

c-erbB-2 Skor 2 Olan Meme Karsinomlarında HER-2 Amplifikasyonu ve Prognostik Etkinliği

Amplification and Prognostic Efficiency of HER-2 in c-erbB-2 Score 2 Breast Carcinomas

Doğuş ÖZDEMİR, Işın PAK

Abdurrahman Yurtaslan Ankara Onkoloji Hastanesi, Patoloji Bölümü, ANKARA, TÜRKİYE
Department of Pathology, Abdurrahman Yurtaslan Ankara Oncology Hospital, ANKARA, TURKEY

ÖZ

Amaç: Çalışmanın amacı, meme karsinomunda hedefe yönelik tedavi alması tartışmalı bir grup olan c-erbB-2 skor 2 olgularda HER-2 gen amplifikasyon oranını tespit etmek ve amplifikasyonun patolojik prognostik faktörler ile olan ilişkisini değerlendirmektir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda immünohistokimyasal olarak c-erbB-2 skor 2 olarak değerlendirilmiş 80 adet invaziv meme karsinomunda, silver in situ hibridizasyon (SISH) yöntemi ile hangi oranda HER-2 amplifikasyonu olduğu araştırdık. Daha sonra olguları HER-2 amplifikasyonu olan (AP) ve olmayan (AN) olarak kategorize ederek patolojik prognostik parametreler ile ilişkileri açısından karşılaştırdık.

Bulgular: Olguların %30'unda SISH ile HER-2 gen amplifikasyonu tespit edilmiştir. AP grupta ortalama hasta yaşı 50.3 (± 11.4) bulunmuştur. AN grupta ise ortalama hasta yaşı 56.7 (± 13.0) olarak hesaplanmıştır. SISH ile HER-2 gen amplifikasyonu tespit edilen gruptaki tümörlerin istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.044$) yüksek mitotik skora sahip olduğu saptanmıştır. AP gruptaki ortalama metastatik lenf nodu sayısı 10'ken, AN gruptaki ortalama metastatik lenf nodu sayısı 1 bulunmuştur. Ayrıca lenfovasküler invazyon, HER-2 gen amplifikasyonu ile istatistiksel anlamlı ilişki tespit ettiğimiz bir diğer parametredir. HER-2 gen amplifikasyonu ile tümör boyutu, histolojik grade nükleer grade, en büyük metastatik lenf nodu çapı, steroid reseptör ekspresyonu ve tümör nekrozu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmamıştır.

Sonuç: Her-2 gen amplifikasyonu görülen meme karsinomları lenfovasküler invazyon oranı artmış, metastatik lenf nodu sayısı fazla ve yüksek mitotik skora sahip tümörlerdir. İmmünohistokimyasal olarak c-erbB-2 skor 2 bulunan olgularından önemli bir kısmında HER-2 gen amplifikasyonu vardır ve bu tartışmalı olgularda immünohistokimyasal çalışmaya ek olarak genetik bir test yapılmalıdır. SISH bu amaçla kullanılabilir nispeten kolay, ucuz ve kantitatif bir alternatiftir.

Anahtar Sözcükler: HER-2, c-erbB-2, İmmünohistokimya, İn situ hibridizasyon, Prognoz

ABSTRACT

Objective: The aim of the study is to evaluate HER-2 gene amplification ratio in c-erbB-2 score 2 breast carcinoma cases which have been controversial for targeted therapy and determine its correlation with pathologic prognostic factors.

Material and Method: We analyzed 80 infiltrating breast carcinomas, which were immunohistochemically score 2 with silver in situ hybridization (SISH) assay to determine Her-2 gene amplification. Afterwards cases have been grouped as amplification positive (AP) and amplification negative (AN). These groups have been compared with each other to reveal their relationship with pathologic prognostic factors.

