

Egyetemi doktori (PhD) értekezés
Összehasonlító elemzések az emlőrák HER-2 státuszának meghatározásában

Dr. Kósa Csaba

Témavezető:

Dr. Szöllősi Zoltán PhD



DEBRECENI EGYETEM

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2017.

Tartalomjegyzék

RÖVIDÍTÉSEK	4
1 Bevezetés	5
1.1 A HER2 státusz meghatározásának jelentősége	6
1.2 Célkitűzések	9
1.2.1 A dual-color dual-hapten brightfield in situ hibridizáció (DDISH) és a fluorescens in situ hibridizáció (FISH) módszerek összehasonlítása az emlőrák HER-2 amplifikációjának vizsgálatában	9
1.2.2 Az emlőrákos betegek HER-2 státuszának újra osztályozása a 17-es kromoszóma centromer régiójának vizsgálatával	9
2 Irodalmi áttekintés	10
2.1 A HER-2 státusz in situ hibridizációs technikákkal történő meghatározásának irodalmi áttekintése	10
2.2 Irodalmi áttekintés: A 17-es poliszómia jelentősége a HER-2 státusz meghatározásban	12
3 Anyag és módszer	16
3.1 Anyag és módszer a dual-color dual-hapten brightfield in situ hibridizáció (DDISH) validálásában	16
3.1.1 A tumoros minták kiválasztása	16
3.1.2 Fluoreszcens in situ hibridizáció	16
3.1.3 Dual-color dual-hapten brightfield in situ hibridizáció (DDISH)	17
3.1.4 Statisztikai analízis	18
3.2 Anyag és módszer az emlőrákos betegek HER-2 státuszának újra osztályozása során	18
3.2.1 Betegek kiválasztása	18
3.2.2 Fluoreszcens in situ hibridizáció	19
4 Eredmények	20
4.1 Eredmények a dual-color dual-hapten brightfield in situ hibridizáció (DDISH) validációs vizsgálata során	20
4.1.1 Fluoreszcens in situ hibridizáció	20
4.1.2 Dual-color dual-hapten in situ hibridizáció (DDISH).....	20
4.1.3 A két próba összehasonlítása.....	21
4.2 Eredmények az emlőrákos betegek HER-2 státuszának újra osztályozása során	22
5 Megbeszélés	24
5.1 A dual-color dual-hapten brightfield in situ hibridizáció (DDISH) validációs vizsgálata	24

5.1.1	Új megállapítások a validációs vizsgálat során.....	29
5.2	A 17-es kromoszóma centromer régió vizsgálatának jelentősége az emlőrákok HER-2 státuszának meghatározásában – eredmények megbeszélése.....	30
5.2.1	Eredményeink klinikai validálása, a betegek utánkövetése	33
5.2.2	Új megállapítások a HER-2 státusz újra osztályozása során.....	36
6	Összefoglalás	37
	Summary	38
7	Irodalomjegyzék	39
7.1	A hivatkozott közlemények jegyzéke.....	39
7.2	Saját közlemények jegyzéke.....	49
8	Tárgyszavak	51
9	Köszönetnyilvánítás	52
10	Mellékletek: a munka alapjául szolgáló publikációk másolata	53

RÖVIDÍTÉSEK

CEP17	-a 17-es kromoszóma centromer régiója
c-ERBB-2	-cellularis erythroblastos leukémia onkogén homológ, 2-es típus
CI	-konfidencia intervallum
CISH	-chromogenic in situ hibridizáció
DAPI	-4,6-diamino-2-phenilindol
DDISH	-dual-colour dual-hapten brightfield in situ hibridizáció
DIG	-digoxigenin
DISH	-dual-color in situ hibridizáció
DNP	-dinitrophenol
EGFR-2	-epidermal growth factor receptor, type 2
ERBB2	-viralis erythroblastos leukémia onkogén homológ, 2-es típus
FDA	-Food and Drug Administration
FISH	-fluorescence in situ hibridizáció
GOLDFISH	-gold-facilitated in situ hibridizáció
HE	-hematoxin-eosin festés
HER-2	-humán epidermális növekedési faktor receptor 2-es típusa
HG	-high grade (magas grádus)
HRP	-horseradish peroxydase (tormaperoxidáz)
IHK	-immunhisztokémia
ISH	-in situ hibridizáció
NPI	-Nottingham prognosztikus index
RARA	-retinoic acid receptor
RC	-konkordancia korrelációs együtthatók
RFLP	-microarray analysis, restriction fragment length polymorphism analysis
SISH	-silver in situ hibridizáció
SKY	-spectral karyotyping
SMS	-Smith-Magenis szindróma
TMA	-tissue microarray, szöveti microarray, szöveti multiblokk

1 Bevezetés

A Központi Statisztikai Hivatal haláloki statisztikai adatai szerint 2013-ban hazánkban 126778 haláleset történt, ebből 33274 daganatos megbetegedés következtében. Korábban az emlőrák volt a leggyakoribb daganatos hálálok nőknél, azonban 2003-óta a tüdőrák vezeti a rangsort mindkét nemben. A daganatos halálozásban a második helyet a vastagbélrák foglalja el. A harmadik helyen férfiaknál a prostata-, nőknél az emlőrák áll. Kb. 7000 diagnosztizált eset mellett az emlőrák Magyarországon megközelítőleg 2200 halálesetért felelős minden évben.

A daganat diagnózisának felállítása és a kezelési terv elkészítése bonyolult algoritmusok által meghatározott multidiszciplináris folyamat. A diagnózis legtöbbször valamilyen patológiai leleten alapszik.

A helyes diagnózis felállítása céljából patológiai módszerek gazdag tárháza áll rendelkezésünkre, mint például a citológia, a klasszikus szövettani vizsgálat, immunhisztokémia és molekuláris vizsgálatok. Ezen módszerek birtokában meg kell határozni a daganat méretét, a többgócúság meglétét, a pontos szövettani típust, a daganat differenciáltsági fokát (grádus), a vér- és nyirokérben való terjedést, a sebészi reszekciós szélek állapotát, valamint a regionális nyirokcsomók státuszát. Ezen felül minden esetben meg kell határozni a daganat proliferációs rátáját, a hormonreceptor és HER-2 státuszát, valamint a daganat fontos prognosztikai információkkal bíró genetikai tulajdonságait, melyekre egyre nagyobb igény mutatkozik. A folyamat kivitelezésében nemzetközi és hazai ajánlások vannak segítségünkre, melyek választható módszereket tartalmaznak, így rajtunk áll, hogy ezeket, avagy megfelelő áttekintés után egy, az ajánlásban nem szereplő másik módszert választunk.

Értekezésemben két, a szakirodalomban nagy népszerűségnek örvendő, intenzíven taglalt témakörrel fogok foglalkozni: az emlőrák HER-2 státuszának in situ hibridizációs módszerrel történő meghatározásával, illetve a 17-es kromoszóma poliszómiájának jelentőségével a HER-2 státusz meghatározásban. Mindkét téma rendkívül fontos szerepet tölt be az emlőrák prognózisának meghatározásában és a megfelelő terápiás módszer megválasztásában.

1.1 A HER2 státusz meghatározásának jelentősége

A HER-2 pozitív emlődaganatokban HER-2 protein túltermelés mutatható ki, mely lényeges negatív prognosztikai jel, mivel ezek a daganatok gyorsabban nőnek, hamarabb adnak távoli áttéteket, gyakrabban recidiválnak és a hagyományos terápiás módszereknek jobban ellenállnak. (1-3) A HER-2 pozitív daganatok célzott trastuzumab (HERCEPTIN) terápiájának bevezetésével, 1998-tól szükséges a HER-2 státusz meghatározása. (4) Az első szövettani diagnóziskor, ha emlőrák igazolódik a HER-2 tesztet rutinszerűen kell elvégezni minden egyes esetben. Ennek gyakorlati jelentősége egyre nagyobb a HER-2 pozitív emlőrákok gyors felismerésében a klinikai kezelési gyakorlat megváltozásával. A modern emlőrák kezelésben, a személyre szabott kezelési mechanizmus meghatározásában az aspirációs cytológiát jelentősen háttérbe szorította a részletesebb információkkal bíró core biopsziás mintavétel. Ennek eredményeképpen már a kezelés megkezdése előtt lényeges információkkal bírhatunk a daganatok biológiai viselkedése tekintetében és ez például a HER-2 pozitív emlőrákok esetében is a kezelési terv megváltoztatásával járhat. Egyre gyakrabban döntünk HER-2 pozitív emlőrák esetén a primer szisztémás kezelés megkezdéséről a műtéti ellátás előtt.

A hazai és nemzetközileg is elfogadott protokoll szerint az elsőként választandó módszer az immunhisztokémiai (IHK) vizsgálat, melyet három kereszttel szokás értékelni. Az immunhisztokémiai eredményeket az FDA által jóváhagyott ajánlás szerint négy csoportba szokás osztályozni, erősségük szerint. (0, 1+, 2+, 3+) (16,17) A teszt 3+ esetén tekintendő pozitívnak, illetve 0 vagy 1+ esetén negatívnak. A 2+ es esetekben bizonytalan az eredmény, így ennek tisztázása céljából újabb vizsgálatokat kell végezni, mely általában valamilyen in situ hibridizációs technika, ezzel kell feltárni az esetleges HER-2 génszakasz sokszorozódásának jelenlétét. (5)

Számos in situ hibridizációs módszer létezik, mint például chromogenic in situ hibridizáció (CISH), metallographic in situ hibridizáció, gold-facilitated in situ hibridizáció (GOLDFISH), silver in situ hibridizáció (SISH), de a leginkább elterjedt manapság a fluoreszcens in situ hibridizáció (FISH). A lehetőségek bőséges tárházában szerepelnek a dual-color in situ hibridizációs módszerek (DISH) is, mint a dual-colour chromogenic in situ hibridizáció, vagy a dual-colour dual-hapten brightfield in situ hibridizáció (DDISH). Ennek használatával megbízhatóbb eredményekhez juthatunk, mivel egyidejűleg vizsgálható a HER-2 státusz és a 17-es poliszómia jelensége valamint a szöveti struktúra, magasabb a térbeli felbontása, nem igényel speciális berendezést csak hagyományos fénymikroszkópot, magas megbízhatóságú és jól reprodukálható, illetve nem utolsó sorban költséghatékonyabb is a mindennapi gyakorlatban elterjedt FISH-szel szemben. (6,7) A már említett multidiszciplináris döntések elősegítésében, neoadjuváns kezelések indikálásában jelenthet előnyt a széles körben elérhető és gyorsabban kivitelezhető új in situ hibridizációs technika, hiszen jelenleg 2+, tehát bizonytalan immunhisztokémiai reakció esetén gyakran más intézetbe kell elküldeni az anyagot a FISH vizsgálat elvégzésére, ami jelentős idővesztést és többletköltséget jelent.

A terápiát valamint a betegség kimenetelét nagymértékben meghatározó HER-2 génszakasz sokszorozódása, ezáltal a HER-2 protein túltermelése nemcsak génamplifikáció, hanem poliszómia következtében is létrejöhet. A HER-2 gén a 17-es kromoszóma hosszú karján, a centromer régió közelében foglal helyet. Génamplifikáció esetében a HER-2-t tartalmazó szakasz sokszorozódik meg, poliszómia esetében pedig a kromoszómák száma növekszik, vele együtt a centromer régiók és az annak közelében lévő HER-2 szakaszok száma is. (8) Génamplifikáció az emlőrákos esetek kb. 20%-ában fordul elő, míg poliszómiát az esetek egyharmadában, 10% és 50% között mutattak ki attól függően, hogy milyen kritériumrendszert használtak. (9) Ennek elkülönítése végső soron a beteg sorsát befolyásolja. Egyrészt prognosztikai faktorként is értékelhető, másrészt a gyógyszeres terápia hatékonyságát is jelentősen meghatározza. 17-es poliszómia esetén rosszabb prognózis várható (8) és a célzott trastuzumab kezelés is hatástalan marad, ami nem elhanyagolható, a terápiával járó jelentős citotoxicitás és a költségek miatt. A poliszómia vizsgálatára számos módszer létezik: in situ hibridizáció (ISH), spectral karyotyping (SKY), microarray analysis, restriction fragment length polymorphism analysis (RFLP), áramlási citometria stb. A génamplifikáció és poliszómia elkülönítése vagy két in situ hibridizációs vizsgálat összehasonlításával történik, ahol az egyik esetben a HER-2 génszakasz festődik a másikban pedig a 17-es kromoszóma centromer régiója, vagy dual-color in situ hibridizációs módszerekkel lehetséges sokkal egyszerűbben, melynek lényege, hogy a kromoszóma centromer régiója és a HER-2 gén külön, más színnel festődik, így ezek arányából megállapítható, az amplifikáció és/vagy poliszómia jelenléte. Dolgozatomban emlőrákos esetek HER-2 státuszának újra osztályozását végeztem el, a 17-es poliszómia jelenlétének figyelembevételével.

