

Egyetemi doktori (Ph.D) értekezés

Az emlőrák HER2 diagnosztikájának aktuális kérdései

dr. Egervári Kristóf

Témavezetők:
Prof. Dr. Nemes Zoltán
Dr. Szöllősi Zoltán

Debreceni Egyetem
Orvos- és Egészségtudományi Centrum
Pathológiai Intézet
2008.

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések jegyzéke	3
1. Bevezetés	4
2. Célkitűzések	8
3. Irodalmi áttekintés	9
a. Szöveti microarray-ek	9
b. Emlőrákok HER2 diagnosztikája	12
4. Anyagok és módszerek	18
a. Esetek kiválasztása	18
b. Szöveti microarray-ek	18
c. Immunhisztokémia	20
d. Fluoreszcencia in situ hibridizáció	22
e. Statisztikai elemzés	24
5. Eredmények	25
a. Szöveti microarray-ek validálása	25
b. A HER2 diagnosztikában használatos immunhisztokémiai antitestek összehasonlítása szöveti microarray-eken	28
6. Megbeszélés	34
7. Összefoglalás	41
Irodalomjegyzék	43
A munka alapjául szolgáló közlemények	52
Egyéb, jelen munkában nem használt közlemények jegyzéke	52
Köszönetnyilvánítás	54
Mellékletek	55

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ADCC	- antitest dependens celluláris citotoxicitás
ASCO	- American Society of Clinical Oncologists
bioHER	- biotinilált trastuzumab
c-erbB2	- celluláris erythroblastos leukémia onkogén homológ-2
CISH	- chromogen in situ hibridizáció
DAB	- 5% 3,3'-diaminobenzidin-tetrahidroklorid
DAPI	- 4',6-diamidin-2'-fenilindol-dihidroklorid
DCIS	- ductalis carcinoma in situ
DNS	- dezoxiribonukleinsav
EGF	- epidermális növekedési faktor
EGFR	- epidermális növekedési faktor receptor
ERBB2	- virális erythroblastos leukémia onkogén homológ-2
FDA	- Food and Drug Administration
FISH	- fluoreszcencia in situ hibridizáció
HE	- hematoxylin-eosin festés
HER1	- humán epidermális növekedési faktor receptor 1-es típus
HER2	- humán epidermális növekedési faktor receptor 2-es típus
HER3	- humán epidermális növekedési faktor receptor 3-as típus
HER4	- humán epidermális növekedési faktor receptor 4-es típus
IHC	- immunhisztokémia
neu	- neuro/glioblastoma eredetű onkogén
PCR	- polimeráz láncreakció
qPCR	- kvantitatív polimeráz láncreakció
RNS	- ribonukleinsav
RT-PCR	- reverz-transzkriptáz polimeráz láncreakció
SISH	- silver-enhanced in situ hibridizáció
TMA	- tissue microarray, szöveti microarray

1. BEVEZETÉS

Az emlőrák világviszonylatban fontos morbiditási tényező. Magyarországon a nők leggyakoribb daganata, amely hozzávetőleg 8000 új megbetegedést jelent évente, és összességében a nők halálozásának mintegy 15.7%-át teszi ki. [1] Az emlőrák tekintetében a terápiás és diagnosztikus lehetőségeink igen előrehaladtak, de továbbra is kiemelt fontosságú kutatási irányvonalat képviselnek.

Az emlőrákok pathológiai diagnosztikájában a szövettani típus, a TNM státusz, valamint a hisztológiai grádus megállapítása mellett rutinszerűen prognosztikai és kezelést befolyásoló vizsgálatok végzendők, mint például a p53 mutáció, a proliferációs aktivitás vagy az ösztrogén-, progeszteronreceptor státusz immunhisztokémiai vizsgálata. Utóbbi rutinvizsgálatok közé tartozik a HER2 (ERBB2, c-erbB2, neu) státusz megállapítása is, mely fontos terápiás jelentőséggel bír.

Molekuláris pathológiai megközelítés szerint az emlőrákok átfogó génexpressziós tanulmányok alapján feloszthatók különböző csoportokra. Az ösztrogénreceptor pozitív csoporton belül elkülöníthető az ún. luminal 1-es, luminal 2-es és a luminal 3-as típus, melyekre alapvetően jobb prognózis és hormonális terápiára adott kedvező válasz jellemző. Az ösztrogénreceptor negatív tumorok többnyire rosszabb kimenetelűek és kezelésük is nehezebb. Ezen hormonreceptor negatív csoport tovább bontható basal-like 1-es, basal-like 2-es valamint az úgynevezett HER2/neu alcsoportokra. [2]

A HER2 fehérje egy 185 kD molekulasúlyú, tirozin kináz aktivitással bíró, transzmembrán növekedési faktor receptor, mely az I-es típusú tirozin-kináz növekedési faktor receptorok családjába tartozik. Génje a 17-es kromoszóma hosszú karján helyezkedik el (17q12-21.32), s genetikailag közelebb áll az epidermális növekedési faktor receptorhoz (EGFR, HER1), mint a receptorcsalád egyéb tagjaihoz. [3] A jelenlegi ismeretünk szerint in vivo önálló specifikus ligandja nincs, funkcióit a receptorcsalád egyéb tagjaival (HER1, HER3 és HER4) képzett heterodimerek tagjaként fejtik ki olyan extracelluláris fehérjékre adott celluláris válasz elindítójaként, mint például az epidermális növekedési faktor (EGF). [4]

A HER2 biológiája komplex; a heterodimertől függően a HER2 számos sejtfolyamatban vehet részt, úgy a differenciáció elindításában, mint a proliferáció fokozásában; valamint fontos szerepe van a sejtek túlélésében, a sejtmotilitásban és az invázió szabályozásában is. [5] A HER2 fehérje fokozott expressziója, melynek hátterében 90%-ban génamplifikáció áll, elsősorban a magasabb szövettani grádusú, agresszívabb, hamarabb metasztatizáló tumorokban figyelhető meg. A HER2 pozitív tumorok anthracyclin alapú kemoterápiára fokozott, míg fluorouracyl alapú kemoterápiás protokollokra csökkent érzékenységet mutatnak.

A HER2 gén az invazív emlőrákok 10-30%-ában amplifikált. HER2 amplifikáció és overexpresszió gyakrabban figyelhető meg 2-es, 3-as grádusú invazív ductalis carcinomákban és high-grade in situ ductalis carcinomákban (DCIS), ugyanakkor ritkán figyelhető meg lobularis carcinomákban (kivéve a lobularis carcinoma pleiomorph variánsát). [5]

Az agresszív HER2 pozitív emlőrákok kezelésében forradalmi váltást hozott, hogy 1998-ban az amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hivatal (Food and Drug Administration, FDA) törzskönyvezte a trastuzumabot (Herceptin®), a HER2 extracelluláris doménja elleni monoklonális antitestet, mint célterápiás ágens. A trastuzumab egy egér-humán kiméra antitest, mely csupán 5%-ban tartalmaz egér eredetű fehérjét. Hatásmechanizmusa szerteágazó; a p27 upregulációja révén a sejtciklust G1 fázisban leállítja, triggereli az antitest-dependens celluláris citotoxicitást (ADCC), fokozza a HER2 downregulációját a sejtfelszínről, stimulálja a funkcióképtelen HER2 homodimerek kialakulását és részlegesen megelőzi a heterodimer formációt, gátolja a posztreceptor intracelluláris jelátvitelt, gátolja az angiogén faktorok termelését és számos citotoxikus ágens aktivitását fokozza. [6]

A biológiai terápia eleinte áttéttel rendelkező, HER2 pozitív emlőrákok kezelésében bizonyult hatásosnak mind önállóan, mind pedig kombinációkban alkalmazva. A legeffektívebb kombináció paclitaxellel érhető el, mely kombinációt alkalmazva hosszabb túlélés és nagyobb terápiás válasz jelentkezik, mint a paclitaxel kemoterápiát önállóan alkalmazva. [7] A trastuzumab kezelés optimális időtartama egyelőre nem meghatározott, azonban megfelelő terápiás válasz általában 9-12 hónapon át nyerhető, utána szerzett rezisztencia alakulhat ki. Többnyire helytálló megállapítás, hogy bármilyen terápiás válasz csak azoktól a tumoroktól várható, melyekben erős HER2 expresszió (3+) vagy még inkább HER2 génamplifikáció igazolható. [8-12]

A trastuzumab alkalmazása azonban számos mellékhatással is bír, melyek közül kiemelendő a cardiotoxicitás, különösen doxorubicin vagy paclitaxel együttes alkalmazása mellett, s ezenfelül a kezelés költségei sem elhanyagolhatóak. [13] Érthető tehát, hogy az emlőrákok pathológiai diagnosztikája során egyik fő célunk, hogy biztonsággal meghatározzuk, melyik beteg esetében várható terápiás előny a trastuzumab alkalmazásától. Ennek érdekében számos vizsgálat folyt és folyik, időről időre új módszerek és ajánlások jelennek meg, melyek alapján a terápia-központú daganatdiagnosztika egyre korszerűbbé és megbízhatóbbá válik.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Jelen dolgozatomban a HER2 diagnosztika korszerűsítésének lehetőségeit és ezek rutin alkalmazhatóságáról szerzett tapasztalatainkat kívánom ismertetni az alábbi pontok alapján:

- szöveti microarray-ekből készült metszetek HER2 immunhisztokémiai és fluoreszcencia in situ hibridizációs vizsgálatának beállítása,
- a fenti eljárások rutindiagnosztikában való alkalmazhatóságának vizsgálata,
- 6 különböző, kereskedelmi forgalomban kapható HER2-ellenes immunhisztokémiai antitest összehasonlító vizsgálata,
- egy megfelelően érzékeny és specifikus diagnosztikus algoritmus ajánlása az emlőrákok HER2 státuszának rutinvizsgálatára.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.a. Szöveti microarray-ek

Battifora "sausage block" (1986) és "checkerboard" (1990) elnevezésű multiblokkjai abban az időben még úttörő eljárások voltak, de egyes laboratóriumokban már akkor is használták immunhisztokémiai antitestek tesztelésére. [14-15] Kononen és munkatársai 1998-ban használták először a 'tissue microarray' (szöveti microarray, TMA) elnevezést, mely azóta is fennmaradt a multiblokkok egyezményes neveként, bármilyen technikával készüljenek is. [16]

A szöveti microarray technika azt jelenti, hogy egyetlen recipiens paraffin blokkba számtalan — 10-től akár 1000-ig — különböző donor-blokkból származó szövethengert építünk be meghatározott koordináták szerint egy erre alkalmas berendezéssel, s az így elkészült multiblokkból készített TMA metszeteken kivitelezhetők ugyanazok a vizsgálatok, amelyeket nagylemezes metszeteken végezhetünk. A szövethengerek átmérője 0.6 mm-től 3 mm-ig terjedhet a legáltalánosabban használt rendszerekben, s ez, valamint az egymáshoz viszonyított távolság korlátain belül helyezhetünk el tetszőleges számú szövethengert a recipiens blokkba. Egy recipiens blokkból akár 100 metszet is készíthető, s mivel párhuzamosan akár több egymással identikus recipiens blokk is építhető, tovább növelhetjük a készíthető metszetek számát, mely számos párhuzamos immunhisztokémiai vagy in situ hibridizációs vizsgálat elvégzését és eredményeinek összevetését teszi lehetővé. [17-18] A szöveti microarray-ek alkalmazása a fentieknek megfelelően számtalan

előnnyel bír. Átfogó vizsgálatok esetén alkalmazásukkal csökken az elvégzendő reakciók száma, ami reagens- és időmegtakarítást jelent, s természetesen előnyösen befolyásolja a költségeket. [16-18] A szöveti microarray-ek igazi jelentősége azonban a standard körülmények biztosításában rejlik, mely elengedhetetlen feltétel az összehasonlító immunhisztokémiai és in situ hibridizációs vizsgálatok kivitelezésénél. [19]

