



# Importance of HER2/NEU (C-ERB-B2) Status in Breast Cancer: Which Method is More Effective to Evaluate of HER-2 Status?

## Meme Kanserinde HER-2/NEU (C-ERB-B2) Durumunun Önemi: Hangi Yöntemle Değerlendirmek Daha Uygun?

Nuket Eliyatkin<sup>1</sup>, Baha Zengel<sup>2</sup>, Safiye Aktaş<sup>3</sup>

<sup>1</sup>İzmir (Bozyaka) Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Patoloji Kliniği, İzmir, Türkiye

<sup>2</sup>İzmir (Bozyaka) Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 3. Genel Cerrahi Kliniği, İzmir, Türkiye

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

### ABSTRACT

Approximately 20% of breast cancers are characterized by overexpression of human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2) protein and associated gene amplification. HER-2 testing is an essential part of pathological assessment in breast cancer patients, as HER-2 provides not only prognostic but also predictive information on the response to targeted therapy. A humanized monoclonal antibody against the extracellular domain of HER-2 protein, trastuzumab, has significantly improved treatment outcomes in patients with HER-2-overexpressing breast cancer. Therefore, distinguishing which patients will benefit from this drug is essential. Immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization are used in many laboratories to determine HER-2 status. Both methods require interpretation of the test by a pathologist. Since the correlation between these two methods is nearly below 80% and these techniques are difficult to standardize across laboratories and are subject to interobserver variability, molecular techniques based on the quantitative evaluation of HER-2 messenger RNA (mRNA) have been proposed. More recently, by using quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (Q-RT-PCR), the HER2 mRNA levels have been successfully measured, making this assay a potentially specific, highly sensitive, reliable, and cost-effective way of measuring HER2 status. Q-RT-PCR could become the test of choice to evaluate HER2 status in breast cancer. To achieve this result, however, it will be necessary to validate Q-RT-PCR by a multicenter trial, with the inclusion of several testing laboratories. Accurate HER2 testing is essential for quality patient care. However, no gold standard exists for HER2 testing, and an optimal test for evaluation of HER2 status is still being discussed by pathology.

**Key words:** Breast cancer, HER-2, method

### ÖZET

Meme kanserlerinin yaklaşık %20'sinde, insan epidermal büyüme faktörü reseptörü-2 (HER-2) proteininin overekspresyonu ve ilişkili olduğu genin amplifikasyonu görülmektedir. HER-2 testi, meme kanserli hastaların patolojik değerlendirilmesinde önemli bir faktördür, yalnızca prognostik değil aynı zamanda hedefe yönelik tedavi seçiminde prediktif bilgi de sağlamaktadır. HER-2 proteininin ekstrasellüler bölgesine karşı geliştirilmiş bir antikor olan trastuzumab'ın, HER-2 overekspresyonu gösteren meme kanserli hastaların tedavisinde kullanılması sağkalım sürelerini anlamlı olarak uzatmıştır. Bu ilaçtan yarar görecekt hastaların belirlenmesi optimum tedavi için gereklidir. HER-2 durumunu değerlendirmek için, birçok laboratuvarıda immunohisto-kimya ve floresan in situ hibridizasyon yöntemleri kullanılmaktadır. Her iki yöntem de bir patoloğ tarafından değerlendirmeyi gerektirir. Bu iki yöntem arasındaki korelasyonun %80'in altında olduğu bildirildiği gibi, laboratuvarlar arasında standardize etmenin zorluğu ve gözlemciler arasında da değişiklik nedeniyle, HER-2 mesajcı RNA (mRNA)'nın değerlendirildiği moleküler teknikler önerilmektedir. Daha yeni olarak, kantitatif real-time reverz transkripsiyon-PCR (Q-RT-PCR) kullanımıyla, HER-2 mRNA seviyelerinin oldukça spesifik, sensitif, güvenilir ve ekonomik olarak başarılı şekilde ölçülebileceği bildirilmiştir. Q-RT-PCR, meme kanserinde HER-2 durumunu değerlendirmede gelecekte seçilecek bir test olabilir. Ancak, bunun mümkün olabilmesi için, çeşitli laboratuvarların dahil edildiği çok merkezli çalışmalar ile Q-RT-PCR'in geçerliliğinin kabul edilmesi gerekli olacaktır. Doğru HER-2 testi, hasta tedavisini iyileştirmek için gereklidir. Ancak HER-2 testinde altın standart yoktur ve hala bu konuda optimal testin ne olması gerektiği, temel bir disiplin olarak patoloji tarafından tartışılmaktadır.

**Anahtar sözcükler:** Meme kanseri, HER-2, yöntem

Meme kanseri, kadın sağlığını olumsuz olarak etkileyen önemli bir kanser tipi olup, Batı dünyasında insidans ve mortalite yönünden birinci sıradadır. Yaklaşık olarak her yıl bildirilen 1,000,000 yeni vaka ile, tüm dünyada, kadınlar arasında kanserden ölüme yol açan önemli bir hastalıktır (1). Ülkemizde ise 2004-2006 kanser insidansı verilerine göre meme kanserleri, malign tümörler arasında kadınlarda 1'inci sırayı almaktadır ve insidansı 100,000 kişide 39,1 olarak belirlenmiştir (2).

Meme kanseri klinik davranışı, radyolojik ve patolojik özellikleri ile biyolojik potansiyeli farklı olan heterojen bir hastalık grubudur (3). Bu heterojenite, her meme kanseri olgusunun, bu geniş spektrum içindeki uygun ve doğru yerine, ayrı ayrı yerleştirilmesi ihtiyacını beraberinde getirir (4, 5). Bu da ancak bugüne kadar tanımlanmış, morfolojiye dayalı prognostik parametreler yanı sıra morfolojiye dayalı olmayan prognostik parametreler, yani moleküler belirteçlerin bilinmesi ve değerlendirilmesi, ayrıca her hasta için gerekli bireysel tedavi planının oluşturularak kişiye özel tedavinin sağlanması ile mümkün olabilmektedir (6). Bu bağlamda, patolojik prognostik bir parametre ve moleküler belirteç olarak bir biomarker olan "insan epidermal büyüme faktörü reseptörü-2 geni=HER-2 geni veya c-erbB-2 geni" durumu, aynı zamanda tedavi planlanmasını da yönlendirecek önemli verilerden biri olarak karşımıza çıkmaktadır. İnvaziv meme kansinonlarının yaklaşık olarak %20'sinde (%10-%30), HER-2 gen amplifikasyonu ya da bu genin protein ürününün overekspresyonu

