

Egyetemi doktori (Ph.D) értekezés tézisei

**Az emlőrák HER2 diagnosztikájának aktuális kérdései**

dr. Egervári Kristóf

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

Debreceni Egyetem  
Orvos- és Egészségtudományi Centrum  
Pathologiai Intézet  
2008.

## **1. BEVEZETÉS, IRODALMI HÁTTÉR**

A c-erbB-2 (HER2, HER2/neu, ERBB-2) protoonkogén a 17-es kromoszóma hosszú karján (17q12-21.32) helyezkedik el, és egy 185 kD molekulatömegű transzmembrán glikoproteint kódol. A HER2 fehérje a tirozin-kináz típusú növekedési faktor receptorok családjába tartozik, de mindmáig nem ismert önálló ligandja. Jelen irodalmi adatok szerint a receptorcsalád egyéb tagjaival heterodimert alkotva vesz részt olyan extracelluláris ligandokra adott sejtszintű válasz elindításában, mint például az epidermális növekedés faktor.

Az emlőrákok 10-30%-ában a HER2 fehérje overexpressziója, valamint génamplifikáció is kimutatható, ugyanis az ilyen tumorok közel 90%-ában a fokozott fehérje expresszió hátterében HER2 génamplifikáció áll. Az immunhisztokémiaileg (IHC) detektálható HER2 overexpresszió emlőrákok esetén nemcsak a betegség kimenetelét rontja, hanem hormon terápiára és fluorouracyl alapú kemoterápiára rezisztenciát, anthracyclin alapú kemoterápiára pedig fokozott érzékenységet hoz létre; a HER2 státusz igazi jelentőségére azonban a trastuzumab (Herceptin), HER2 fehérje ellenes monoklonális antitest megjelenése hívta fel a figyelmet. A trastuzumab eredményesen alkalmazható a HER2 pozitív emlőrákok túlnyomó többségében, azonban a terápiára való alkalmasság eldöntése fontos kérdés nemcsak a kezelés magas költsége, hanem lehetséges mellékhatásai miatt is.

A HER2 státusz vizsgálatára a rutindiagnosztikában legelterjedtebb módszer az immunhisztokémia, mivel formalin fixált, beágyazott

anyagokon egyszerűen kivitelezhető és a vizsgálat költségei is alacsonyak. Az immunhisztokémia -mintegy szűrővizsgálatként- fokozott fehérje expressziót mutató esetek kiválasztására használatos, melyek valószínűleg alkalmasak trastuzumab terápiára, amennyiben további genetikai vizsgálatokkal a HER2 génamplifikáció igazolható. Más nézetek szerint erős immunhisztokémiai pozitivitás (3+) esetén genetikai vizsgálat nélkül is megállapítható a HER2 pozitivitás. Kereskedelmi forgalomban hozzávetőleg húsz különböző HER2 ellenes immunhisztokémiai antitest létezik, melyek között találhatunk az irodalom által pozitívan jellemzett, az amerikai Élelmiszer és Gyógyszerügyi Hivatal (Food and Drug Administration, FDA) által bejegyzett úgynevezett farmakodiagnosztikumokat, és több alacsonyabb árfekvésű, általában kevésbé megbízható antitestet, mely utóbbiakat a rutindiagnosztikában való alkalmazás előtt validálni szükséges. Általánosan elfogadott antitest nem létezik, de világszerte a HercepTest alkalmazása terjedt el leginkább.

A trastuzumab terápiára adott válasz előrejelzésében a legelfogadottabb eljárás a HER2 génamplifikáció kimutatása fluoreszcencia in situ hibridizációval (FISH). Az immunhisztokémia kevésbé megbízható és specifikus, mint a FISH, és egyes szerzők szerint az immunhisztokémiát elhagyva az in situ hibridizáció önállóan is alkalmas a HER2 státusz megállapítására. A fluoreszcencia in situ hibridizáció azonban bonyolultságát, műszer- és költségigényét figyelembe véve, egyelőre a fokozott fehérje expressziót mutató tumorok vizsgálatára korlátozódik.

