te  
2  
arın geliştirilmesini gerekli h  
m  
te  
2  
ni hedef alan humanize fastuzumab bu tür yeni önemli ilaçlardandır. HER-2/neu dermal büyümeye faktörü

reseptörü ya da HER ailesine ait bir üye olan bir tirozin kinaz reseptör proteini kodlayan kromozom 17q üzerinde bulunan bir proto-onkogen'dır. HER-2/neu gen amplifikasyonu ya da protein aşırı ekspresyonu meme kanserlerinin %10-30'unda görülür (2). Çok sayıda çalışma HER-2/neu aşırı ekspresyonunun prognostik bir faktör olduğunu işaret etmektedir. HER-2/neu aşırı ekspresyonu tümörlerin, hastalığın tekrarlama ve metastaz riskini artırdığı ve hayatı kalma süresini kısalttığını göstermektedir (3, 4). HER-

2/neu ile ilgili prognostik değere ilaveten, trastuzumab'ın HER-2/neu için kuvvetli bir pozitiflik sergileyen ve metastaz yapan hastalığı olan olguların tedavi edilmesinde etkili olduğu gösterilmiştir(4, 5).

Trastuzumab tedavisinde başarılı olabilmenin en zor yanı hasta seçimidir (4, 6). HER-2/neu'nun değerlendirilmesi için en iyi deneylerde dahi uyuşmazlık yaşanabilmektedir. HER-2/neu protein ekspresyonunu değerlendirmekte kullanılan IHC yöntemi; maliyeti, biyolojik uygunluğu ve tüm patoloji laboratuvarlarında kullanıma hazır olması bakımından klinik açıdan oldukça çekici bir test yöntemidir (7, 8). Bununla beraber, spesmenin türü, fiksasyon süresi, fiksasyondan önce dokunun dilimlenmesi, fiksatif tipi, blokların saklanması, kesitlerin hazırlanışı, kullanılan antikorun duyarlılığı, teknik problemler ve yorum farklılıklar gibi IHC yöntemiyle ilgili bazı sorunlar bulunmaktadır. IHC yönteminde kullanılan puanlama sisteminin subjektif olmasından dolayı, patologlar laboratuvarlar arasında büyük farklılıkların olduğunu ve düşük konkordans bulduğunu bildirmiştir(9).

Bir başka popüler alternatif yöntem ise, HER-2/Neu gen amplifikasyonunu ölçen FISH yöntemidir. Bu son derece yüksek doğruluğa, mükemmel bir hassasiyete ve özgünlüğe sahip olan bir test yöntemidir ve yorumlanmasına yardımcı olmak amacıyla pozitiflik eşigi standartlaşmıştır. Sonuç itibarıyle, FISH yöntemi ile HER-2/neu tespiti daha objektiftir ve IHC yönteminin etkilendiği doku preperasyon faktörlerinden daha az etkilenmektedir (4, 10, 11). Trastuzumab'a bağlı tümör yanıtları için en önemli göstergenin HER-2/neu gen amplifikasyonu olduğu ileri sürülmektedir (12). Bununla beraber, FISH teknik olarak daha zor bir yöntemdir ve maliyeti yüksektir. Bu nedenle rutin olarak patoloji laboratuvarlarında kullanılmamaktadır (4, 6-8, 13, 14). Süregelen çalışmalar, HER-2/neu geninin değerlendirilmesini optimize etmek ve kolaylaştmak için bir algoritmanın kullanılmasını önermekte ve buna göre FISH yönteminin IHC yöntemi ile 2+ boyanmış olgulara uygulanması gerekişi vurgulanmaktadır (15, 16).

Özellikle prognoz ve tedavi yaklaşımı ile tam korelasyon gösteren en kolay uygulanabilir yöntem olan IHC, hastanın yetersiz tedavi acak veya gereksiz pahalıının uygulanmasını bu durumunun tespiti hem tedavi yöntemini belirlemeye

kritik öneme sahiptir. Yaptığımız bu çalışmada, HER2/neu durumunu saptamada laboratuvarımızda yaygın kullanılan IHC yöntemi ile altın standart olan FISH yönteminin tutarlılık tespiti amaçlanmaktadır. Ayrıca çalışmamızda, tümör büyülüğu, östrojen/progesteron reseptörleri (ER/PR) premenopozal ya da postmenopozal durum, tümör derecesi, aksiller lenf nodlarının durumu ve hastanın yaşı dahil meme tümörlerinin diğer klinikopatolojik özelliklerini IHC ve FISH yöntemleri ile karşılaştırıldı. Bahsettiğimiz histopatolojik özellikler ile прогноз arasında ilişki olup olmadığını da değerlendirdik. Takip süresi içerisinde nüks yada uzak organ metastazı olan olguları istatistiksel değerlendirme amacıyla kötü, diğerlerini iyi prognostik grup olarak tanımladık.

