

## AMPLIFIKACE A OVEREXPRESSE HER-2/NEU V INVAZIVNÍCH KARCINOMECH PRSU : SROVNÁVACÍ ANALÝZA METOD IMUNOHISTOCHEMICKÝCH A FLUORESCENČNÍ IN SITU HYBRIDIZACE

## AMPLIFICATION AND OVEREXPRESSION OF HER-2/NEU IN INVASIVE BREAST CARCINOMAS : COMPARATIVE ANALYSIS OF IMMUNOHISTOCHEMICAL METHODS AND FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDISATION

HERMANOVÁ M.<sup>1</sup>, NENUTIL R.<sup>2</sup>, KROUPOVÁ I.<sup>1</sup>, BRAZDIL J.<sup>1</sup>, LUKÁŠOVÁ E.<sup>3</sup>, KOZUBEK S.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>PATOLOGICKO-ANATOMICKÝ ÚSTAV FN BRNO, LÉKARSKÁ FAKULTA MASARYKOVY UNIVERSITY

<sup>2</sup>ODD. PATOLOGIE, FN BRNO, PRACOVNÍŠTĚ PORODNICE

<sup>3</sup>BIOFYZIKÁLNÍ ÚSTAV BRNO, AV ČR

**Souhrn:** *Východiska:* Proto-onkogen HER-2/neu lokalizovaný na dlouhém raménku 17. chromosomu kóduje transmembránový receptor, který je strukturálním homologem receptoru pro epidermální růstový faktor. Exprimuje se na plazmatických membránách adultních i fetálních epitelových buněk a uplatňuje se v normálním růstu a diferenciaci. Overexpresse HER-2/neu je v literatuře popisována u 10-34% invazivních karcinomů prsu. V 90% těchto případů je způsobena amplifikací genu HER-2/neu a nezávisle asociována se špatnou prognózou u pacientek s prokázanými metastázami v lymfatických uzlinách. Výsledky preklinických i klinických studií ukazují, že laboratorní průkaz exprese a amplifikace genu HER-2/neu je důležitým prognostickým faktorem, ale hraje i významnou roli v predikci odpovědi na různé terapeutické modalitě, které se uplatňují v terapii invazivních karcinomů prsu. *Typ studie a soubor:* Standardní průkaz amplifikace a overexpresse HER-2/neu se tímto stává nesmírně významný. Cílem naší studie bylo posouzení validity metod imunohistochemických (IHC) při použití různých primárních protilátek a metodických postupů ve srovnání s metodou fluorescenční in situ hybridizace (FISH) na formol-parafinověm materiálu pro diagnostické účely. *Metody a výsledky:* Vyšetřili jsme šedesát vzorků invazivních karcinomů prsu zpracovaných standardně pro histologické vyšetření metodami IHC při použití diagnostického kitu DAKO HercepTest<sup>TM</sup> a tři monoklonálních protilátek firmy Novocastra (NCL-c-erbB-2-316, NCL-c-erbB-2-356, NCL-CB11) a metodou FISH při použití INFORM HER-2/neu Gene Detection System, (Ventana). Amplifikace byla detekována v 13,3% případů. Overexpresse byla detekována v 13,3%-28,3% v závislosti na použité metodologii a primární protilátce. Perfektní shoda byla zaznamenána mezi metodou FISH a IHC při použití monoklonálních protilátek firmy Novocastra NCL-c-erbB-2-316, NCL-c-erbB-2-356, v metodickém postupu, který vynechává tzv. oživení (retrieval) antigenu ve vodní lázni. Devět DAKO HercepTest<sup>TM</sup> pozitivních případů (sedm 2+ a dva 3+) bylo metodou FISH klasifikováno jako neamplifikované. *Závěry:* Naše výsledky ukazují, že vysoká úroveň overexpresse (3+) stejně jako normální HER-2/neu exprese (0, 1+) mohou být spolehlivě detekovány oběma metodami. Hraniční případy, zejména 2+ pozitivita, musí být interpretovány velmi pozorně při využití obou metod (IHC a FISH) a optimalizovaných metodických postupů. Navrhujeme algoritmus screeningu a detekce overexpresse HER-2/neu, kombinující obě metodiky.

**Klíčová slova:** karcinom prsu, ERBB2/HER-2, imunohistochemie, FISH

**Summary:** *Background:* The HER-2/neu proto-oncogene encodes one of the epithelial growth factor receptors in the cell membrane, the functions of which include stimulation of mammary epithelial cell proliferation. In breast carcinomas, overexpression has been reported in 10-34% of invasive cancer. Data published to date shows that ERBB2/HER-2 protein overexpression has been caused by gene amplification in 90% of these cases and has been shown to be associated with poor prognosis. Results of both preclinical and clinical studies show that laboratory assessment of ERBB2/HER-2 status can be useful not only as a prognostic factor in breast cancer, but also as a predictive marker for projecting response to different therapy regimens. *Design and subjects:* Standardised determination of ERBB2/HER-2 status has become more important. The purpose of this study has been a determination of the validity of different methods for detecting the status of ERBB2/HER-2 oncogene in formalin fixed and paraffin-embedded breast cancer tissues for diagnostic use. *Methods and results:* Sixty routinely formalin fixed and paraffin-embedded invasive breast carcinoma tissues were investigated both by fluorescence in situ hybridisation (FISH) using INFORM<sup>TM</sup> Her-2/neu Gene Detection system (Ventana) and by immunohistochemistry (IHC) using DAKO-HercepTest<sup>TM</sup> and Novocastra monoclonal antibodies (NCL-HER2-356, NCL-HER2-316, NCL-CB11). Amplification was detected in 13,3% of the cases. Overexpression was detected in 13,3-28,3% of the cases depending on the methodology and/or reagent used. Perfect concordance was found between results of FISH and IHC using NCL-HER2-356 as well as between FISH and IHC using NCL-HER2-316 with no antigen retrieval. Nine DAKO-HercepTest<sup>TM</sup> positive carcinomas (seven 2+, two 3+) were classified as non amplified using FISH. *Conclusions:* Our results indicate that high level expression as well as normal ERBB2/HER-2 status can be reliably detected both by IHC and FISH using the standardised methodology. Borderline results, especially 2+ immunopositivity should be interpreted with caution using both methods (IHC and FISH) with standardised methodological approaches. An algorithm of screening and evaluation of ERBB2/HER2 status using both above approaches is suggested.