### Address for Correspondence/Yazışma Adresi:

Nuket Eliyatkin, İzmir (Bozyaka) Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Patoloji Kliniği, İzmir, Türkiye  
Phone / Tel.: +90 232 375 21 25 e-mail / e-posta: drnuket2003@yahoo.com

Received / Geliş Tarihi: 11.06.2012  
Accepted / Kabul Tarihi: 02.01.2013

görülür (7, 8). Meme kansinomunda HER-2 pozitifliği; agresif tümör büyümesi, rekürrens riskinde artış, kısa sağkalım ve özellikle lenf nodu pozitifliği olan hastalarda kötü prognoz ile birlikte (9, 10). Ayrıca, meme kanserli hastada, kemoterapi ve hormonoterapiye yanıtın tahmininde de kullanılmaktadır (11, 12). Meme kansinomunda, HER-2 gen amplifikasyonunun bilinmesi, HER-2 pozitif olan ileri evre metastatik meme kanseri tedavisinde, bu reseptörü hedef alan "trastuzumab"ın (Herceptin; Genentech, San Francisco, CA, USA) geliştirilmesi ile daha da önem kazanmıştır (11). Trastuzumab, HER-2 proteininin ekstrasellüler bölgesini hedef alan bir monoklonal antikorudur ve 1990'lı yılların sonlarına kadar bu bileşiğin potansiyel terapötik rolleri, klinik çalışmalar ile yoğun olarak araştırılmıştır (12). Özellikle de, HER-2 overekspresyonu gösteren metastatik meme kanserlerinin tedavisinde, trastuzumab ile konvansiyonel kemoterapinin kombinasyonunun, yalnızca kemoterapi ile tedavi edilmesinden çok daha etkili olduğu gösterilmiştir (13). Bu bilgiler doğrultusunda, trastuzumab, opere edilebilir HER-2 overekspresyonu gösteren meme kanserlerinde, adjuvan ya da neo-adjuvan olarak kullanılır duruma gelmiştir (14). Ancak trastuzumabın, yüksek ilaç maliyeti ve az da olsa kardiyak toksitesi nedeniyle, HER-2 amplifiye eden veya overekspresyon eden tümörlerin en doğru ve güvenilir şekilde saptanması da gerekli hale gelmiştir.

### Meme Kanseri Patogenezinde HER-2

c-erbB-2 olarak ta bilinen HER2/neu protoonkogeni, 17. kromozomun kısa kolunda (17q21) lokalizedir. Bu gen, yüz seksen beş kilodalton (kDa) moleküler ağırlığa sahip ve 1255 amino asit içeren transmembran HER-2 glikoproteinini kodlar. Normal meme epitel hücreleri, HER-2 geninin 2 kopyasını içerir ve hücre yüzeyindeki HER-2 reseptörünü düşük seviyelerde eksprese eder. Ancak bazı kişilerde, hücredeki gen kopyalarının sayısı, onkojenik transformasyon nedeniyle artmaktadır. Bu durumda genin amplifikasyonu, HER-2 proteinin artmış membran ekspresyonu ile sonuçlanmaktadır. Bu nedenle de HER-2 protein overekspresyonunun temel mekanizmasının, gen amplifikasyonu olduğu kabul edilmektedir. HER-2 proteininin artmış membran ekspresyonu, dimerizasyonu artırarak HER-2 tirozin kinazı aktive eder. Bu aktivasyon sinyali, hücre nükleusuna iletilir; bu da onkojenik transformasyona uğrayan hücrede, hücre replikasyonu ve mitozu neden olur. Böylece HER-2 gen amplifikasyonunun, meme kansinomu gelişim sürecine, yani kansinogenezise katkıda bulunduğu kabul edilmektedir.

Gerçekten de deneysel çalışmalar ile memeye ilişkili epitel hücrelerine HER-2'nin transfeksiyonunun, onkojenik transformasyona neden olduğu gösterilmiştir (15). İnvaziv meme kansinomlarının yaklaşık olarak %20'sinde (10-30), HER-2 gen amplifikasyonu ya da bu genin protein ürününün overekspresyonu görüldüğü için bu hastalarda hedefe yönelik tedavi olarak trastuzumab tedavisine başlayabilmek için, pozitif HER-2 durumunun doğru, güvenilir ve tekrarlanabilir şekilde belirlenmesi gereklidir. Bu nedenle de tümörde gen amplifikasyonunu ve/veya overekspresyonunu saptamada basit, doğru, yaygın olarak kullanılan, klinik olarak uygulanabilir, aynı zamanda tekrarlanabilir ve düşük maliyetli yöntemlerin kullanılması hem klinisyen hem de patolog açısından oldukça önemlidir. Ancak, meme kanserli hastalarda tümörün HER-2 durumunun hangi yöntemle tespit edilmesi gerektiği tartışmalı bir konudur. HER-2 durumu, onkoprotein miktarı, gen amplifikasyon miktarı veya m-RNA düzeyinin immünohistokimya (İHK), ELİSA, *in situ* hibridizasyon yöntemleri veya polimeraz zincir reaksiyonu ile değerlendirilebilir. Literatürde üstünde net olarak görüş birliğine varılmış optimal bir yöntem bulunmamaktadır. Her yeni çıkan uygulamanın diğerlerine üstünlükleri ve kısıtlılıkları, değişik çalışmaların sonuçlarının birikmesi ve değerlendirilmesi ile daha sağlıklı veriler elde edilmesini sağlayacaktır.

### Meme Kanserinde HER-2 Değerlendirmesi

Meme kansinomunda HER-2 gen durumunu değerlendirmek için çoğu rutin laboratuvar da yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biri İHK ile değerlendirilmez. İHK değerlendirme, gen amplifikasyonunu indirekt olarak belirleyen bir yöntemdir ve frozen ya da parafine gömülü meme kanseri dokusundaki hücreler tarafından eksprese edilen HER-2 proteinlerini tanımlamak üzere antikorların uygulanması ile gerçekleştirilir. Genelde, standart laboratuvar ortamında, parafine gömülü dokularda uygulandığı için çoğu klinik laboratuvarlar için tercih edilen yöntem durumundadır. Ancak İHK'sal değerlendirmeler mikroskopik analiz teknikleridir ve yoğun zaman alan yorumlama gerektirir. Tümör hücrelerinin boyanma yoğunluğu ve miktarına dayandığı için subjektif bir değerlendirilmez. Üstelik, bu gibi teknikleri laboratuvarlar arasında standardize etmek nispeten zordur ve aynı laboratuvar da kişiler arasında da değişkenlik gösterebilmektedir (16, 17). Bunun yanı sıra, tümör dokusunun fiksasyonu ve doku takip sürecinden etkilenmesi nedeniyle laboratuvarlar arası teknik standardizasyonun da güç olduğu düşünülmektedir. İHK'sal değerlendirme ile negatif ve pozitif olguların saptanmasında laboratuvarlar arası ve önemli olarak da diğer standart yöntemler ile korelasyonun oldukça yüksek olduğu bildirilen çalışmalar mevcuttur (18-20).