### **Materyal ve metod**

Bu çalışmada 2004-2006 yılları arasında 50 adet invaziv meme karsinomlu hastaya ait Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi, Patoloji Laboratuvarı arşivinden elde edilen parafin bloklar incelendi. Tümörlerin tamamı modifiye radikal mastektomi materyallerinden örneklandı. Olguların ortalama yaşı 57 civarında ve yaş aralıkları 26-82 arasında idi ve tamamındaki histolojik tip infiltratif duktal karsinoma idi. Hastalar aksilla metastazı açısından; negatif, 1-3 adet lenf nodülü metastazı (low grade) ve 4 ve üzeri lenf nodülü metastazı (high grade) olmak üzere 3 gruba ayrıldı. Preperatların tümünde HER-2/neu geni hem IHC hem de FISH yöntemleri yardımıyla test edildi. İlk olarak IHC yöntemi uygulandı. Ayrıca ER ve PR pozitifliği, tümör derecesi, aksiller lenf noduna metastaz, tümörün büyülüğu ve hastanın yaşı gibi diğer klinikopatolojik özellikler analize dahil edildi. ER ve PR değerleri, ER ve PR'ye karşı monoklonal antikorlar kullanılarak değerlendirildi. Dokunun %10 ya da daha fazlasındaki boyanma 1+ pozitif olarak tanımlandı. Negatifliği ise, tümör hücrelerinin %10'unundan daha azında boyanma veya herhangi bir boyanma olmaması olarak tanımlandı.

### **Preperatların hazırlanması**

Arşivden elde edilen parafin bloklardan 4 mikron kalınlığında kesitler alınıp Hematoksilen-Eozin (H&E) ile boyandı. H&E'li preperatların tümü modifiye Elston Ellis dereceleme sistemine göre Grade I-II-III olarak derecelendirildi.

### **IHC yöntemi**

HER2/neu'nun IHC ile değerlendirilmesinde DAKO poliklonal tavşan anti-human C-erbB-2 onkoprotein kullanıldı. Boyamanın şiddeti bir patolog tarafından değerlendirildi ve sonuçlar dört kategoriye ayrıldı.



1. Tümör hücrelerinde membran boyanması yok yada %10'undan daha az membran boyanması (0-negatif).
2. Tümör hücrelerin %10'undan fazlasında hafif-parsiyel membran boyanması (1+ negatif).
3. Tümör hücrelerin %10'undan fazlasında komplet hafif-orta şiddette membran boyanması (2+ zayıf pozitif, Şekil 1).
4. Tümör hücrelerin %10'undan fazlasının komplet kuvvetli membran boyanması (3+ zayıf pozitif, Şekil 2).

Hercep Testi HER2 protein aşırı ekspresyonu (0 ve 1+) için negatif, zayıf pozitif (2+ boyama şiddeti) ve kuvvetli pozitif (3+ boyama şiddeti) olarak yorumlandı.

### FISH yöntemi

Kimyasal maddelerin tümü QBiogene (Oncor, UK)'den satın alındı. Kesitler ksilene içinde parafinden arındırıldı (2x10 Dakika, RT), %99,98 etanol'da suyu giderildi (2x5 dakika, RT) ve havada kurutuldu. Doku kesitleri ön işlem çözeltisi ile muamele edildi (15–30 dakika, 45 Cş, su banyosunda). Numuneler standart salin sitrat (2xSSC) içinde çalkalandıktan sonra, proteinaz K (Oncor, UK) çalışma çözeltisine aktarıldı (25–45 dakika 45 Cş, su banyosu). Enzimatik parçalanmayı takiben lamlar 2xSSC ile çalkalandı ve etanol (%70, %80, %96, 1 dakika, RT) içinde suyundan arındırıldı. Dijesyon derecesi 20 ml propidium iyodür (Oncor, UK) ilave edilerek ölçüldü. Lamlar daha sonra fluoresan mikroskopu altında incelendi ve invaziv karsinoma dijesyonu olarak değerlendirildi. Uygun bir şekilde hazırlanan doku kesitleri daha sonra 2xSSC ile çalkalandı, çeşitli etanol (%70, %80, %96, 1 dakika, RT) derecesi serilerinde suyundan arındırıldı ve havada kurutuldu.

HER2/neu (rodamin-etiketli, kırmızı) ve kromozom 17 (FITC- etiketli, yeşil) problardan oluşan iki-renkli prob kokteyl uygulandı (Oncor, UK). Prob karışımının miktarı slaydın (10 ile 30 ml arası/slayt)büyüklüğüne bağlıdır. Numune ve prob DNA numuneleri sıcak-plaka üzerine yerlestirmekle denature edildi (80°C, 2 dakika). Hibridizasyon işlemi ıslak bir havnede plastik bir lamel altında gerçekleştirildi (bir gece boyunca, 37 Cş). Hibridizasyon sonrası yıkama, 1xPBD (Oncor, UK) (5 dakik RT) ile yapılan yıkamayı takiben, 2xSSC (5 dakik RT) ile aksa yönde boyandı.

Doku kesitleri FITCH, Teksas Red, DAPI yapıldı. Doku kesitleri FITCH, Teksas Red, DAPI ile aksa yönde boyandı.

sinyalleri için sensitif uygun fitreler kullanılarak Zeiss KS 400 3.0 adlı program ile değerlendirme yapıldı. Her silindir yukarıda belirtilen filtreler kullanılarak HER2, CEP17 ve DAPI açısından değerlendirildi. Tümörü temsil eden alanlarda toplam 40 adet hücreyi değerlendirmeye izin verecek şekilde 3-5 (ortalama 4) alandan her 3 filtre ile ayrı ayrı fotoğraf çekildi ve bu fotoğraflar her alan bir slayt olacak şekilde Microsoft Powerpoint Programı içerisinde kaydedildi. Değerlendirme bu fotoğraflar üzerinden yapıldı.