**Key words:** breast cancer, ERBB2/HER-2, immunohistochemistry, FISH

## Úvod

Protoonkogen HER-2/neu (c-erbB-2, ERBB 2) je lokalizován na dlouhém raménku 17. chromosomu, v oblasti 17q12-21.32. Kóduje transmembránový glykoprotein, známý rovněž jako p185, jehož vnitřní doména má tyrosinkinázovou aktivitu, extracelulární doména je strukturálním homologem receptoru pro epidermální růstový faktor (1). HER-2/neu je exprimován na plazmatických membránách fetálních i adultních epitelových buněk a uplatňuje se v normálním růstu a diferenciaci (2). Amplifikace a overexprese HER-2/neu byla pozorována u celé řady primárních tumorů včetně karcinomů prsu, ovaria, plic, žaludku, endometria, dutiny ústní a močového měchýře (3-9). U karcinomů prsu byla overexprese onkogenu HER-2/neu zjištěna u 10-34% invazivních karcinomů (5, 11). Ve více než 90% případů je overexprese přičítána amplifikaci genu HER-2/neu, čili zvýšení počtu kopií tohoto genu v buňce, což vyústí ve zvýšení koncentrace příslušné mRNA a následně ve zvýšenou syntézu proteinu lokalizovaného v plazmatické membráně (5, 12). Ve zbývajících případech se pravděpodobně uplatňují jiné mechanismy, například aktivace transkripce či jiné posttranskripční dysregulace (4). Overexprese HER-2/neu je nezávisle asociována se špatnou prognózou u žen s karcinomem prsu s prokázanými metastázami v lymfatických uzlinách. Prognostický význam průkazu overexprese HER-2/neu u pacientek bez metastáz v lymfatických uzlinách není jednoznačně objasněn (11, 13). Přesné stanovení amplifikace a overexprese genu HER-2/neu nabývá na významu. Expres HER-2/neu není u karcinomu prsu pouze prognostickým faktorem, ale rovněž markerem umožňujícím predikci odpovědi na různé terapeutické modalilty. Celá řada klinických studií se zabývala vztahem amplifikace a overexprese genu HER-2/neu a citlivostí karcinomů prsu na různé druhy terapií (26). Důraz je v poslední době kladen na rozvoj imunoterapeutických přístupů v léčbě invazivních karcinomů prsu. Preklinické studie prokázaly inhibici růstu nádorových buněk karcinomu prsu *in vitro* při použití myší monoklonální protilátky 4D5 (15). Tato protilátka, která se váže na extracelulární doménu HER-2/neu, byla humanizována a vyprodukována protilátka IgG1 obsahující v komplementaritě určitých oblastech elementy výchozí protilátky myší (16). Následně preklinické a klinické studie s touto rekombinantní protilátkou rhuMAB HER-2 (trastuzumab, Herceptin<sup>®</sup>) prokázaly antiproliferační efekt na buňky karcinomu prsu *in vitro*, který může být zvýšen v kombinaci s některými chemoterapeutiky (16, 23, 25). Z výše uvedeného vyplývá nutnost vypracování vysoce senzitivních a specifických metodik na průkaz amplifikace a overexprese HER-2/neu. K určení statusu HER-2/neu byla použita celá řada metod detekujících jednak genovou amplifikaci (Southern blotting, slot blot, polymerase chain reaction, *in situ* hybridizace, fluorescenční *in situ* hybridizace), jednak metody hodnotící overexpresi mRNA (Northern blotting, slot blot) či metody hodnotící overexpresi HER-2/neu na úrovni proteinu (Western blotting, immunoassaye a metody imunohistochemické). Většina z těchto metod neumožňuje zpracování formalinem fixovaného v parafínu zalitého materiálu a nemohou být tudíž prováděny na archívním materiálu. Metodiky fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) detekující počet kopií genu HER-2/neu v buňce a metodiky imunohistochemické detekující úroveň exprese HER-2/neu tuto nevýhodu nemají a s jejich pomocí lze úspěšně detekovat amplifikaci a overexpresi HER-2/neu na materiálu standardně zpracovaném pro histologické vyšetření (14). Proto se tyto dvě metody stávají metodami volby pro průkaz HER-2/neu amplifikace a overexprese na formol-parafinovém materiálu pro diagnostické účely. Cílem naší studie byl průkaz validity metod imunohistochemických (IHC) ve srovnání s metodou fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) na formol-parafinovém materiálu.