Ülkemizde de 2010 yılında patoloji dernekleri federasyonu meme çalışma grubunun konsensus toplantısında, meme kanserlerinde östrojen reseptörü (ER) ve progesteron reseptörü (PR) yanı sıra HER-2 durumunun değerlendirilmesinin gerekliliği vurgulanmıştır. Çünkü, postoperatif tedavinin belirlenmesi ve prognoz tahmininde kritik öneme sahip belirteçlerdir. Dolayısıyla bu belirteçlerin durumu patoloji raporunun standart bir parçasıdır. Ayrıca bu toplantıda HER-2'nin değerlendirilmesinde öncelikle İHK'sal yöntemin kullanılması önerilmiştir. İHK'sal değerlendirme, invaziv kansinom hücrelerinin boyanma yüzdesi ve boyanma niteliğine (zayıf-orta-kuvvetli/inkomplet-komplet membranöz) göre skorlanma temelinde yapılır. Bu İHK'sal değerlendirmenin, American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists (ASCO/CAP) önerilerine göre aşağıdaki gibi skorlanması önerilmektedir (21).

Skor 0: Membran boyanması yok

Skor 1: İnvaziv kansinom hücrelerinde oranı ne olursa olsun membranı çevrelemeyen, varlığı zor saptanan, tam membranöz olmayan boyanmalarda ya da hücrelerin %10'dan azında tüm membranı çevreleyen, zayıf boyanma

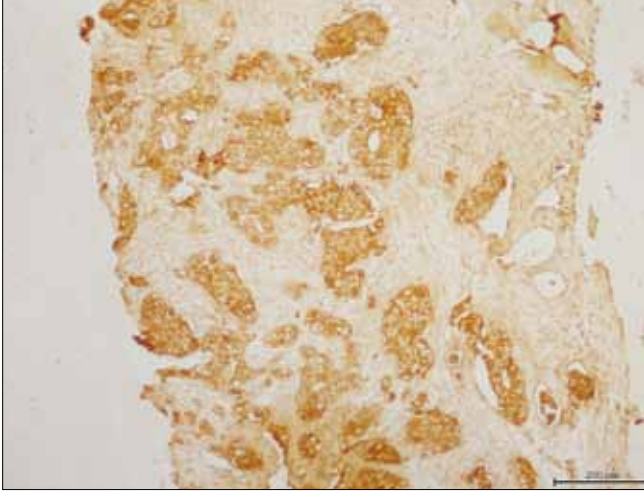
Skor 2: İnvaziv kansinom hücrelerinin en az %10'unda sitoplazmik membranı tümüyle çevreleyen ancak orta şiddette boyanma ya da %30'undan daha az ama kuvvetli membranöz boyanma

Skor 3: İnvaziv kansinom hücrelerinin en az %30'unda tüm sitoplazmik membranı çevreleyen uniform tarzda kuvvetli immün boyanma (Resim 1). Bu skorlama sonuçlarına göre;

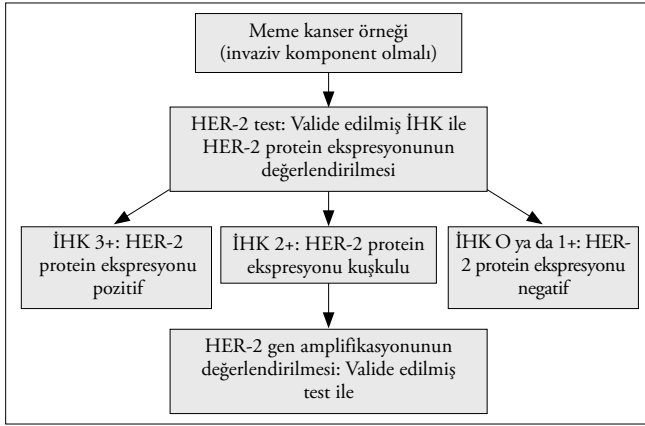
Skor 0 ve 1: İmmünohistokimya negatif demektir, *in situ* hibridizasyon önerilmez.

Skor 3: İmmünohistokimyasal olarak kuvvetli pozitifdir, *in situ* hibridizasyon önerilmez.

Skor 2: İmmünohistokimyasal olarak şüpheli pozitif demektir, *in situ* hibridizasyon ile doğrulanmalıdır. İHK sonuçlarına göre uygulanan algoritma Şekil 1'de özetlenebilir.



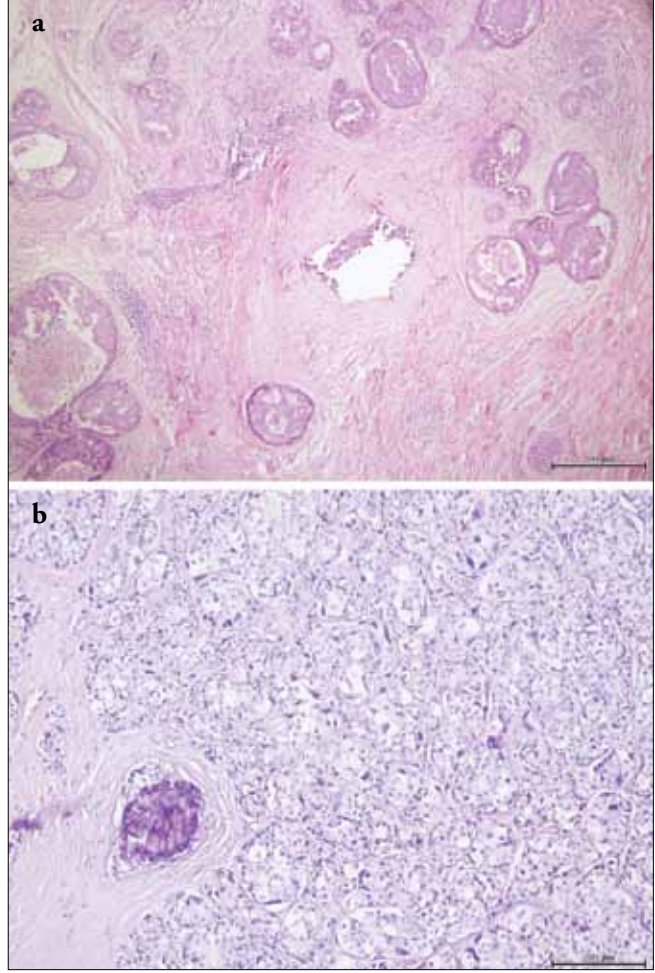
**Resim 1.** İHK yöntemiyle cerbB2(HER-2) skor 3 invaziv meme karsinom olgusu