Results: 30% of the cases showed HER-2 gene amplification with SISH. Median age of patients in AP group was 50.3 (± 11.4). Median age of AN group was 56.7 (± 13.0). We found that tumors in AP group had much higher mitotic rate ($p=0.044$). Mean metastatic lymph node number in AP group was 10, while it was only 1 in AN group. Lymphovascular invasion was the other striking parameter which showed statistically significant correlation with HER-2 amplification. We didn't find any statistically significant correlation between HER-2 amplification and tumor size, histologic grade, nuclear grade, diameter of the largest metastatic lymph node, steroid receptor expression and tumor necrosis.

Conclusion: Tumors that show HER-2 gene amplification have much higher mitotic rate, increased metastatic lymph node number and increased lymphovascular invasion rate. Unignorable part of controversial immunohistochemically c-erbB-2 score 2 cases show HER-2 gene amplification and we need to confirm these cases with genetic tests. SISH is a cheap, easy and quantitative alternative.

Key Words: HER-2, c-erbB-2, Immunohistochemistry, In situ hybridization, Prognosis

Geliş Tarihi/Received : 26.10.2009

Kabul Tarihi/Accepted : 04.03.2010

Yazışma Adresi/Correspondence: Doğuş ÖZDEMİR

Abdurrahman Yurtaslan Ankara Onkoloji Hastanesi, Patoloji Bölümü, ANKARA, TÜRKİYE/Department of Pathology, Abdurrahman Yurtaslan Ankara Oncology Hospital, ANKARA, TURKEY

E-posta/E-mail: dogusdr@yahoo.com Tel/Phone: +90 312 336 09 09

GİRİŞ

Meme kanseri klinik davranışı, radyolojik ve patolojik özellikleri ile biyolojik potansiyeli farklı olan heterojen bir hastalık grubudur (1). Bu heterojenitenin bilinmesi, her bir olgunun, bu evrimsel spektrum içindeki yerine, ayrı ayrı yerleştirilmesi ihtiyacını doğurur (2,3). Bu da ancak bugüne kadar tanımlanmış, morfolojiye dayalı prognostik parametreler ile morfolojiye dayalı olmayan prognostik parametreler yani moleküler belirteçlerin (4) ve klinik bulguların birlikte değerlendirilmesi ve her hasta için gerekli bireysel tedavi planının oluşturulması ile mümkündür.

Patolojik prognostik bir parametre ve moleküler belirteç olan HER-2/ NEU (c-erbB-2) gen durumu aynı zamanda tedavi planlanmasını yönlendirecek verilerden biridir. Yaklaşık olarak invaziv meme kansinomlarının %15-25'inde (10-30), HER-2 gen amplifikasyonu görülür (5-10). Meme kansinomunda HER-2 pozitifliği; agresif tümör büyümesi, rekürens riskinde artış, kısa sağkalım ve özellikle lenf nodu pozitifliği olan hastalarda kötü prognoz ile birlikte (6-8,10). Meme kansinomu hastasında HER-2 gen amplifikasyonu, kemoterapi ve hormonoterapiye yanıtın tahmininde kullanılır (5,10,11). Meme kansinomunda, HER-2 gen amplifikasyonunun bilinmesi, HER-2 pozitif olan ileri evre metastatik meme CA tedavisinde, bu reseptörü hedef alan monoklonal antikor (MAb) olan "trastuzumab"ın (Herceptin: Genentech, San Francisco, CA, USA) geliştirilmesi ile daha da önem kazanmıştır (10-12). Çünkü monoklonal antikor tedavisinden en çok yarar görecektir hasta grubu, HER-2 pozitifliği yüksek olan hastalardır (12). Bu tedavinin aynı zamanda kardiyotoksik etki gibi yan etkileri de bulunduğu, tedavi için en uygun hasta grubunun uygun bir yöntemle seçilmesi gerekir (10).

Meme kansinomu hastalarında tümörün HER-2 durumunun hangi yöntemle tespit edilmesi gerektiği ise tartışmalı bir konudur. Onkoprotein miktarı, immünohistokimya, ELISA veya western blot ile; gen amplifikasyon miktarı southern blot, in situ hibridizasyon yöntemleri veya PCR ile; m-RNA düzeyi northern blot ile ölçülebilir (11). Aslında henüz, literatürde üstünde görüş birliğine varılmış optimal bir yöntem yoktur. HER-2 gen durumunun tespitindeki en önemli sorunsal ise "borderline" yani arada kalan; net olarak pozitif veya negatif denemeyen olgulardır (13).