Her silindirde 40 adet hücrede önce HER2/neu sinyalleri (kırmızı sinyal) sayılı, daha sonra aynı hücrelerdeki CEP17 sinyalleri (yeşil sinyal) sayılı ve HER2/CEP17 oranları belirlendi. Oranın 2'nin üzerinde olduğu silindirlerde amplifikasyon olduğu kabul edildi. Açık gen amplifikasyonu var ise (HER2 sinyal/CEP17 sinyal >10) sayılan 40 hücrenin %50'sinden fazlasında nükleus başına 4-10 sinyal veya belirgin kümeler var ise amplifikasyon olarak değerlendirildi (Şekil 3-6). İkinci bir yöntem olarak da 40 adet hücrede HER2/neu kırmızı sinyalleri sayilarak sinyal sayısı tümör hücresi sayısına (40 hücre) bölünerek her bir doku için bir tümör hücresi başına düşen HER2 sinyali sayısı belirlendi ve bu oranın 4'ün üzerinde olduğu dokularda amplifikasyonun olduğu kabul edildi.

### Istatistiksel değerlendirme

Bu çalışmada istatistiksel değerlendirmeler SPSS 10.0 Windows Software Paketi kullanılarak yapıldı. Değişkenlerin değerlendirilmesinde Ki Kare (Chi Square) testi, T-testi, Kruskal Wallis ve Mann-Whitney U Testi kullanıldı.

### Bulgular

Elli invaziv meme kanseri olgusunun yaşları 26-82 (ortalama 57) arasında idi. Tanı konulduğunda hastaların 32'si (%64) postmenopozal, 18'i (%36) premenopozal durumda idi. Ameliyat materyallerinin tamamı Modifiye Radikal Mastektomi (MRM) materyallerinden oluşmaktadır. Çalışma grubumuzu oluşturan olgularda makroskopik tümör çapları en küçük 2 cm, en büyük 5 cm, ortalama 3,39 cm idi. Çalışmamızda 14 (%28) olguda aksilla metastazı negatif, 13 (%26) olguda low grade (1-3 adet lenf nodülü metastazı) ve 23 (%46) olguda high grade (4 ve üzeri lenf nodülü metastazı) mevcut idi.

Çalışmaya alınan hastalar en az 22 ay, en fazla 46 ay klinik olarak takip edildi. Ortalama takip süresi 34 aydır. Takip süresince 18 (%36) hastada uzak organ metastazı, 6 (%12) hastada nüks tespit edildi. Takip periyodu boyunca 3 (%6) hasta eks oldu (Tablo 1). Takip süresi içerisinde uzak organ metastazı ve/veya nüks bulunduran hastalar istatistiksel değerlendirme

amacıyla kötü, diğerleri iyi prognostik grup olarak tanımlandı.

Çalışma grubumuzda aksilla metastazı pozitif olan olguların kötü прогноз gösterdikleri bulundu. İstatistiksel anlamlılığı oluşturan ise high grade metastaz yapan grup idi ( $p<0,05$ ). Elli olgunun 27'sinde IHC yöntemi ile ER pozitif, 24'ünde PR pozitif bulundu. ER ve PR pozitifliği ile прогноз arasında anlamlı ilişki bulunamadı ( $p>0,05$ ). ER pozitifliği ile düşük tümör derecesi arasında anlamlı ilişki bulundu ( $p<0,05$ ). Ayrıca PR pozitifliği ile tümör çapının büyülüğu arasında negatif yönde ilişki saptandı ( $p<0,05$ ).

Çalışma grubumuzdaki olgularda minimum tümör çapı 2 cm, maksimum tümör çapı 5 cm, ortalama tümör çapı 3,39 cm'dir. Aksilla metastazına göre tümör çapı değerlendirildiğinde metastaz olmayan grup ile yüksek derece metastazı olan grup arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulundu ( $p<0,05$ ). Çap arttıkça aksillaya metastazın arttığı sonucuna varıldı. Tümör çapı ile прогноз arasında da anlamlı ilişki saptandı ( $p<0,05$ ). Tümör çapı arttıkça kötü прогноз oranının arttığı sonucuna varıldı.