## Materiál a metody

Retrospektivně jsme vyšetřili soubor 60 pacientek s invazivním karcinomem prsu operovaných ve FN Brno (pracoviště

porodnice) v roce 1999. Soubor zahrnoval 45 invazivních ductálních karcinomů blíže neurčených, 2 invazivní ductální karcinomy komedonového typu, 2 ductální mucinózní karcinomy, 4 tubulární karcinomy, 1 čistý mucinózní karcinom, 2 smíšené invazivní karcinomy se složkou ductální i lobulární, 3 invazivní lobulární karcinomy a 1 atypický medulární karcinom. Pro IHC vyšetření jsme použili diagnostický kit DAKO HercepTest<sup>™</sup> (obsahující polyklonální protilátku proti vnitřní doměně proteinu HER-2/neu) a tři monoklonální protilátky: NCL-c-erbB-2-316, NCL-CB11 (proti vnitřní doměně proteinu HER-2/neu) a NCL-c-erbB-2-356 (proti zevní doměně proteinu HER-2/neu) firmy Novocastra. Současně jsme testovali vliv tzv. retrievalu antigenu ve vodní lázni nepocháním tohoto kroku v metodickém postupu. Počet kopií genu HER-2/neu v nádorových buňkách jsme detekovali pomocí diagnostického kitu INFORM-HER-2/neu Gene detection Systém<sup>®</sup>, (Ventana). Metoda FISH se vyznačuje vysokou senzitivitou, reprodukovatelností a přesností při použití na formol-parafinovém archívním materiálu a je metodou volby pro průkaz amplifikace genu HER-2/neu ve standardně histologicky zpracovaných tkáňových řezech (18).

## Průkaz amplifikace genu HER-2/neu metodou FISH

Metoda i hodnocení bylo prováděno přesně podle pokynů výrobce a distributora diagnostického kitu INFORM-HER-2/neu Gene Detection Systém<sup>®</sup> (Ventana) uvedených v „Procedure and Interpretation Guide“.

Tkáňové řezy 4 $\mu$ m silné, na elektrostaticky upravených sklech (Superfrost Plus, Menzel, SRN) byly sušeny přes noc při teplotě 65 °C, standardně odparafinovány a natráveny v Protein Digestion Solutin (Ventana). Po dehydrataci řezy bylo aplikováno 10 $\mu$ l biotinylované HER-2/neu proby a provedena denaturace při 75 °C. Hybridizace probíhala přes noc ve vlhké komůrce při teplotě 37 °C, druhý den byla nespecificky navázaná proba vymyta v roztoku obsahující 50% formamid a bylo přistoupeno k detekci a amplifikaci získaných signálů. V dalším kroku byl aplikován fluoresceinem značený avidin vyznačující se chemickou vazbou na biotin konjugovaný na probu. Biotinem značená anti-avidovaná protilátka se v dalším kroku váže na fluoresceinem značený avidin navázaný na biotinylovanou probu, což umožňuje zesílení fluorescenčního signálu po aplikaci dalšího fluoresceinem značeného avidinu. V každém běhu jsem používali pozitivní a negativní kontroly. Jaderná DNA byla dobarvena DAPI/Antifadem. K hodnocení jsme používali fluorescenční mikroskop Nikon Eclipse E1000 vybavený FITC a DAPI filtrem a systém obrazové analýzy LUCIA<sup>®</sup>.

Hodnotili jsme fluorescenční signály celkem ve 40 buňkách, ve dvou oddělených oblastech vždy po 20 buňkách v rámci jednoho tkáňového řezu. Pro lepší orientaci v tkáňovém řezu jsme používali paralelní tkáňové řezy obarvené hematoxylinem-eosinem. Hodnotili jsme signály v nepřekrývajících se intaktních náhodně vybraných buňkách. Tumory s počtem signálů na buňku  $\leq 4$  jsme hodnotili jako neamplifikované. Tumory s počtem signálů na buňku  $>4$  byly hodnoceny jako amplifikované (obr. 5-7).

## Průkaz overexprese HER-2/neu metodami IHC

Pro vyšetření imunohistochemická jsme využili diagnostický kit HercepTest<sup>™</sup> firmy DAKO obsahující králičí polyklonální protilátku proti vnitřní doměně proteinu HER-2/neu (anti-human ERBB2-oncoprotein, Code No. A0485, DAKO) a tři myší monoklonální protilátky firmy Novocatra (NCL-c-erbB-2-316 a NCL-CB11 proti vnitřní doměně proteinu HER-2/neu a NCL-c-erbB-2-356 proti zevní doměně proteinu HER-2/neu). Při práci s kitem HercepTest jsme postupovali přesně podle pokynů výrobce uvedených v „DAKO HercepTest Quick Guide“. Neutrálním 10% pufovaným formalinem fixované v parafínu zalité tkáňové bloky byly nařezány na mikrotomu na tkáňové řezy o tloušťce 4-5 $\mu$ m, standardně odparafinova-