Mind a fluoreszcencia in situ hibridizáció, különösen pedig az immunhisztokémiai vizsgálatok megbízható kivitelezéséhez elengedhetelen feltétel az egységes, standard körülmények biztosítása. Ehhez egyrészt validált, megbízható antitestek, diagnosztikai kitek használata és szigorú protokollok betartása szükséges, de szöveti microarray-ek (tissue microarray, TMA) alkalmazásával tovább fokozhatjuk a reakció körülmények egységességét. Szöveti microarray multiblokkok építése során tumorszövetet tartalmazó paraffin blokkokból származó, 0.6-3 mm átmérőjű, reprezentatív szövethengereket építünk úgynevezett recipiens blokkokba, és az így kapott multiblokkból készült metszeteken minden szövethenger átmetszete jelen van. A multiblokkok metszetein mind immunhisztokémiai, mind pedig in situ hibridizációs vizsgálatok kivitelezhetők, mégpedig a hagyományos metodikánál egységesebb körülmények között, és nem utolsósorban alacsonyabb költségek mellett.

Battifora és munkacsoportja "sausage block" és "checkerboard" elnevezésű kezdetleges multiblokkjai után 1998-ban írt Kononen és munkacsoportja először szöveti microarray-ekről. Az elnevezés ekkor honosodott meg, és azóta számos szerző alkalmazta a szöveti microarray-eket a kutatásban és számolt be előnyeikről. Statisztikai sokaságok vizsgálatakor többek is ugyanazokat az arányokat és összefüggéseket találták TMA-k alkalmazásával, mint amelyek korábban hagyományos módszerrel megállapításra kerültek, azonban a tumorok heterogenitásából következően az egyes esetek szintjén előfordulhatnak tévedések. Nem várható el ugyanis egy 0.6 mm átmérőjű szövet-hengertől, hogy minden

esetben megfelelően reprezentálja a méreteiben azt jóval meghaladó tumort, azonban a rutindiagnosztikában ezek a tévedések megengedhetetlenek. Néhányan korábban beszámoltak arról, hogy szöveti microarray-ek megbízhatóan alkalmazhatók IHC és FISH vizsgálatok eredményeinek intézeten belüli és intézetek közti validálásban, azonban a rutindiagnosztikai felhasználásról egyedül Sapino és munkacsoportja írt.

## **2. CÉLKITŰZÉSEK**

Célkitűzéseink között elsőként az általunk használt szöveti microarray-ek validálása és rutindiagnosztikai megbízhatóságának vizsgálata szerepelt. Ezután hat különböző HER2 ellenes immunhisztokémiai antitest összehasonlító vizsgálatát végeztük el emlőrákokból készült szöveti microarray-eken, melyek közül négy antitest a HER2 fehérje intracelluláris doménjére (NCL-CB11, Pathway CB11, HercepTest, Pathway RM-4B5) és kettő pedig a HER2 fehérje extracelluláris doménjére volt specifikus (NCL-CBE356, NCL-CBE1). A tumorokhoz tartozó FISH eredményeket alapul véve jellemeztük az antitesteket.

Végül adataink alapján célunk volt egy HER2 diagnosztikus algoritmus kidolgozása, mellyel megbízhatóbban és költséghatékonyság szempontjából is kedvezőbben végezhető a HER2 státusz megállapítása.

### **3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

#### *3.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 pedig szöveti microarray-eket készítettünk.

#### *3.b. Szöveti microarray-ek*

A szöveti microarray-eket Kononen és munkatársai eredeti leírása alapján készítettük, az akkori lehetőségeink korlátai miatt szükségszerű módosításokkal. A haematoxylin-eosin (HE) 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. Minden multiblokkba átlós elrendezésben jelölőhengereket (máj vagy lép szövet) helyeztünk, hogy megkönnyítsük a későbbi mikroszkópos orientációt.