Meme kansinomunda HER-2 gen durumunu değerlendirmek için en yaygın kullanılan yöntemlerden biri immünohistokimya (İHK)'dir. İHK kolay ve ucuz bir test olup en önemli deavantajı değerlendirme kriterlerinin subjektifliği nedeniyle değerlendiriciler arasındaki uyumsuzluktur. Ayrıca cerrahi materyalin patoloji laboratuva-

rina gelişinden itibaren immünohistokimyasal çalışmanın sonuçları fiksasyon ve tüm doku takip sürecinden etkilendiği için laboratuvarlar arası standardizasyonun güç olduğu düşünülür. Aslında İHK sanılandan daha güvenilir bir yöntem olup, negatif ve pozitif olgu tespitinde farklı laboratuvarlar arası (14) veya diğer standart yöntemler ile korelasyonu yüksektir (15,16).

İlk olarak frozen kesitlerde çalışılan southern blot yönteminden sonra, floresan in situ hibridizasyon ve daha sonraları ise kromojen ve silver in situ hibridizasyon yöntemleri geliştirilmiştir. İn situ hibridizasyon yöntemleri, DNA problemleri kullanarak HER-2 gen kopya sayısının farklı şekillerde görselleştirerek miktarının tespit edilmesine dayanır. DNA problemleri, floresan in situ hibridizasyonda floresanla, kromojenik in situ hibridizasyonda kromojenle işaretlenir (11). İHK ile standart bir yöntem olarak kabul edilen FISH yöntemi arasındaki korelasyon %90'lar civarındadır (13-15).

"Silver enhanced" in situ hibridizasyon yöntemi (SİSH) metalografiye dayalı bir yöntem olup, bir olgunun HER-2 durumunun, invaziv tümöral hücrelerdeki HER-2 gen kopya sayısının; kromozom 17 kopya (Kr-17, CHR 17) sayısına oranlanması ile tespit edilmesi esasına dayanır. Işık mikroskopunda değerlendirme yapılır ve preparatlar arşivlenebilir. Bu yöntem kantitatif bir yöntem olup değerlendiriciler arasındaki uyum yüksektir. Ayrıca SİSH ASCO/CAP kılavuzunun önerdiği floresan in situ hibridizasyon (FISH) ile %95 uyumlu olma kriterine uygundur (17).

Bu çalışmanın amacı, invaziv meme kansinomlarından, immünohistokimyasal olarak c-erbB-2 skor 2 olarak değerlendirilmiş ve "borderline" kabul edilen olguların ne kadar bir kısmında SİSH ile HER-2 gen amplifikasyonu olduğunu tespit etmek ve HER-2 amplifikasyonunun klinikopatolojik parametreler ile olan ilişkisini değerlendirmektir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Rutin değerlendirmeler: Bu çalışmada, hastanemiz Patoloji Bölümü'nde Ekim 2007 ile Şubat 2008 arasında bölümümüzce primer tümörü değerlendirilerek invaziv meme kansinomu tanısı almış veya dış merkezlerden konsülte edilmiş ve tarafımızdan tekrar değerlendirilmiş, immünohistokimyasal olarak HER-2 durumu c-erbB-2 skor 2 olan, 64 modifiye radikal mastektomi ve aksiller diseksiyon yapılmış olgusu, 12 eksizyonel biyopsi materyali, 4 insizyonel biyopsi materyali olmak üzere toplam 80 olgu incelenmiştir.

Bölümümüzce primer tümörleri değerlendirilmiş olgular, %10'luk tamponlu nötral formalinde, 6-12 saat fikse edilmiş, rutin takip işlemi sonrası parafin bloklara gömülmüş ve 5 µm kalınlığında kesitler alınıp rutin olarak Hematoksilen Eozin ve immünohistokimyasal olarak ER, PR ve c-erbB-2 ile boyanmıştır. Olgulara ait tüm Hematoksilen Eozin (H&E) boyalı preparatlar incelenmiş ve klinikopatolojik parametreler yönünden değerlendirilmiştir.