ny a rehydratovány. Ve vodní lázni obsahující Epitope retrieval solution a destilovanou vodu v poměru 1:10 předehřáté na 95-99 °C byly za účelem tzv. oživení antigenů řezy inkubovány po dobu 40 minut. Následovala aplikace blokátoru endogenní peroxidázy a 100µl vlastní králičí polyklonální protilátky (předředěné výrobcem, ready to use) nebo Negative Control Reagent. K vizualizaci vazby antigen-protilátka byl využit DAKO EnVision™ systém (HRP.Rabbit DAB+, obr.B), kde se jako chromogen využívá diaminobenzidin (DAB), který po finální peroxidázové enzymatické reakci dává pozitivní hnědé zbarvení. K dobarvení jader nádorových buněk byl použit hematoxylin. Preparáty byly hodnoceny ve světelném mikroskopu podle kritérií daných výrobcem diagnostického kitu nezávisle dvěma patologi. Obdobně jsme postupovali při imunohistochemickém vyšetření s monoklonálními protilátkami NCL-c-erbB-2-316 (ředění 1:100), NCL-CB11 (ředění 1:100) a NCL-c-erbB-2-356 (ředění 1:50) firmy Novocastra. Na těchto protilátkách jsme současně testovali vliv retrievalu antigenu ve vodní lázni, provedený stejným způsobem jako při použití diagnostického kitu HercepTest DAKO™. Reakce antigen-protilátka byla vizualizována systémem EnVision™ DAKO (K 4006 HRP.Mouse DAB+). Hodnocení bylo prováděno podle stejných kritérií jako při použití diagnostického kitu DAKO HercepTest™ nezávisle dvěma patologi. 0 negativní případy vykazovaly částečnou membránovou pozitivitu v méně než 10% nádorových buněk (obr. 1), 1+ pozitivní případy jsou charakterizovány slabou, rovněž pouze částečnou membránovou pozitivitou ve více než 10% nádorových buněk (obr. 2). 2+ pozitivní případy vykazovaly slabě až středně intenzivní membránovou pozitivitu ve více než 10% nádorových buněk (obr. 3). Pozitivita byla patrná na celých membránách stejně jako u případů 3+ pozitivních, kde silná pozitivní membránová reakce je detekována ve více než 10% nádorových buněk (obr. 4).

### Statistické hodnocení

Korelace mezi frekvencí HER-2/neu pozitivních a negativních případů detekovaná různými metodami při použití různých primárních protilátek a reagensů byla hodnocena pomocí kontingenčních tabulek statisticky analyzovaných Pearsonovým chí kvadrátem (pro kontingenční tabulky 2-6) a Fisherovým exact testem s Yatesovou korekcí (pro kontingenční tabulky 2x2). Dále jsou dopočítány hodnoty specifity, senzitivity, efektivity, prediktivní hodnota pozitivního a negativního výsledku a koeficient shody Cohenovo Kappa u jednotlivých IHC metod ve srovnání s FISH.

### Výsledky

Amplifikace byla detekována v 8 ze 60 případů (13,3%) metodou fluorescenční in situ hybridizace. Počet signálů v amplifikovaných případech se pohyboval v rozmezí 4,65 – 13,375 signálů na buňku. Průměrný počet signálů na buňku v amplifikovaných případech se jednalo o invazivní duktální karcinomy, z toho dva komedonového typu, grade 2 nebo 3. Nebyla zastížena amplifikace u karcinomu grade 1. 52 ze 60 případů (86,7%) bylo interpretováno jako neamplifikované s počtem signálů v rozmezí 1,450-3,720 signálů na buňku. Overexprese byla detekována ve 13,3-28,3% případů v závislosti na použité protilátce a metodologii. Všechny IHC negativní případy až na jeden (protilátka CB11 bez antigen retrievalu) byly interpretovány jako neamplifikované ve FISH. Prediktivní hodnota negativního výsledku byla 100% ve všech pozitivních IHC metodických postupech kromě protilátky CB11 bez použití retrievalu antigenu. Perfektní shoda byla zaznamenána mezi výsledky FISH a IHC při použití monoklonálních protilátek NCL-c-erbB-2-316 a NCL-c-erbB-2-356 (Novocastra) v metodickém postupu vynechávajícím retrieval antigenu ve vodní lázni. 95% shodu mezi výsledky FISH a IHC jsme zaznamenali při použití monoklonální protilátky NCL-c-erbB-2-356, kde součás-

**Tabulka 1.** Srovnání protilátek a protokolů z hlediska predikce výsledku FISH

Protilátka, protokol	Efektivita (%)	Senzitivita (%)	Specifita (%)	PH+V* (%)	PH-V** (%)
DAKO Herceptest	85	100	83	47	100
DAKO bez retrievalu §	93	100	92	67	100
Novocastra 316 retrieval	93	100	92	67	100
Novocastra 316 bez retrievalu	100	100	100	100	100
Novocastra 356 retrieval	95	100	94	73	100
Novocastra 356 bez retrievalu	100	100	100	100	100
Novocastra CB11 retrieval	92	100	90	62	100
Novocastra CB11 bez retrievalu	97	88	98	88	98

\* Prediktivní hodnota pozitivního výsledku

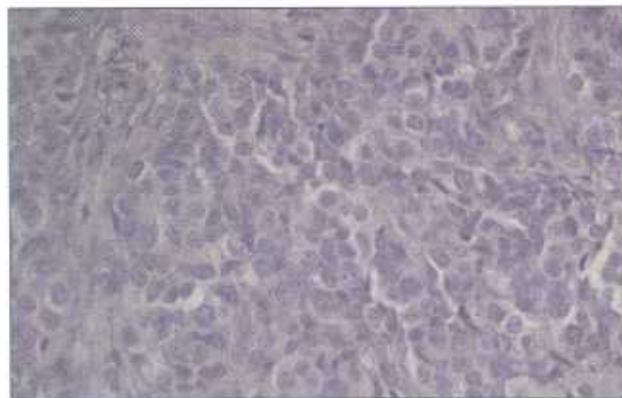
\*\* Prediktivní hodnota negativního výsledku

§ vyšetření opakováno bez retrievalu pro výsledky Herceptestu 1+, 2+, 3+. Výsledky Herceptestu 0 považovány za negativní i pro toto vyšetření