1.2 Célkitűzések

1.2.1 A dual-color dual-hapten brightfield in situ hibridizáció (DDISH) és a fluorescens in situ hibridizáció (FISH) módszerek összehasonlítása az emlőrák HER-2 amplifikációjának vizsgálatában

- A HER-2 státusz in situ hibridizációs technikákkal való meghatározásának irodalmi áttekintése.
- A dual-color dual-hapten brightfield in situ hibridizáció (DDISH) és a fluorescens in situ hibridizáció (FISH) módszerek eredményeinek összehasonlítása.
- A dual color dual hapten brightfield in situ hibridizáció (DDISH) használatával kapcsolatos tapasztalatok összefoglalása.

1.2.2 Az emlőrákos betegek HER-2 státuszának újra osztályozása a 17-es kromoszóma centromer régiójának vizsgálatával

- Irodalmi áttekintés: A 17-es poliszómia jelentősége a HER-2 status meghatározásban.
- Emlőrákos betegek HER-2 státuszának újra osztályozása génamplifikáció és a 17-es kromoszóma centromer régiójának vizsgálatával, alternatív módszer alkalmazásával, mely terápiás következményekkel járhat és pontosíthatja a bizonytalan esetek megítélését.

2 Irodalmi áttekintés

2.1 A HER-2 státusz in situ hibridizációs technikákkal történő meghatározásának irodalmi áttekintése

Az emlőrák diagnosztikája jóval komplexebb folyamattá vált az elmúlt években. A kórisme intraoperatív megállapítása helyett a multidiszciplináris közegben megvalósuló preoperatív/nonoperatív diagnosztika került előtérbe. Egyre nagyobb hangsúlyt kaptak azok a prediktív markerek (ösztrogénreceptor, progeszteronreceptor, HER-2, bazális és proliferációs markerek), melyek az emlőrákok molekuláris típusát határozzák meg, segítséget nyújtva a szisztémás kezelés megválasztásában, vagy a neoadjuváns kezelés indikációjában. (10)

Az epidermális növekedési faktor receptor 2. típusa (EGFR-2), más néven: c-ERBB-2, vagy HER-2/neu egy, a 17-es kromoszóma hosszú karjára (17q12) lokalizálódó gén, melyet 1985-ben klónoztak először. (11) Terméke egy 185 kDa súlyú transzmembrán lokalizációjú tirozin-kináz aktivitással bíró enzim, melynek saját ligandját a család többi tagjával ellentétben még nem sikerült azonosítani. (12,13) A ligand kötődése aktiválja a receptort, annak citoplazmatikus része foszforilálódik, a receptorcsalád egy másik tagjával összekapcsolódik és a RAS jelátviteli úton keresztül a p13k úton beindítja a sejtproliferációt, valamint gátolja az apoptózist. (14) A gén megsokszorozódása, amplifikációja a fehérje túltermeléséhez vezet, aminek következményeként a sejtfelszínen nagy tömegben jelennek meg a receptorok, mely immunhisztokémiai (IHK) reakcióval is kimutatható, ezáltal mérhetővé válik.

A HER-2 státusz meghatározása rutinszerűen minden emlőrákos esetben meg kell, hogy történjen. (5) A meghatározás első vonalban immunhisztokémiai módszerrel történik, mely egy egyszerűen kivitelezhető, a legtöbb szövettani laborban rutinszerűen végezhető folyamat. Egy hazai felmérés - amely immunhisztokémiai reakciók értékelését hasonlította össze

különböző intézetek között - kimutatta, hogy Magyarországon az emlőrákok HER-2-pozitivitási aránya szövettani laboratóriumonként nagyon változó, és összesítve a nemzetközi irodalmi adatok alsó értéke körül mozog (12% 3+ és 11% 2+ értékelésű eset). A HER-2-immunhisztokémia minőségellenőrzése céljából önkéntes részvételű, anonimá tett, háromfordulós körvizsgálat eredményei alapján a HER-2-státusz meghatározása csak megfelelő minőségbiztosítás mellett ad megbízható eredményeket, mert a kiértékelés meglehetősen szubjektív, a reprodukálhatóság alacsony, kiváltképp a bizonytalan 2+-es esetekben. (15) Az FDA által jóváhagyott protokoll is a szubjektivitást próbálja csökkenteni azáltal, hogy a reakciókat négy csoportba osztályozza erősségük szerint, melyet keresztekkel jelölünk. (0, 1+, 2+, 3+) (16,17) Több esetben megfigyelték, hogy IHK vizsgálattal pozitív reakciót adó esetek egy része alacsony arányban mutat összefüggést a trastuzumab kezelés hatékonyságával. A jelenség azzal áll összefüggésben, hogy a HER-2 fehérje felszaporodását nem csak a gén amplifikációja okozhatja, hanem a 17-es kromoszóma poliszómiája is, ahol a kromoszómák számának növekedésével együtt a HER-2-t kódoló szakaszok száma is nő. Ezzel magyarázható a génamplifikáció nélküli, immunhisztokémiaileg kimutatható fehérje túlermelés. (18-22) Ezért a nemzetközileg elfogadott és a hazai protokoll részeként is a bizonytalan 2+ esetekben valamely in situ hibridizációs módszerrel további vizsgálatot kell végezni. A 2013-as ASCO/CAP ajánlás is tartalmazza, hogy akár ISH módszerek is alkalmazhatók első választásként, sőt egyes szerzők kifejezetten ezt ajánlják az IHK szubjektivitása és technikai nehézségei miatt, melyek következtében akár ugyanazon blokkok ismételt vizsgálata is eltérő eredményt mutathat. (80) Mindazonáltal az IHK olcsósága és technikai egyszerűsége miatt nem szorulhat ki az elsőként választandó módszerek közül.

FISH esetében a fluoreszkáló jelet a daganatsejtekben direkt módon lehet számolni. Dual-color módszerrel pedig egyszerre festhető meg külön színnel a 17-es kromoszóma centromerje (CEP17) és a HER-2/neu gén lókusza. Sejtenként számolva meghatározható az

egy kromoszómára, illetve egy sejtmagra eső gének száma. Ez a fajta kiértékelés nagyfokban növeli az ISH technikák objektivitását és megbízhatóságát. (23,24) A FISH költségei, időigényessége és technikai feltételei (fluoreszcens mikroszkóp használata) miatt több patológiai laborban nem áll rendelkezésre, emiatt számos új ISH módszer adott a HER-2 vizsgálatára, melyek megbízhatóságát, időigényét, technikai feltételeit és nem utolsósorban árát néhány tanulmány igen intenzíven tárgyalja. Az FDA által jóváhagyott scoring rendszerben az immunhisztokémiailag 2+ erősségűnek, azaz bizonytalanul megítélhetőnek vélt daganatokot tovább kell vizsgálni valamely in situ hibridizációs módszerrel. (FISH, CISH, SISH, GOLDFISH) Az alternatív in situ hibridizációs módszerek konkordanciája igen kiemelkedő, gyakorlatilag valamennyi esetben 90% feletti. (30-33)

Az utóbbi időben jelentek meg a dual-color brightfield in situ hibridizációs technikák, melyek technikailag egyszerűbbek, a scoring rendszerük azonos a többi módszerével, rövidebb a vizsgálati idő és egyazon metszeten a szöveti struktúra is vizsgálható a HER-2 lókuszok és a 17-es kromoszóma centromerje mellett. Ezen módszerek viszonylagosan újak számítanak, így a patológiai laboratóriumok nem mindig rendelkeznek még a mindennapos használatával kapcsolatos megfelelő mennyiségű tapasztalattal, de vizsgálatok szerint ezek az eljárások is magas konkordanciával bírnak (90% felett). Jelen munkámban is egy dual color módszer validálását végeztük el, a dual-color dual-hapten brightfield in situ hibridizációjét. (DDISH) Ha a módszer megbízhatósága megfelelő, gazdaságosabbá, gyorsabbá és hatékonyabbá teheti a HER-2 státusz meghatározását emlőrákok esetében.

2.2 Irodalmi áttekintés: A 17-es poliszómia jelentősége a HER-2 státusz meghatározásban

Az emlőkarcinóma prognózisának megítélésében és a megfelelő kezelési terv elkészítésében nélkülözhetetlen szerepet játszik a daganat HER-2 státuszának meghatározása, (38-40) mely az emlődaganatok kb. 20%-ában mutat túltermelést. (41,42) A célzott trastuzumab (HERCEPTIN) kezelés hatékonysága szoros összefüggést mutat a daganat HER-2 státuszával. A trastuzumab egy humanizált monoklonális antitest a HER-2 protein ellen, mely a HER-2-t túltermelő sejtek proliferációját gátolja, ezáltal biztosítva hosszabb túlélést a betegeknek. (43-47) Mindezekon túl a trastuzumab kezelés igen költséges és nem elhanyagolható veszélye a cardiotoxicitás, melyet a kezelt betegek 1-4%-ában figyeltek meg. (48) Ebből is látható, hogy a HER-2 meghatározás kulcsfontosságú lépése az emlőrákok sikeres kezelésének, azonban megfigyeltek olyan eseteket, melyekben immunhisztokémiailag kimutatható volt a HER-2 túltermelés, de a daganat mégsem reagált kellőképpen a gyógyszeres kezelésre. Ennek háttérében az állt, hogy a HER-2 fehérje túltermelése nem csak génamplifikáció útján jöhet létre, hanem poliszómia útján is. Génamplifikáció során a 17-es kromoszóma hosszú karján a HER-2-t tartalmazó génszakasz sokszorozódik meg. Poliszómia esetén pedig a 17-es kromoszómák száma nő, ezzel együtt pedig a rajtuk lévő HER-2-t tartalmazó szakaszok száma is. Ez okozza a jelenséget, miszerint immunhisztokémiailag kimutatható egyértelmű 3+ HER-2 fehérje túltermelés mellett negatív fluoreszcens in situ hibridizációs eredmény születik. (49-54) Ezekben az esetekben a 17-es kromoszóma számának növekedéséhez emelkedett ERBB2 protein szint kapcsolódik, de ERBB2 génamplifikáció nélkül. Ugyanakkor egy belga tanulmány által talált poliszómiás esetek kizárólag bizonytalan (2+) IHC festődést mutattak.(73) Ezen felül olyan esetekről is beszámoltak, melyekben 17-es poliszómiás IHC 3+, FISH negatív daganatok reagáltak trastuzumab kezelésre. (55) Összességében elmondhatjuk, hogy a 17-es poliszómiával bíró esetek nagy részében nem figyelhető meg génamplifikáció, ami arra utal, hogy a génamplifikáció és a poliszómia keletkezési mechanizmusa egymástól független. (50)

Lényeges tehát elkülöníteni a 17-es kromoszóma poliszómiáját és a HER-2 génamplifikációt, ami legegyszerűbben a HER-2/neu génszakaszok számának és a 17-es kromoszóma centromer régiójának (CEP17) arányával (HER2/CEP17 arány) lehetséges. (56,57) A HER-2/CEP17 arány vizsgálatára alkalmasak az úgynevezett dual-color in situ hibridizációs technikák, melyekben külön színnel festődik a HER-2 génszakasz és a 17-es kromoszóma centromer régiója, így ezek arányából következtethetünk az esetleges poliszómia és/vagy génamplifikáció jelenlétére. A gyógyszeres kezelésen túl ez azért is fontos, mert a 17-es poliszómiás emlőrákok rosszabb prognózist szavatolnak. A rosszabb prognózis azzal magyarázható, hogy a 17-es kromoszóma aneuploiditása genetikai instabilitásnak tekinthető, mely hozzájárul az emlőrák kialakulásához a genetikai hibák felhalmozásán keresztül. (70) Így számos tanulmány adatai szerint magasabb nukleáris atípiá, magasabb arányú limfogén metasztázis, magasabb nyirokcsomó érintettség, emelkedett proliferációs index, és magasabb Nottingham Prognosztikus Index (NPI) társul azon emlőrákokhoz, melyekben a 17-es kromoszóma poliszómiája kimutatható, ezáltal alacsonyabb túlélési idő. (71-74) Egy tanulmány ellentmond a fent említetteknek, mivel Torrisi és munkatársai (65) szerint az amplifikáció nélküli 17-es poliszómia nem értékelhető rossz prognosztikai faktorként.