Çalışma grubumuzdaki olguların 15'inde Cerb-B2 0 ve +1,17'sinde +2,18'inde +3 olarak değerlendirildi. Olguların 27'sinde (%54) FISH ile HER2/neu amplifikasyonu negatif, 23'ünde (%46) pozitif bulundu. Prognos, ER ve PR reseptörleri, menopozal durum, tümör derecesi, çapı ve aksiller tutulum gibi histopatolojik özellikler ile IHC ve FISH sonuçları arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı ( $p>0,05$ ). FISH ile immunohistokimyasal Cerb-B2 sonuçları karşılaştırıldığında anlamlı farklılık bulundu ( $p<0,05$ ). Immunohistokimyasal Cerb-B2 0 ve +1 olarak değerlendirilen 15 olgunun 12'sinde (%80) FISH negatif, 3'ünde (%20) FISH pozitif bulundu. Immunohistokimyasal Cerb-B2 +2 olarak değerlendirilen 17 olgunun 5'i (%29,4) FISH pozitif, 12'si (%70, 6) FISH negatif bulundu. Immunohistokimyasal Cerb-B2 +3 olarak değerlendirilen 18 olgunun 15'i (%83,3) FISH pozitif, 3'ü (%16,7) FISH negatif bulundu (Tablo 2). Ayrıca Cerb-B2 negatif (0 ve +1), FISH pozitif olarak değerlendirilen 3 olgunun 1'inde kötü прогноз olarak tanımladığımız uzak organ metastazı tespit edildi.



Değerlendirilmesinde, yüksek kararlanabilirliğinden dolayı, FISH yöntemin en iyi test teknolojisi olarak kabul edilmektedir (10, 11, 17, 18).

Trastuzumab-monoklonal anti-HER2 antikor-HER2 reseptörün aşırı ekspresi edildiği meme kanserlerin tedavisinde kullanılmıştır (19). HER2 protein aşırı ekspresyonu ve/veya HER2/neu gen amplifikasyonu olan hastalar trastuzumab tedavisinden fayda görmüşür ve bu durum çok sayıda yayında da tanımlanmıştır (20-22).

Yapılan çok sayıda çalışma doğrultusunda artık lenf nodu metastazı olan hastalarda HER2/neu'nun bağımsız bir prognostik faktör olduğu kabul edilmektedir (23, 24). Bizim çalışmamızda, HER2/neu amplifikasyon ve aşırı ekspresyonun aksilla pozitif olgularda прогноз üzerine anlamlı etkisi bulunmadı. Ancak aksilla metastazı ile прогноз arasında anlamlı ilişki tespit edildi. Özellikle de bu ilişkinin high grade olarak sınıflandırılan 4 ve üzeri lenf nodu metastazı olan hastalarda daha da kuvvetli olduğu görüldü. Prognos üzerine etkili olabilecek hasta yaşı, menopozal durum, hormon reseptörü ve tümör derecesi gibi diğer klinikopatolojik parametreler de прогноз ile ilişkili bulunmadı. Bu durum çalışmamızdaki hasta sayısının az olmasına bağlı olarak ortaya çıkan olabilir.

Yapılan çalışmalarda tümör çapı ile nodal metastaz insidansı ve прогноз arasında ilişkinin olduğu gösterilmiştir (25). Bizim çalışmamızda da tümör çapı ile прогноз arasında ilişki saptanmış olup, tümör çapı arttıkça kötü прогноз gösteren olgu sayısının arttığı tespit edilmiştir. Yine tümör çapı ile aksilla metastazı durumu arasında da ilişki saptanmış olup, tümör çapı arttıkça yüksek derece metastaz yapan olgu sayısında artış olduğu saptanmıştır.

Yapılan bir çalışmada, hem östrojen hem progesteron reseptör pozitifliği ile tümör çapı arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır (26). Yaptığımız çalışmada ise, hormon reseptörleri ile tümör çapını karşılaştırdığımızda tümör çapı ve progesteron reseptör durumu arasında negatif yönde ilişki saptanırken östrojen reseptör durumu ile ilişki saptanmadı.

Çalışma grubumuzda hormon reseptörleri ve прогноз arasında ilişki saptanmadı. Fakat hormon reseptörlerinden ER, tümör derecesi ile ilişkili bulundu. ER reseptörü pozitif olgular düşük tümör derecesi ile ilişkili bulundu.

Yapılan bir çalışmada, östrojen ve progesteron pozitif tümör grubunda HER2 amplifikasyonu %9, 6 oranında tespit edilirken, negatif tümörlerde bu oran %31, 2 olarak bulunmuştur (27). Çalışmamızda ise, HER2/neu ekspresyonu ve amplifikasyonu ile hormon reseptörleri arasında ilişki bulunmadı.

Yapılan bir çalışmada, HER2/neu pozitif olguların negatif olgulardan (ortalama 57, 6) daha genç (ortalama 53, 9) olduğu bunun da istatistiksel anlam

taşımıladığı bulunmuştur. Bazı çalışmalarda tümör çapı ile FISH pozitifliği arasında bir ilişki bulunmamış (28-30). Çalışmamızda FISH pozitifliğinin hasta yaşı, tümör derecesi ve menopoz durumundan etkilenmediği tespit edildi. Ayrıca tümör çapı ile FISH pozitifliği arasında ilişki bulunmadı. Bu nedenle çalıştığımız histopatolojik özelliklerin FISH yöntemi uygulamasında herhangi bir yol göstericiliğinin bulunmadığı sonucuna varıldı.