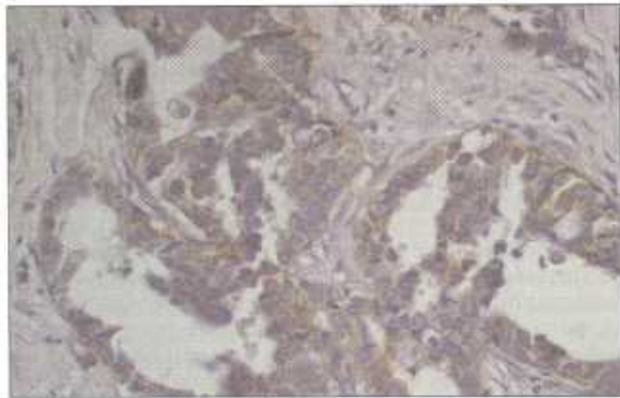
tí použité metodiky byl retrieval antigenu ve vodní lázni (tři 2+ pozitivní případy v této metodě byly interpretovány jako neamplifikované při použití FISH). Výsledky FISH a IHC byly shodné v 93% případů při aplikaci protilátky NCL-c-erbB-2-316 s provedeným retrievalem antigenu (čtyři 2+ pozitivní případy v této metodě byly metodou FISH interpretovány jako neamplifikované). Nejmenší efektivitu vykázal DAKO HercepTest™ (85%). Sedm DAKO HercepTest 2+ pozitivních případů a dva DAKO HercepTest 3+ pozitivní případy byly klasifikovány jako neamplifikované ve FISH. Jeden případ vykazoval pouze úsekovitou overexpresi proteinu HER-2/neu, hodnocenou v různých IHC metodách jako 2+ nebo 3+ pozitivita. Analýza FISH prokázala ve dvou oddělených oblastech tohoto nádoru hraniční amplifikaci genu HER-2/neu s průměrným počtem signálů na buňku 4,75. Hodnocení protilátek a protokolů z hlediska predikce výsledku FISH obsahuje tabulka 1. Je zřejmé že imunohistologie má vysokou senzitivitu a variabilní specifitu podle použitého protokolu. Vzhledem k nižší ceně a metodické náročnosti se tedy jeví jako vhodné screeningové vyšetření.

### Diskuse

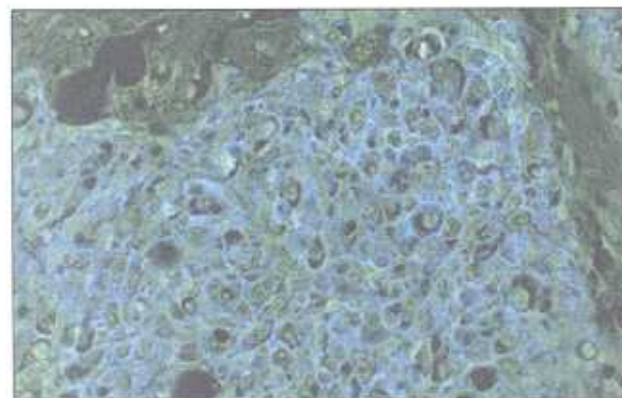
Výsledky naší metodologické studie prokázaly vysokou úroveň korelace mezi metodami IHC a FISH, což je ve shodě s výsledky obdobných recentních komparativních studií (18-22). Procento případů invazivních karcinomů prsu s prokázanou amplifikací a overexpresí genu HER-2/neu nevybočuje z publikovaného rozmezí 10-34% HER-2/neu pozitivních invazivních karcinomů prsu (5,11). Nejmenší efektivitu ve srovnání s FISH vykázal DAKO HercepTest™. Nápadné je zejména vysoké procento 2+ pozitivních případů, které byly metodou FISH interpretovány jako neamplifikované (sedm 2+ pozitivních případů interpretováno metodou FISH jako neamplifikované). Nález je ve shodě s některými studii, které rovněž použily tento diagnostický kit (18, 21) a porovnávaly metody IHC a FISH. Tuto skutečnost lze vysvětlit vyšší senzitivitou polyklonální protilátky obsažené v kitu ve spojení s vysoce citlivým vizualizačním systémem EnVision™. Nelze opomenout skutečnost, že v literatuře je uváděno až 10% případů invazivních karcinomů prsu, u nichž zvýšená exprese proteinu HER-2/neu není v souvislosti s amplifikací genu HER-2/neu, ale uplatňují se zde i jiné mechanismy jako aktivace transkripce případně jiné posttranskripční dysregulace (4,17). Naše výsledky získané použitím monoklonálních protilátek při metodickém postupu, který vynechává retrievalu antigenu, však ukazují úplnou shodu mezi amplifikací genu HER-2/neu detekovanou metodou FISH a overexpresí proteinu



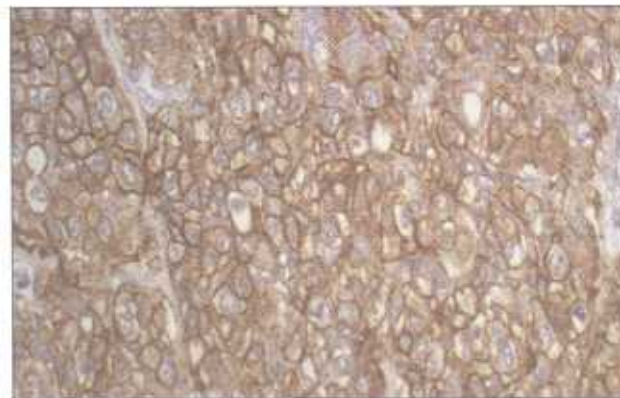
Obr. 1. Imunohistologie HER-2/neu, negativní výsledek, skóre 0