Bizonyos esetekben, amikor a CEP17 és a HER-2 jel is magas arányú in situ hibridizációs vizsgálómódszerrel, nem mindig jelent 17-es kromoszóma poliszómiát. Az ilyen esetekben az emelkedett HER-2 és CEP17 jel a két génszakasz (a HER-2 és a centromer régió) koamplifikációja miatt jön létre, ily módon álpozitív eredményt hozva poliszómiára. Alternatív 17-es kromoszóma próbák alkalmazásával bizonyították - mint például SMS (Smith-Magenis syndrome, 17p11.2) és RARA (retinoic acid receptor, 17q21.2) -, hogy a CEP17 eltérések hátterében gyakran (55,5%) a centromer régió amplifikációja áll. Ennek fényében a valódi poliszómia és a HER-2/CEP17 koamplifikáció elkülönítése rendkívül fontos a HER-2 státusz helyes meghatározása céljából, ezért sokan az egyes alternatív 17-es

kromoszóma próbák, illetve HER-2 és ezek (HER-2/RARA és HER-2/SMS) arányainak vizsgálatát tartják kívánatosabbnak, hogy pontosabb képet kapjanak az adott eset génstátuszáról. (4,75)

A klinikai gyakorlatban egyre nagyobb szükség van a poliszómia szűrésére emlőrákok esetén, mivel jelentősen befolyásolja a választandó kezelést, a prognózist és végső soron a beteg túlélési idejét. Dolgozatomban emlődaganatok HER-2 státuszának újra osztályozását végeztem el a 17 kromoszóma poliszómiájának figyelembevételével.

3 Anyag és módszer

3.1 Anyag és módszer a dual-color dual-hapten brightfield in situ hibridizáció (DDISH) validálásában

3.1.1 A tumoros minták kiválasztása

2010 és 2011 között diagnosztizált 105 invazív emlőrákos beteget választottunk ki a vizsgálatra. Valamennyi esetben a műtéti preparátumból paraffinos blokkok álltak rendelkezésre, mely a beválaszthatóság előfeltétele volt. A rendelkezésre álló paraffinos blokkokból készült metszetek alapján választottuk ki a további vizsgálatnak alávett, tumort tartalmazó részeket. A korábban készült hematoxin-eosin (HE) metszeteket és az immunreakciókat valamennyi esetben patológus vizsgálta felül és ellenőrizte a korábbi diagnózis helyességét. A munka során a mintákat kódokkal jelöltük, hogy a mindenkori orvosi etikai szabályzatban foglaltaknak megfelelően a minták kapcsán a betegeket azonosítani ne lehessen.

3.1.2 Fluoreszcens in situ hibridizáció

A metszeteket xilolban deparaffináltuk és etanolban rehidráltuk. A tárgylemezeket Paraffin Treatment II kittel (Abbot-Vysis, Downers Grove, IL, USA) kezeltük a használati útmutató szerint. Röviden: a lemezeket 6 percig proteáz-K oldattal kezeltük 37 °C-os vízfürdőben. Öblítés és levegőn történő szárítást követően 10 µl próbát tettünk mindegyik lemezre. Fedés és gumi tömítővel való lezárás után a metszeteket 5 percig 73 °C-on denaturáltuk, majd ezt követően egy éjszakán át 37 °C-on hibridizáltuk. A hibridizációt StatSpin® Thermobrite hibridizációs készülékkel végeztük (Abbott-Vysis, Downers Grove, IL, USA). A metszetek hibridizáció utáni mosását követően 20 µl 4,6-diamino-2-phenilindollal (DAPI) festettük.

3.1.3 Dual-color dual-hapten brightfield in situ hibridizáció (DDISH)

A DDISH teljesen automatizált folyamat, melyet Roche Diagnostics BenchMarkXT™ készülék segítségével végeztünk (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) a használati útmutató szerint. Tömören: a metszeteket deparaffináltuk, ezután két ciklusban 8 és 12 percig citrát pufferben (pH 6) kezeltük 90 °C-on majd ezt követően proteáz 3-mal kezeltük 16 percig. Haptén jelölt próbát, dinitrophenol (DNP) jelölt HER-2 próbát és digoxigenin (DIG) jelölt 17. kromoszóma centromer specifikus próbát alkalmaztunk. A próbát és a mintát 80 °C-on 20 percig denaturáltuk, amit 6 órás hibridizáció követett 44 °C-on. A jelek detektálását egymás után végeztük el a 17. kromoszóma centromer és HER-2 lokusznál egyaránt. Mosást követően a HER-2 szignált 20 perces nyúl anti-DNP monoklonális antitesttel történő inkubáció után HRP-konjugált kecske, nyúl-ellenes antitesttel kezeltük 16 percig, majd ezüst-detektálási reakciót használtunk, (silver, hydroquinone and hydrogen peroxide) mely fekete színű jelet eredményezett. A 17. kromoszóma centromerjét egér anti-DIG monoklonális antitesttel kezeltük 20 percig, majd alkalikus foszfatáz-konjugált kecske, egér ellenes antitesttel 24 percig, végül Fast Red/Naphthol detektálási reakciót alkalmaztunk, mely piros szignált eredményezett. A tárgylemezre pár csepp csapvíz tartalmú tisztítószer került, majd három öblítés történt ultratiszta vízzel. Ezután 15 percig 37 °C-on szárítottuk, végül DePeX-el fedtük. (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) Minden mintában 30 különálló, fedésben nem lévő sejtmagot vizsgáltunk meg, a HER-2/CEP17, a HER-2 és a Chr17. szignálok számának meghatározására. A SISH szignálok referencija jel használatával becsültük meg. HER-2 amplifikáció szempontjából negatívnak tekintettük az esetet, ha a HER-2/CEP17 arány kevesebb mint 1,8 volt, illetve 2,2 fölött pozitívnak. Bizonytalan esetekben, azaz 1,8 és 2,2 közötti értékeknél újabb 20-40 sejtet vizsgáltunk meg, melyek

alapján újra számoltuk az eredményt. Ha a 17. kromoszóma sejtenkénti számának átlaga 2,5 fölött volt, poliszómiát állapítottunk meg.

3.1.4 Statisztikai analízis

Konkordancia korrelációs együtthatók (RC) és Bland-Altman-féle 95%-os egyezési határok kiszámításának segítségével értékeltük az eljárások közötti egyezést, a folytonos változóként kifejezett eredményekre vonatkozóan. (76-78) Az adathalmaz centrumának megjelenítéséhez az átlagok metszéspontján a szórások hányadosának megfelelő meredekséggel áthaladó egyenest, azaz redukált fő tengelyt alkalmaztunk. A kategorikus kimenetek közti egyezést Kappa-statisztikával vizsgáltuk, bootstrap-alapú, tehát az osztályok számának megfelelően analitikus eljárással képezve annak konfidencia-intervallumát. (CI) (79)

3.2 Anyag és módszer az emlőrákos betegek HER-2 státuszának újra osztályozása során

3.2.1 Betegek kiválasztása

405 emlőrákos beteget választottunk ki, mely eseteket a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum Patológiai Intézetében diagnosztizáltak. Az összes esethez tartozó korábbi FISH-lelet rendelkezésre állt. A tumoros minták az esetek nagy többségében szöveti microarray blokkokban (TMA) voltak vizsgálva, melyeket előzőleg FISH segítségével teszteltünk. A fennmaradó esetekben hagyományos blokkokból történt a meghatározás. A TMA blokkokból és a többi blokkból hagyományos metszeteket húztunk le felületkezelt tárgylemezre. A korábbi hematoxilín-eosin (HE) metszeteket és az immunfestéseket minden esetben patológus vizsgálta felül.

3.2.2 Fluoreszcens in situ hibridizáció

A minták FISH vizsgálata a következőképp zajlott: a TMA és hagyományos metszetet xilolban deparaffináltuk és etanolban rehidráltuk. A tárgylemezeket a Vysis által gyártott Paraffin Pretreatment II kittel kezeltük (Vysis, Downers Grove, IL, USA) a használati utasítások szerint. Röviden: a lemezeket 37 °C-os vízfürdőben 6-10 percig proteáz-K oldattal kezeltük. Öblítés és levegőn történő szárítás után 10 µl dual-color próbát (PathVysion, Vysis) tettünk mindegyik lemezre. Fedés és gumitömlővel való lezárás után a metszeteket 73 °C-on 5 percig denaturáltuk és éjszaka 37 °C-on hibridizáltuk. A hibridizáció után a metszeteket mostuk, majd 20 µl DAPI-val (4,6-diamino-2-phenilindol) festettük. A FISH szignálokat Olympus BX51-es fluorescence mikroszkóppal azonosítottuk. A filterpárt a PathVysion kithoz optimalizáltuk. A HER-2 lókuszt specifikus azonosító jel és a centromer azonosító jel arányát (HER-2/CEP17) tumoronként 60 tumorsejten, 100-szoros immerziós nagyítással számoltuk le. Pozitív HER-2 amplifikációnak tartottuk, ha a HER-2 szignál és a 17-kromoszóma aránya 2,2 vagy annál több volt, míg negatív eredményt 1,8 alatti értéknél állapítottunk meg. Bizonytalan esetekben - amikor az arány 1,8 és 2,2 közötti érték volt - további 20-40 sejtet vizsgáltunk meg és ennek megfelelően értékeltük újra az eredményt. Ha a 17. kromoszóma sejtenkénti számának átlaga 2,5 fölött volt poliszómiát állapítottunk meg.

4 Eredmények

4.1 Eredmények a dual-color dual-hapten brightfield in situ hibridizáció (DDISH) validációs vizsgálatán

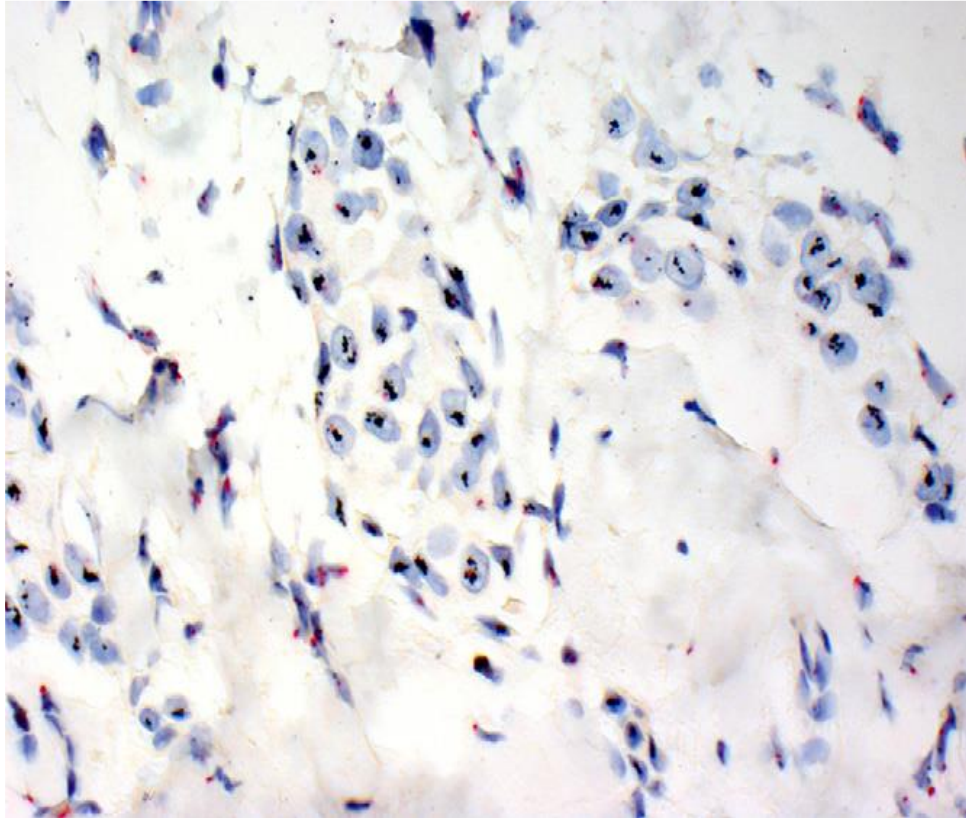
4.1.1 Fluoreszcens in situ hibridizáció

A HER-2 FISH analízis a PathVysion segítségével valamennyi emlőrákos esetben sikeres volt. Technikai hibából kifolyólag egy esetet sem kellett kizárnunk a vizsgálatból. A festődés és a szignál minősége kiváló volt. PathVysion reagenssel 71 esetben nem volt amplifikáció, míg 28 esetben pozitív reakciót láttunk.