**Şekil 1.** HER-2 durumunun immunohistokimyasal değerlendirilmesi ve yorumlanması

Ülkemiz şartlarında bütün meme karsinomu olgularına *in situ* hibridizasyon uygulanması önerilmemektedir. Yalnızca, İHK'sal yöntemle skor 2 olan olgularda *in situ* hibridizasyon ile değerlendirme önerilmektedir. Meme karsinomunda HER-2 gen durumunu değerlendirmek için en yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biri olan İHK, kolayca uygulanabilir ve ucuz bir testtir. Ancak, en önemli dezavantajı, değerlendirme kriterlerinin subjektifliği nedeniyle değerlendiriciler arasındaki uyumsuzluktur. Nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte *in situ* duktal karsinom alanlarında, invaziv karsinom alanlarına kıyasla daha fazla HER-2 pozitifliği olmaktadır. Dolayısıyla bu değerlendirmeyi yapan kişi, *in situ* duktal karsinom ile invaziv karsinom ayırımını yapabilecek deneyimde (tercihen meme patolojisinde deneyimli) bir patoloji uzmanı olma gerekliliğine sebep olmaktadır (Resim 2a, b). Ayrıca cerrahi materyalin patoloji laboratuvarına gelişinden itibaren İHK'sal çalışmanın sonuçları fiksasyon ve tüm doku takip sürecinden etkilendiği için de laboratuvarlar arası standardizasyonun güç olduğu düşünülür.

İlk olarak frozen dokuda uygulanan southern blot yönteminden sonra, floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) ve daha sonraları ise kromojen ve silver *in situ* hibridizasyon (CISH ve SISH) yöntemleri geliştirilmiştir. *In situ* hibridizasyon, nükleik asitleri tanımaya yönelik bir moleküler biyolojik yöntemdir. DNA ya da bir RNA transkriptine bir probun

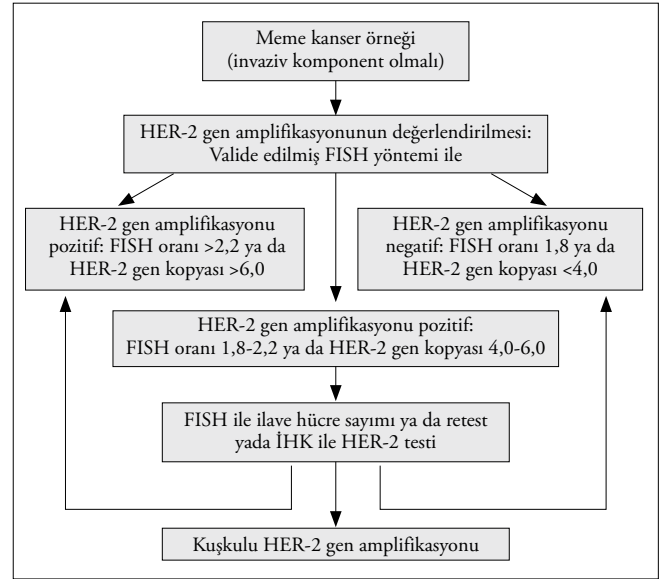


**Resim 2.** a) Duktal karsinoma in situ morfolojisi gösteren meme tümör dokusu (hematoksilen&eosin ile boyalı). b) Amorf kalsifikasyon içeren yüksek dereceli invaziv duktal karsinom morfolojisinde tümör dokusu (hematoksilen&eosin ile boyalı)

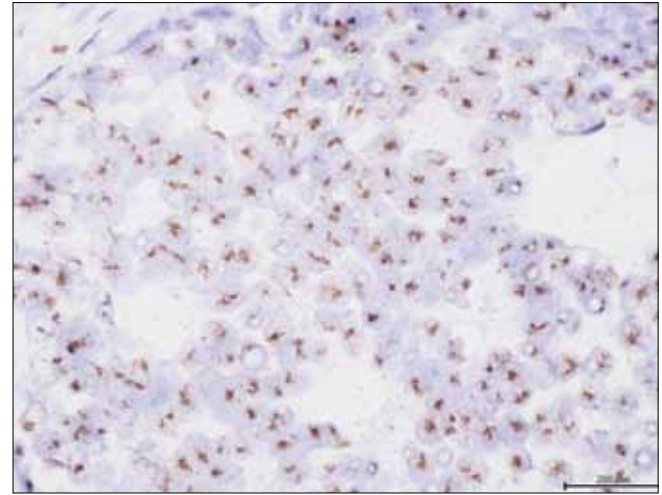
hibridize olması ve bu probun görüntülenmesine dayalı mikroskobik gözlemlerle gerçekleşen bir yöntemdir. Bu yöntem ile HER-2 gen kopya sayısı farklı şekillerde görselleştirilerek, miktarının tespit edilmesi sağlanırlar. DNA problrarı, FISH yönteminde floresanla, CISH yönteminde kromojenle işaretlenir (12). "Silver enhanced" *in situ* hibridizasyon yöntemi (SISH) ise nispeten daha yeni, metalografiye dayalı bir *in situ* hibridizasyon yöntemidir.

İHK'sal değerlendirme, HER-2 proteininin overekspresyonunu indirekt olarak, *in situ* hibridizasyon yöntemleri ise HER-2 gen amplifikasyonunu direkt olarak saptayan bir metottur. Ancak İHK'sal yöntemle yukarıda belirtilen değerlendirmedeki zorluklar nedeniyle birçok laboratuvarında HER-2 gen amplifikasyonunu belirlemek için bir yöntem olarak FISH gibi *in situ* hibridizasyon yöntemleri tercih edilmeye başlanmıştır. FISH yöntemi daha fazla emek ve zaman gerektirmesi yanı sıra özelleşmiş bir donanım da gerektirir. Ayrıca, nispeten maliyeti yüksektir. Bununla beraber, bu tekniğin doğruluğu, FISH ile HER-2 durumunun değerlendirilmesi, parafine gömülü meme kanserlerinde HER-2'nin saptanmasında zaman zaman altın standart olarak kabul edilmesine neden olmuştur. Uygulanan FISH yöntemleri arasında iyi bir korelasyon bulunsa da (%98), FISH ve İHK arasında genellikle iyi bir korelasyon yoktur (16, 22). FISH değerlendirmede, hedeflenen 20 interfaz nükleusuna sahip tümör hücresinde total HER-2/neu