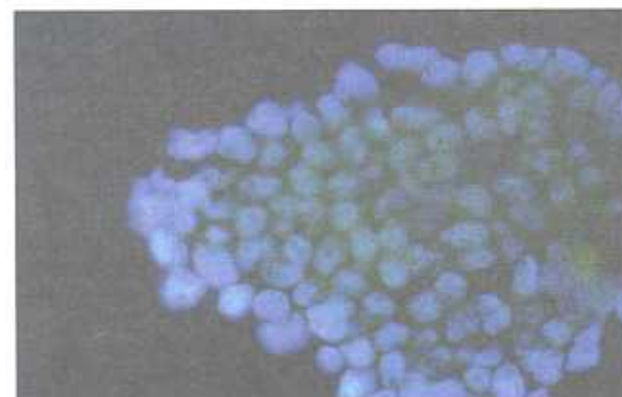
Obr. 2. Imunohistologie HER-2/neu, negativní výsledek, skóre 1+



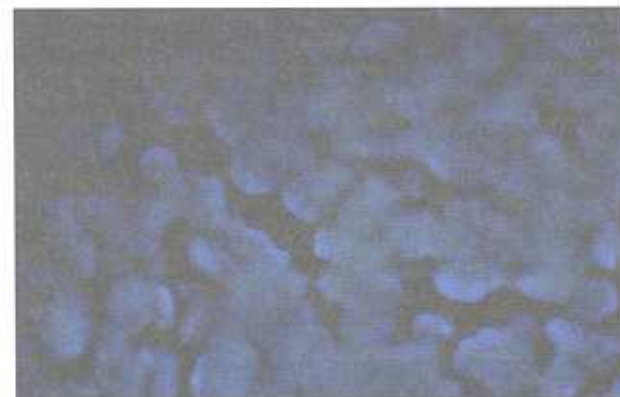
Obr. 3. Imunohistologie HER-2/neu, pozitivní výsledek, skóre 2+



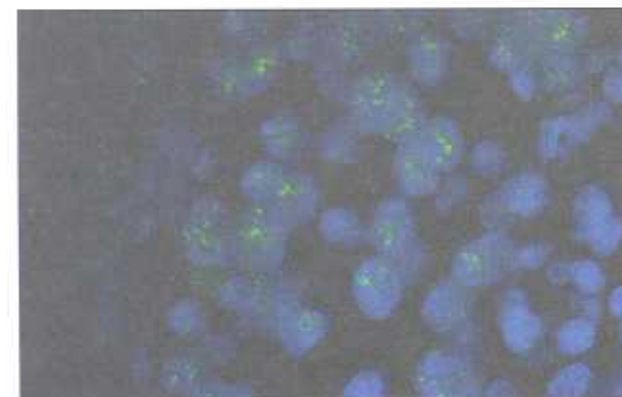
Obr. 4. Imunohistologie HER-2/neu, pozitivní výsledek, skóre 3+



Obr. 5. FISH, bez amplifikace HER-2/neu



Obr. 6. FISH, hraniční amplifikace HER-2/neu



Obr. 7. FISH, amplifikace HER-2/neu



Obr. 8. Navržený algoritmus vyšetření statusu HER-2/neu

Tab. 2

Herceptest versus FISH			
	NA	A	celkem
N	43	0	43
P	9	8	17
celkem	52	8	60

Statistický test		hodnota	SV	PR
Pearsonův chí kvadrát		23,348	1	<0.000
Fisherův exact test		19,454	1	<0.000
S Yatesovou korekcí				
Koeficient shody (Cohenovo kappa)	0,560			
Efektivita				85%
Senzitivita				100%
Specifická				83%
Prediktivní hodnota pozitivního výsledku				47%
Prediktivní hodnota negativního výsledku				100%

Tab. 3

NCL-c-erbB-2-316 (s retrievalem) versus FISH			
	NA	A	celkem
N	48	0	48
P	4	8	12
celkem	52	8	60

Statistický test		hodnota	SV	PR
Pearsonův chí kvadrát		36,923	1	<0.000
Fisherův exact test		31,379	1	<0.000
S Yatesovou korekcí				
Koeficient shody (Cohenovo kappa)	0,762			
Efektivita				93%
Senzitivita				100%
Specifická				92%
Prediktivní hodnota pozitivního výsledku				67%
Prediktivní hodnota negativního výsledku				100%

Tab. 4

NCL-c-erbB-2-316 bez retrievalu) versus FISH			
	NA	A	celkem
N	52	0	48
P	0	8	12
celkem	52	8	60

Statistický test		hodnota	SV	PR
Pearsonův chí kvadrát		60		1
<0.000				
Fisherův exact test		51,658	1	<0.000
S Yatesovou korekcí				
Koeficient shody (Cohenovo kappa)	1,0			
Efektivita				100%
Senzitivita				100%
Specifická				100%
Prediktivní hodnota pozitivního výsledku				100%
Prediktivní hodnota negativního výsledku				100%