Mivel a tumorok heterogenitása régóta ismert tény, számos szerző foglalkozott a TMA-k reprezentativitásának kérdésével. Fontos tanulmányukban Kononen és munkatársai ugyanolyan gyakoriságúnak találták a HER2, a c-myc és a cyclin D1 expressziót valamint a 17q23 kromoszómális régió amplifikációját emlőrákokból készült szöveti multiblokkokban, mint amit az irodalom alapján vártak. [16] Ugyanezen tanulmányban tumor phenotypus és génamplifikáció közötti ismert összefüggéseket sikerült megerősíteniük. Hasonló meggyőző érvekkel szolgált a microarray-ek megbízhatóságával kapcsolatban Nocito, valamint Schraml közleménye is. [20-21]

A fentiek alapján azonban a TMA-k elsősorban a nagy számok törvénye szerint adnak megbízható eredményt. Mivel a szöveti microarray-ek eredetileg tumorpopulációk vizsgálatára lettek tervezve, nem lehet elvárni, hogy egy 0.6 mm-es szövethengerekből készült metszet minden esetben megfelelően reprezentálja az eredeti daganatot, s így az egyes betegek szemszögéből nézve a tévedések elengedhetetlenek. Ez a tény a rutindiagnosztikában megengedhetetlen. Gancberg és munkatársai a tumorok heterogenitásának tényéből kiindulva

validálták a HER2 génamplifikáció kimutatását szöveti microarray-eken, és más, későbbi tanulmányokkal összhangban arra a következtetésre jutottak, hogy a TMA-k megbízhatóságát a tumorok különböző helyeiről származó szövethengerek egyidejű vizsgálatával lehet növelni. [22-24] Másik lehetőség a szövethengerek 0.6 mm-es átmérőjének növelése. [25] Kuraya és munkatársai más szemszögből közelítették meg a reprezentativitás kérdését. Elméletük szerint a szöveti heterogenitás szerepe hasonlóképp jelentős egy hagyományos metszet térfogatát viszonyítva a teljes tumor térfogatához, mintha a TMA core-t viszonyítjuk a hagyományos metszethez. [26]

A szöveti microarray-ek mai napig tehát elsősorban a kutatásban kaptak kiemelkedő szerepet, azonban használatuknak más alternatíváit is felvetették már. Kay és munkatársai TMA-kat használtak a HER2 immunhisztokémia és fluoreszcencia in situ hibridizáció (FISH) intézetek belüli és intézetek közötti minőségellenőrzésére, standardizálására. Elképzelésük szerint minden emlőrákot beépítenek TMA-ba, azonban ezek csupán a nagylemezes eredmények validálására és más intézetek HER2 diagnosztikájának kontrollálására szolgálnak. Diaz és munkatársai szintén intézetek közti összehasonlító vizsgálatról számolnak be microarray-ekkel foglalkozó tanulmányukban. [23] Gulmann és munkatársai mini-TMA-kat használtak HercepTest-tel végzett immunhisztokémiai reakcióik belső minőségi ellenőrzésére. [27]

A szöveti microarray-ek igazi rutindiagnosztikai alkalmazhatóságának vizsgálatát munkacsoportunkkal párhuzamosan, azonban tőlünk

függetlenül Sapino és munkatársai végezték. [28] Tanulmányukban 237 emlőrákos eseten nemcsak a HER2 fehérjét és gént, hanem az ösztrogén- és progeszteronreceptor státuszt valamint a Ki-67 indexet is vizsgálták szöveti microarray-eken, és az így kapott eredményeket összevetve a várt összefüggést találták a grádus, a proliferációs aktivitás, a hormonreceptor-expresszió és a HER2 státusz között. Ezen túlmenően pilot study-ként 20 eset TMA-val nyert immunhisztokémiai és fluoreszcencia is situ hibridizációs eredményeit összehasonlítva a hagyományos metszetek eredményeivel szintén kiváló egyezést tapasztaltak, ez azonban az alacsony esetszám miatt statisztikailag nem tekinthető megbízhatónak.

3.b. Emlőrákok HER2 diagnosztikája

A HER2 státusz meghatározása nem csak prognosztikai, de terápiás szempontból is döntő jelentőségű. Ahogy az 1. táblázatban látható, a HER2 vizsgálható mind DNS, mind RNS valamint fehérjeszinten, melyek közül a rutindiagnosztikában az RNS alapú vizsgálatok egyelőre nem terjedtek el.

Mai napig a HER2 diagnosztikával foglalkozó intézmények számára az elsőszámú eljárás a fehérje vizsgálata immunhisztokémiai reakcióval. Az immunhisztokémia viszonylag könnyen elvégezhető, széles körben hozzáférhető vizsgáló módszer, mely hozzávetőleg 25 éves múltra tekint vissza. Számos előnye mellett hátrányokkal is bír: a reakciók nemritkán alacsony reprodukálhatósága az antitestek és a szövetfeldolgozási

technikák sokrétűségében rejlik, emellett nem elhanyagolható, hogy az értékelés meglehetősen szubjektív.

1. táblázat A HER2 státusz vizsgálati lehetőségei

HER2 génamplifikáció (DNS)	Megnövekedett HER2 mRNS transzkripció (RNS)	HER2 protein overexpresszió (fehérje)
fluoreszcencia in situ hibridizáció (FISH)	reverz transzkriptáz - polimeráz láncreakció (RT-PCR)	immunhisztokémia (IHC)
chromogen in situ hibridizáció (CISH)	northern blot	western blot
polimeráz láncreakció (PCR)		
southern blot		

Hozzávetőleg húsz kereskedelmi forgalomban kapható és számos egyéb, saját fejlesztésű antitest áll jelenleg rendelkezésre, melyek közül egyik sem tekinthető standard eljárásnak, azonban a HercepTest használata a legelterjedtebb. Néhány primer antitest a HER2 fehérje intracelluláris doménjére specifikus (HercepTest, CB11, RM-4B5), másokat az extralluláris domén ellen termeltek (TAB250, CBE356, CBE1); az antitestek lehetnek poliklonálisak (HercepTest=A0485), illetve monoklonálisak (CB11, RM-4B5); egérben, illetve újabban nyúlban előállítottak. A legkorszerűbb antitestek a nyúlban termeltetett monoklonális antitestek, amit általában az irodalmi eredmények is alátámasztanak. [29]

Press és munkatársai sokat citált tanulmányukban 117 ismert HER2 státusszal rendelkező esetet vizsgáltak és bemutatták, hogy a poliklonális R60 és a monoklonális 10H8 antitestek a FISH-nél alig kisebb

pontossággal (97.4% vs. 96.6% és 95.7%) határozzák meg a HER2 státuszt, míg a jól ismert HercepTest és CB11 pontossága 90% alatt maradt. [30]

Ainsworth és munkatársai a HercepTest-nél meggyőzőbbnek találták az extracelluláris domén specifikus, CBE356 elnevezésű monoklonális antitestet, mind pontosság, mind szenzitivitás viszonylatában. [31] Jelentőségüket kiemelő, az amerikai FDA 1998-ban elsőként a HercepTest-et, 2000-ben a Pathway CB11-et majd 2007-ben a Pathway RM-4B5-öt fogadta el és ajánlja a HER2 immunhisztokémiai vizsgálatok megbízható kivitelezésének érdekében. Ezek az úgynevezett farmakodiagnosztikumok elsősorban standardításukkal tűnnek ki a többi antitest közül. Birner és munkatársai ezen antitestek megbízhatóságát bizonyították vizsgálatukkal, mivel úgy találták, hogy az FDA által elfogadott HER2 IHC pontozási és tesztsémák jól korreláltak a FISH eredményekkel. [32] Powell és munkatársai a legutóbb megjelent nyúl monoklonális 4B5-ről (Pathway RM-4B5) bizonyították, hogy magas szenzitivitása és specifitása mellett, használatával az eredmények intézetek közti reprodukálhatósága is magas. [33]

A trastuzumab kötőhelyére egyik extracelluláris domén elleni antitest sem specifikus, így Bussolati munkacsoportja tanulmányukban a trastuzumab biotinilált formáját (biotHER) használta immunhisztokémiai jelölésre. Úgy találták, hogy a biotHER FISH-től független, megbízható tényező a trastuzumab terápiára adott válasz predikciójában. Eredményeik ellenére a biotHER jelölés egyelőre nem terjedt el. [34]

Az immunhisztokémiai pozitivitás háttérében legtöbbször génamplifikáció áll, és mivel az immunhisztokémia nem minden esetben egyértelmű pozitív vagy negatív, a HER2 státusz eldöntésére legtöbbször a HER2 gén vizsgálata is elengedhetetlen. A HER2 gén több módszerrel is vizsgálható, melyek közül a pathologiai diagnosztikában a fluoreszcencia in situ hibridizáció terjedt el leginkább. A FISH magas specificitással rendelkezik és értékelése az immunhisztokémiánál jóval objektívebb. Mind kivitelezéséhez, mind értékeléséhez tapasztalat szükséges, a vizsgálat időigényes, valamint a költségek is magasabbak, mint az immunhisztokémia esetében, azonban néhány tanulmány alapján a terápiás választ megbízhatóbban jelzi előre, mint az IHC. [12]

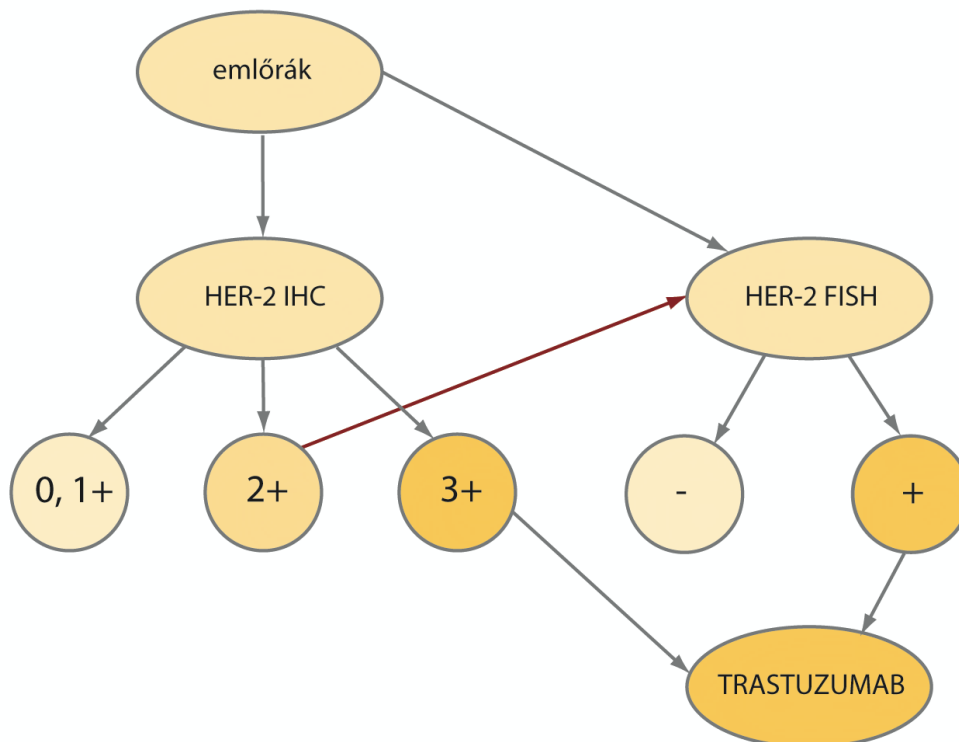
A kereskedelmi forgalomban kapható és legáltalánosabban használt FISH kitek közül vannak úgynevezett dual-color kitek, melyek egyik fluorochrom-mal a HER2 gént, egy másik fluorochrommal pedig a 17-es kromoszómát jelölik a sejtmagokon belül (Vysis PathVysion, DAKO PharmDX), és találhatunk úgynevezett mono-color kiteket, melyek kizárólag HER2 specifikus próbát alkalmaznak (Ventana INFORM Her2/neu). A PathVysion egyik előnye az INFORM Her2/neu-val szemben az, hogy direkt jelölt próbákat használ és így csökken a nem-specifikus jelölődés, a másik előnye pedig, hogy a 17-es kromoszóma poliszómiája elkülöníthető a valódi HER2 amplifikációtól. Egyes szerzők szerint a 17-es kromoszóma poliszómiája nincs hatással a HER2 expresszióra, [9, 35-36] más tanulmányok alapján viszont a gyenge, esetenként erős HER2 expresszióért is felelőssé tehető az aneuszómia amplifikáció hiányában.