Çalışmamızda IHC ile 0 ve +1 olarak değerlendirilen olguların %20'sinde (3/15) FISH ile amplifikasyon gözlenirken, +2 olarak değerlendirilen olguların %29'unda (5/17), +3 olarak değerlendirilen olguların %83, 3'ünde (15/18) FISH ile amplifikasyon tespit edildi. Literatürlerden elde edilen sonuçlarla paralel olarak bizim bulgularımız da +2 olgularda FISH ile gen amplifikasyonunun değerlendirilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır. Ancak literatürde pek çok çalışmada IHC ile 0 ve +1 olguların FISH yöntemi ile doğrulanmasına gerek olmadığı belirtilirken, bizim çalışmamızda bu grupta 3 vaka FISH ile amplifikasyon göstermiştir. Bu nedenle 0 ve +1 olgularda da FISH yöntemi çalışılması gerektiği sonucuna varıldı.

Yapılan bir çalışmada immünhistokimyasal olarak 0, +1, +2 ve +3 olarak skorlanan olgularda FISH pozitiflik oranları sırası ile %3, 5, %6, 4, %25, 7, %81, 5 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre trastuzumab tedavisi göz önünde bulundurulduğunda, 0 ve +1 olgularda da FISH yöntemi çalışılabilcegi sonucuna varılmıştır. +3 olgularda tespit ettikleri amplifikasyon oranının %81, 5 olması, bu grup olgularda FISH yönteminin daha fazla bilgi sağlamadığını göstermiştir (30).

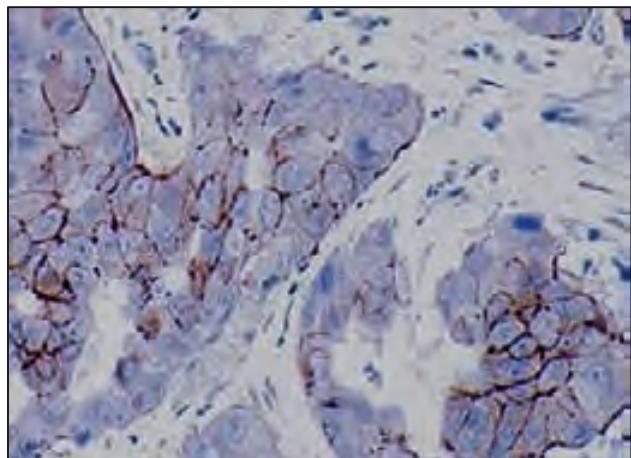
Yapılan başka bir çalışma, immünhistokimyasal olarak 0 ve +1 olarak değerlendirilen ve FISH ile amplifikasyon tespit edilen 11 olgunun 10'u klinik olarak takip edildiğinde +1 olarak tespit edilen 10 olgunun 3'ünde metastaz geliştiği tespit edilmiş (30). Bu nedenle FISH yönteminin daha üstün prognostik faktör olduğu sonucuna varıldı. Bizim olgularımızdan immünhistokimyasal olarak 0 ve +1 grubunda olup FISH ile amplifikasyon tespit edilen 3 vakanın 1'inde metastaz gelişti. Bu sonuç da FISH'in daha iyi bir prognostik göstergesi olduğunu ve bu grup olgularda da FISH yöntemi çalışılması gerektiği söylenmektedir. Başka bir çalışmada da 0 ve +1 olguların %12 oranında FISH ile amplifikasyon tespit edilmiştir. Bu olguların 10'undan fayda görebileceği 3'ü çalışmada HER2 /neu

durumunu belirlemede FISH yönteminin IHC yönteminden çok daha güvenilir metot olduğu ve daha doğru immünhistokimyasal sonuçlar için daha ileri kalite kontrol ölçümlere ihtiyaç duyulduğu sonucuna varılmıştır (32, 33).

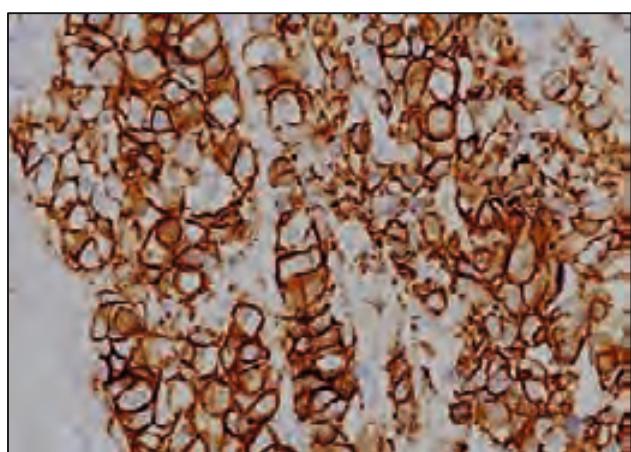
Literatürde FISH ile IHC arasındaki uyumsuzluğun en önemli nedenini +2 olgular meydana getirmektedir. Bizim çalışmamızda, IHC ile +2 bulunan olguların %29'unda amplifikasyon tespit edilmiştir. +2 olgularda IHC ile FISH arasındaki uyum literatürde %20-30 oranında bildirilmiştir. Bizim +2 olgularda bulduğumuz bu oran literatürle uyumlu olup bu gruptaki olguların ilaveten FISH yöntemi ile teyit edilmesi gereği sonucuna varıldı. +3 olguların %83, 3'ünde amplifikasyon pozitiftir. %16, 7 olguda amplifikasyon saptanmadı. Literatürlerde +3 olgularda FISH ile amplifikasyon %79-100 oranında bildirilmektedir. Bu muhtemelen membran boyamıyla ilgili subjektif değerlendirme bir sonucu olabilir. Bir başka olasılık da söz konusu proteinin mRNA'sının stabilitesi yada reseptör parçalanması ile ilgili bozukluklardan kaynaklanan aşırı ekspresyondur. Bizim çalışmamızdaki +3 olgularda IHC ve FISH yöntemleri arasındaki uyumluluk literatürle örtüşmektedir. Buna göre +3 olguların FISH yöntemi ile teyit edilmesine gerek yoktur.