4.1.2 Dual-color dual-hapten in situ hibridizáció (DDISH)

A DDISH protokoll módosítása a protokoll optimalizáció során minimális hatással volt az eredményekre. A protokoll szerint 16 perces proteáz emésztés és 72 °C-os mosás szükséges. Ezután 8 mintában nem láttunk piros szignált. Az előkezelési módosítások elvégzése után az ismételt hibridizációval 6 mintára csökkent a piros szignálok hiánya. Ezeket a mintákat a vizsgálatból kizártuk. Ezen inadekvát hibridizációk a fixálás és az előkezelés következményei lehetnek, mely felhívja a figyelmet arra, hogy a DDISH ezen eljárásokra érzékenyebb lehet, mint a FISH. A fixálás önmagában befolyásolja az immunhisztokémiai vizsgálatok eredményét, de a molekuláris vizsgálatokét is. Ezért is – valamint a neoadjuváns terápia meghatározásának megkönnyítésére - javasolt a core biopsziás anyagon végezni a HER-2 meghatározást. Mivel centralizáltan történő vizsgálatokról van szó, különböző mintavételi intézetekből, különböző patológiákról származnak a minták, így különböző a fixálási idő, tárolás, szállítás körülményei. Emiatt más-más előkezelés kellene, de az automatizálás miatt nem teljesen lehetséges, csak egy, a minták nagy részére optimális előkezelés. FISH esetén nem okoz problémát, hogy fedné egymást a két különböző színű

reakció, mivel külön szűrővel vizsgáljuk a zöld és a piros jeleket. DDISH-nél viszont nincs szűrő, tehát itt előfordulhat, hogy a cluster-szerű amplifikáció lefedi a centromer specifikus (piros) jelet, így az nem látható. (1. ábra) DDISH-el 75 esetben nem láttunk amplifikációt és 24 esetben kaptunk pozitív reakciót.



1.ábra HER-2 DDISH-el. Az összecsapódott, amplifikált HER-2 szignálok „elfedik” a piros jeleket

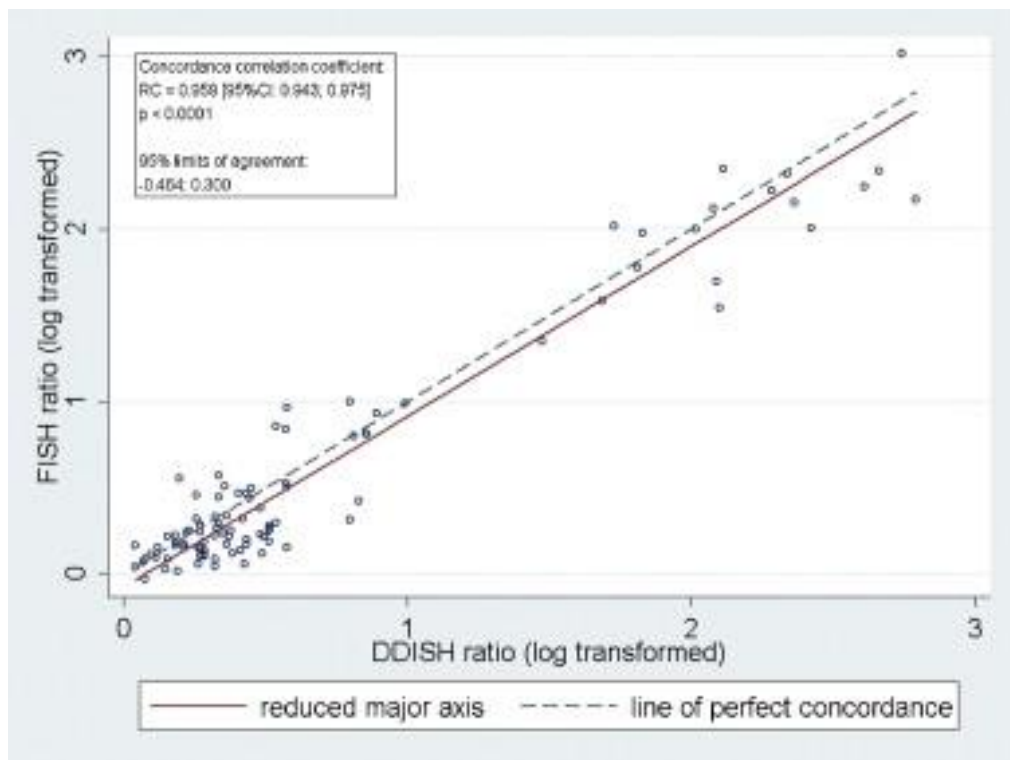
4.1.3 A két próba összehasonlítása

A különböző reakciók szubjektív megítélés mellett hasonló mértékben voltak értékelhetőek. A HER-2/CEP17 arányt folytonos változóként vizsgáltuk. 99-ből 4 minta mutatott eltérést a FISH eredményekhez képest. Ez a négy minta negatív volt DDISH-el vizsgálva. (1. táblázat) A konkordancia korrelációs együttható (RC) közel tökéletes egyezést mutatott a HER-2/CEP17 arányok vizsgálata során PathVysion és DDISH módszerek esetén. (RC=0.959, $P < 0.0001$) A redukált főtengety ábrázoló grafikonról is hasonló eredmény volt leolvasható, miszerint a főtengety a tökéletes konkordanciát jelölő egyenes közvetlen

szomszédságában haladt. A két módszer egyezésének mértéke Kappa statisztikával igen jelentős, 95.9%. (Kappa=0.8712, P<0.0001) (2. ábra)

	FISH nem amplifikált	FISH amplifikált	Összesen
DDISH nem amplifikált	71	4	75
DDISH amplifikált	0	24	24
Összesen	71	28	99

1.táblázat Dual-color dual-hapten in situ hibridizáció (DDISH) és fluorescence in situ hibridizáció (FISH) eredmények összefoglalása.



2.ábra FISH és DDISH során talált HER2/CEN17 hányadosok konkordanciája

4.2 Eredmények az emlőrákos betegek HER-2 státuszának újra osztályozása során

Munkámban 405 emlőrákos eset HER-2 státuszának újra osztályozását végeztem el a 17-es kromoszóma poliszómiájának figyelembevételével. Az eredeti FISH leletek rendelkezésre álltak, melyeket minden esetben patológus vizsgált felül. Ha a HER-2 lokuszok sejtenkénti száma 6 fölött volt, úgy HER-2 pozitívnak tekintettük. Amennyiben viszont a

lokuszok száma 6 vagy attól kevesebb volt, az esetet negatívnak véleményeztük. A 405 megvizsgált esetből 143 mutatott génamplifikációt és 243 pedig negatívnak bizonyult az alkalmazott FISH módszerekkel. Összesen 19 (4,69%) ellentmondásos eset fordult elő, amiből 5 (1,23%) eredetileg nem mutatott amplifikációt, de a HER-2 lokuszok sejtenkénti száma 6 fölött volt. Ennek megfelelően újra osztályoztuk őket, mint HER-2 pozitív eseteket. Ezen felül 14 esetben (3,46%) eredetileg amplifikáció volt kimutatható 6, vagy az alatti HER-2 lokusz számok mellett. (2. táblázat)

		Eredmények a HER2/CEP17 arány figyelembevételével	
		Amplifikált	Nem amplifikált
Eredmények a HER2 jelek egyedüli értékelésével	Amplifikált	143 (35,31%)	5 (1,23%)
	Nem amplifikált	14 (3,46%)	243 (60,00%)

2. táblázat Her-2 státusz a CEP17 szignálok figyelembevételével és anélkül

5 Megbeszélés

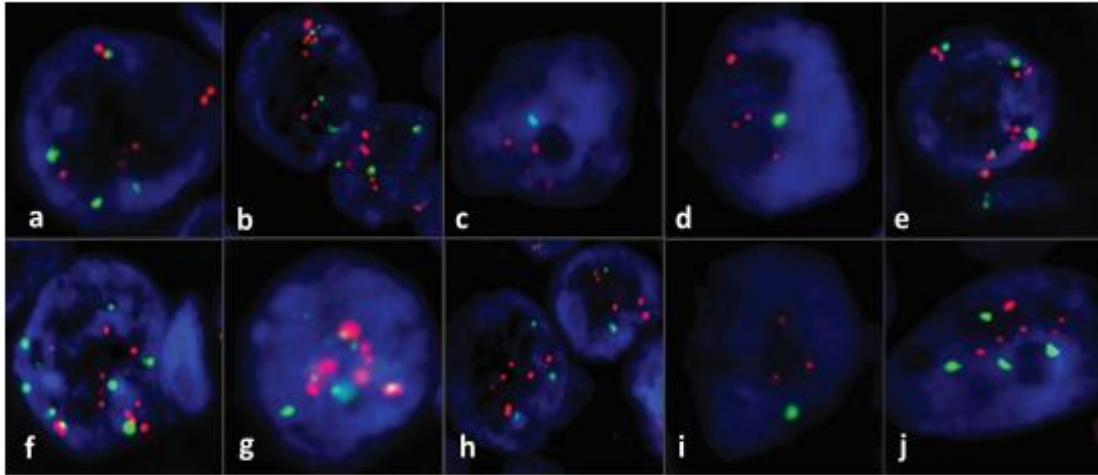
5.1 A dual-color dual-hapten brightfield in situ hibridizáció (DDISH) validációs vizsgálata

Emlőrákok esetében a diagnosztikai lehetőségek egyre gazdagabb tárháza áll rendelkezésünkre, mely miatt a folyamat jóval összetettebb lett az elmúlt évek során. Kiemelkedően fontos szerepet kaptak az emlőrákok molekuláris típusát meghatározó tényezők, mint például az ösztrogénreceptor, progeszteronreceptor, HER-2 státusz, bazális és proliferációs markerek. Ezek segítségével átfogóbb képet kaphatunk az egyes daganatok tulajdonságairól, így téve könnyebbé a megfelelő terápiás módszer megválasztásához szükséges döntések meghozatalát. (10) Ezek között a HER-2 státusz még inkább kiemelkedik, mivel a HER-2 pozitív daganatokban a túlzott HER-2 fehérje termelés ellen célzott trastuzumab (HERCEPTIN) kezelés alkalmazható.

Az epidermális növekedési faktor receptor 2. típusa (EGFR-2), más néven: c-ERBB-2, vagy HER-2/neu génjének amplifikációja a HER-2 fehérje túltermeléséhez vezet, mely különböző módszerekkel kimutatható. A mindennapi gyakorlatban az immunhisztokémia (IHK) terjedt el, valószínűleg azért, mert a vizsgálat paraffinos blokkon kivitelezhető és illeszkedik a rutin patológiai munkafolyamatokba. Összehasonlító elemzések alapján elmondhatjuk, hogy az immunhisztokémiailag HER-2 negatív (0, 1+) tumorok FISH vizsgálattal 92-98%-ban nem mutattak ki génamplifikációt. Hasonló eredmények születtek HER-2 pozitív (3+) daganatok esetén is, ahol 89-100%-ban mutattak ki egyezést a két vizsgálómódszer között. A bizonytalanul megítélhető esetekben (2+) már csak a daganatok 23-25%-ában mutatható ki génamplifikáció. (25-29) Ez az, ami miatt lehetővé vált, hogy az immunhisztokémiai reakciókat előszűrő tesztként lehessen alkalmazni a daganatok HER-2 státuszának meghatározása során.

A 2+-es esetek megítélése bizonytalan, mivel beszámoltak olyan esetekről, ahol az immunhisztokémiai reakció pozitivitása mellett a daganat célzott trastuzumab kezelésre adott válasza nem volt megfelelő. Ennek háttérében az állt, hogy bizonyos esetekben a HER-2 génszakasz megsokszorozódása nem amplifikáció útján jön létre, hanem a 17-es kromoszóma poliszómiája révén, ami azt jelenti, hogy több 17-es kromoszóma van jelen a sejtben, ezáltal több a HER-2-t kódoló gén szakasz és az immunhisztokémiaileg kimutatható fehérjék mennyisége, ily módon hamisítva meg az immunhisztokémiai eredményeket. (18-22) Ilyenkor a HER-2 státusz pontos feltárásának és az esetleges génamplifikáció kimutatásának céljából további vizsgálatokat kell végezni, mely általában valamilyen in situ hibridizációs módszer. A mindennapokban leginkább elterjedt módszer a fluorescens in situ hibridizáció (FISH), mely szintén paraffinos szöveti blokkból kivitelezhető és szintén jól illeszkedik a rutin patológiai diagnosztikába, azonban a vizsgálatok kiértékeléséhez fluoreszcens mikroszkóp is szükséges. Manapság számos in situ hibridizációs módszer létezik, melyek hatékonyságát és megbízhatóságát a szakirodalom igen intenzíven tárgyalja. Izgalmas új területként bukkantak fel az úgynevezett dual-color in situ hibridizációs módszerek, melyek segítségével összetettebb képet kaphatunk az egyes daganatok HER-2 státuszáról. Ezek a módszerek teljesen automatizáltak, nem igényelnek speciális technikai felszerelést, a scoring rendszerük megegyezik a többi módszerével, kevesebb idő alatt juthatunk eredményhez, nem beszélve arról, hogy költséghatékonyabb a FISH-hez képest és a patológusoknak is időt spórol azáltal, hogy egyazon mintában a szöveti struktúra mellett számolható a HER-2 lókuszon és a 17-es kromoszóma centromerje. Ezzel pontos információt kapunk a génamplifikáció és/vagy poliszómia jelenlétéről. A mintákban hosszú szobahőmérsékletű tárolás esetén sem csökken számottevően a jelintenzitás. Mindazonáltal a dual-color módszerek viszonylagosan újak számítanak, így a patológiai laboratóriumok nem mindig rendelkeznek még a mindennapos használatával kapcsolatos megfelelő mennyiségű tapasztalattal. Ugyanakkor ezek az eljárások