[37-39] Ennek függvényében az immunhisztokémia mellett a csak a HER2 régiót vizsgáló FISH megtevéseztő lehet a pathologus számára.

Számos tanulmány foglalkozott a HER2 immunhisztokémiai és a FISH eredmények összefüggésével, valamint azzal, hogy mely esetekben szükséges a genetikai vizsgálat. [10, 24, 40] Az IHC-FISH összefüggés az átmeneti pozitivitást hordozó eseteknél (2+) a legkritikusabb kérdés, és ezen esetek között igen eltérő arányban fordul elő génamplifikáció (26%-83%) a releváns irodalom alapján. [5] Mass és munkatársai szerint a standardizált HercepTest immunhisztokémia alkalmazása esetén csak a közepesen pozitív (2+) eseteket kell FISH-sel tovább vizsgálni, [41] míg Larsimont és munkatársai egy magas szenzitivitású IHC reakcióval minden pozitív esetet (1-3+) FISH vizsgálatnak vetnének alá. [40] Sauer és munkacsoportja felvetik a FISH primer alkalmazásának lehetőségét az immunhisztokémiát elhagyva. [10] Mass és munkatársai másik tanulmányukban pedig megfogalmazták, hogy adataik alapján a FISH a legoptimálisabb módszer a trastuzumab terápiára való alkalmasság eldöntésére. [12] Ezek ellenére az American Society of Clinical Oncology (ASCO) 2007-es ajánlása alapján csak az IHC 2+-es esetek genetikai vizsgálata kötelező, és a 3+-es immunhisztokémia a terápiára való alkalmasságot egyértelműen meghatározza. [42] (1. ábra)

A teljesség kedvéért megemlítendő, hogy a HER2 gén vizsgálatára a FISH helyett egyre elterjedtebben alkalmazzák a chromogén in situ hibridizációt (CISH), valamint a legújabb in situ hibridizációs eljárást, a silver-enhanced in situ hibridizációt (SISH). Előnyük, hogy kiértékelésük a

1. ábra Az emlőrákok HER2 diagnosztikus algoritmus a 2007-es ASCO ajánlás alapján



IHC, immunhisztokémia; FISH, fluoreszcencia in situ hibridizáció

fluoreszcens jelölés elhagyása miatt nem igényel fluoreszcens mikroszkópiát, azonban jelentős hátrányuk, hogy a mono-color FISH-hez hasonlóan a 17-es kromoszómáról nem szerezhető információ ugyanazon metszetben. [43-44]

Az in situ hibridizációs technikák fő alternatívája a DNS alapú valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció (real-time qPCR), mely ugyan folyadék alapú eljárás, és mint ilyen a konvencionális hisztopathológiai módszerektől távol áll, azonban kiemelkedő megbízhatósága, reprodukálhatósága és a vizsgálatok jóval alacsonyabb költsége miatt egyre nagyobb jelentőséggel bír. [45] Erre vonatkozóan saját vizsgálataink folyamatban vannak, azonban ezek részletes ismertetése meghaladná jelen munka terjedelmét.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.a. Esetek kiválasztása

A szöveti microarray-ek validációs vizsgálatához a 2005-2006-os években a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum Pathologiai Intézetében diagnosztizált invazív emlőrákos esetek közül 174 random kiválasztott beteg anyagát dolgoztuk fel.

Az immunhisztokémiai antitestek összehasonlító vizsgálatához az eseteket továbbiakkal egészítettük ki, és így összesen 199 beteg anyagát vontuk be a tanulmányba.

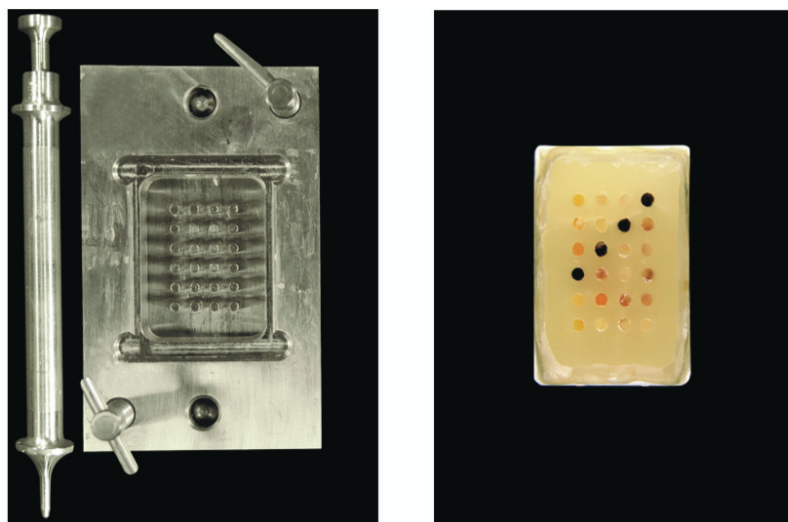
A paraffin blokkokat és a meglévő haematoxylin-eosin (HE) festett és immunhisztokémiai metszeteket kigyűjtöttük, s a meglévő diagnózist ellenőriztük: 174 esetben invazív ductalis carcinoma, 24 esetben invazív lobularis carcinoma és 1 esetben mucinosus carcinoma volt a diagnózis. A betegek adatait táblázatba foglaltuk, a blokkokból szöveti microarray-eket készítettünk.

4.b. Szöveti microarray-ek

A szöveti microarray-eket Kononen és munkatársai eredeti leírása alapján készítettük, az akkori lehetőségeink korlátai miatt szükségszerű módosításokkal. [16] A haematoxylin-eosin festett metszeteken reprezentatív területeket vízálló tintával jelöltünk. A megfelelő blokkok ezen területeiről 3 mm vastag szövethengereket emeltünk ki a pécsi Hisztopathológia Kft. által gyártott 'Manual tissue puncher' szerkezettel. A szövethengereket előre elkészített, 24 lyukkal rendelkező, standard

méretű recipiens blokkba helyeztük a koordinátákat rögzítve. A szöveti microarray-ek validációs vizsgálataihoz készült multiblokkokba minden esetből egy, majd az újonnan készült multiblokkokba tumoronként kettő, különböző helyről származó szövethengert építettünk be, hogy minimalizáljuk a tumorheterogenitás kedvezőtlen hatását. [22] Minden multiblokkba átlós elrendezésben jelölőhengereket (máj- vagy lép szövet) helyeztünk, hogy megkönnyítsük a későbbi mikroszkópos orientációt. A kész multiblokkokat olvasztott paraffinba (T: 56 °C) helyeztük 0.5-1 perc erejéig, hogy a szövet-paraffin átmenet közti rés beolvadjon, és a metszés során ne veszítsünk szövethengereket. (2. ábra)

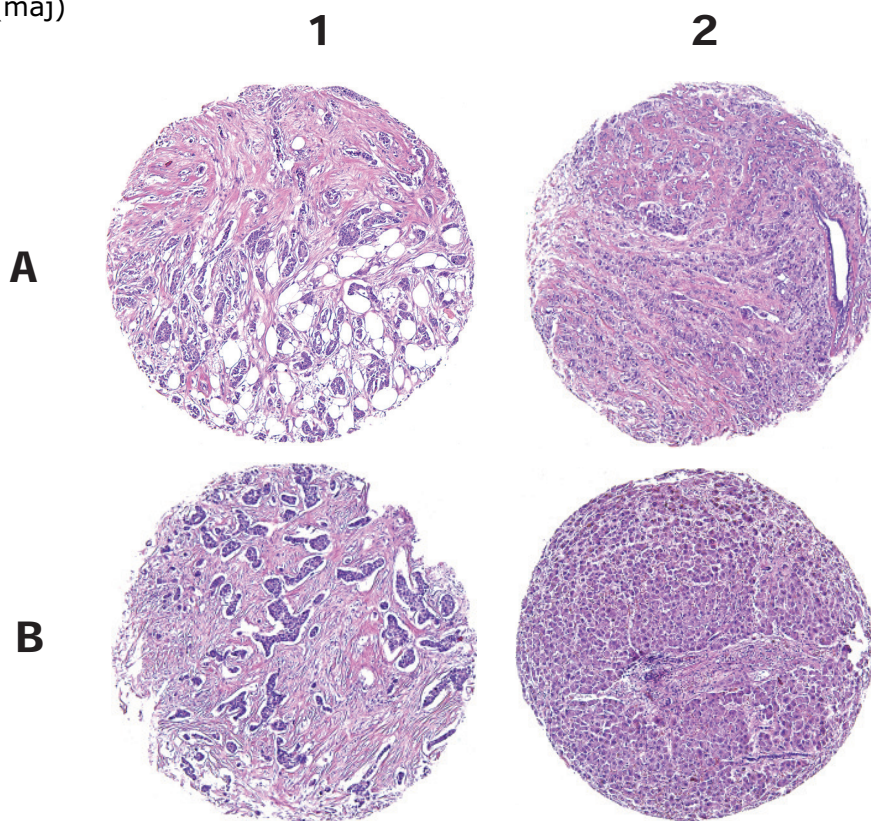
2. ábra Kézi szöveti microarray építő berendezés és multiblokk



Hogy az előkezelési-festési lépések során a TMA core-ok ne sodródjanak le, az elkészült 4 µm vastag metszeteket szilanizált, adhezív tárgylemezre vittük fel. Minden multiblokkból elsőként HE festett metszet készült, melyen felmértük, melyik TMA core nem tartalmaz értékelhető mennyiségű tumorszövetet. Ebben az esetben új

szövethengert építettünk be az adott tumor valamely blokkjából egy másik multiblokkba. (3. ábra)

3. ábra Szöveti microarray részlet (haematoxylin-eosin festés) A1, A2, B1- emlőrák, B2- jelzőanyag (máj)



4.c. Immunhisztokémia

Hat különböző antitesttel és immunhisztokémiai kittel végeztünk immunhisztokémiai reakciókat a TMA-kból készült metszeteken. A felhasznált antitestek gyártók alapján csoportokba rendezve a következők voltak: NCL-CB11, NCL-CBE1, NCL-CBE356 (Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK), Pathway CB11, Pathway RM-4B5 (Ventana Medical Systems Inc, Tucson, AZ, USA), valamint a HercepTest (Dako, Glostrup, Denmark) farmakodiagnosztikai kit. Ezek közül a szöveti microarray-ek validálásához az NCL-CB11 és a HercepTest reakciókat mind hagyományos metszeteken, mind pedig szöveti microarray metszeteken elvégeztük. A többi

immunhisztokémiai reakciót csak TMA-kból készült metszeteken végeztük el. Az immunhisztokémiai reakciókat a gyártó által ajánlott protokoll alapján készítettük, automatizáltan, pozitív és negatív kontroll mellett. Részletes információ a protokollokról és az antitestekről a 2. táblázatban található.