Sonuç olarak, IHC yöntemi ile 0 ve +1 ile +2 olgularda FISH yöntemi çalışılması gereği, +3 olgularda ise buna gereksinim olmadığı sonucuna varılmıştır. Yaygın olarak kullanılan IHC yönteminin FISH metodu ile kontrol edilmesi ve her laboratuvarın kendi güvenilirlik oranlarını belirlemesi bir gereklilikdir.

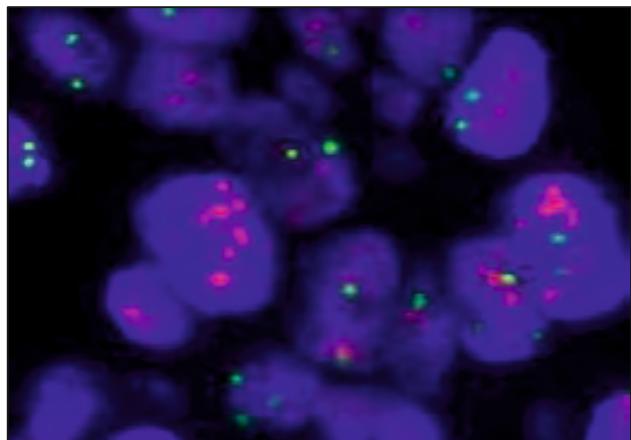




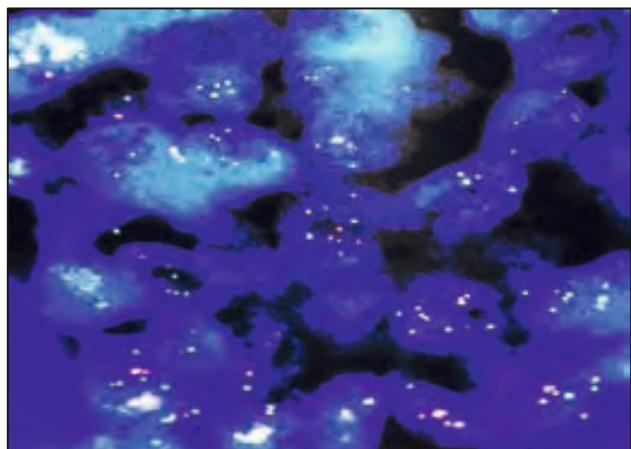
**Resim 1.** HER2 2+ IHK'sal boyama.  
Hafif-orta şiddette membran boyama (x40 BBA)



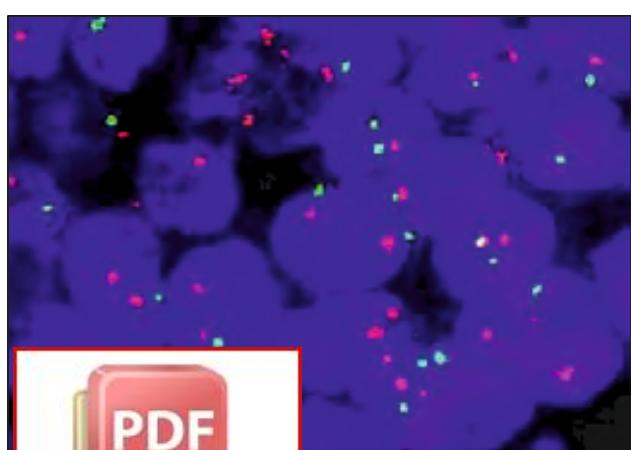
**Resim 2.** HER2 3+ IHK'sal boyama.  
Kuvvetli pozitif membran boyama (x40 BBA)



**Resim 4.** HER2/neu genin amplifikasyonu (rodamin- işaretelli, kırmızı).  
Kromozom 17'nin orta kısımları FITC ile (yeşil) işaretlenmiştir.



**Resim 5.** HER2/neu genin düşük amplifikasyonu  
(rodamin- işaretelli, kırmızı).  
Kromozom 17'nin orta kısımları FITC ile (yeşil) işaretlenmiştir.



**Resim 6.** HER2/neu genin yüksek amplifikasyonu  
(rodamin- işaretelli, kırmızı).  
Kromozom 17'nin orta kısımları FITC ile (yeşil) işaretlenmiştir.