sinyallerinin, 17. kromozom sentromerine (CEN-17) sinyallerine oranı saptanır. FISH değerlendirme sırasında normal hücreler internal kontrol olarak bulunmalıdır. Nükleer morfoloji intakt olmalı, çok sayıda ghost-like hücreler ve genel kötü nükleer morfolojide değerlendirme yapılmamalıdır. Değerlendirilen sinyaller, parlak, ayrı ve kolay görülebilir olmalı ve en önemlisi normal hücrelerde sinyal yoksa değerlendirme kesinlikle güvenilir olmadığı için yapılmamalıdır. HER-2/CEN-17 oranı 1,8-2,2 ise ek bir değerlendirme daha yapılması önerilmektedir. Değerlendirme sonucu 2,2 üzerinde ise sorunsuz olarak amplifikasyon mevcut anlamına gelmektedir. FISH uygulama ve değerlendirme algoritması Şekil 2'de özetlenmiştir. CISH ise doku örneğinde, spesifik bir DNA yada RNA sekansını lokalize etmek için işaretli komplementer DNA ve RNA zincirinin kullanıldığı bir işlemdir. Bu metodoloji de kromojenle işaretli DNA problemleri ile gen amplifikasyonu yani sıra gen delesyonu, kromozom translokasyonu ve kromozom sayısı değerlendirilebilmektedir. CISH, formalinde fikse parafine gömülü dokularda oldukça etkili ve bazı kaynaklarda FISH'e alternatif bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. FISH ile karşılaştırıldığında, CISH'in en önemli avantajı, standart ışık mikroskopik değerlendirmenin mümkün olması, böylece dokuya ait histolojik ayrıntıların daha iyi gözlenebilmesi ve morfolojile paralel bir değerlendirmenin mümkün olmasıdır. Ayrıca prob sinyalleri hızlı solmadığı için arşivleme imkanı da sağlanmaktadır (Resim 3). Dual-Color CISH (dc-CISH), 2 renkli FISH tekniğine benzer bir prensibe dayanır; HER-2 değerlendirilmesi, HER-2/CEP17 oranı şeklinde belirlenir, 2 ya da 2'nin üstü değerler HER-2 gen amplifikasyonu olarak yorumlanır. Meme kansinomuunda CISH tekniği ile HER-2 durumunu pratik, daha az maliyetli ve etkin bir alternatif olarak değerlendirmenin etkinliğini saptamak amacıyla çok sayıda yeni çalışmalar yapılmaktadır. SISH yöntemi ise metalografiye dayalı bir yöntem olup diğer *in situ* hibridizasyon yöntemlerine (FISH ve CISH) benzer şekilde bir olgunun HER-2 durumunun, invaziv tümöral hücrelerdeki HER-2 gen kopya sayısının; kromozom 17 kopya sayısına oranlanması esasına dayanır. Bu değerlendirme invaziv tümöral sahada ışık mikroskopunda üretici firmanın kılavuzuna uygun olarak semikantitatif ya da kantitatif yöntemle yapılır (23). Bu değerlendirmelerin ışığında HER-2 amplifikasyonu açısından 2 grup tanımlanmaktadır: HER-2 amplifikasyonu olan grup ve HER-2 amplifikasyonu olmayan grup (negatif+“borderline” olgular). SISH yönteminde ışık mikroskopunda değerlendirme yapıldığı için CISH gibi değerlendirme yapılan preparatlar arşivlenebilir ve kantitatif bir yöntem olduğu için değerlendiriciler arasındaki uyum yüksektir. Bir çalışmada İHK'sal olarak c-erb-B2 skor 2 olarak değerlendirilen olgularda moleküler genetik bir test olarak SISH yöntemi ile HER-2 gen amplifikasyonunu değerlendirilmiş ve kullanılabilir güncel bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır (24). Ayrıca SISH, ASCO/CAP kılavuzunun önerdiği FISH ile %95 uyumlu olan bir yöntemdir. Günümüzde birçok laboratuvarında yeni tanı almış meme kansinomlarında HER-2 durumunu belirlemek için standart yöntemler olarak İHK ya da FISH uygulaması yapılmaktadır ve önerilmektedir (25). İki yöntem arasındaki uyumsuzluk, FISH ile amplifikasyon göstermeyen, İHK ile 3 pozitif olan bazı tümörler ile FISH ile gen amplifikasyonu gösteren, İHK ile 2 pozitif tümörlerin arasında söz konusudur. İHK ve FISH arasındaki uyumsuzluğu çözmeye yardımcı olabilmek amacıyla HER-2 mRNA'nın kantitatif değerlendirilmesine dayalı moleküler teknikler önerilmiştir. İlki, end point ölçümleri ve jel elektroforez görüntülemeyi kullanan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile HER-2 gen amplifikasyonunun saptanmasıdır (26-28). PCR, herhangi bir organizmaya ait genomik DNA'daki özgül bölgelerin çoğaltılmasını (amplifikasyonunu) sağlayan basit ama çok başarılı bir *in vitro* DNA sentezi yöntemidir. Bu yöntem, DNA molekülünün milyonlarca hatta milyarlarca kopyasını kısa



Şekil 2. HER-2 durumunun FISH yöntem ile değerlendirme ve yorumlanması



Resim 3. CISH yöntemle HER-2 için yüksek amplifikasyon gösteren meme kansinomu olgusu

zamanda yapabildiği gelişmiş bir tekniktir. PCR reaksiyonlarında temelde 3 basamak vardır: Denatürasyon, hibridizasyon ve polimerizasyon (sentez). PCR temelli değerlendirmeler hem HER-2 gen sayısındaki değişiklikleri hem de ekspresyonunu saptayabilmektedir (29). Bu tekniğin geliştirilmesiyle kantitatif real-time reverz transkripsiyon-PCR (Q-RT-PCR) kullanımı, HER-2 mRNA seviyelerinin, başarılı şekilde ölçülmesini sağlamıştır. DNA'nın real-time PCR (RT-PCR) analizi, gen amplifikasyonunun kusursuz kantitatif analizidir. Bu tekniğin avantajı, basit, kullanışlı, non-radyoaktif ve hızlı olmasıdır ki bu nedenle de gelişmiş merkezi rutin klinik laboratuvarlar için çok uygundur. Dikkatli ve aseptik pipetleme tekniği dışında hiçbir tecrübe gerektirmez. Bu değerlendirme, HER-2 durumunun ölçümü için spesifik, yüksek oranda sensitif, güvenilir ve masrafsız bir yöntemdir. Bu gibi kantitatif çalışmalar, ilk olarak taze doku ya da frozen örneklerde yapılmıştır, ancak çoğu hastane ve laboratuvarında bu nitelikte doku elde edilmesi nispeten zordur. Bununla birlikte, kantitatif RT-PCR değerlendirmelerden elde edilen sonuçlar, tümör örneğine komşu nontümöral dokudaki nükleik asit ile kontaminasyonu ile etkilenebilir. Bu problem, laser-destekli mikrodiseksiyon kullanımı ile veya (laser