2. táblázat Használt immunhisztokémia antitestek és metodika

Antitest (hígítás)	Forgalmazó	Antigén feltárás	Kromogén	Automatizálás
NCL-CB11 (1:40)	Novocastra	pH:6 Citrát puffer 3' kukta	DAB	Nexes
Pathway CB11 (RTU)	Ventana	pH:6 Citrát puffer 3' kukta	DAB	Nexes
HercepTest (RTU)	DAKO	pH:7.2 Citrát puffer (0.1 mol/L) 40' 95C vízfürdőben	DAB	DAKO Autostainer
NCL-CBE356 (1:40)	Novocastra	nem szükséges	DAB	Nexes
NCL-CBE1 (1:15)	Novocastra	pH:6 Citrát puffer 3' kukta	DAB	Nexes
Pathway RM-4B5 (RTU)	Ventana	pH:6 Citrát puffer 3' kukta	DAB	Nexes

DAB, 5% 3,3'-diaminobenzidin-tetrahidroklorid kromogén oldat; Nexes, Ventana Nexes (Ventana Medical Systems Inc., Tucson, AZ, USA); DAKO Autostainer (DAKO, Glostrup, Dánia); RTU, ready-to-use - használatra kész állapotban

A reakciók értékelésénél a Sapino és munkatársai által kidolgozott pontozási rendszert használtuk. [46] Az immunhisztokémiai metszeteket két bíráló egymástól függetlenül értékelte a membrán pozitivitás jellege és intenzitása alapján. Ha a tumorsejtek több mint 10%-a gyenge vagy középerős és komplett membránpozitivitást mutatott: a reakciót közepesen pozitívnak (2+), ha a tumorsejtek több mint 10%-a erős és komplett membránpozitivitást mutatott: a reakciót erős pozitívnak (3+) minősítettük. Ha a membránpozitivitás hiányzott (0), vagy a tumorsejtek kevesebb mint 10%-ában volt jelen (1+): a reakciót negatívnak vettük. Az

aspecifikus cytoplasmaticus pozitívítást minden esetben figyelmen kívül hagytuk a reakciók értékelésénél.

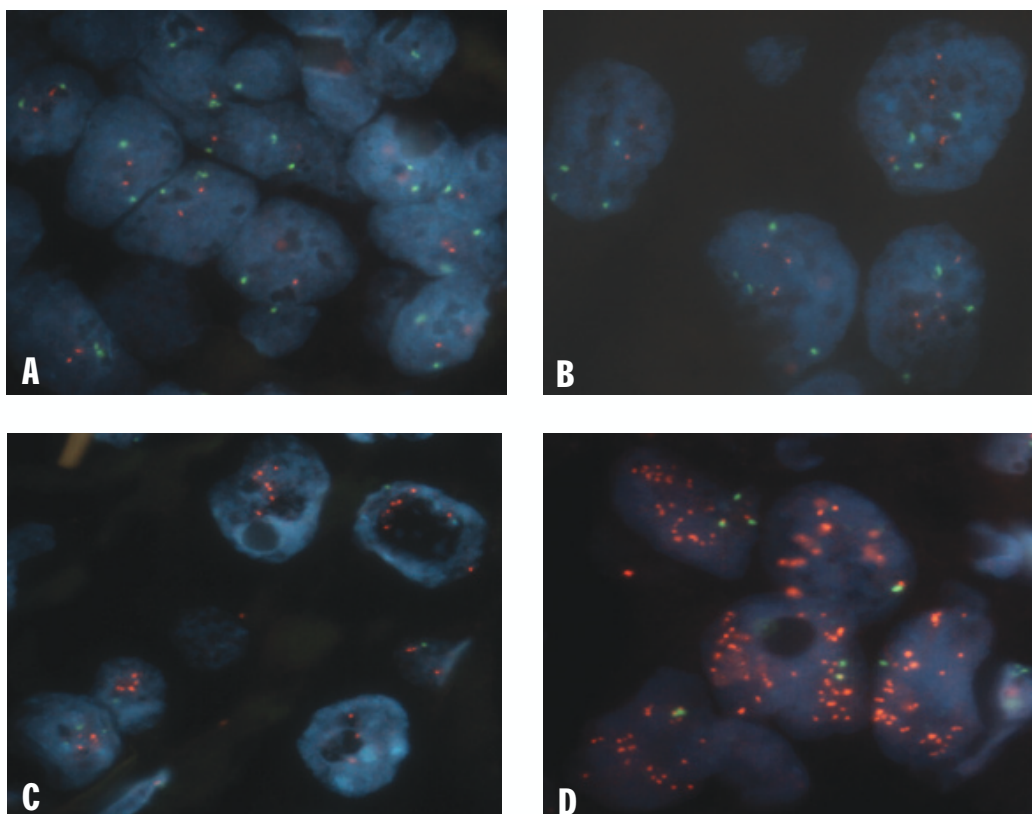
4.d. Fluoreszcencia in situ hibridizáció

A szilanizált tárgylemezen levő 4 µm-es metszeteket deparaffináltuk (xylol - 3x10 perc) és dehidráltuk (abszolút alkohol - 2x5 perc), majd a sejtek előkezelése következett a Paraffin Pretreatment Kit II-vel (Vysis, Des Plaines, IL, USA), a gyártó által ajánlott protokoll szerint (0.2 M-os HCl - 20 perc; desztvíz - 3 perc; 2xSSC - 3 perc; Pretreatment Solution - 80°C, 20 perc; desztvíz - 3 perc). Ezután a szöveteket enzimatikusan emésztettük (Proteinase K - 37°C, 5 perc). Ezt követően felvittünk a metszetekre összesen 7 µl 'spectrum orange' jelölt HER2 specifikus próbát és 'spectrum green' jelölt 17-es kromoszóma centromerikus régiójára specifikus próbát (PathVysion HER-2/neu DNA Probe Kit, Vysis, Des Plaines, IL, USA), majd a genomikus DNS-t a próbával együtt denaturáltuk 90°C-on 10 percig. A fluoreszcensen jelölt próbákat 16 órán keresztül, 37°C-on hibridizáltuk a genomikus DNS-hez. Mind a denaturáció, mind pedig a hibridizáció ThermoBrite (Vysis, Des Plaines, IL, USA) félautomata FISH berendezésen került kivitelezésre. Második nap reggel poszthibridizációs mosást követően a metszeteket 4',6-diamidin-2'-fenilindol-dihidrokloriddal (DAPI, Vysis, Des Plaines, IL, USA) háttérfestettük. A metszeteket 4 °C-on 1 órán át tároltuk, majd fluoreszcens mikroszkóp (Olympus BX51, Lake Success, NY, USA) segítségével értékeltük. Tízszeres objektívvel és DAPI filterrel a TMA core-

okat beazonosítottuk, majd 100x-os, immerziós nagyítással vizsgáltuk a tumorsejteket tripla sávszűrő (DAPI/Orange/Green) segítségével. Negyven sejtmagon belüli narancssárga (HER2) és zöld (CEP17) szignált összeadva átlagot vontunk, majd kiszámoltuk a HER2/CEP17 hányadost.

Az eseteket 'nem amplifikálnak' tartottuk, ha a hányados 1.8 vagy az alatti volt és 'amplifikálnak', ha 2.2 feletti. Ha hányados a 1.8 és 2.2 közötti volt, újabb 20 sejtmagon belüli jeleket adtunk össze és a hányadost újraszámoltuk. Ha a sejtmagokon belüli CEP17 jelek száma átlagosan 1.5 és 2.5 között volt a 17-es kromoszóma számot normálisnak vettük (diszómia), 1.5 vagy az alatt monoszómiát, 2.5 felett poliszómiát véleményyeztünk. (4. ábra)

4 ábra. A HER2 gén/17-es kromoszóma dual-color fluoreszcencia in situ hibridizációs vizsgálata



A - nem amplifikált, diploid tumor; B - poliszómia; C - low grade amplifikáció; D - high grade amplifikáció

4.e. Statisztikai elemzés

A hagyományos metszeteken kivitelezett NCL-CB11 és HercepTest IHC reakciókat összevetve a TMA metszetek NCL-CB11 és HercepTest IHC reakcióinak eredményével kiszámoltuk az immunhisztokémiai konkordanciákat. Az egyes csoportokat mindemellett összevetettük a FISH eredményekkel.

A továbbiakban, a FISH eredményeket alapul véve, egyenként kiszámoltuk a 6 különböző immunhisztokémiai antitesttel végzett reakció szenzitivitását, szelektivitását, pozitív és negatív prediktív értékét (PPV és NPV) valamint pontosságát. A számításokat kétféleképp végeztük: az első esetben az immunhisztokémiai eredmények dichotomizálásakor a 2+-es eseteket is pozitívnak tekintettük, a második esetben pedig csak a 3+-es eseteket vettük pozitívnak. A 0 és 1+-es IHC reakciók mindkét esetben negatívnak számítottak. A FISH eredmények dichotomizálásakor a diszómiás, nem amplifikált eseteket a 17-es kromoszóma aneuszómiával (monoszómia, poliszómia) rendelkező esetekkel együtt 'FISH negatívnak' tekintettük, mivel mostanáig ezen tumorok trastuzumab válaszkészsége nem bizonyított. [9] Kizárólag a tényleges HER2 amplifikációt vettük "FISH pozitívnak" (grádustól függetlenül).

5. EREDMÉNYEK

5.a. Szöveti microarray-ek validálása

Az antigén feltárási, előkezelési, emésztési és mosási lépések folytán a TMA core-ok 10.2%-a sodródott le a metszetekről.

A 3. táblázatban a 174 eset nagylemezes immunhisztokémiai (NCL-CB11) adatai és a TMA metszetekből készült immunhisztokémiai (NCL-CB11) eredmények összevetése látható a megfelelő FISH eredmények függvényében.

A 91/174 (52%) hagyományos módon kivitelezett immunhisztokémiával negatív eset közül 86 (94.5%) a TMA metszeteken is negatívnak bizonyult. Ezek közül 83 eset nem mutatott amplifikációt FISH-sel, két esetben HER2 génamplifikáció, egy esetben a 17-es kromoszóma aneuszómiája volt igazolható. A négy (4.4%) HER2 2+-es eset közül három diploid nem amplifikált tumor volt, a fennmaradó egy esetben aneuszómiát találtunk. A 91-ből az egyetlen TMA metszeten 3+-es eset FISH-sel diploid, nem amplifikált tumor volt.

Meglehetősen nagyszámú, 49/174 (28%) 2+-es esetet találtunk a hagyományos metszeteken, melyek közül 40 (81.7%) TMA-kon is 2+-es reakciót adott, és ezen belül nyolc esetben HER2 génamplifikációt is sikerült kimutatni. További hét eset IHC negatív volt, kettő pedig 3+-es volt a szöveti microarray-eken, és egyikük sem hordozott sem génamplifikációt, sem pedig a 17-es kromoszóma aneuszómiáját.