Minden multiblokkból elsőként HE festett metszet készült, és felmértük, melyik TMA core nem tartalmaz értékelhető mennyiségű tumor szövetet. Ebben az esetben új szövethengert építettünk be az adott tumor valamely blokkjából egy másik multiblokkba.

### *3.c. Immunhisztokémia*

Hat különböző antitesttel és immunhisztokémiai kittel végeztünk immunhisztokémiai reakciókat a TMA-kból készült metszeteken. A felhasznált antitestek gyártók alapján csoportokba szedve 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 az 1. táblázatban található.

**1. táblázat** A felhasznált immunhisztokémiai 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. Az immunhisztokémiai metszeteket két vizsgáló egymástól függetlenül értékelte a membránpozitivitás jellege és intenzitása alapján. Ha a tumorsejtek több, mint 10%-a gyenge vagy közepesen erős 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 kevesebb, mint a tumorsejtek 10%-ban volt jelen (1+), a reakciót negatívnak vettük. Az aspecifikus cytoplasmaticus pozitivitást minden esetben figyelmen kívül hagytuk a reakciók értékelésénél.

### *3.d. Fluoreszcencia in situ hibridizáció*

A szilanizált tárgylemezen levő 4 µm-es metszeteket deparaffináltuk és dehidráltuk, majd ezt követően a sejtek előkezelése következett a Paraffin Pretreatment Kit II segítségével (Vysis, Des Plaines, IL, USA), a gyártó által ajánlott protokoll szerint. 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), majd a genomikus DNS-t a próbával együtt denaturáltuk 90 °C-on 10 percig, amelyet hibridizáció követett 37°C-on egy éjszakán át. Mind a denaturáció, mind pedig a hibridizáció ThermoBrite (Vysis) kézi FISH berendezésen került kivitelezésre. A poszthibridizációs mosás után a metszeteket 4',6-diamidin-2'-fenilindol-dihidroklorid-dal (DAPI, Vysis) háttérfestettük. A metszeteket 4 °C-on 1 órán át tároltuk, majd fluoreszcens mikroszkóppal (BX51, Olympus, Tokyo, Japan) értékeltük. 10x-es 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 számoltunk, majd meghatároztuk a HER2/CEP17 hányadost.

Az eseteket 'nem amplifikálnak' minősítettük, ha a hányados 1.8, vagy az alatti és 'amplifikálnak', ha 2.2 feletti volt. 1.8 és 2.2 közötti hányados esetén 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, akkor a 17-es kromoszóma számot normálisnak tekintettük (diszómia), míg 1.5, vagy az alatt monoszómiát, 2.5 felett pedig poliszómiát véleményeztünk.

### *3.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 is.

A továbbiakban FISH eredményeket alapul véve kiszámoltuk a hat különböző immunhisztokémiai antitesttel végzett reakció szenzitivitását, szelektivitását, pozitív és negatív prediktív értékét (PPV és NPV), valamint pontosságát. A számításokat kétféleképpen 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. Kizárólag a tényleges HER2 amplifikációt vettük 'FISH pozitívnak'.

## 4. EREDMÉNYEK

### 4.a. Szöveti microarray-ek validálása

Az antigén feltárási, előkezelési, emésztési és mosási lépések alatt a TMA core-ok 10.2% sodródott le a metszetekről. Az 174 eset hagyományos immunhisztokémiai (NCL-CB11) adatai és a TMA metszetekből készült immunhisztokémiai (NCL-CB11) és FISH eredmények összevetése során eredményeink a következők voltak:

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 17-es kromoszóma aneuszómia volt igazolható. A négy (4.4%) HER2 2+-es eset közül három diploid, nem amplifikált tumor volt, a maradék egy esetben aneuszómiát találtunk. A TMA metszeten 3+ pozitivitást hordozó 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 génamplifikációt, vagy pedig 17-es kromoszóma aneuszómiát.