destekli mikrodiseksiyon sağlanamazsa) tümör alanının dikkatli bir şekilde çıkarılıp analiz için yalnızca tümör dokusunun kullanılmasıyla azaltılabilir. Ancak RT-PCR ile mRNA seviyesinde HER-2 durumunun değerlendirilmesinde, formalinde fikse parafine gömülü (FFPG) dokunun kullanımı sıkıntı yaratabilir (29, 30). Çünkü, bu işlem sırasında RNA yoğun olarak degrade olabilmektedir. Ancak günümüzde bu kısıtlılığı da aşan değişik teknikler geliştirilmiştir. HER-2 değerlendirmesi, meme kanserinde tedavi planlamada, prediktif biomarkerların prototipi olduğu için, en uygun ve en doğru yöntemi bulmak için değerlendirme yöntemlerini karşılaştıran çok sayıda çalışmalar vardır. Bu gibi çalışmalarda İHK'sal yöntemle HER-2 protein seviyesini değerlendirme ile FISH ya da CISH ile gen amplifikasyonunu değerlendirme arasında çok yüksek bir korelasyon gösterilmiştir. Böylece, geçerli yaklaşım, kuşku (skor 2) olgularda *in situ* hibridizasyon tekniklerinin ilave edilmesi ile kombine edilen İHK'sal değerlendirme gibi kabul görmektedir. Ancak, çeşitli raporlarla, İHK ile HER-2 değerlendirmede %20'ye varan uyumsuzluk oranları ile birlikte önemli zorluklara dikkat çekilmiştir (31). Bu durum temelde daha çok, İHK'sal değerlendirmenin yalnızca semi-kantitatif olması ile ilişkili gibi görünmektedir (32). HER-2 ekspresyonunun, FFPG dokuda RT-PCR ile mRNA seviyesinde ölçülebileceği ileri sürülmüştür (33, 34). Bu gözlem temelinde yapılan bir çalışmada, meme kanseri olgularında FFPG dokularda HER2 durumu üç farklı yaklaşım ile değerlendirilmiştir: İHK, FISH ve kinetik RT-PCR (28). Bu çalışma ile konvansiyonel İHK ve FISH'e ek olarak kinetik RT-PCR ile HER-2 seviyelerinin sonuçları arasında belirgin bir korelasyon olması yanı sıra FFPG dokularda HER-2 mRNA seviyelerinin değerlendirilebilirliği gösterilmiştir. HER-2 immün boyamasının ve *in situ* hibridizasyonun laboratuvar ve gözlemci değişkenliği ile etkilenmesi nedeniyle, kinetik RT-PCR HER-2 değerlendirmesinde ilave bir moleküler test olarak kullanılabilir. Bu yaklaşım, HER-2 ekspresyonunun nispeten hızlı, tekrarlanabilir nitelikte olmasını sağlar ve gözlemciler arası değişkenliği azaltır.

HER-2'nin değerlendirilmesinde kantitatif Q-RT-PCR'ın teknik ve maliyet analizinin değerlendirildiği bir çalışmada Q-RT-PCR ve İHK (skor 2 olgular hariç) sonuçları arasında tam bir uyum vardır (35). Meme kanserinde, HER-2 sonuçları ile ilgili tecrübeler, değerlendirme sonuçlarının tutarlı ve güvenilir olması gerekliliğinin altını çizmiştir. Mikroarray teknolojilerinin gelişimiyle kantitatif real-time PCR (Q-RT-PCR) uygulamalarında da ilerlemeler olmuştur. Q-RT-PCR, homojen bir yöntemdir, hem amplifikasyonu hem de analizi yapar, slab gels, radyoaktivite veya örnek manipülasyonu gerektirmez. Moleküler yaklaşımlar için RT-PCR'ın kullanımı, ilgi çekicidir, çünkü objektif, hızlı, esnek, ve maliyeti düşüktür. Meme kanserli olgularda HER-2 durumunu belirlemede, Q-RT-PCR yönteminin yararlılığını araştıran geniş bir seride olgular İHK, FISH, SISH ve Q-RT-PCR ile değerlendirilmiştir (34). Q-RT-PCR ile şüpheli olmayan olgulara ait İHK (2 pozitif olgular hariç) değerlendirmeleri arasında %97,3 oranında konkordans saptamışlar ve Q-RT-PCR yönteminin oldukça güvenilir, kantitatif bir değerlendirme olması nedeniyle de İHK için faydalı bir yardımcı-yöntem-olabileceğionucunavarmışlardır (34). HER-2 değerlendirme yöntemleri ve bu yöntemlerin avantajları ve dezavantajları Tablo 1'de özetlenmiştir.

HER-2 pozitif meme kanser hastalarında kullanılan trastuzumabın, potansiyel tedavi edici etkisi uzun yıllardır yoğun olarak araştırılmıştır. Özellikle de konvansiyonel kemoterapi ile kombinasyonun, HER-2 eksprese eden metastatik kanserlerin tedavisinde oldukça etkili olduğu gösterilmiştir (13). Ancak zaman içinde relapslar ve tedaviye direnç gösteren olgular nedeniyle, bu ajana karşı rezistansa neden olabilecek çok sayıda mekanizmalar araştırılmıştır (35-38). Kötü prognozlu HER-2 pozitif meme kanser hastalarının bir kısmının, p95HER-2 olarak bilinen HER-2 karboksi-terminal fragmanlarının heterojen bir grubunu eksprese ettiği bildirilmiştir (12). Bu fragmanlardan biri,