3. táblázat Hagyományos immunhisztokémiai adatok (NCL-CB11) összehasonlítása a szöveti microarray metszeteken kapott immunhisztokémiai (NCL-CB11) és fluoreszcencia in situ hibridizációs eredményekkel

Hagyományos IHC		IHC szöveti microarray-en		Fluoreszcencia in situ hibridizáció	
HER2 negatív	91	HER2 negatív	86 (94.5%)	Diploid, nem amplifikált	83
				Diploid, amplifikált	2
				Aneuszómia	1
		HER2 2+	4 (4.4%)	Diploid, nem amplifikált	3
				Diploid, amplifikált	0
				Aneuszómia	1
		HER2 3+	1 (1.1%)	Diploid, nem amplifikált	1
				Diploid, amplifikált	0
				Aneuszómia	0
HER2 2+	49	HER2 negatív	7 (14.3%)	Diploid, nem amplifikált	7
				Diploid, amplifikált	0
				Aneuszómia	0
		HER2 2+	40 (81.7%)	Diploid, nem amplifikált	32
				Diploid, amplifikált	8
				Aneuszómia	0
		HER2 3+	2 (4%)	Diploid, nem amplifikált	2
				Diploid, amplifikált	0
				Aneuszómia	0
HER2 3+	34	HER2 negatív	3 (8.8%)	Diploid, nem amplifikált	2
				Diploid, amplifikált	0
				Aneuszómia	1
		HER2 2+	2 (5.9%)	Diploid, nem amplifikált	2
				Diploid, amplifikált	0
				Aneuszómia	0
		HER2 3+	29 (85.3%)	Diploid, nem amplifikált	7
				Diploid, amplifikált	21
				Aneuszómia	1
Összesen	174		174		174

IHC, immunhisztokémia; TMA, szöveti microarray

A fennmaradó 34/174 (20%) eset a hagyományos metszeteken 3+-es pozitivitást mutatott, ezen belül 29 (85.3%) TMA-kon is 3+-es volt, kettő (5.9%) immunhisztokémiaileg 2+-es és három (8.8%) IHC negatív volt. Utóbbi három esetből egynél aneuszómiát találtunk és a másik kettő sem mutatott génamplifikációt. Amíg a kettő 2+-es esetből egyik sem volt amplifikált, a 29 3+-es esetből 21 hordozott génamplifikációt és egy esetben aneuszómiát láttunk.

HercepTest-et használva a hagyományos és a TMA metszeteken végzett immunhisztokémiai reakciók részben más eredményeket hoztak, melyeket a 4. táblázatban foglaltunk össze.

4. táblázat Hagyományos immunhisztokémiai adatok (HercepTest) összehasonlítása a szöveti microarray metszeteken kapott immunhisztokémiai (HercepTest) és fluoreszcencia in situ hibridizációs eredményekkel

Hagyományos IHC		IHC szöveti microarray-en		Fluoreszcencia in situ hibridizáció	
HER2 negatív	123	HER2 negatív	114 (92.7%)	Diploid, nem amplifikált	110
				Diploid, amplifikált	2
				Aneuszómia	2
		HER2 2+	7 (5.7%)	Diploid, nem amplifikált	4
				Diploid, amplifikált	3
				Aneuszómia	0
		HER2 3+	2 (1.6%)	Diploid, nem amplifikált	1
				Diploid, amplifikált	1
				Aneuszómia	0
HER2 2+	31	HER2 negatív	5 (16.1%)	Diploid, nem amplifikált	5
				Diploid, amplifikált	0
				Aneuszómia	0
		HER2 2+	25 (80.7%)	Diploid, nem amplifikált	17
				Diploid, amplifikált	8
				Aneuszómia	0
		HER2 3+	1 (3.2%)	Diploid, nem amplifikált	0
				Diploid, amplifikált	1
				Aneuszómia	0
HER2 3+	20	HER2 negatív	2 (10%)	Diploid, nem amplifikált	1
				Diploid, amplifikált	0
				Aneuszómia	1
		HER2 2+	2 (10%)	Diploid, nem amplifikált	1
				Diploid, amplifikált	1
				Aneuszómia	0
		HER2 3+	16 (80%)	Diploid, nem amplifikált	0
				Diploid, amplifikált	15
				Aneuszómia	1
Összesen	174		174		174

IHC, immunhisztokémia; TMA, szöveti microarray

Negatív reakciót 123 eset (123/174, 71%) mutatott a nagy metszeteken, melyek közül 114 (92.7%) TMA metszeteken is hasonlóan viselkedett. Ezek közül két eset mutatott HER2 amplifikációt, további két tumor esetén pedig a 17-es kromoszóma aneuszómiája volt megállapítható. Hét eset (5.7%) — kettőben a HER2 génamplifikációval —

immunhisztokémiaileg 2+-es volt TMA metszeteken, további két eset pedig IHC 3+, mely utóbbiak közül egy génamplifikációt is hordozott.

A HercepTest-tel csupán 31/174 (18%) eset volt 2+-es a hagyományos metszeteken; ebből a 31-ből 25-öt (85.7%) TMA-kon is 2+-es pozitívitás jellemezte, egyet (3.2%) pedig 3+-es. Az összesen 26 konkordáns eset közül kilenc mutatott génamplifikációt és mind az 5 (16.1%) diszkordáns eset diploid, nem amplifikált tumor volt.

A hagyományos reakcióval 20 esetben láttunk 3+ pozitívítást, melyek közül 16 TMA alkalmazásával is ugyanezt az eredményt hozta (16/20, 80%), amelyekből 15 FISH-sel génamplifikációt, egy eset pedig a 17-es kromoszóma aneuszómiáját mutatta. Két eset (10%) mindössze mérsékelt pozitívítást mutatott (2+) TMA-kon, melyek közül csak az egyik volt amplifikált, szintén két eset (10%) pedig IHC negatív volt a szöveti microarray-eken. Utóbbiak közül egyik sem mutatott HER2 génamplifikációt, és csak az egyik hordozott 17-es kromoszóma aneuszómiát.

5.b. A HER2 diagnosztikában használatos immunhisztokémiai antitestek összehasonlítása szöveti microarray-eken

Az antigén feltárási, előkezelési, emésztési és mosási lépések kapcsán a core-ok hozzávetőleg 8%-a sodródott le a TMA metszetekről.

A hat antitesttel kapott immunhisztokémiai eredmények a fluoreszcencia in situ hibridizáció függvényében a 5. táblázatban láthatók.

5. táblázat A hat különböző immunhisztokémiai antitesttel kapott eredményeink a fluoreszcencia in situ hibridizációs adatok függvényében 199 esetben vizsgálva

	NCL-CB11				Pathway CB11				NCL-CBE356			
	0	1+	2+	3+	0	1+	2+	3+	0	1+	2+	3+
HER2 FISH nem amplifikált	32	77	50	5	74	66	20	1	75	57	31	2
HER2 FISH amplifikált	0	1	5	17	1	2	5	15	2	0	6	16
Összesen	32	78	55	22	75	68	25	16	77	57	37	18
%	17.1	41.7	29.4	11.8	40.8	37	13.6	8.69	40.7	30.2	19.6	9.52
	NCL-CBE1				HercepTest				Pathway RM-4B5			
	0	1+	2+	3+	0	1+	2+	3+	0	1+	2+	3+
HER2 FISH nem amplifikált	50	77	34	2	97	50	24	2	134	14	3	1
HER2 FISH amplifikált	0	4	4	14	0	0	7	17	3	1	3	13
Összesen	50	81	38	16	97	50	31	19	137	15	6	14
%	27	43.8	20.5	8.65	49.2	25.4	15.7	9.64	79.7	8.72	3.49	8.14

IHC, immunhisztokémia; FISH, fluoreszcencia in situ hibridizáció

IHC 3+-es pozitivitást 8.14-11.76%-ban észleltünk, antitesttől függően. A 2+ és 3+-es esetek együttesen mintegy 11.63-41.18%-ot tettek ki. NCL-CB11-gyel találtunk a legmagasabb és az RM-4B5-tel legalacsonyabb arányban 2-3+-es eseteket. A 199 esetből összesen 25 mutatott HER2 génamplifikációt. Egyedül a HercepTest esetében nem észleltünk HER2 génamplifikációt IHC negatív esetek között, a legmagasabb számban (4 eset) pedig az NCL-CBE1 és a Pathway RM-4B5 antitestekkel találtunk ilyen eseteket.

A 6 különböző immunhisztokémiai eljárás specificitását, szenzitivitását, pozitív és negatív prediktív értékét, valamint számított pontosságát a 6. és 7. táblázatban foglaltuk össze — az alapján, hogy a

2+ és 3+ eseteket együtt vagy csak a 3+-es eseteket tekintettük IHC pozitívnak.

6. táblázat Az immunhisztokémia antitestek jellemzői a 2+ és 3+-es eseteket pozitívként értékelve

	NCL-CB11	Pathway CB11	NCL-CBE356	NCL-CBE1	HercepTest	Pathway RM-4B5
Specifititás	66.46%	89.96%	80.49%	77.91%	84.97%	97.36%
Szenzitivitás	95.65%	86.96%	91.67%	81.81%	100.00%	80.00%
PPV	28.57%	48.78%	40.74%	33.33%	48.00%	80.00%
NPV	99.09%	97.90%	98.51%	96.95%	100.00%	97.36%
Pontosság	70.05%	86.96%	80.21%	78.38%	86.80%	95.34%

PPV, pozitív prediktív érték; NPV, negatív prediktív érték

Az első megközelítés szerint a legmagasabb szenzitivitása és negatív prediktív értéke a HercepTest-nek volt; mindkettő 100%, mivel nem volt álnegatív eset. A szenzitivitás szempontjából a második az NCL-CB11 (95.65%) volt, míg a legalacsonyabb értéket a Pathway RM-4B5 mutatta (80%). A negatív prediktív érték tekintetében a második ugyancsak az NCL-CB11 (99.09%) volt, amely kevesebb, mint egy százalékkal maradt el a HercepTest-től és még az NCL-CBE1 negatív prediktív értéke is majdnem elérte a 97%-ot (96.95%).

A Pathway RM-4B5 mutatta a legmagasabb specifitást (97.36%), a Pathway CB11 86.96%-os specifitásánál pedig alig volt alacsonyabb a HercepTest 84.97%-os értéke. Ezen számításaink alapján az NCL-CB11 volt a legkevésbé specifikus (66.46%) jelzője a HER2 génamplifikációnak.

Meglehetősen alacsony pozitív prediktív értéket találtunk minden immunhisztokémiai antitest esetében, melyek között a Pathway RM-4B5 80%-os értéke kiemelkedő. A sorrendben ezt követő Pathway CB11-et már 48.78%, az NCL-CB11-et pedig 28.57% jellemezte.

Összesítve, a legmegbízhatóbb eredményeket a Pathway RM-4B5-tel értük el (95.34%), melyet csökkenő sorrendben a Pathway CB11 követett (86.96%). A legkisebb pontossággal az NCL-CB11 volt jellemezhető (70.05%).

7. táblázat Az immunhisztokémia antitestek jellemzői a 3+-es eseteket pozitívként értékelve

	NCL-CB11	Pathway CB11	NCL-CBE356	NCL-CBE1	HercepTest	Pathway RM-4B5
Specifititás	96.95%	99.38%	98.78%	98.77%	98.84%	99.34%
Szenzitivitás	73.91%	65.22%	66.67%	63.63%	70.83%	65.00%
PPV	77.27%	93.75%	88.89%	87.50%	89.47%	92.86%
NPV	96.36%	95.24%	95.32%	95.27%	96.06%	95.56%
Pontosság	94.11%	95.11%	93.23%	94.59%	95.43%	95.35%