HER-2/neu detekovanou určitými IHC metodami. Výjimkou je případ, kde hraniční amplifikace genu HER-2/neu (4.75 signálů na buňku) je provázena klonální úsekovitou overexpresí proteinu HER-2/neu, při níž se mohly uplatnit i výše zmíněné mechanismy aktivace transkripce a posttranskripčních dysregulací. Procento 2+ pozitivních případů interpretovaných v metodě FISH jako neamplifikované je výrazně vyšší i při použití monoklonálních protilátek firmy Novocastra v metodickém postupu, který zahrnuje retrieval antigenu ve vodní lázni (tři 2+ pozitivní s protilátkou NCL-c-erbB-2-356 a čtyři 2+ pozitivní s protilátkou NCL-c-erbB-2-316, 6 2+ a 1 3+ pozitivní s protilátkou NCL-CB11). Porovnání efektu retrievalu antigenu ve vodní lázni na efektivitu IHC metod ve srovnání s FISH nás vede k úvaze o vynechání tohoto kroku v meto-

Tab. 5

NCL-c-erbB-2-356 (s retrievalem) versus FISH			
	NA	A	celkem
N	49	0	49
P	3	8	11
celkem	52	8	60

Statistický test		hodnota	SV	PR
Pearsonův chí kvadrát		41,119	1	<0.000
Fisherův exact test		35,066	1	<0.000
S Yatesovou korekcí				
Koeficient shody (Cohenovo kappa)	0,813			
Efektivita				95%
Senzitivita				100%
Specifická				94%
Prediktivní hodnota pozitivního výsledku				73%
Prediktivní hodnota negativního výsledku				100%

Tab. 6

NCL-c-erbB-2-316 bez retrievalu) versus FISH			
	NA	A	celkem
N	52	0	48
P	0	8	12
celkem	52	8	60

Statistický test		hodnota	SV	PR
Pearsonův chí kvadrát		60	1	<0.000
Fisherův exact test		51,658	1	<0.000
S Yatesovou korekcí				
Koeficient shody (Cohenovo kappa)	1,0			
Efektivita				100%
Senzitivita				100%
Specifická				100%
Prediktivní hodnota pozitivního výsledku				100%
Prediktivní hodnota negativního výsledku				100%

dickém postupu. Tento nález je v rozporu s některými studiemi, které považují retrieval antigenu za nezbytný k získání spolehlivých výsledků imunohistochemických vyšetření formou fixovaných v parafínu zalitých tkání (22). Všechny naše vzorky byly přikrojeny bezprostředně po operaci a fixovány v neutrálním 10% formalínu. Byla dodržována přibližně 24 hodinová doba fixace. Vzorky byly zpracovány v jedné laboratoři a hodnocení prováděno nezávisle dvěma patology. Zůstává otázkou, zda by bylo možné obdržet obdobné výsledky i v případě větší variability ve fixaci a následném zpracování tkáně pro histologické vyšetření (např. při zpracování vzorku získaných z různých nemocnic a laboratoří). Nelze opomenout ani ekonomickou stránku věci. Cena jednoho vyšetření FISH je asi 28x vyšší než cena jednoho IHC vyšetření (19). FISH metody jsou rovněž časově náročnější ve srovnání s IHC a hodnocení výsledků FISH je rovněž pracnější. FISH metody vyžadují nákladný fluorescenční mikroskop a systém obrazové analýzy, i když již existují alternativní postupy (např. kit fy Zymed), umožňující detekci DAB a hodnocení ve světelném mikroskopu, obdobně jako u IHC metod. Ne každé oddělení patologie je vybaveno materiálně i profesionálně na metodiky FISH, IHC je však většinou již metodou rutinní. Výše uvedené důvody nás vedly k vypracování této srovnávací metodologické studie a k hledání metod imunohistochemických, jejichž validita je srovnatelná s metodou fluorescenční in situ hybridizace.

### Závěr

Na základě výsledků naší studie jsme dospěli k názoru že, imunohistochemická detekce stavu exprese HER-2/neu je závislá na nastavení senzitivity IHC reakce a případném retrievalu antigenu. Vysoká úroveň exprese HER-2/neu (3+ pozitivní případy) a normální exprese HER-2/neu (0, 1+ negativní případy)

mohou být spolehlivě detekovány imunohistochemicky při použití optimalizovaných postupů. Imunohistologii lze, vzhledem k vysoké senzitivitě této metody, nižší ceně a metodické náročnosti používat jako screeningové vyšetření statusu HER-2/neu. Případy s hraničním výsledkem imunohistochemického vyšetření (zejména 2+ pozitivní případy) by pak měly být vyšetřeny IHC extenzivněji (více protilátek, srovnání výsledků s retrievalem a bez něj), případně vyšetřeny FISH před vyslovením konečného stanoviska. Tato vyšetření by měla provádět pracoviště, která mají k dispozici metodiku in situ hybridizace k průběžné kalibraci a kontrole výsledků. Navrhujeme proto algoritmus vyšetření statusu HER-2/neu zahrnující IHC jako

screeningové vyšetření s použitím in situ hybridizace pouze k verifikaci imunohistologicky hraničních případů (Obr. 8). Pro zařazení do klinických studií by dle našeho názoru měly být pacientky stratifikovány do tří skupin (1. skupina: HER-2/neu pozitivní; 2. skupina: amplifikaci a overexpresi nelze jednoznačně vyloučit; 3. skupina: HER-2/neu negativní).

#### Poděkování

Práce vznikla s materiální podporou českého zastoupení firmy Roche, dále byla podporována Výzkumným záměrem MZ ČR 000 65 26 17 05. Autoři dále děkují Markétě Smolové za zhotovení celkem asi 600 imunohistologických preparátů.