is magas konkordanciával bírnak (90% felett), buktatójukat ugyanaz képezi, mint a többi in situ hibridizációs módszernél: a szövetminta előkészítése során az emésztés. Ha ez nem megfelelően történik a reakció nem lesz értékelhető. (7,34-37) Ezen módszerrel elkülöníthetjük, hogy valódi génkópia szám megsokszorozódásról, génamplifikációról vagy 17-es kromoszóma számának megsokszorozódásáról, poliszómiáról van-e szó. (3. és 4. ábra) Ez kiemelkedő fontosságú lehet a megfelelő terápiás módszer megválasztásában, ugyanis 17-es poliszómia esetén a daganat nem fog kellőképpen reagálni a célzott trastuzumab terápiára, ugyanakkor a beteget feleslegesen tesszük ki jelentős mellékhatásoknak, mint például a kardiotoxicitás. (48) Számos dual-color módszer létezik, dolgozatomban a dual-color dual-hapten brightfield in situ hibridizáció (DDISH) validálását végeztem el, mely során a fluoreszkáló festékkel direkt jelölt DNS próbák alkalmazásával a HER-2 génkópia szám és a 17-es kromoszóma centromer régiójának arányát is vizsgáltuk. A FISH, mint a nemzetközi szakirodalomból kiderül, egy igen elterjedten használt, bevett módszer, viszont magas költsége, időigényessége, egyéb technikai feltételei miatt a legtöbb patológiai laborban a berendezések üzemeltetése és karbantartása miatt nem fenntartható vagy nem áll rendelkezésre. Ilyen formán joggal merül fel a kérdés, hogy egy alacsonyabb költségű, gyorsabban, egyszerűbben kivitelezhető módszer adhat-e ugyanolyan megbízható és jó eredményeket?

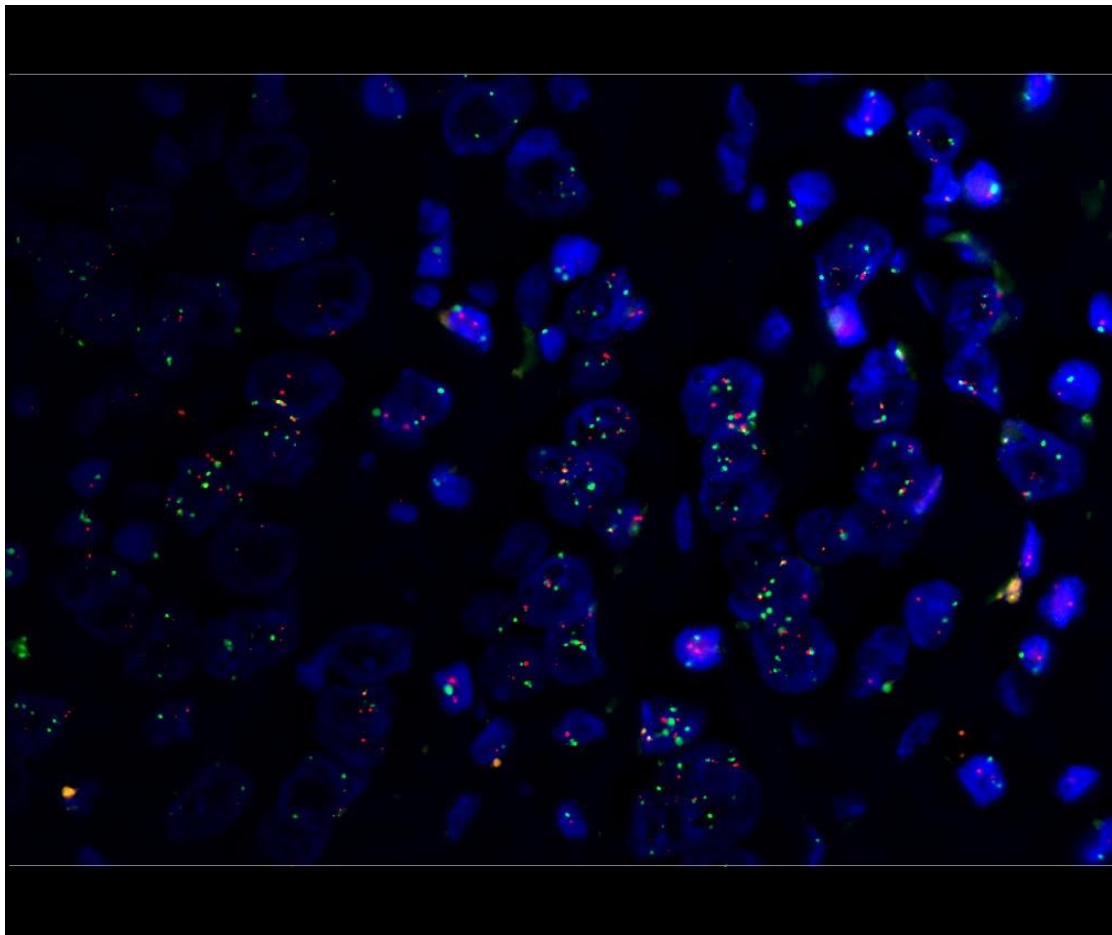


3.ábra Hat, vagy feletti HER-2 kópiaszám ellenére HER-2 nem amplifikáltak minősített esetek a szokatlanul magas CEP17 szám miatt, mely poliszómia jele (a,b,e-h, j);
A relatíve alacsony HER-2 kópiaszám ellenére a szintén alacsony (kb. 1) CEP17 szám miatt (mely monoszómia következménye lehet) amplifikáltak minősített esetek (c,d,i)

A dual-color dual-hapten brightfield in situ hibridizációs módszert a HER-2 gének kópia szám meghatározására optimalizálták, mely mellett az adatok a 17-es kromoszóma centromer régiók száma (CEP17) alapján korrigálhatók. A vizsgálat során az excitációs és emissziós hullámhosszok ugyanazzal a szűrőpárral detektálhatók, melyeket a PathVysion kithoz fejlesztettek ki. Ezek mellett azt tapasztaltuk, hogy a dual-color dual-hapten brightfield in situ hibridizáció során könnyen értékelhető, szép, egyértelmű jeleket kaptunk. Az értékelés során 8 mintában nem láttunk piros szignált. Az előkezelési módosítások elvégzése után az ismételt hibridizációval 6 mintára csökkent a piros szignálok hiánya. Ezeket a mintákat a vizsgálatból kizártuk. DDISH-el 75 esetben nem láttunk amplifikációt és 24 esetben kaptunk pozitív reakciót. A 99 megvizsgált esetből 4 volt, melynek amplifikációs státusza eltért a két módszer alapján. 4 esetben DDISH-sel álnegatív eredményt kaptunk. Álpozitív eredményünk nem volt. Mivel ideális, 100%-os biztonságú vizsgálat nincs, általában a „gold standardként” aposztrofált PathVysion FISH eredményeit alapul véve határozzák meg az új módszerek

használhatóságát, értékét. Ez alapján eredményeink szerint a DDISH módszer magas specificitást (100%), szenzitivitást (85,8%), magas pozitív (100%) és negatív prediktív értéket (94,7%) mutatott. A HER-2 és CEP17 számok és a HER-2/CEP17 arány alapján kalkulált konkordancia korrelációs koefficiens majdnem tökéletes egyezést mutatott a két vizsgáló módszer között. Ezen túl Kappa statisztika során, kategorizált változókkal hasonló eredményt kaptunk.

A DDISH költséghatékonysága abban áll, hogy – bár a próba költsége alig kisebb a FISH-hez képest – nem igényel igen költséges fluorescens mikroszkópot, rövidebb az inkubációs ideje, teljesen automatizált a folyamat. További előny, hogy egyazon metszeten a szöveti struktúra is vizsgálható, könnyebben, rövidebb idő alatt tanulható meg, így mind ezek jelentős munkaidő- és humánerőforrás megtakarítást jelentenek annak anyagi vonzatával együtt (sajnos ez Magyarországon még nem meghatározó szempont). Tekintettel az archiválhatóságra, ez szintén költség-megtakarítást jelent, mert nem kell ismételni a vizsgálatot, ellentétben a FISH-sel.



4.ábra Poliszómia jelensége magas sejtenkénti CEP17 (zöld) és Her-2 (piros) szignálokkal

5.1.1 Új megállapítások a validációs vizsgálat során

Ezekből az eredményekből a következő megállapításokra jutottunk:

- A Dual-color dual-hapten brightfield in situ hibridizáció (DDISH) megbízhatóan alkalmazható a klinikai gyakorlatban, mert
 - magas konkordanciával bír a hagyományos FISH vizsgálattal összehasonlítva, mind az amplifikáció azonosításában, mind az amplifikáció mértékének meghatározásában.
 - a standard próbákhoz hasonló arányban mutat amplifikációt az immunhisztokémiailag pozitív és negatív emlőrákokban

- a módszer kisebb technikai háttérrel igényel a FISH-hez viszonyítva.
- jelentős mértékű költségmegtakarítást lehet elérni az alkalmazásával, illetve emellett több információt is kapunk az adott daganat genetikai tulajdonságairól.

5.2 A 17-es kromoszóma centromer régió vizsgálatának jelentősége az emlőrákok HER-2 státuszának meghatározásában – eredmények megbeszélése

A HER2 pozitív emlődaganatok célzott terápiájaként alkalmazott trastuzumab kezelés magas költségekkel jár és nem elhanyagolható mellékhatása a kardiotoxicitás, amit a kezelt betegek 1-4%-ában figyeltek meg. (48) Az immunhisztokémiaileg pozitív (3+) esetekben FISH vizsgálattal nem mindig mutatható ki HER-2 amplifikáció. Ennek oka a 17-es kromoszóma poliszómiájának jelensége. Amikor a 17-es kromoszóma hosszú karján a HER-2 lokusz (q21) megsokszorozódik valódi génamplifikációról beszélünk. Azonban ha a 17-es kromoszómák száma nő és ez által a HER-2 lokuszok száma is, poliszómia áll fenn. Ezekben az esetekben immunhisztokémiaileg pozitív FISH eredmények születnek és az irodalmi adatok alapján ezek a daganatok nem rendelkeznek megfelelő terápiás válasszal trastuzumab kezelésre. (49-54) A költségek és a kardiotoxikus mellékhatások, valamint a leghatékonyabb kezelés megválasztása miatt is lényeges a poliszómia elkülönítése a génamplifikációtól. Számos tanulmány vizsgálja a 17-es poliszómia jelenségét és jelentőségét, eltérő eredményekkel. Ennek háttérében a poliszómia definíciójának meghatározása áll a legtöbb esetben. A kérdés az, hogy hány CEP17 jel/sejtmag-tól beszélünk poliszómiáról. Bizonyos vizsgálatok szerint relatíve gyakorinak mondható a 17-es poliszómia, az emlőrákos esetek 3-46%-ában észlelhető. (58-69) Vizsgálatunk idején messze nem volt egységes a poliszómia kvantitatív definíciója, számos tanulmány született, melyek különböző értékeket használtak 2,1 és 4 között, így ennek következtében illetve a kritériumok különbözősége folytán alakulhatott ki az a helyzet, hogy a poliszómia előfordulása ilyen tág határok között

mozoghatott. Tanulmányunkban 2,5-ös értéket használtunk, de azóta talán a ≥ 3 CEP17 jel/sejtmag kópiaszám mellett alakul ki a legnagyobb konszenzus. Valójában a munkám során alkalmazott besorolási kritériumokat nem befolyásolta, hogy az eset poliszómiának bizonyult-e vagy sem, így az eredményeinket sem változtatná meg egy másik határérték választása. Citogenetikai analízis hiányában ISH analízis során észlelt CEP17 szignálok száma használatos a 17-es kromoszóma-szám meghatározására. Ugyanakkor nem egyértelmű, mekkora szignál-számnál kell a határt meghúzni. Még bizonyítottan diszómiás minták is eltérhetnek az ideális 2-től, melynek oka metszési artefaktum, G2 fázisú sejtek jelenléte és kromoszóma instabilitás lehet. Általános konszenzus nincs, de nagy kohort tanulmányok manapság a 3 vagy a feletti jelszámot használják.