PPV, pozitív prediktív érték; NPV, negatív prediktív érték

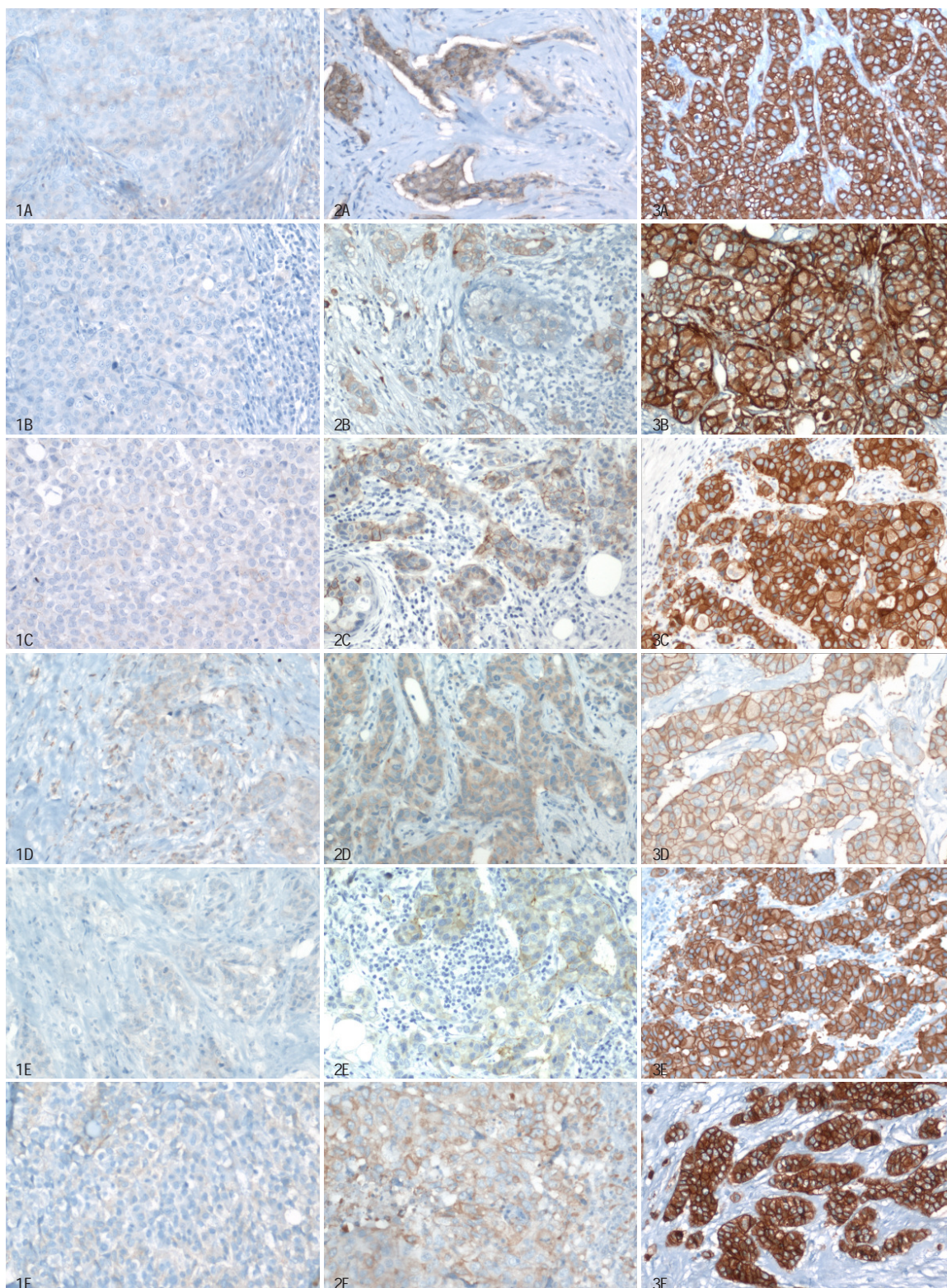
A második megközelítés során, amikor a 2+-es eseteket negatívnak tekintettük, figyelemre méltó változásokat tapasztaltunk az antitestek sorrendjében, ami annak köszönhető, hogy a 2+-es esetek közel 90%-a nem hordozott HER2 génamplifikációt. Összességében elmondható, hogy az antitestek specifitása, pozitív prediktív értéke és pontossága általában nőtt, míg a szenzitivitásuk és a negatív prediktív értékük csökkent.

A két CB11 antitestet jellemezte a legmagasabb szenzitivitás és NPV (NCL-CB11 - 73.91% és 96.36%), valamint specifitás és PPV (Pathway CB11 - 99.38% és 93.75%). A második legmagasabb specifitást és pozitív prediktív értéket a Pathway RM-4B5 mutatta (99.34% és 92.86%), a legalacsonyabbat pedig az NCL-CB11 (96.95% és 77.27%). A HercepTest lett a második legszenzitívebb (70.83%) és második legnagyobb negatív prediktív értékű (96.06%) immunreakció. A legalacsonyabb szenzitivitása az NCL-CBE1 antitestnek lett (63.63%), a legkisebb NPV-je pedig a Pathway CB11 kitnek (95.24%). A legmagasabb

pontosság ezúttal a HercepTest-et jellemezte (95.43%), mely kicsivel meghaladta az első számításunk során a Pathway RM-4B5-tel elért legmagasabb pontosságot. Csak a 3+-es eseteket véve pozitívnak a második legmegbízhatóbb antitest a Pathway RM-4B5 lett (95.35%), a legkevésbé pontos pedig az NCL-CBE356 (93.23%).

Immunhisztokémiai mikrofotográfiákon a hat különböző antitesttel végzett reakciók közti különbséget demonstráltuk az 5. ábrán.

5. ábra 1+, 2+ és 3+-es immunhisztokémiai reakciók a különböző antitestekkel
A - NCL-CB11, B - NCL-CBE356, C - HercepTest, D - Pathway RM-4B5, E - Pathway
CB11, F - NCL-CBE1 (20x)



6. MEGBESZÉLÉS

Az emlőrákok pathológiai diagnosztikájának elengedhetetlen része a HER2 státusz meghatározása, mely kiemelt prognosztikai és főleg célterápiás jelentősége miatt fontos, hogy standardizált, megbízható és költséghatékony módon történjen. A standardizálás validált immunhisztokémiai antitestek használata és meghatározott protokollok szigorú betartása mellett tovább növelhető szöveti microarray-ek alkalmazásával. Munkacsoportunk első célja az volt, hogy bizonyítsuk a TMA-k alkalmazhatóságát a rutin HER2 diagnosztikában.

Szöveti microarray-eket kutatási céllal számos csoport alkalmazott és alkalmaz különböző immunhisztokémiai és in situ hibridizációs vizsgálatok nagy vizsgálati anyagon történő elvégzéséhez, azonban a tumorheterogenitásból adódó kétes megbízhatóság miatt TMA-kat a rutin diagnosztikában eddig nem használtak. Kutatócsoportunkkal párhuzamosan, de függetlenül Sapino és munkatársai végeztek ilyen irányú vizsgálatokat, azonban mindössze 20 eset immunhisztokémiai és FISH összehasonlítását végezték el. [28] Vizsgálataink első részében 174 emlőrákos eset hagyományos módon és szöveti microarray-eken szimultán kivitelezett immunhisztokémiai összehasonlítása történt, mely eredményeket szöveti microarray-eken végzett FISH eredményekkel vetettük össze. Mind az NCL-CB11 antitesttel, mind pedig a HercepTest farmakodiagnosztikummal végzett IHC vizsgálatok során magas korreláció volt megfigyelhető a HER2 negatív (94.5% és 92.7%), a HER2 2+-es (81.7% - 2+ és 4% - 3+; 80.7% - 2+ és 3.2% - 3+) valamint a HER2

3+-es eseteknél (5.9% - 2+ és 85.3% - 3+; 10% - 2+ és 80% - 3+). Amennyiben a TMA-kon végzett FISH eredmények az immunhisztokémia alapján várttal nem egyeztek, a genetikai vizsgálat eredményét minden esetben megerősítettük hagyományos módon kivitelezett fluoreszcencia in situ hibridizációval. Eredményeink alapján megállapítható, hogy az általunk használt szöveti microarray-ek megfelelő megbízhatóság mellett alkalmazhatók a rutindiagnosztikában.

A microarray-ek validálása során 3 mm átmérőjű szövethengerekből tumoronként csupán egyet építettünk be TMA-ba, azonban a megbízhatóság minden bizonnyal tovább növelhető, ha tumoronként több különböző helyről származó szövethengert használunk. [22]

Mindazonáltal elgondolkoztató, hogy amennyiben egy core-biopszia immunhisztokémiai és FISH eredményeit reprezentatívnak tekintjük a tumor egészére vonatkozóan, akkor a kellően vastag, szimpla hengerekből álló szöveti microarray-eket is megbízhatónak kellene tekintenünk.

A fluoreszcencia in situ hibridizációs vizsgálatok költségeinek csökkentése és a reakciók egységes körülményeinek megteremtése mellett a szöveti microarray-ek további előnye, hogy a FISH metszetek mikroszkópos értékelése gyorsabb, hiszen csupán előre kiválasztott, ideális, nem átfedő tumorsejtekben gazdag területeket kell áttekintenünk. A TMA technika lehetséges hátrányai között felmerülhet, hogy plusz lépések beiktatása miatt a leletátfutási idő számottevően megnőhet, azonban tapasztalataink szerint, amennyiben megfelelő számú emlőrákos eset vizsgálata zajlik, a multiblokkok építése nem jelent többlet energia-

és idő ráfordítást, ami számottevően befolyásolná a diagnosztika sebességét.

A microarray-ek validálása során az NCL-CB11 jelzésű antitesttel meglepően magas arányban találtunk HER2 2+-es eseteket (28%), ezért a vizsgálatokat megismételtük egy FDA minősített farmakodiagnosztikummal is. A HercepTest alkalmazása mellett 17.8%-ban találtunk közepesen pozitív eseteket, amely a korábbi irodalmi adatokkal jobban egyezik, míg a nagylemezes és TMA metszeteken végzett immunhisztokémia konkordanciája jelentősen nem változott. [11, 22, 25, 28, 31, 47-48] A HER2 ellenes antitestek összehasonlítása során szintén kevesebb volt a 2+-es esetek száma HercepTest-tel, mint NCL-CB11-el, mely alátámasztja, hogy az eltérés az antitestek különbözőségében rejlik.

Minden esetet genetikailag is megvizsgálva találtunk olyan tumorokat, melyekben az erős HER2 expresszió hátterében nem állt génamplifikáció, vagy épp ellenkezőleg HER2 génamplifikáció mellett nem volt szignifikáns protein expresszió. Az ilyen diszkordáns esetekben a fluoreszcencia in situ hibridizációt hagyományos nagylemezes módszerrel is megismételtük, és kivétel nélkül a TMA-val azonos eredményt kaptunk. A fenti eltérés oka intracelluláris, vélhetőleg fokozott vagy csökkent, a receptor internalizációját okozó folyamat lehet, melynek további vizsgálata fontos kérdésekre adhat választ akár a trastuzumab hatékonyságával kapcsolatban is. [49-50]

Az NCL-CB11 antitesttel 3+-es esetek 62-66%-a volt csak amplifikált, míg HercepTest-tel ez az arány 80-89% volt. Az irodalomban

különböző antitesteket véve alapul 3+-es esetek tekintetében az IHC-FISH konkordancia 55.6-100%-ig terjed, mely alapján elfogadhatók az eredményeink, azonban ez a széles variancia megkérdőjelezi az immunhisztokémia megbízhatóságát. [5, 24-25, 31, 46, 51-57] Többek között ezen megfontolásból végeztük el hat különböző, egyenként ígéretes HER2 ellenes immunhisztokémiai antitest összehasonlító vizsgálatát.

Három FDA által elfogadott farmakodiagnosztikai kit (HercepTest, Pathway CB11 és Pathway RM-4B5), két különböző extracelluláris domén elleni antitest (NCL-CBE1 és NCL-CBE356) és az intézetünkben régóta használatos intracelluláris domén specifikus NCL-CB11 antitest eredményeit hasonlítottuk össze 199 emlőrákos eseten, és a FISH eredményeket alapul véve jellemeztük őket.

Minden antitesttel találtunk 3+ pozitivitást génamplifikáció nélkül, mely alapján indokoltnak tartjuk a 3+-es esetek genetikai vizsgálatát rutinszerűen elvégezni. Számos szerző szerint mind a 2+ és 3+-es esetek in situ hibridizációs vizsgálatát célszerű elvégezni, más források alapján viszont a 3+ erősségű immunhisztokémiai pozitívitas önmagában HER2 pozitívnak tekinthető. [6, 8, 11, 42, 53, 58-60] Ezen elvek alapján az immunhisztokémiai eredmények dichotomizálását kétféleképpen végeztük: az egyik esetben a 2+-es eseteket is, míg a másik esetben csak a 3+-es eseteket tekintettük IHC pozitívnak.