**Tablo 1.** Çalışma grubumuzdaki olgular

No	Yaş	Menopoz durumu	Çap (cm)	Derece	Aksilla metastazı	ER	PR	Cerb-B2	FISH
1	70	Post	3, 5	III	Negatif	-	-	++	-
2	39	Pre	2, 5	II	Negatif	+	+	+++	+
3	56	Post	3, 5	II	High Grade	+	-	++	-
4	50	Pre	3	III	High Grade	-	-	++	-
5	43	Pre	3	II	Negatif	-	+	+++	+
6	77	Post	4	III	Low Grade	+	-	++	-
7	70	Post	4	III	Low Grade	-	-	++	-
8	72	Post	3, 5	II	High Grade	-	-	+++	+
9	61	Post	3, 5	II	High Grade	+	+	+++	+
10	42	Pre	4, 5	II	High Grade	-	-	+++	+
11	73	Post	4, 2	II	Negatif	+	-	++	-
12	75	Post	4, 5	II	High Grade	+	-	++	+
13	46	Pre	2	III	Negatif	-	-	0-1+	+
14	43	Pre	2, 5	II	Negatif	+	-	+++	+
15	78	Post	4	II	Negatif	+	+	++	-
16	63	Post	3, 5	II	Low Grade	+	-	0-1+	-
17	42	Pre	3	III	High Grade	-	+	+++	-
18	61	Post	3	II	High Grade	+	-	++	-
19	57	Post	3	II	High Grade	+	+	0-1+	-
20	37	Pre	3, 5	II	Low Grade	+	+	+++	+
21	66	Post	4, 3	II	Low Grade	-	-	+++	+
22	42	Pre	2, 8	II	Negatif	+	-	0-1+	-
23	82	Post	3	III	High Grade	-	-	+++	+
24	58	Post	2, 5	II	High Grade	+	+	+++	-
25	64	Post	4, 8	II	Negatif	-	-	++	+
26	56	Post	4, 5	III	High Grade	-	-	++	+
27	60	Post	2, 5	II	Low Grade	+	+	0-1+	-
28	65	Post	3	II	Negatif	+	+	0-1+	+
29	58	Post	2	II	Low Grade	+	+	++	+
30	26	Pre	3	II	Negatif	+	+	++	-
31	35	Pre	4	III	High Grade	-	+	+++	+
32	70	Post	4, 1	II	High Grade	-	-	0-1+	-
33	71	Post	4, 5	II	High Grade	+	-	+++	+
34	48	Pre	4, 5	II	High Grade	+	+	0-1+	-
35	61	Post	2, 5	III	Negatif	+	+	0-1+	-
36	67	Post	5	II	High Grade	+	+	++	+
37	39	Post	3, 5	II	High Grade	+	+	0-1+	-
38	37	Pre	2	II	Low Grade	-	+	0-1+	-
39	53	Post	4	III	High Grade	-	-	0-1+	+
40	67	Post	2	II	Low Grade	+	+	+++	-
41	60	Post	3, 5	II	High Grade	-	-	0-1+	-
42	49	Post	2, 5	II	Low Grade	-	+	0-1+	-
43	42	Pre	3, 5	III	High Grade	-	-	0-1+	-
44	51	Post	3, 7	III	Low Grade	+	+	+++	+
45	43	Pre	2	II	Negatif	-	+	++	-
46	64	Post	4, 5	II	High Grade	+	+	+++	+
47	60	Post	4	III	Low Grade	-	-	++	-
48	38	Pre	3, 5	III	High Grade	-	-	++	-
49	39	Pre	2, 5	II	Negatif	+	+	+++	+
50	65	Pre	3, 5	II	Low Grade	-	-	+++	+

ER: Östrojen reseptörü

PR: Progesteron reseptörü

FISH: Floresan In Situ Hibridizasyon

C VE FISH dağılım tablosu

	CerbB2 0, +1	CerbB2 +2	CerbB2 +3
3	5	15	
12	12	3	
15	17	18	



## Meme kanserinde İHC ve FISH

Yazarlarla ilgili bildirilmesi gereken konular (Conflict of interest statement) : Yok (None)