A nemzetközi irodalom szerint a poliszómiás esetek nagy részében nem figyelhető meg génamplifikáció, mely arra enged következtetni, hogy a két genetikai jelenség keletkezési mechanizmusa nem azonos. Génamplifikáció során az érintett – jelen esetben HER-2 – génszakasz megsokszorozódásával állunk szemben, míg poliszómia esetén az egész – esetünkben 17. – kromoszóma sokszorozódik meg, beleértve a centromer régiót és a HER-2 lókuszt is. Valódi amplifikációval nem járó, poliszómiás tumorok klinikai tulajdonságai, lefolyása inkább a HER-2 negatív tumorokhoz teszi hasonlatossá ezeket a daganatokat. Mindazonáltal 17-es poliszómia emlőrákok esetében rosszabb prognózist jelent, mivel a 17-es kromoszóma aneuploiditása genetikai instabilitásnak tekinthető, mely hozzájárul az emlőrák kialakulásához a genetikai hibák felhalmozásán keresztül. (70) Ebből kifolyólag számos tanulmány adatai szerint magasabb nukleáris atípiá, magasabb arányú limfogén metasztázis, magasabb nyirokcsomó érintettség, emelkedett proliferációs index és magasabb Nottingham Prognosztikus Index (NPI) társul azon emlőrákokhoz, melyekben a 17-es kromoszóma poliszómiája kimutatható, ezáltal alacsonyabb túlélési idő. (71-74) A poliszómia kimutatására számos módszer létezik, azonban manapság legjobban elterjedt valamely in situ hibridizációs

technika, mely a 17-es kromoszóma centromer régióját festi, ezáltal ad információt a kromoszómák számáról. Léteznek erre a célra úgynevezett dual-color in situ módszerek is, melyek lényege, hogy egyszerre festik külön színnel a 17-es kromoszóma hosszú karján a HER-2-t kódoló szakaszt (piros) és a 17-es kromoszóma centromer régióját (zöld). Ez lehetőséget ad arra, hogy együtt, arányaiban vizsgálhassuk a HER-2 és CEP17 jeleket egy sejtmagon belül. A nemzetközi irodalomban számos ajánlást találunk, hogy hány jel/sejtmag esetén beszélhetünk génamplifikációról vagy poliszómiáról. Génamplifikációt általában 6 jel/sejtmag fölött véleményezünk. A vizsgálat buktatója, hogy bizonyos esetekben a HER-2 génszakasz és a 17-es kromoszóma centromer régiójának koamplifikációja áll fenn, ami azt jelenti, hogy egy dual-color in situ módszerrel magas CEP17 és HER-2 számot látunk, amiből poliszómiára következtetnénk, azonban mindkét génszakasz valódi amplifikációjáról van szó. Ilyen formán hibás eredményeket kaphatunk. Egy tanulmányban array komparatív genomikus hibridizáció (aCGH) segítségével 17. kromoszóma poliszómiás eseteket vizsgáltak. 18 esetből egynél tudták kimutatni a teljes kromoszóma duplikációt, a többi esetben a pericentromerikus régió valamilyen többlete okozta a centromer-jel sokszorozódást.(75) Hasonló eredményre jutott egy 97 esetet vizsgáló másik tanulmány is. Ugyancsak a probléma megoldására használatosak az alternatív 17-es kromoszóma próbák, mint például SMS (Smith-Magenis syndrome, 17p11.2) és RARA (retinoic acid receptor, 17q21.2), melyek használatával biztonságosabban megítélhető az adott daganat génstátusza.

Magának a poliszómiának illetve a poliszómiás esetek HER-2 státuszának a megítélése igen nehéz feladat. Ebben nyújt segítséget az a 2014-ben megjelent konszenzusos javaslat, mely poliszómia (CEP17-jel sokszorozódás) esetén – az általunk alkalmazott módszerhez hasonlóan – csak a HER-2 jelszámot veszi figyelembe és 6 vagy a felett pozitivitást véleményez.(81) Eszerint amennyiben a CEP17 szám magas, akkor a HER-2 kópiaszám alapján 4/sejtmag alatt nem amplifikált, 6/sejtmag vagy e felett amplifikált a HER-2 státusz.

A két érték közötti HER-2 szám esetén – amennyiben korábban nem történt – IHK vizsgálat javasolt és az ismert osztályozás szerinti besorolás. Továbbra is bizonytalan – IHK-val 2+ - esetekben a klinikumban egy másik szöveti blokk vizsgálata javasolt immunhisztokémiával. Amennyiben az azonos eredményt hoz, akkor negatívnak kell tekinteni az esetet. Kutatási vizsgálat esetén az alternatív 17-es kromoszóma próbák ISH vizsgálata (SMS, RARA) vagy molekuláris kariotipizálás javasolt.

Dolgozatomban emlődaganatok HER-2 státuszának újra osztályozását végeztem el a 17-es kromoszóma poliszómiájának figyelembevételével. Az újraosztályozásnál csak a HER-2-jelek számát vettük figyelembe a besorolásnál, így a 405 esetből mindössze 19 esetben találtunk eltérő eredményeket. 5 esetben (1,23%) a HER-2 amplifikáció indokoltá tette volna a célzott biológiai kezelést, 14 esetben (3,46%) viszont átsorolásunk értelmében a trastuzumab terápia felesleges lehetett.

5.2.1 Eredményeink klinikai validálása, a betegek utánkövetése

A 19 ellentmondásos esetet két csoportra bontva vizsgáltuk a daganatok jellemzőit illetve az egyes esetekben alkalmazott kezeléseket – különös tekintettel a Herceptin indikációjára – és a betegség kimenetelét, a betegek túlélési adatait. Egy esetet kivéve – mely invazív lobuláris karcinómának bizonyult – valamennyi betegnek invazív duktális daganata volt.

	KOR (év)	G	pT	pN	pM	OE/PR (%)	MIB-1	IHK	HER2	CEP17	H/C
1	53	3	2	0	0	90/80	10%	2+	6,8	6,3	1,07
2	56	3	1b	0	0	70/20	5%	3+	7,4	8,3	0,89
3	63	2	2	0	0	50/5	30%	3+	12,2	11,7	1,04
4	49	2	2	2	0	40/40	30%	3+	15	12	1,25
5	76	2	1b	0	0	0/0	10%	3+	13,2	10,1	1,3

3.táblázat Pozitívként újraértékelt betegek adatai (G:grádus, OE:ösztogén, PR:progeszteron, IHK: immunhisztokémia, H/C:HER-2/CEP17 arány)

	HER2	CEP17	H/C	Herceptin	Kemo- th.	Hormon th.	Irradiáció	DFS	OS	EXIT
1	6,8	6,3	1,07	IGEN	+	+	+	9 év	9 év	-
2	7,4	8,3	0,89	NEM	-	+	+	7 év	7 év	IGEN/m.ok
3	12,2	11,7	1,04	IGEN	+	+	-	6 hó	14 hó	IGEN
4	15	12	1,25	NEM	+	+	+	N.A.	N.A.	N.A.
5	13,2	10,1	1,3	NEM	+	-	+	2 év	2 év	IGEN/m.ok

4.táblázat Pozitívként újraértékelt betegek utánkövetése (N.A.:nincs adat, m.ok:más ok miatt)

A 3. és 4. táblázatban összefoglalva láthatók az újraértékelésnél HER-2 pozitívnak véleményezett esetek. Az eredetileg negatív (HER-2/CEP17 arány <1,8) státuszt 6 feletti HER-2 jelszám miatt módosítottuk pozitívrá. 4 betegről sikerült adatokat gyűjteni. Érdekes módon az eredeti besorolás ellenére 2 beteg részesült Herceptin kezelésben, egyik esetben a 3+ immunhisztokémiai lelet volt a kezelés indoka, ez a beteg jelenleg is daganatmentes, egyedül ő van életben ebből a csoportból. A másik esetben az igen magas (12 feletti) HER-2 kópiaszám volt az indoka a kezelésnek, ezt a beteget igen rapid lefolyású betegség miatt 14 hónappal később elvesztettük. Az 5 éves túlélés 75%-os (3/4).

Az 5. és 6. táblázatban foglaltam össze azokat az eseteket, amelyeknél az eredetileg pozitív (HER-2/CEP17 arány >2,2) értékelést módosítottuk negatívra a HER-2<6 kópiaszám miatt. A 11 esetről sikerült az adatokat begyűjteni. Közülük – a pozitív HER-2 státusz ellenére – csak 4 beteg részesült Herceptin kezelésben. Ennek háttérében több okot is sikerült azonosítani: a daganatok korai stádiuma (trastuzumab kezelés nélkül csak további 3 beteg kapott kemoterápiát), a betegek kora, gyenge általános állapota és a mintavételek, műtétek időpontjában érvényes finanszírozási környezet (egyedi elbírálás alapján) mind hozzájárult ahhoz, hogy csak a betegek bizonyos hányada részesült anti-HER-2 kezelésben. 6 beteget vesztítettünk el, 3 esetben daganatmentes állapotban más betegség vezetett halálhoz. Az 5 éves túlélés 82%-os (9/11), az átlagos túlélés közel 7 év (6 év 10 hó).

	KOR (év)	gradus	pT	pN	pM	OE/PR (%)	MIB- 1	IHK	HER2	CEP17	HER2/ CEP17
1	44	3	1b	0	0	0/0	35%	3+	5,9	2,5	2,36
2	60	2	1b	1	0	50/0	15%	2+	4,7	2,1	2,24
3	57	2	2	0	0	0/0	20%	3+	4,8	2,1	2,28
4	61	3	1c	2	0	0/0	10%	2+	5,2	1,8	2,88
5	57	3	1b	0	0	0/0	20%	3+	5,4	2,0	2,7
6	78	2	1a	0	0	80/60	5%	3+	5,15	1,95	2,64
7	77	2	1c	0	0	70/65	3%	3+	4,0	1,8	2,22
8	69	2	1c	0	0	80/0	30%	2+	4,9	2,1	2,33
9	76	3	2	0	0	70/70	30%	2+	5,4	2,0	2,7
10	48	2	2	0	0	50/0	15%	2+	4,6	2,0	2,3
11	78	2	2	0	0	70/70	50%	3+	5,8	2,1	2,76
12	35	3	1c	0	0	80/70	15%	2+	4,4	1,9	2,31
13	65	3	1c	2	0	80/70	15%	2+	5,4	2,1	2,57
14	61	2	1c	0	0	0/80	15%	2+	4,7	2,1	2,23

5.táblázat Negatívként újraértékelt esetek betegadatai

	HER2	CEP17	HER2/ CEP17	Herceptin	Kemo th.	Hormon th.	Irradiáció	DFS	OS	EXIT
1	5,9	2,5	2,36	IGEN	+	-	+	8 év	8 év	-
2	4,7	2,1	2,24	IGEN	+	+	+	N.A.	N.A.	N.A.
3	4,8	2,1	2,28	IGEN	+	-	+	2 év	8 év	-
4	5,2	1,8	2,88	IGEN	+	-	+	3 év	4 év 6 hó	IGEN
5	5,4	2,0	2,7	NEM	+	-	+	9 év	9 év	-
6	5,15	1,95	2,64	NEM	-	+	+	6 év	6 év	IGEN/m.ok
7	4,0	1,8	2,22	NEM	-	+	+	5 év 2 hó	5 év 2 hó	IGEN/m.ok
8	4,9	2,1	2,33	NEM	-	+	+	N.A.	N.A.	N.A.
9	5,4	2,0	2,7	NEM	-	+	-	4 év	4 év 3 hó	IGEN
10	4,6	2,0	2,3	NEM	-	+	+	8 év	8 év	-
11	5,8	2,1	2,76	NEM	-	+	-	5 év 2 hó	5 év 2 hó	IGEN/m.ok
12	4,4	1,9	2,31	NEM	+	N.A.	+	N.A.	N.A.	N.A.
13	5,4	2,1	2,57	NEM	+	+	+	3 év	8 év	IGEN
14	4,7	2,1	2,23	NEM	-	+	+	9 év	9 év	-

6.táblázat Negatívként újraértékelt betegek utánkövetése

Az előbbieken részletezett betegadatok még nem kerültek publikálásra.

Természetesen már a kis esetszám is alkalmatlanná teszi az adatokat bármilyen következtetés

levonására, de az esetek és az alkalmazott kezelések heterogenitása ezt nem is indokolja. Egy nagyobb esetszámon végzett, prospektív, randomizált vizsgálat adhat választ arra a kérdésre, hogy az újraosztályozással klinikailag bizonyíthatóan - a betegségmentes és teljes túlélést figyelembe véve - nyernek-e a betegek részben a hatásos terápia alkalmazásával, részben a felesleges terápia mellékhatásainak elkerülésével.

A vizsgálat elvégzése által a HER-2 státusz pontosabb megítélését tettük lehetővé, mely hozzájárul a sikeres célzott terápiák kivitelezéséhez. Eredményeink fényében megvizsgáltuk a 19 ellentmondásos eset kórtörténetét, azonban a fentiek miatt következtetések levonására nem vállalkoztunk.