Habár Ainsworth és munkatársai korábban közölt eredményei alapján mást vártunk, a két extracelluláris domén elleni antitest (NCL-CBE1 és NCL-CBE356) vizsgálatunk során nem váltotta be a hozzájuk

fűzött reményeinket. [31] Mind a membránfestődés gyenge minősége, mint pedig a jelentős háttérreakció nehezítette a metszetek értékelését, és sem szenzitivitásukkal, sem specificitásukkal nem tűntek ki a többi antitest közül. Ezek alapján alkalmazásukat a rutindiagnosztikában csak alapos intézeti validálást követően javasoljuk.

A legígéretesebb a vizsgált antitestek közül a Pathway RM-4B5 volt, mely szintén FDA által elfogadott farmakodiagnosztikum, és Powell és munkatársai szerint megbízhatóan alkalmazható a HER2 diagnosztikában. [33] Eredményeink alapján a pontossága kiemelkedő volt, ugyanakkor szenzitivitása elmaradt a HercepTest érzékenységtől. Megemlítenénk, hogy agresszív antigén feltárási lépések a membránfestődés minőségét és így az érzékenységet nem javították, viszont a primer antitest kissé megnyújtott inkubációjával erősebb membránpozitivitást értünk el. Jelen automatizált körülmények között azonban 32 percnél hosszabb inkubációra nincs lehetőség, így az összehasonlításhoz az eredeti eredményeket vettük alapul.

Ha az immunhisztokémiával azon 2-3+-es eseteket választjuk ki, melyeket további DNS szintű vizsgálatnak vetünk alá, akkor a diagnosztika megbízhatósága szempontjából a legfontosabb tulajdonság az IHC szenzitivitása. Ilyen tekintetben a HercepTest-et és az NCL-CB11-et kiemelkedőnek találtuk, hiszen az előbbinek a 2-3+-es eseteket tekintve volt (100%), az utóbbinak pedig a 3+-es eseteket pozitívnak véve volt (73.91%) a legmagasabb az érzékenysége. Fontos tulajdonság továbbá a specificitás, különösen, ha a 3+-es eseteket nem vizsgáljuk genetikailag.

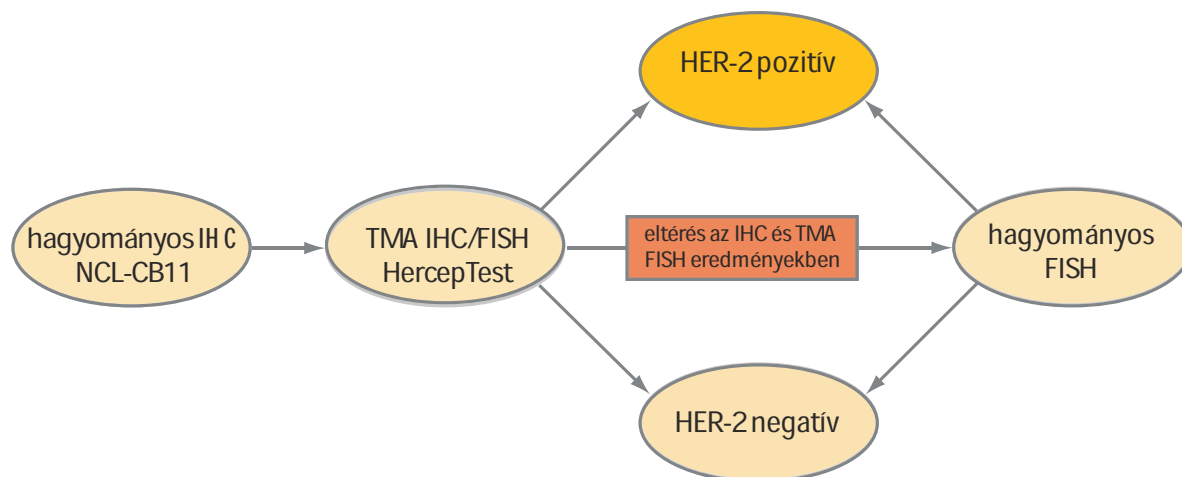
Legmagasabb specificitást a Pathway RM-4B5 és a Pathway CB11 mutatott a 2-3+ és a 3+-es eseteket tekintve. A legkönnyebben értékelhető membránfestődést a HercepTest és a Pathway CB11 farmakodiagnosztikumok biztosították.

Az immunhisztokémia szenzitivitása növelhető, amennyiben párhuzamosan egy másik antitesttel is végzünk vizsgálatot és a DNS szintű vizsgálatot csak akkor hagyjuk el, ha mindkét immunhisztokémiai reakció negatív. Ez utóbbi nézetünket Sapino és munkatársai is megerősítették. [46] A két immunhisztokémiai reakcióhoz eredményeink alapján a HercepTest-et és valamelyik CB11 jelzésű antitestet ajánljuk.

Összefoglalva az emlőrákok HER2 diagnosztikája költség-hatékonysági szempontokat is figyelembe véve az alábbi algoritmus alapján végezhető legmegbízhatóbban. (6. ábra) Minden emlőrákot hagyományos nagy-lemezes módszerrel immunhisztokémiailag vizsgálunk, mely szolgáltat egy közelítő eredményt. Ehhez a leggazdaságosabb és mégis szenzitívnek mondható NCL-CB11 antitestet ajánljuk. Ezután minden emlőrákot szöveti microarray-be építünk be, és TMA metszeten elvégzünk egy második immunhisztokémiai reakciót a legmegbízhatóbb HercepTest-tel, valamint fluoreszcencia in situ hibridizációt valamely dual-color FISH kittel. Ha nincs ellentmondás az immunhisztokémia és a FISH között, akkor az eredményeket elfogadjuk, ellentétes esetben a FISH-t hagyományos nagy-lemezes módszerrel megismételjük, és ezt az eredményt tekintjük véglegesnek. Ilyen módon minimálisra csökkenhetjük a FISH pozitív esetek "elkallódását", és a szöveti microarray-ekkel kapott

minden lehetséges fals eredményt kiszűrünk, mindezt a jelenlegi algoritmusnál jóval költséghatékonyabb és megbízhatóbb módon.

6. ábra Az emlőrákok HER2 diagnosztikus algoritmus



IHC, immunhisztokémia; FISH, fluoreszcencia in situ hibridizáció; TMA, szöveti microarray

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Az emlőrákok modern pathológiai diagnosztikájának szerves részét képezi a HER2 státusz megállapítása, melynek nemcsak a prognózis, hanem a választandó terápia szempontjából is nagy jelentősége van. A nehezen kezelhető, rossz prognózisú HER2 pozitív emlőrákok esetében azonban lehetőség van a trastuzumab monoklonális antitest alkalmazására. A HER2 státusz meghatározása hagyományosan immunhisztokémiai (IHC) és fluoreszcencia in situ hibridizációs (FISH) lépésekkel zajlik, melyek megbízható eredményt akkor szolgáltatnak, ha a reakciók standard körülmények között kerülnek kivitelezésre.

Célkitűzésünk között az egységes környezetet megteremtő szöveti microarray-ek rutin HER2 diagnosztikában való alkalmazhatóságának vizsgálata, valamint hat különböző kereskedelmi forgalomban kapható, HER2 ellenes immunhisztokémiai antitest (HercepTest, NCL-CB11, NCL-CBE1, NCL-CBE356, Pathway CB11, Pathway RM-4B5) összehasonlítása, és végül egy megbízható és költséghatékony HER2 diagnosztikus algoritmus kidolgozása szerepelt.

A szöveti microarray-ek validálását 174 emlőrákos eset hagyományos és microarray-ekkel kapott immunhisztokémiai eredményeinek összehasonlításával végeztük, majd az adatokat összevetettük a microarray-eken végzett fluoreszcencia in situ hibridizáció eredményeivel. A továbbiakban 199 szöveti microarray-ekbe épített emlőrákos eset FISH adatait alapul véve, a hat különböző antitesttel végzett immunhisztokémiai reakciók eredményeiből számítottuk ki az egyes antitestek

szenzitivitását, specificitását, pozitív és negatív prediktív értékét valamint pontosságát.

Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy az általunk használt szöveti microarray-ek megbízhatóan alkalmazhatók az emlőrákok rutin HER2 diagnosztikájában mind immunhisztokémiai, mind pedig FISH vizsgálatok kivitelezésére. Tapasztalatainkat összesítve a vizsgált antitestek közül a legmegfelelőbbnek a HercepTest bizonyult, azonban az immunhisztokémia érzékenysége fokozására egy másik antitesttel (NCL-CB11) párhuzamosan végzett IHC reakció elvégzését is javasoljuk. Szöveti microarray-ek használatával a fluoreszcencia in situ hibridizáció minden esetben elvégezhető, és így minimalizálható a nem overexpresszált FISH pozitív tumorok elvesztése. Amennyiben erős fehérje overexpresszió mellett a génamplifikáció microarray-eken nem igazolható, a genetikai vizsgálat eredményét hagyományos, nagylemezes FISH-sel szükséges megerősíteni.

IRODALOMJEGYZÉK

- 1.Józan P. Rákepidemiológiai viszonyok Magyarországon. Onkológia 2005;8:931.
- 2.Sotiriou C, Neo SY, McShane LM et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. Proc Natl Acad Sci USA 2003;100:10393-10398.
- 3.Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. Science 1987;235:177-182.
- 4.Nahta R, Yu D, Hung M-C, Hortobagyi GN, et al. Mechanisms of disease: understanding resistance to HER2-targeted therapy in human breast cancer. Nat Clin Pract Oncol 2006;3:269-280.
- 5.Lewis F, Jackson P, Lane S, et al. Testing for HER2 in breast cancer. Histopathology 2004;45:207-217.
- 6.Cardoso F, Piccart MJ, Durbecq V, et al. Resistance to trastuzumab: a necessary evil or a temporary challenge? Clin Breast Cancer 2002;3:247-257.
- 7.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 Eng J Med 2001;344:783-792.
- 8.Wang S, Saboorian MH, Frenkel E, et al. 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.
9. Downs-Kelly E, Yoder BJ, Stoler M, et al. The influence of polysomy 17 on HER2 gene and protein expression in adenocarcinoma of the breast. *Am J Surg Pathol* 2005;29:1221-1227.
10. Sauer T, Wiedswang G, Boudjema G, et al. Assessment of HER-2/neu overexpression and/or gene amplification in breast carcinomas: should in situ hybridization be the method of choice? *APMIS* 2003;111:444-450.
11. Pauletti G, Dandekar S, Rong HM, 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;18:3651-34.
12. Mass RD, Press MF, Anderson S, et al. Evaluation of clinical outcomes according to HER2 detection by fluorescence in situ hybridization in women with metastatic breast cancer treated with trastuzumab. *Clin Breast Cancer* 2005;6:240-246
13. Romond E, Perez EA, Bryant J, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2 positive breast cancer. *N Eng J Med* 2005;353:1673-1684.
14. Battifora H. The multitumor (sausage) tissue block: novel method for immunohistochemical antibody testing. *Lab Invest* 1986;55:244-248.
15. Battifora H, Mehta P. The checkerboard tissue block. An improved multitissue control block. *Lab Invest* 1990;63:722-724.