A fennmaradó 34/174 (20%) eset a hagyományos metszeteken 3+ pozitivitást mutatott, ezen belül 29 (85.3%) TMA-kon is 3+ volt, kettő (5.9%) immunhisztokémiaileg 2+, és három (8.8%) pedig IHC negatív

volt. Utóbbi három esetből egynél aneuszómiát láttunk, a másik kettő nem mutatott génamplifikációt. Amíg a kettő 2+-es esetből egyik sem volt amplifikált, addig 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:

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 bizonyítható. Hét eset (5.7%) -kettőben a HER2 amplifikációval- immunhisztokémiaileg 2+ 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 jellemzett, egyet (3.2%) pedig 3+-es. Az összesen 26 konkordáns eset közül kilenc mutatott génamplifikációt, és mind az öt (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 HER2 amplifikációt, egy eset pedig 17-es kromoszómaaneuszómiát mutatott. Két eset 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 az egyik nem mutatott HER2 amplifikációt, és a másik 17-es kromoszómaaneuszmóciát hordozott.

#### *4.b. A HER2 diagnosztikában használatos immunhisztokémiai antitestek összehasonlítása szöveti microarray-eken*

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

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

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 volt (95.65%), 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 érte el a legmagasabb specificitást (97.36%), a Pathway CB11 86.96%-os specificitásánál 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 amplifikációnak.

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

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

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 volt a második legszenzitívebb (70.83%) és a második legnagyobb negatív prediktív értékű (96.06%) immunreakció. A legalacsonyabb szenzitivitása az NCL-CBE1 antitestnek volt (63.63%), a

legkisebb NPV-je pedig a Pathway CB11 kitnek (95.24%). A legpontosabbnak ezúttal a HercepTest bizonyult (95.43%), mely kicsivel meghaladta az első számításunk során a Pathway RM-4B5-tel leírt értéket. 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%) volt.

## **5. MEGBESZÉLÉS**

Az emlőrákok pathologiai 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 rutindiagnosztikában eddig nem használtak. Kutatócsoportunkkal párhuzamosan, de függetlenül Sapino és munkatársai végeztek ilyen irányú vizsgálatokat, azonban mindössze 20 eset direkt immunhisztokémiai és FISH össze-hasonlítását végezték el. 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+ (81.7% - 2+ és 4% - 3+; 80.7% - 2+ és 3.2% - 3+) valamint a HER2 3+ 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 megbízhatóan alkalmazhatók a rutindiagnosztikában.

A microarray-ek validálása során 3mm átmérőjű szövethengerekből tumoronként csupán egyet építettünk be TMA-ba, azonban a megbízhatóság minden bizonnyal tovább fokozható, ha tumoronként több különböző helyről származó szövethengert használunk. Ugyanakkor elgondolkodtató, 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 hasonlóan, megbízhatónak kellene tekintenünk.

A fluoreszcencia in situ hibridizációs vizsgálatok költségeinek csökkentése és a reakciók egységes körülményeinek megteremtése mellett a szöveti microarray-ek 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 vizsgálati idő számottevően megnő, 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+ 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 nagy lemezes és TMA metszeteken végzett immunhisztokémia konkordanciája számottevően nem változott. A HER2 ellenes antitestek összehasonlítása során szintén kevesebb volt a 2+-es esetek száma a HercepTest-tel, mint NCL-CB11 antitesttel, 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

receptor internalizációt okozó folyamat lehet, melynek további vizsgálata fontos kérdésekre adhat választ, akár a trastuzumab hatékonyságával kapcsolatban is.

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. 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 az IHC 3+ 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+ immunhisztokémiai pozitívitas önmagában HER2 pozitívnak tekinthető. 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. Mind a membránfestődés gyenge minősége, mint pedig a jelentős háttér reakció 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. Eredményeink alapján számított pontossága kiemelkedő volt, ugyanakkor szenzitivitása elmaradt a HercepTest érzékenységétől. 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%) az érzékenysége a legmagasabb. 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 nézve. 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. 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: minden emlőrákot hagyományos nagylemezes módszerrel immunhisztokémiaileg 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 HercepTesttel, 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 nagylemezes 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.

## **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 histiocytoma. 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