5.2.2 Új megállapítások a HER-2 státusz újra osztályozása során

Az eredményekből az alábbi megállapításokra jutottunk:

A HER-2 génstátusz pontosabb meghatározásában jelentős szerepe van a részletesebb 17-es kromoszóma centromer régió vizsgálatoknak, mert:

- a célzott terápia sikerességének érdekében elengedhetetlen a fals pozitív és fals negatív eredmények kiszűrése.
- a vizsgálattal a 17-es poliszómia által okozott fals pozitív eredmények kiszűrhetők.
- a fals negatív eredmények feltárhatók, így a betegek számára engedélyezik a célzott terápiát, mely gyógyulásuk kulcsfontosságú momentuma.

6 Összefoglalás

Az emlőrákok kezelésének sikeres megtervezéséhez és kivitelezéséhez elengedhetetlen fontosságú a daganat genetikai tulajdonságainak, ezen belül a HER-2 státuszának feltárása. Dolgozatomban az emlőrák kezelését alapvetően meghatározó HER-2 expresszió meghatározásának technikáival foglalkoztam.

Az első részben a FISH vizsgálat került összehasonlításra egy ún. dual-color módszerrel, a DDISH-sel. A validációs vizsgálat során azt tapasztaltuk a statisztikai analízis alapján, hogy a DDSIH magas konkordanciával bír, tehát a két módszer megbízhatósága közel azonos, így a dual-color dual-hapten brightfield in situ hibridizáció alacsony ára, kisebb technikai háttérrel miatt megfelelő alternatíva lehet olyan laborok számára, ahol FISH vizsgálat nem áll rendelkezésre.

A második részben az emlőrákok HER-2 státuszának meghatározását megnehezítő genetikai jelenséggel a 17-es kromoszóma poliszómiájával foglalkoztam. Ha a 17-es kromoszómák száma megsokszorozódik és ezzel együtt a HER-2-t kódoló szakaszok száma is, az FISH vizsgálattal álpozitív eredményt adhat. Dolgozatomban emlődaganatok HER-2 státuszát osztályoztam újra a HER-2/CEP17 arány figyelembevételével. A statisztikai analízis fényében elmondhatjuk, hogy a két vizsgálómódszer érzékenysége eltér, így van létjogosultsága a CEP17-et vizsgáló módszereknek a HER-2 státusz meghatározásában.

Dolgozatomban az emlődaganatok HER-2 státuszának meghatározásával kapcsolatos hasznosítható tapasztalatokat foglaltam össze.

Summary

Exploration of the genetic profile of an individual tumour, including determination of its HER2 status, is essential for the successful design and implementation of therapy in breast cancer. The present dissertation deals with techniques used for the determination of HER2 expression, a factor playing a key role in the choice of therapy in breast cancer.

In the first part, the FISH assay is compared with DDISH, a so-called dual colour technique. In the validation study, DDISH has been shown to have high concordance in the statistical analysis, suggesting similar reliability for the two methods. Therefore, it has been concluded that owing to its lower price and less demanding technical background dual-colour dual-hapten in situ hybridisation can be a suitable alternative for laboratories where FISH is not available.

The second part of the paper deals with chromosome 17 polysomy, a genetic phenomenon complicating HER2 status determination in breast cancer. Multiplication of chromosomes 17, with a resulting increase in the number of HER2 coding sections, may yield false-positive results by the FISH test. In the present study, the HER2 status of mammary tumours was reclassified, with the HER2/CEP17 ratio taken into consideration. On the basis of the statistical analysis it can be concluded that the use of CEP17 testing in HER2 determination is justified as the sensitivity of the two techniques is different.

Relevant experiences with HER2 status determination in breast cancer are summarised.

Keywords: breast cancer, HER2 status, amplification, polysomy

7 Irodalomjegyzék

7.1 A hivatkozott közleménynek jegyzéke

1. Gennari A, Sormani MP, Pronzato P, et al. **HER-2 status and efficacy of adjuvant anthracyclines in early breast cancer: a pooled analysis of randomized trials.** J Natl Cancer Inst 2008;100:14-20.
2. Cheang MCU, Chia SK, Voduc D, et al. **Ki67 index, HER-2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer.** J Natl Cancer Inst. 2009;101(10): 742.
3. Fiermonte G, Soon D, Paradies E, et al. **Her2 status and benefits from adjuvant trastuzumab in breast cancer.** N Engl J Med. 2008;358;13:1409-1411.
4. Troxell M.L, Bangs C, Lawce H et al. **Evaluation of Her-2/neu status in carcinomas with amplified chromosome 17 centromere locus.** Am J Clin Pathol 2006;126:709-716.
5. Wolff AC, Hammond EH, Hicks DG, et al. **Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update.** J Clin Onc. 2013;10:2-7.
6. Gruver AM, Peerwani Z, Tubbs RR. **Out of the darkness and into to light: bright field in situ hybridisation for delineation of ERBB2 (HER2) status in breast carcinoma.** J Clin Pathol. 2010;63:210-219.
7. Laasko M, Tanner M, Isola J. **Dual-colour chromogenic in situ hybridisation for testing of HER-2 oncogene amplification in archival breast tumors.** J Pathol 2006;210:3-9.
8. Wedad MH, Rüschoff J, Bilous M, et al. **HER2 in situ hybridisation in breast cancer: clinical implications of polysomy 17 and genetic heterogeneity.** Mod Pathol 2014;27:6-9.

9. Rosenberg CL. **Polysomy 17 and HER-2 amplification: true, true and unreleased.** J Clin Oncol. 2008;26:4856-4858.
10. Cserni G. **Complex pathological diagnosis of breast cancer and patient care based on it over past 20 years.** LAM 2012;22:17.
11. Salamon DJ, Clark GM, Levin SG, et al. **Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene.** Science 1987;235:177-82.
12. Khursid R, Saleem M, Gul-e-Raana, et al. **Phosphorylation sites of HER2/c-erbB-2: role in cell growth and in disease.** Acta Bioch Polon. 2014;61:699-703.
13. Chan PM, Nestler HP, Miller WT. **Investigating the substrate specificity of the HER2/Neu tyrosine kinase using peptide libraries.** Canc Letters 2000;160:159-169.
14. Monilola A Olayioye. **Update on HER-2 as a target for cancer therapy: intracellular signaling pathways of ErbB2/HER-2 and family members.** Breast Cancer Res. 2001;3(6):385-389.
15. Cserni G, Kálmán E, Kulka J, et al. **HER2 immunohistochemical vizsgálatok minőségellenőrzése.** Magy Onkol 2007; 51(1):23-9.
16. Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H, Barnes MJ, Schnitt SJ. **Specificity of HerceptTest in determining HER-2/neu status in breast cancer using the United States Food and Drug Administration- approved scoring system.** J clin Oncol 1999; 17:: 1983-1987.
17. Penault-Llorca F, Balaton A, Sabourin JC, Le Doussal V. **Immunohistochemical evaluation of HER2 status in infiltrating breast cancers: development of technical protocol and reading of results-recommendations.** Ann Pathol 2002; 22:150-157.
18. Tubbs RR, Pettay JD, Roche PC, Stoler MH, Jenkins RB, Grogan TM. **Discrepancies in clinical laboratory testing of eligibility for trastuzumab therapy: apparent**

- immunohistochemical false positives do not get the message.** J Clin. Oncol 2001; 19:2714-2721.
19. Ross JS, Fletcher JA, Bloom KJ, et al. **Targeted therapy in breast cancer: the HER2/neu gene and protein.** Mol Cell Proteomics. 2004;3(4):379-389.
 20. Bartlett JMS, Going JJ, Mallon EA, Watters AD, Reeves JR, Stanton P, et al. **Evaluating HER2 amplification and overexpression in breast cancer.** J Pathol 2001;195:422-428.
 21. Sauer T, Assessment of HER2 APMIS 2003;111:444-450.
 22. Mass RD, Press M, Anderson S, Cobleigh MA, Vogel CL, Dybdal N, et al. **Evaluation of clinical outcomes according to HER2 detection by fluorescence in situ hybridisation in women with metastatic breast cancer treated with trastuzumab.** Clin Breast Cancer 2005;6:240-246.
 23. Garcí'a-Caballero T, Grabau D, Green A R, Gregory J, Schad A, Kohlwes E, Ellis I O, Watts S & Mollerup J. **Determination of HER2 amplification in primary breast cancer using dual-colour chromogenic in situ hybridization is comparable to fluorescence in situ hybridization: a European multicentre study involving 168 specimens.** Histopathology 2010;56:472-480.
 24. Mayr D, Heim S, Weyrauch K, Zeindl-Eberhart E, Kunz A, Engel J & Kirchner T. **Chromogenic in situ hybridization for Her-2/neu-oncogene in breast cancer: comparison of a new dual-colour chromogenic in situ hybridization with immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization.** Histopathology 2009;111:1-8.)
 25. Jimenez RE, Wallis T, Tabasczka P, Visscher DW. **Determination of HER-2/neu status in breast carcinoma: comparative analysis of immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridisation.** Mod Pathol 2000;13:37-45.

26. Lebeau A, deimling D, Kaltz C, Sendelhofert A, Iff A, Luthardt B, et al. **HER-2/neu analysis in archival tissue samples of human breast cancer: comparison of immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridisation.** J Clin Oncol 2001;19:154-363.
27. Ganchberg D, Lespangnard L, Rouas G, Paesmans M, Piccart M, di Leo A, et al. **Sensitivity of HER-2/neu antibodies in archival tissue samples of invasive breast carcinomas. Correlation with oncogene amplification in 160 cases.** Am J Clin Pathol 2000;113:675-682.
28. Owens MA, Horten BC, Da Silva MM. **HER2 amplification ratios by fluorescence in situ hybridisation and correlation with immunohistochemistry in a cohort of 6556 breast cancer tissues.** Clin Breast Cancer 2004;5:63-9.
29. Dybdal N, Leiberman G, Anderson S, McCune B et al. **Determination of HER2 gene amplification by fluorescence in situ hybridisation and concordance with the clinical trials immunohistochemical assay in women with metastatic breast cancer evaluated for treatment with trastuzumab.** Breast Cancer Res Treatment 2005;93:3-11.
30. Wedad M, Kwok K. **Chromogenic in-situ hybridisation: a viable alternative to fluorescence in-situ hybridisation in the HER2 testing algorithm.** Mod Pathol 2006;19:481-487.
31. Papouchado BG, Myles J, Lloyd R, et al. **Silver in situ hybridisation (SISH) for determination of HER2 gene status in breast carcinoma: comparison with FISH and assessment of interobserver reproducibility.** Am J Surg Pathol 2010;34:773.

32. Tubbs R, Pettay J, Powell R, et al. **Gold-facilitated in situ hybridisation. A bright-field autometallographic alternative to fluorescence in situ hybridisation for detection of HER-2/neu gene amplification.** Am J Pathol. 2002;160:1589-1595.
33. Tubbs R, Skacel M, Pettay J, et al. **Interobserver interpretative reproducibility of GOLDFISH, a first generation gold-facilitated autometallographic bright field in situ hybridisation assay for HER-2/neu amplification in invasive mammary carcinoma.** Am J Surg Pathol. 2002;26:908-913.
34. Priti L, Paulo A, Cliffod A, Ladanyi M, et al. **HER-2 testing in breast cancer using immunohistochemical analysis and fluorescence in situ hybridisation. A single-institution experience of 2279 cases and comparison of dual-color and single-color scoring.** Am J Clin Pathol 2004;121:631-636.
35. Bartlett JMS, Starczynski J, Atkey N, Kay E, O'Grady A, Dandy M, et al. **HER2 testing in the UK: recommendations for breast and gastric in-situ hybridisation methods.** J Clin Pathol 2011;64:649-653.
36. Gao F, Dabbs J, Cooper L, Bhargava R. **Bright-field HER2 dual in situ hybridisation (DISH) assay vs fluorescence in situ hybridisation (FISH).** Am J Clin Pathol 2014;141(1):102-110.
37. Penault-Llorca F, Bilous M, Dowsett M, Wedad H, Yoshiyuki Osamura R, Rüschoff J, van de Vijver M, **Emerging technologies for assessing HER2 amplification.** Am J Clin Pathol 2009;132:539-548.
38. Winstanley J, Cooke T, Murrar GD, et al. **The long term prognostic significance of c-erbB-2 in primary breast cancer.** Br J Cancer 1991;63:447-450.
39. Toikkaen S, Helin H, Isola J, et al. **Prognostic significance of HER-2 oncoprotein expression of breast cancer: a 30-year follow-up.** J Clin Oncol. 1992;10:1044-1048.