- 16.Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 1998;4:844-847.
- 17.Henshall S. Tissue Microarrays. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2003;8:347-358.
- 18.Kallioniemi OP, Wagner U, Kononen J, et al. Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. *Hum Mol Genet* 2001;10:657-662.
- 19.Bubendorf L, Nocito A, Moch H, et al. Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. *J Pathol* 2001;195:72-79.
- 20.Nocito A, Kononen J, Kallioniemi OP, et al. Tissue microarrays (TMAs) for high-throughput molecular pathology research. *Int J Cancer* 2001;94:1-5.
- 21.Schraml P, Kononen J, Bubendorf L, et al. Tissue microarrays for gene amplification surveys in many different tumor types. *Clin Cancer Res* 1999;5:1966-1975.
- 22.Gancberg D, Di Leo A, Rous G, et al. Reliability of the tissue microarray based FISH for evaluation of the HER-2 oncogene in breast carcinoma. *J Clin Oncol* 2002;55:315-317.
- 23.Diaz LK, Gupta R, Kidwai N, et al. The use of TMA for interlaboratory validation of FISH testing for detection of HER2 gene amplification in breast cancer. *J Histochem Cytochem* 2004;52:501-507.

- 24.Dolan M, Snover D. Comparison of immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization assesment of HER2 status in routine practice. Am J Clin Pathol 2005;123:766-770.
- 25.Chang E, Lee A, Lee E, et al. Her2/neu oncogene amplification by chromogenic in situ hybridization in 130 breast cancers using tissue microarray and clinical follow-up studies. J Korean Med Sci 2004;19:390-396.
- 26.Kuraya KA, Simon R, Sauter G. Tissue microarrays for high-throughput molecular pathology. Ann Saudi Med 2004;24:169-174.
- 27.Gulmann C, Loring P, O'Grady A, et al. Miniature tissue microarrays for HercepTest standardisation and analysis. J Clin Pathol 2004;57:1229-1231.
- 28.Sapino A, Marchio C, Senetta R, et al. Routine assesment of prognostic factors in breast cancer using a multicore tissue microarray procedure. Virchows Arch 2006;449:288-296.
- 29.Cheang MC, Treaba DO, Speers CH, et al. Immunohistochemical detection using the new rabbit monoclonal antibody SP1 of estrogen receptor in breast cancer is superior to mouse monoclonal antibody 1D5 in predicting survival. J Clin Oncol 2006;24:5637-5644.
- 30.Press MF, Slamon DJ, Flom KJ, et al. Evaluation of HER-2/neu gene amplification and overexpression: comparison of frequently used assay methods in a molecularly characterized cohort of breast cancer specimens. J Clin Oncol 2002;20:3095-3105.

- 31.Ainsworth R, Bartlett JMS, Going JJ, et al. IHC for Her2 with CBE356 antibody is a more accurate predictor of Her2 gene amplification by FISH than HercepTest in breast carcinoma. *J Clin Pathol* 2005;58:1086-1090.
- 32.Birner P, Oberhuber G, Stani J, et al. Evaluation of the United States Food and Drug Administration-approved scoring and test system of HER-2 protein expression in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2001;7:1669-1675.
- 33.Powell WC, Hicks DG, Prescott N, et al. A new rabbit monoclonal antibody (4B5) for the immunohistochemical (IHC) determination of the HER2 status in breast cancer: comparison with CB11, fluorescence in situ hybridization (FISH), and interlaboratory reproducibility. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2007;15:94-102.
- 34.Bussolati G, Montemurro F, Righi L, et al. A modified Trastuzumab antibody for the immunohistochemical detection of HER-2 overexpression in breast cancer. *Brr J Cancer* 2005;92:1261-1267.
- 35.Dal Lago L, Durbecq V, Desmedt C, et al. Correction for chromosome-17 is critical for the determination of true Her-2/neu gene amplification status in breast cancer. *Mol Cancer Ther* 2006;5:2572-2579.
- 36.Wang S, Hossein Saboorian M, Frenkel EP, et al. Aneusomy 17 in breast cancer: its role in HER2/neu protein expression ad implication for clinical assessment of HER2/neu status. *Mod Pathol* 2002;15:137-145.

- 37.Ma Y, Lespagnard L, Durbecq V et al. Polysomy 17 in HER-2/neu status elaboration in breast cancer: effect on daily practice. Clin Cancer Res 2005;11:4393-4399.
- 38.Salido M, Tusquets I, Corominas JM, et al. Polysomy of chromosome 17 in breast cancer tumors showing an overexpression of ERBB2: a study of 175 cases using fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. Breast Cancer Res 2005;7:267-273.
- 39.Bose S, Mohammed M, Shintaku P, et al. Her-2/neu gene amplification in low to moderately expressing breast cancers: possible role of chromosome 17/Her-2/neu polysomy. Breast J 2001;7:337-344.
- 40.Larsimont D, Di Leo A, Rouas G, et al. HER2/neu evaluation by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization in breast cancer: implications for daily laboratory practice. Anticancer Res 2002;22:2485-2490.
- 41.Mass RD, Sanders C, Charlene K, et al. The concordance between the clinical trial assay (CTA) and fluorescence in situ hybridization (FISH) in the Herceptin pivotal trials. Proc Am Soc Clin Oncol 2000;19:pp57a, abstr 291.
- 42.Wolff AC, Hammond MEH, Schwartz JN, 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;25:1-28.

- 43.van de Vijver M, Bilous M, Hanna W, et al. Chromogenic in situ hybridisation for the assessment of HER2 status in breast cancer: an international validation ring study. 2007;9:R68.
- 44.Dietel M, Ellis IO, Höfler H, et al. Comparison of automated silver enhanced in situ hybridisation (SISH) and fluorescence ISH (FISH) for the validation of HER2 gene status in breast carcinoma according to the guidelines of the American Society of Clinical Oncology and the College of American Pathologists. *Virchows Arch* 2007;451:19-25.
- 45.Gjerdrum LM, Sorensen BS, Kjeldsen E, et al. 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.
- 46.Sapino A, Coccorullo Z, Casoni P, et al. Which breast carcinomas need HER2/neu gene study after immunohistochemical analysis? Results of combined use of antibodies against different c-erbB2 protein domains. *Histopathology* 2003;43:354-362.
- 47.Bofin AM, Ytterhus B, Martin C, et al. Detection and quantitation of HER2 gene amplification and protein expression of breast carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2004;122:110-119.
- 48.Zhang D, Salto-Tellez M, Do E, et al. Evaluation of HER2/neu oncogene status in breast tumors on tissue microarrays. *Hum Pathol* 2003;34:362-368.
- 49.Hommelgaard AM, Lerdrup M, van Deurs B. Association with Membrane Protrusions Makes ErbB2 an Internalization-resistant Receptor. *Mol Biol Cell* 2004;15:1557-1567.

- 50.Sorkin A, Di Fiore PP, Carpenter G. The carboxyl terminus of epidermal growth factor receptor/erbB2 chimerae is internalization impaired. *Oncogene* 1993;8:3021-3028.
- 51.Bámkfalvi A, Boecker W, Reiner A. Comparison of automated and manual determination of HER2 status in breast cancer for diagnostic use: a comparative methodological study using the Ventana Benchmark automated staining system and manual tests. *Int J Oncol* 2004;25:929-935.
- 52.Bartlett J, Going J, Mallon E, et al. Evaluating HER2 amplification and overexpression in breast cancer. *J Pathol* 2001;195:422-428.
- 53.Dowsett M, Bartlett J, Ellis IO, et al. Correlation between immunohistochemistry (HercepTest) and fluorescence in situ hybridization (FISH) for HER2 in 426 breast carcinomas from 37 centres. 2003;199:418-423.
- 54.Falo C, Moreno A, Lloveras B, et al. Algorithm for the diagnosis of HER2/neu status in breast-infiltrating carcinomas. *Am J Clin Oncol* 2003;26:465-470.
- 55.Kobayashi M, Ooi A, Oda Y, et al. Protein overexpression and gene amplification of c-erbB-2 in breast carcinomas: a comparative study of immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization of formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Hum Pathol* 2002;33:21-28.
- 56.Risio M, Casorzo L, Redana S, et al. HER2 gene-amplified breast cancer with monosomy of chromosome 17 are poorly responsive of trastuzumab-based treatment. *Oncol Rep* 2005;13:305-309.

- 57.Vera-Román J, Rubio-Martinez L. Comparative assays for the HER2/neu oncogene status in breast cancer. Arch Pathol Lab Med 2004;128:627-633.
- 58.Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2 overexpressing metastatic breast cancer. J Clin Oncol 2002;20:719-726.
- 59.Gancberg D, Jarvinen TAH, Di Leo A, et al. Evaluation of HER-2/NEU protein expression in breast cancer by immunohistochemistry: an interlaboratory study assessing the reproducibility of HER-2/NEU testing. Breast Cancer Res Treat 2002;74:113-120.
- 60.Hammock L, Lewis M, Phillips C, et al. Strong HER2/neu protein overexpression by immunohistochemistry often does not predict oncogene amplification by fluorescence in situ hybridization. Hum Pathol 2003;34:1043-1047.

A MUNKA ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

1. **Egervari K**, Szollosi Z, Nemes Z. Tissue microarray technology in breast cancer HER2 diagnostics. Pathol Res Pract 2007;203:169-177. IF: 0.892
2. **Egervari K**, Szollosi Z, Nemes Z. Immunohistochemical antibodies in breast cancer HER2 diagnostics. A comparative immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization study. Tumor Biol Közlésre elfogadva. IF:2.407

EGYÉB, JELEN MUNKÁBAN NEM HASZNÁLT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

1. Szollosi Z, Scholtz B, **Egervari K**, Nemes Z. Transformed dermatofibrosarcoma protuberans: real time PCR detection of COLIA1-PDGFB fusion transcripts in sarcomatous areas. J Clin Pathol. 2007;60:190-4. IF: 2.245
2. Szollosi Z, **Egervari K**, Nemes Z, Kaczur V. Re: Lottner et al. simultaneous detection of HER2/neu gene amplification and protein overexpression in paraffin-embedded breast cancer. J Pathol. 2005;207:119-20. IF: 6.213
3. Szollosi Z, Nemeth T, **Egervari K**, Nemes Z. Histiocyte-like cells expressing factor XIIIa do not belong to the neoplastic cell population in

malignant fibrous histiocyoma. Pathol Res Pract. 2005;201:369-77. IF: 0.892

4. **Egervari K**, Szollosi Z, Nemes Z, Kaczur V. Comparison of immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization assessment of HER-2 status in routine practice. Am J Clin Pathol. 2006;125:155-6. IF: 2.939
5. **Egervari K**, Szollosi Z, Nemes Z. Reply to „IHC for Her2 with CBE356 antibody is a more accurate predictor of Her2 gene amplification by FISH than HercepTest in breast carcinoma”. J Clin Pathol. 2006;59:665. IF: 2.245
6. **Egervari K**, Szollosi Z, Nemes Z. Re: A New Rabbit Monoclonal Antibody (4B5) for the Immunohistochemical (IHC) Determination of the HER2 Status in Breast Cancer: Comparison With CB11, Fluorescence In Situ Hybridization (FISH), and Interlaboratory Reproducibility. Appl Immunohist Mol Morphol. Közlésre elfogadva. IF: 1.621

A közlemények összesített impakt faktora: 19.454

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom elsőként mindkét témavezetőmnek, Prof. Dr. Nemes Zoltánnak, aki lehetőséget biztosított, hogy munkámat az ő irányítása alatt álló DEOEC Pathológiai Intézetben minden támogatását élvezve végezhessem, és Dr. Szöllősi Zoltánnak, aki kezdettől felkarolt és szorgalmazta kibontakozásomat, akihez kérdéseimmel, ötleteimmel mindig bátran fordulhattam, és aki értékes tanácsaival és meglátásaival munkámat mindvégig maximálisan segítette, irányította és felügyelte.

Köszönet illeti továbbá az intézet dolgozói közül Szeőcs Judit és Tóth Mónika aszisztensnőket, akik az esetek kigyűjtésében segédkeztek, valamint az immunhisztokémiai és a fluoreszcencia in situ hibridizációs vizsgálatokat készítették. És végül köszönöm pótolhatatlan adminisztratív segítségét Horváthné Vígh Andreának.

MELLÉKLETEK