Tablo 1. İHK, FISH, CISH ve SISH yöntemlerinin karşılaştırılması

Avantajları	Dezavantajları
<b>İHK</b> Çoğu patoloji laboratuvarında tercih edilir Nispeten hızlı, ucuz, kolay bir yöntem Arşivlenebilir ve yeniden değerlendirilebilir Hücrelerin morfolojik özellikleri korunur	Test protokollerinde değişiklikler olabilir Semikantitatif ve subjektif skorlama
<b>FISH</b> Preanalitik faktörler/işlemlerden daha az etkilenir (DNA, proteinden daha stabildir) Skor yorumlama daha objektif ve kantitatif (Sayısal bir sonuç) İHK 2+ olgular içinde HER2 + tümörleri belirler	Pahalı bir yöntem (Fluoresans mikroskop ve dijital kamera gerekli) Sinyaller zamanla solar İnvaziv karsinom alanlarını değerlendirmek zor
<b>CISH</b> FISH göre daha ucuz Standard ışık mikroskobu gerekli Doku morfolojik özellikleri değerlendirilebilir Nispeten hızlı değerlendirme Arşivlenebilir ve yeniden değerlendirilebilir	Daha yeni bir teknoloji; tecrübe kısıtlı Monokrom CISH de kromozom 17 sayısı için İntrinsik kontrol yok, polizominin saptanması zor
<b>SISH</b> Standard ışık mikroskobu gerekli Tam otomatik/hızlı uygulama HER-2 ve CEP17 eş zamanlı değerlendirme Boyanma uzun bir süre stabil kalır Yorumlamak nispeten kolay	Daha yeni bir teknoloji; tecrübe kısıtlı

611-CTF, HER-2'nin onkogenidir. Böylece p95HER-2-pozitif tümörlerin progresyonunda, muhtemelen 611-CTF gen durumunun etkili olduğu ve trastuzumab kullanımının bu gibi hastalarda hedefe yönelik tedaviyi sağlayamayacağı sonucuna ulaşılmıştır (39). Bu nedenle meme kanserinde, HER-2 pozitif meme kanserli hastaların tedavi planlanmasında, trastuzumab tedavisine başlamadan önce ya da HER-2 ile birlikte p95HER-2 değerlendirilmesi yararlı olabilir. Ancak bu konuda yeni yapılacak prospektif klinik çalışmalar, bu belirtecin gerçek rolünü ortaya çıkarmaya yardımcı olacaktır.

## Sonuç

HER-2 durumu meme kanserli hastaların tedavisinde kritik bir rol oynadığı için, ASCO/CAP kurallarının uygulanmasıyla standardize edilmiş bir HER-2 değerlendirmesi gelecekteki klinik tecrübeler temel oluşturacaktır. Hormon reseptörleri ve HER-2 durumunun değerlendirilmesinde, güvenilir nitelikteki standartlar rutin klinik yaklaşımlarda da gereklidir. Bunun yanı sıra HER-2'nin IHC ve zaman alan ISH yöntemleri ile değerlendirilmesi yanlış-pozitif oran nedeniyle, güvenilir ve doğru değerlendirme yaklaşımları zorunlu hale gelmektedir. Kabul görmüş yöntemlere ilave olarak, HER-2 değerlendirmesinde, kinetik RT-PCR, diagnostik alternatif bir yöntem olabilir. Ancak, bu kantitatif yaklaşımın avantajlarını doğrulamak için daha ileri çalışmalar gereklidir.

## Conflict of Interest

No conflict of interest was declared by the authors.

**Peer-review:** Externally peer-reviewed.

## Author Contributions

Concept - N.E., S.A.; Design - N.E.; Supervision - S.A.; Funding - B.Z.; Materials - N.E., B.Z.; Data Collection and/or Processing - N.E.; Analysis and/or Interpretation - N.E., S.A.; Literature Review - N.E., B.Z.; Writer - N.E.; Critical Review - S.A.

## Çıkar Çatışması

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

**Hakem değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

## Yazar Katkıları

Fikir - N.E., S.A.; Tasarım - N.E.; Denetleme - S.A.; Kaynaklar - B.Z.; Malzemeler - N.E., B.Z.; Veri toplanması ve/veya işlemesi - N.E.; Analiz ve/veya yorum - N.E., S.A.; Literatür taraması - N.E., B.Z.; Yazıyı yazan - N.E.; Eleştirel İnceleme - S.A.

## Kaynaklar

1. McPherson K, Steel CM, Dixon JM. ABC of breast diseases. Breast cancer epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ* 2000; 321: 624-8. (PMID: 10977847) [CrossRef]
2. Eser S, Olcayto E, Karakılınç H, Karaoğlu O, Yakut C, Ozalan S, ve ark. Nüfus tabanlı kanser kayıt merkezleri veri havuzu: Sekiz il, 2004-2006 Değerlendirilmesi. <http://www.kanser.gov.tr/folders/file/8iL-2006-SON.pdf>
3. Schnitt SJ, Milis RR, Handy AM. The Breast in: Mills SE, Carter D, Reuter VE (Eds). *Sternberg's Diagnostic Surgical Pathology*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2004.
4. Heimann R, Hellman S. Aging, progression, and phenotype in breast cancer. *J Clin Oncol* 1998; 16: 2686-92. (PMID: 9704718)