40. Rilke F, Colnaghi MI, Cascinelli N, et al. **Prognostic significance of HER-2/neu expression of breast cancer and its relationship to other prognostic factors.** *Int J Cancer.* 1991;49:44-49.
41. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al. **Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of HER-2/neu oncogene.** *Science.* 1987;235:177-182.
42. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, et al. **Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer.** *Science.* 1989;244:707-712.
43. Hudziak RM, Lewis GD, Winget M, et al. **p185 (Her2) monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor.** *Mol Cell Biol.* 1989;9:1165-1172.
44. Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathi D, et al. **Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease.** *J Clin Oncol.* 1999;17:2639-2648.
45. Slamon D, Leyland-Jones B, Shak S, et al. **Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2.** *Engl J Med.* 2001;344:783-792.
46. Thor A. **HER2: a discussion of testing approaches in the USA.** *Ann Oncol.* 2001;12(suppl 1):S101-S107.
47. Vogel C, Cobleigh M, Tripathy D, et al. **Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER-2 overexpressing metastatic breast cancer.** *J Clin Oncol.* 2002;20:719-726.
48. Hayes DF, Picard MH. **Heart of darkness: the downside of trastuzumab.** *J Clin Oncol.* 2006;24:4056-4058.

49. Varshney D, Zou YY, Geller SA, Alsabeh R. **Determination of HER-2 status and chromosome 17 polysomy in breast carcinomas comparing HerceptTest and PathVysion FISH assay.** Am J Clin Pathol. 2004;121:70-77.
50. Salido M, Tusquets I, Corominas JM, Suarez M, et al. **Polysomy of chromosome 17 in breast tumors showing an overexpression of ERBB2: a study of 175 cases using fluorescence in situ hybridisation and immunohistochemistry.** Breast Cancer Res. 2005;7:R267-R273.
51. Bose S, Mohammed M, Shintaku P, et al. **HER-2/neu gene amplification in low to moderately expressing breast cancers: possible role of 17/HER-2/neu polysomy.** Breast J. 2001;7:337-44.
52. Lal P, Salazar PA, Ladanyi M, et al. **Impact of polysomy 17 in HER-2/neu immunohistochemistry in breast carcinomas without HER-2/neu gene amplification.** J Mol Diagn. 2003;5:155-9.
53. 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;11:4393-9.
54. 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: fluorescence in situ hybridisation, immunohistochemical, isotopic mRNA in situ hybridisation study.** Am J Surg Pathol. 2005;29:1221-7.
55. Hofmann M, Stoss O, Gaiser T, et al. **HER2 IHC and FISH analysis in trastuzumab (Herceptin®) phase II monotherapy study: assessment of test sensitivity and impact of chromosome 17 polysomy.** J Clin Pathol. 2008;61:89-94.
56. Vranic S, Teruya B, Repertinger S, et al. **Assessment of HER-2 gene status in breast carcinomas with polysomy of chromosome 17.** Cancer. 2011;117:48-53.

57. Dal Lago L, Durbecq V, Desmedt C, et al. **Correction of 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.
58. Cuadros M, Cano G, Lopez FJ, et al. **HER2 status in breast cancer: experience of a Spanish National Reference Centre.** *Clin Transl Oncol.* 2011;13:335-340.
59. Hajduch M, Trojanec R, Bouchalova K, et al. **Chromosome 17 polysomy and Her-2/neu status in metastatic breast cancer patients indicated to trastuzumab therapy.** *J Clin Oncol.* 2005;23: (16 Suppl) : abstract 9584.
60. Kokate P, Sawaimoon S, Bhatia S, Mandava S. **Evaluation of genetic status of HER-2/neu and aneusomy 17 by fluorescence in situ hybridisation and comparison with immunochemistry assay from Indian breast cancer patients.** *Genet Test Mol Biomarkers.* 2012;16:239-245.
61. Krishnamuri U, Hammers JL, Atem FD, et al. **Poor prognostic significance of unamplified chromosome 17 polysomy in invasive breast carcinoma.** *Mod Pathol.* 2009;22:1044-1048.
62. Merola R, Mottolese M, Orlandi G, et al. **Analysis of aneusomy level and HER-2 gene copy number and their effect on amplification rate in breast cancer specimens read as 2+ in immunohistochemical analysis.** *Eur J Cancer.* 2006;42:1501-1506.
63. Mezzelani A, Alasio L, Bartoli C, et al. **c-erbB2/neu gene and chromosome 17 analysis in breast cancer by FISH on archival cytological fine-needle aspirates.** *Br J Cancer.* 1999;80:519:525.
64. Öhlschlegel C, Zahel K, Kradolfer D, et al. **HER2 genetic heterogeneity in breast carcinoma.** *J Clin Pathol.* 2011;64:1112-1116.

65. Torrisi R, rotmensz N, Bagnardi V, et al. **HER2 status in early breast cancer: relevance of cell staining patterns, gene amplification and polysomy 17.** Eur J Cancer. 2007;43:2339-2344.
66. Tubbs RR, hicks DG, Cook J, et al. **Fluorescence in situ hybridisation (FISH) as primary methodology for the assessment of HER-2 status in adenocarcinoma of the breast: a single institution experience.** Diagn Mol Pathol. 2007;16:207-210.
67. Watters AD, going JJ, Cooke TG, Bartlett JM. **Chromosome 17 aneusomy is associated with poor prognostic factors in invasiva breast carcinoma.** Breast Cancer Res Traet 2003;77:109-114.
68. Zhu X, Lu Y, Lu H, et al. **Genetic alterations and protein expression of HER2 and chromosome 17 polysomy in breast cancer.** Hum Pathol. 2011;42:1499-1504.
69. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, et al. **American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epiermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer.** J Clin Oncol. 2007;25:118-145.
70. Vance GH, Barry TS, Bloom KJ, et al. **Genetic heterogenity in HER2 testing in breast cancer: panel summary and guidelines.** Arch Pathol Lab MEd. 2009;133(4):611-612.
71. Takehisa M, Sasa M, Bando Y, et al. **Chromosomal aneusomy (chr 1, 11, 17) detected by fluorescence in situ hybridisation may be a prognostic factor in breast cancer.** Anticancer Res. 2007;27:1073-1078.
72. Petroni S, Addati T, Mattioli E, et al. **Centromere 17 copy number alteration: negative prognostic factor in invasive breast cancer?** Arch pathol Lab Med. 2012;136:993-1000.

73. Bempt IV, Loo PV, Drijkoningen M, et al. **Polysomy 17 in breast cancer: clinicopathologic significance and impact on HER2 testing.** *J Clin Onc.* 2008;30:4869-4874.
74. Lu YL, Zhong M, Liu L, et al. **Clinicopathologic significance of chromosome 17 polysomy in breast cancer.** *Zhonghua Bing Xue Za Zhi* 2008;37:88-91.
75. Marchió C, Lambros M, Gugliotta P, et al. **Does chromosome 17 centromere copy number predict polysomy in breast cancer? A fluorescence in situ hybridisation and microarray-based CGH analysis.** *J Pathol.* 2009;219:16-24.
76. Lin LI. **A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility.** *Biometrics.* 1989;45:255-68.
77. Liao JJ, Lewis JW. **A note on concordance correlation coefficient.** *PDA J Pharm Sci Technol* 2000;54:23-26.
78. Bland JM, Altman DG. **Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement.** *Lancet* 1986;1:307-10.
79. Lee J, Fung KP. **Confidence interval of kappa coefficient by bootstrap resampling.** *Psychiatry Res.* 1993;49:97-8.
80. Sauter G, Lee J, Bartlett JM, Slamon DJ, Press MF. **Guidelines for human epidermal growth factor receptor 2 testing: biologic and methodologic considerations.** *J Clin Oncol* 2009; 27(8):1323-33.
81. Hanna WM, Rüschoff J, Bilous M, Coudry RA, Dowsett M, Osamura RY, Penault-Llorca F, van de Vijver M, Viale G. **HER2 in situ hybridization in breast cancer: clinical implications of polysomy 17 and genetic heterogeneity.** *Modern Pathology* 2014; 27, 4–18

7.2 Saját közlemények jegyzéke



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR



Nyilvántartási szám: DEENK/244/2016.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

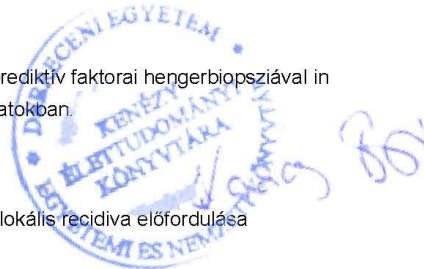
Jelölt: Kósa Csaba
Neptun kód: GB63HJ
Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Kósa, C.**, Kardos, L., Kovács, J., Szöllősi, Z.: Comparison of dual-color dual-hapten brightfield in situ hybridization (DDISH) and fluorescence in situ hybridization in breast cancer HER2 assessment.
Pathol. Res. Pract. 209 (3), 147-150, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.prp.2013.01.006>
IF: 1.562
2. Egervári, K., **Kósa, C.**, Szöllősi, Z.: Impact of chromosome 17 centromere region assessment on HER2 status reported in breast cancer.
Pathol. Res. Pract. 207 (8), 468-471, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.prp.2011.05.008>
IF: 1.213

További közlemények

3. Lázár, G., Bursics, A., Farsang, Z., Harsányi, L., **Kósa, C.**, Maráz, R., Mátrai, Z., Paszt, A., Pavlovics, G., Tamás, R.: III. Emlőrák Konszenzus Konferencia: az emlőrák korszerű sebészeti kezelése.
Magyar Onkol. 60, 194-207, 2016.
4. **Kósa, C.**, Garami, Z., Dinya, T., Fülöp, B.: Az invazivitás prediktív faktorai hengerbiopsziával in situ ductalis carcinomának diagnosztizált emlődaganatokban.
Magyar Seb. 65 (4), 216-219, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/MaSeb.65.2012.4.8>
5. Garami, Z., Szluha, K., **Kósa, C.**, Fülöp, B., Lukács, G.: A lokális recidiva előfordulása emlőmegtartásos műtéteink után.
Magyar Seb. 59, 179-183, 2006.



Cím: 4032 Debrecen, Egyetem tér 1. ☐ Postacím: 4010 Debrecen, Pf. 39. ☐ Tel.: (52) 410-443
E-mail: publikaciok@lib.unideb.hu ☐ Honlap: www.lib.unideb.hu



6. Garami, Z., Benkő, K., **Kósa, C.**, Fülöp, B., Lukács, G.: A mammográfiás emlőrákszűrés hatása a tumorméretre, a hónalji nyirokcsomó státuszra és a szövettani anaplázia fokára.
Magyar Seb. 59, 383-387, 2006.
7. Damjanovich, L., **Kósa, C.**, Bartha, I.: A hereditár nonpolyposis colon carcinoma felismerésének gyakorlati jelentősége = The importance of the recognition of hereditary nonpolyposis colon carcinoma.
Magyar Seb. 54 (2), 88-90, 2001.
8. Kincses, Z., Kanyári, Z., Asztalos, L., **Kósa, C.**, Bodrogi, P., Balázs, G.: A vastagbél diverticulitisek sebészi kezelése.
Magyar Seb. 54, 84-85, 2001.
9. Bartha, I., Damjanovich, L., **Kósa, C.**, Németh, A.: Enterovaginális sipoly kezelése mucous fistulával.
Magyar Seb. 54 (2), 86-87, 2001.
10. Szegedi, Z., **Kósa, C.**: A peritoneovenosus (Denver) shunt alkalmazása az ascites sebészi kezelésben.
Magyar Seb. 49, 195-202, 1996.

A közlő folyóiratok összesített impact faktora: 2,775

A közlő folyóiratok összesített impact faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 2,775

A DEENK a Jelölt által az IDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2016.10.04.



8 Tárgyszavak

Tárgyszavak:

Emlőrák

HER-2

FISH vizsgálat

Validációs vizsgálat

17-es poliszómia

Dual-color dual-hapten brightfield in situ

hibridizáció

Keywords:

Breast cancer

HER-2

FISH assay

Validation study

Chromosome 17 polysomy

Dual-color dual-hapten brightfield in situ

hybridisation

9 Köszönetnyilvánítás

Hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Szöllősi Zoltánnak, aki útmutatásával, értékes tanácsaival és a patológiai vizsgálatok koordinálásával segítette jelen értekezés és az alapjául szolgáló közlemények megírását, publikációját.

Hálásan köszönöm Prof. Dr. Szántó János és az Onkológiai Tanszék támogatását, mely nélkül munkánk nem jöhetett volna létre.

Külön köszönet illeti Dr. Kovács Judit főorvos asszonyt, aki lehetővé tette, hogy a vizsgálatok patológiai jellegű kérdéseit osztályán tisztázzuk.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Damjanovich László intézetvezetőnek, aki lehetővé tette, hogy munkámat a Sebészeti Intézetben végezhessem.

Végül, de nem utolsósorban hálás vagyok családomnak, hogy rendületlenül igyekeznek munkámhoz nyugodt, szerető háttérrel biztosítani, mely felbecsülhetetlen.

10 Mellékletek: a munka alapjául szolgáló publikációk másolata