### Kaynaklar

- 1) American Cancer Society. Breast Cancer Facts and Figures 2003–2004. Available at [http://www.cancer.org/docroot/STT/content/STT\\_1x\\_Breast\\_Cancer\\_Facts\\_Figures\\_2003-2004.asp](http://www.cancer.org/docroot/STT/content/STT_1x_Breast_Cancer_Facts_Figures_2003-2004.asp).
- 2) Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, et al. Science. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. 1989; 244(4905): 707-712.
- 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): 177-182.
- 4) Ross JS, Fletcher JA, Bloom KJ, et al. Targeted therapy in breast cancer: the HER-2/neu gene and protein. Mol Cell Proteomics. 2004; 3(4): 379-398.
- 5) Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. N Engl J Med. 2001; 344(11): 783-792.
- 6) Bilous M, Ades C, Armes J, et al. Predicting the HER2 status of breast cancer from basic histopathology data: an analysis of 1500 breast cancers as part of the HER2000 International Study. Breast. 2003; 12(2): 92-98.
- 7) Thomson TA, Hayes MM, Spinelli JJ, et al. HER-2/neu in breast cancer: interobserver variability and performance of immunohistochemistry with 4 antibodies compared with fluorescent in situ hybridization. Mod Pathol. 2001; 14(11): 1079-1086.
- 8) van de Vijver MJ. Assessment of the need and appropriate method for testing for the human epidermal growth factor receptor-2 (HER2). Eur J Cancer. 2001; 37 Suppl 1: 11-17.
- 9) Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H, Barnes MJ, Schnitt SJ. HER-2/neu protein expression in breast cancer evaluated by immunohistochemistry. A study of interlaboratory agreement. Am J Clin Pathol. 2000; 113(2): 251-258.
- 10) Kaptain S, Tan LK, Chen B. Her-2/neu and breast cancer. Diagn Mol Pathol. 2001; 10(3): 139-152.
- 11) Bartlett JM, Going JJ, Mallon EA, et al. Evaluating HER2 amplification and overexpression in breast cancer. J Pathol. 2001; 195(4): 422-428.
- 12) Vogel CL, Franco SX. Clinical experience with trastuzumab (herceptin). Breast J. 2003; 9(6): 452-462.
- 13) van de Vijver M. Emerging technologies for HER2 testing. Oncology. 2002; 63 Suppl 1: 33-38.
- 14) Pegram MD, Pauletti G, Slamon DJ. HER-2/neu as a predictive marker of response to breast cancer therapy. Breast Cancer Res Treat. 1998; 52(1-3): 65-77.
- 15) Yaziji H, Goldstein LC, Barry TS, et al. HER-2 testing in breast cancer using parallel tissue-based methods. JAMA. 2004; 291(16): 1972-1977.
- 16) Di Leo A, Dowsett M, Horten B, Penault-Llorca F. Current status of HER2 testing. Oncology. 2002; 63 Suppl 1: 25-32.
- 17) Pauletti G, Dandekar S, Rong H, et al. Assessment of methods for tissue-based detection of the HER-2/neu alteration in human breast cancer: a direct comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. J Clin Oncol. 2000; 18(21): 3651-3664.
- 18) Sauer T, Wiedswang G, Boudjema G, Christensen H, Karesen R. Assessment of HER-2/neu overexpression and/or gene amplification in breast carcinomas: should in situ hybridization be the method of choice? APMIS. 2003; 111(3): 444-450.
- 19) Smith I. Future directions in the adjuvant treatment of breast cancer: the role of trastuzumab. Ann Oncol. 2001; 12 Suppl 1: S75-79.
- 20) Baselga J, Tripathy D, Mendelsohn J, et al. Phase II study of weekly intravenous trastuzumab (Herceptin) in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. Semin Oncol. 1999; 26(4 Suppl 12): 78-83.
- 21) Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, et al. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. J Clin Oncol. 1999; 17(9): 2639-2648.
- 22) Gaiser T, Hofmann M, Weng LP, Schmidtgen C, Maass G, Gross C, Henkel T, Ruechhoff J: Her2 status determination: significance of chromosome 17 polysomy identified using 2-colour FISH. San Antonio Breast Cancer Symposium 2003, #601
- 23) Seshadri R, Firgaira FA, Horsfall DJ, McCaul K, Setlur V, Kitchen P. J Clin Oncol. Clinical significance of HER-2/neu oncogene amplification in primary breast cancer. The South Australian Breast Cancer Study Group. 1993; 11(10): 1936-1942.
- 24) Rilke F, Colnaghi MI, Cascinelli N, et al. Prognostic significance of HER-2/neu expression in breast cancer and its relationship to other prognostic factors. Int J Cancer. 1991; 49(1): 44-49.
- 25) Egan RL. Multicentric breast carcinomas: clinical-radiographic-pathologic whole organ studies and 10-year survival. Cancer. 1982; 49(6): 1123-1130.
- 26) Anim JT, John B, Abdulsathar S SA, et al. Relationship between the expression of various markers and prognostic factors in breast cancer. Acta Histochem. 2005; 107(2): 87-93.
- 27) Tsuda H, Hirohashi S, Shimosato Y, et al. Correlation between histologic grade of malignancy and copy number of c-erbB-2 gene in breast carcinoma. A retrospective analysis of 176 cases. Cancer. 1990; 65(8): 1794-1800.
- 28) Prati R, Apple SK, He J, Gornbein JA, Chang HR. Histopathologic characteristics predicting HER-2/neu amplification in breast cancer. Breast J. 2005; 11(6): 433-439.
- 29) Ariga R, Zarif A, Korasick J, Reddy V, Siziopikou K, Gattuso P. Correlation of her-2/neu gene amplification with other prognostic and predictive factors in female breast carcinoma. Breast J. 2005; 11(4): 278-280.
- 30) Prati R, Apple SK, He J, Gornbein JA, Chang HR. Histopathologic characteristics predicting HER-2/neu amplification in breast cancer. Breast J. 2005; 11(6): 433-439.
- 31) Press MF, Hung G, Godolphin W, Slamon DJ. Sensitivity of HER-2/neu antibodies in archival tissue samples: potential source of error in immunohistochemical studies of oncogene expression. Cancer Res. 1994; 54(10): 2771-2777.
- 32) Paik S, Bryant J, Tan-Chiu E, et al. Real-world performance of HER2 testing—National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project experience. J Natl Cancer Inst. 2002; 94(11): 852-854.
- 33) Press MF, Sauter G, Bernstein L, et al. Diagnostic evaluation of HER-2 as a molecular target: an assessment of accuracy and reproducibility of laboratory testing in large, prospective, randomized clinical trials. Clin Cancer Res. 2005; 11(18): 6598-6607.



Optimization Software:  
[www.balesio.com](http://www.balesio.com)