#### Literatura:

- Bargmann CI, Hung MC, Weinberg RA. The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor related protein. *Nature* 1986, 319, 226-230
- Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ulrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relaps and survival with amplification of HER-2/neu oncogen. *Science* 1987, 235, 177-182
- Van de Vijver MJ, Mooi WJ, Peterse JL, Nusse R. Amplification and overexpression of the neu oncogene in human breast carcinomas. *Eur J Surg. Oncol* 1988, 14, 111-114
- Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, et al. Studies of HER-2/neu proto-oncogene in human breast ovarian cancer. *Science* 1989, 244, 707-712
- Shi D, He G, Cao S, Pan W, Zhang HZ, Yu d, et al. Overexpression of the c-erbB-2/neu encoded p185 protein in primary lung cancer. *mol carcinog.* 1992,5,213-218
- Albino AP, Jaehne J, Altorki a, Blundell M, Urmacher C, Lauwers G, et al. Amplification of HER-2/neu gene in human gastric carcinomas: correlation with primary site. *Eur J Surg. oncol* 1995, 21, 56-60
- Hetzel DJ, Wilson TO, Keeney GL. HER-2/neu expression: A major prognostic factor in endometrial cancer. *Gynecol oncol* 1992, 47, 179-185
- Brandt B, vogt u, Schlotter CM, Jackisch C, Werkmeister R, Thomas M, et al. Prognostic relevance of aberrations in the erbB oncogenes from breast, ovarian, oral and lung cancers: double differential polymerase chain reaction (ddPCR) for clinical diagnosis. *gene* 1995, 159, 35-42
- Swanson PE, Frierson-HF J, Wick MR. c-erbB-2 (HER-2/neu) oncoprotein immunoreactivity in localised, high-grade transitional cell carcinoma of the bladder. *Mod. Pathol* 1992, 5, 531-536
- Revillion F, Bonnetterre J, Peyrat JP. ERBB2 oncogene in human breast cancer and its clinical significance. *Eur J Cancer* 1998, 34, 791-808
- Naber SP, Tsutsumi Y, Yin S, et al. Strategies for the analysis of oncogene overexpression. Studies of the neu oncogene in breast carcinoma. *Am J Clin Pathol* 1990, 94, 125-136
- Ross JS, Fletcher JA. the HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. *Stem cells* 1998, 16, 413-428
- Press MJ, Bernstein L, Thomas PA et al. Her-2/neu gene amplification characterized by fluorescence in situ hybridisation: poor prognosis in node-negative breast carcinomas. *J Clin Oncol* 1997, 15, 2894-2904
- Lewis GD, Figari I, Fendly B, Wong WL, Carter P, Gorman C, Shepard HM (1993) Differential responses of human tumor cell lines to anti-p185HER2 antibodies. *Cancer Immunol Immunother* 37:255
- Carter P, Presta L, Gorman CM, Ridgway JB, Henner D, Wong WL, Rowland AM, Kotts C, Carver ME, Shepard HM (1992) Humanization of an anti-p185HER-2 antibody for human cancer therapy. *Proc natl Acad Sci USA* 89:4285
- Pegram M, Hsu S, Lewis G, Pietras R, beryt M, Skliwowski M, Coombs D, Baly D, Kabbinnar F, Slamon D (1999) Inhibitory effects of combinations of HER-2/neu antibody and chemotherapeutic agents used for treatment of human breast cancers. *Oncogen* 18:2241
- Pauletti G, Godolphin W, Press MF, Slamon DJ. detection and quantification of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using FISH. *oncogene* 1996, 13, 63-72.
- Wang S, Saboorian MH, Frenkel E, Hynan L, Gokaslan ST, Ashfaq R (2000) Laboratory assessment of the status of HER-2/neu protein and oncogene in breast cancer specimens: comparison of immunohistochemistry assay with fluorescence in situ hybridisation assays. *J Clin Pathol* 2000,53,374-381
- Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H, Barnes M, Schnitt SJ (1999) Comparison of fluorescence in situ hybridisation and immunohistochemistry for the evaluation of HER-2/neu in breast cancer. *J Clin Oncol.* Vol 17, No7, 1999, 1974-1982
- Jimenez RE, Walli T, Tabaszka BS, Visscher DW (2000) Determination of HER-2/neu status in breast carcinoma: Comparative analysis of immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. *Mod Pathol* 2000, 13(1):37-45
- Bankfalvi A, Simon R, Brandt B, Burger H, Vollmer I, Dockhorn-Dvorniczak B, Jelle RJ, Bocker W (2000) Comparative methodical analysis of ERBB2/HER-2 gene dosage, chromosomal copy number and protein overexpression in breast carcinoma tissues for diagnostic use. Accepted for publication in *Histopathology*
- Haerslev T, Jacobsen GK: Microwave processing of formalin fixed paraffin-embedded sections improves the immunoreactivity of c-erbB-2 oncoprotein in breast cancer. (1993) *Appl Immunohistochem.* 1:223-226
- Lebwohl DE, Canetta R :New developments in chemotherapy of advanced breast cancer. (1999) *Ann Oncol.* 10Suppl 6, 139-146
- Gilewski T, Seidman A, Norton L, Hudis C: An immunotherapeutic approach to treatment of breast cancer: focus on trastuzumab plus paclitaxel. *Breast Cancer Medicine Service* (2000) *Cancer Chemother Pharmacol.* 46(Suppl):S23-S26
- Stebbing J, Copson E, O'Reilly S: Herceptin (trastuzumab) in advanced breast cancer. (2000) *Cancer Treat Rev.* Aug, 26(4):287-90
- Piccart MJ, Di Leo A, Hamilton A: HER2: a "predictive factor" ready to use in the daily management of breast cancer patients ? (2000) *Eur J Cancer.* 36, 1755-61