5. Rosen's Breast Pathology, 3rd Edi. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2009.
6. Ross JS, Fletcher JA. The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor and target for therapy. *Stem Cells* 1998; 16: 413-28. (PMID: 9831867) [CrossRef]
7. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA. Studies of the HER-2 / neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989; 244: 707-12. (PMID: 2470152) [CrossRef]
8. 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: 177-82. (PMID: 3798106) [CrossRef]
9. Bozzetti C, Nizzoli R, Guazzi A, Flora M, Bassano C, Crafa P, et al. HER-2/neu amplification detected by fluorescence in situ hybridization in fine needle aspirates from primary breast cancer. *Ann Oncol* 2002; 13: 1398-403. (PMID: 12196365) [CrossRef]
10. Seshadri R, Firgaira FA, Horsfall DJ, McCaul K, Setlur V, Kitchen P. Clinical significance of HER-2/neu oncogene amplification in primary breast cancer. The South Australian Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 1993; 11: 1936-42. (PMID: 8105035)
11. 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. *J Clin Oncol* 2007; 25: 118-45. (PMID: 17159189) [CrossRef]
12. Hanna WM, Kahn HJ, Pienkowska M, Blondal J, Seth A, Marks A. Defining a test for HER-2/neu evaluation in breast cancer in the diagnostic setting. *Mod Pathol* 2001; 14: 677-85. (PMID: 11455000) [CrossRef]
13. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs 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: 783-92. (PMID: 11248153) [CrossRef]
14. Buzdar AU, Ibrahim NK, Francis D, Booser DJ, Thomas ES, Theriault RL, et al. Significantly higher pathologic complete remission rate after neoadjuvant therapy with trastuzumab, paclitaxel, and epirubicin chemotherapy: results of a randomized trial in human epidermal growth factor receptor 2-positive operable breast cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 3676-85. (PMID: 15738535) [CrossRef]
15. Pierce JH, Arnstein P, Di Marco E, Artrip J, Kraus MH, Lonardo F, et al. Oncogenic potential of erbB-2 in human mammary epithelial cells. *Oncogene* 1991; 6: 1189-94. (PMID: 1713661)
16. Tubbs RR, Pettay JD, Roche PC, Stoler MH, Jenkins RB, Grogan TM. Discrepancies in clinical laboratory testing of eligibility for trastuzumab therapy: apparent immunohistochemical false-positives do not get the message. *J Clin Oncol* 2001; 19: 2714-21. (PMID: 11352964)
17. Onody P, Bertrand F, Muzeau F, Bièche I, Lidereau R. Fluorescence in situ hybridization and immunohistochemical assays for HER-2/neu status determination: application to node-negative breast cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2001; 125: 746-50. (PMID: 11371225)
18. 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: 251-8. (PMID: 10664627) [CrossRef]
19. Couturier J, Vincent-Salomon A, Nicolas A, Beuzeboc P, Mouret E, Zafrani B, et al. Strong correlation between results of fluorescent in situ hybridization and immunohistochemistry for the assessment of the ERBB2 (HER-2/neu) gene status in breast carcinoma. *Mod Pathol* 2000; 13: 1238-43. (PMID: 11106082) [CrossRef]
20. Ridolfi RL, Jamehdor MR, Arber JM. HER-2/neu testing in breast carcinoma: a combined immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization approach. *Mod Pathol* 2000; 13: 866-73. (PMID: 10955453) [CrossRef]
21. 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. (PMID: 19548375)

22. Wang S, Saboorian MH, Frenkel E, Hynan L, Gokaslan ST, Ashfaq R. Laboratory assessment of the status of Her-2/neu protein and oncogene in breast cancer specimens: comparison of immunohistochemistry assay with fluorescence in situ hybridization assays. *J Clin Pathol* 2000; 53: 374-81. (PMID: 10889820) [\[CrossRef\]](#)
23. Interpretation Guideline Inform HER-2. Ventana Medical Systems, 2007, France. Available from: URL: <http://www.ventana.com/product/1553?type=2013>. [\[CrossRef\]](#)
24. Özdemir D, Pak I. c-erbB-2 Skor 2 Olan Meme Karsinomlarında Her-2 Amplifikasyonu ve Prognostik Etkinliği. *Türk Patoloji Dergisi* 2010; 26: 140-6.
25. Bilous M, Morey AL, Armes JE, Bell R, Button PH, Cummings MC, et al. Assessing HER2 amplification in breast cancer: findings from the Australian In Situ Hybridization Program. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 134: 617-24. (PMID: 22678156) [\[CrossRef\]](#)
26. de Cremoux P, Martin EC, Vincent-Salomon A, Dieras V, Barbaroux C, Liva S, et al. Quantitative PCR analysis of c-erbB-2 (HER-2/neu) gene amplification and comparison with p185 (HER-2/neu) protein expression in breast cancer drill biopsies. *Int J Cancer* 1999; 83: 157-61. (PMID: 10471520) [\[CrossRef\]](#)
27. Chaudhary AG, Al-Juhani MA, Azam J, Gari M, Abuzenadah A, Al-Maghrabi, et al. Evaluation of Her-2/Neu Gene Amplification in Saudi Female Breast Cancer Patients Using Quantitative Real-Time PCR and Fluorescence In situ Hybridisation. *World Applied Sciences Journal* 2011; 14: 1445-52.
28. Noske A, Loibl S, Darb-Esfahani S, Roller M, Kronenwett R, Müller BM, et al. Comparison of different approaches for assessment of HER2 expression on protein and mRNA level: prediction of chemotherapy response in the neoadjuvant GeparTrio trial (NCT00544765). *Breast Cancer Res Treat* 2011; 126: 109-17. [\[CrossRef\]](#)
29. Gjerdrum LM, Sorensen BS, Kjeldsen E, Sorensen FB, Nexø E, Hamilton-Dutoit S. Real-time quantitative PCR of microdissected paraffin-embedded breast carcinoma: an alternative method for HER-2/neu analysis. *J Mol Diagn* 2004; 6: 42-51. (PMID: 14736826) [\[CrossRef\]](#)
30. Vanden Bempt I, Vanhentenrijk V, Drijkoningen M, Wlodarska I, Vandenbergh 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: 431-41. (PMID: 15810955) [\[CrossRef\]](#)
31. Gown AM. Current issues in ER and HER2 testing by IHC in breast cancer. *Mod Pathol* 2008; 1: 8-15. (PMID: 18437174) [\[CrossRef\]](#)
32. Paik S, Kim C, Wolmark N. HER2 status and benefit from adjuvant trastuzumab in breast cancer. *N Engl J Med* 2008; 358: 1409-11. (PMID: 18367751) [\[CrossRef\]](#)
33. 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: 563-70. (PMID: 18343783) [\[CrossRef\]](#)
34. 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. *Br J Cancer* 2011; 104: 1739-46. (PMID: 21540864) [\[CrossRef\]](#)
35. Kruser TJ, Wheeler DL. Mechanisms of resistance to HER family targeting antibodies. *Exp Cell Res* 2010; 316: 1083-100. (PMID: 20064507) [\[CrossRef\]](#)
36. Mukohara T. Mechanisms of resistance to anti-human epidermal growth factor receptor 2 agents in breast cancer. *Cancer Sci* 2010; 102: 1-8. (PMID: 20825420) [\[CrossRef\]](#)
37. Gajria D, Chandarlapaty S. HER2-amplified breast cancer: mechanisms of trastuzumab resistance and novel targeted therapies. *Expert Rev Anticancer Ther* 2011; 11: 263-75. (PMID: 21342044) [\[CrossRef\]](#)
38. Wong AL, Lee SC. Mechanisms of Resistance to Trastuzumab and Novel Therapeutic Strategies in HER2-Positive Breast Cancer. *Int J Breast Cancer* 2012; 415170. (PMID: 22649737)
39. Sperinde J, Jin X, Banerjee J, Penuel E, Saha A, Diedrich G, et al. Quantitation of p95HER2 in paraffin sections by sections using a p95-specific antibody and correlation with outcome in a cohort of trastuzumab-treated breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 4226-35. (PMID: 20664024) [\[CrossRef\]](#)