Ayrıca, c-erbB-2 çalışılmak üzere seçilmiş en uygun bloktan hazırlanan adezivli camlara 4 µm kalınlığında kesitler alınarak, otomatik preparat boyayıcı (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA) ile SİSH boyanmıştır. SİSH protokolü: Deparafinizasyon, sitrat muamelesi, İSH proteazla inkübasyon, HER-2 DNA veya Kr-17 probunun eklenmesi ve hibridizasyon için inkübasyon, Silver C ile inkübasyon, kontrast boya olarak Hematoksilen ile inkübasyon ve kontrast boyanma sonrası bluing ile inkübasyon. Proteaz süreleri ve DNA problemleri ile olan inkübasyon süreleri, doku morfolojisi korunarak sinyallerin görünür kılındığı optimal süre olacak şekilde her materyal için ayarlanmıştır.

Dış merkezden bölümümüze konsülte edilen olguların raporları, hazır bloklardan elde edilen ve/veya ilgili merkezce gönderilmiş H&E boyanmış tüm preparatları incelenmiştir. Bu olgulara İHK çalışılarak c-erbB-2 skorları 2 olarak doğrulanmıştır. Hazır gönderilen bloklardan, adezivli camlara 4 µm kalınlığında kesitler alınarak SİSH çalışılmıştır.

Histomorfolojik parametrelerin değerlendirilmesi: Tümör boyutu: Tümörlerin en büyük çapları (cm) alınmış ve önce 3 grup olarak incelenmiş, T1 ≤ 2 cm, 2.1-5 cm, >5 cm; daha sonra düşük tümör evresi (T1+T2) ve yüksek tümör evresi grupları (T3) oluşturulmuştur. Tümör histolojik grade ve nükleer grade: modifiye Bloom-Richardson sistemi kullanılarak üç grupta incelenmiş, daha sonra gruplar şu şekilde birleştirilmiştir. Skor1+skor 2=Düşük nükleer grade'li grup ve Gr 1+ Gr 2 düşük histolojik grade'li grup ile skor 3 ve G3 yüksek grade'li gruplar oluşturulmuştur. Mitoz sayısı: 10 büyük büyütme sahasında (Olympus BX51, x400, görüntü alan çapı 0,55 mm) mitoz sayılmıştır. Mitoz skoru 2 grupta incelenmiştir; Skor 1: ≤ 8 (düşük mitotik skor) Skor 2: 9-17 mitoz + Skor 3: ≥ 18 mitoz (yüksek mitotik skor). Tümör nekrozu ile lenfovasküler invazyon: var/yok şeklinde incelenmiştir. Lenf nodu metastazı durumu, lenf nodu durumu bilinen olgular kullanılarak, metastatik lenf nodu olup olmaması, ortalama metastatik lenf nodu sayısı ve metastaz içeren lenf nodu sayısı <10 olan olgular bir grup, metastaz içeren lenf nodu sayısı ≥ 10 olan olgular diğer grup şeklinde incelenmiştir.

İmmünohistokimyasal değerlendirme: Adezivli lamlara alınan kesitler bir gece 37 °C'de etüvde deparafinizasyon sonrası, otomatik preparat boyayıcısıyla (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA) boyanmıştır. İnternal pozitif kontrolü olmayan tüm boyanacak peraparatlara, boyanacak doku dışında, başka bir adezivli lama veya aynı adezivli lama, boyaya özgü pozitif kontrolü temsil eden dokudan örnek alınmıştır. ER (SP1, rabbit monoklonal, Neomarkers) ve PR (SP2, rabbit monoklonal, Thermo Scientific) için boyanma olmaması veya invaziv tümöral hücrelerde %5'in altında nükleer boyanma olması negatif olarak kabul edilmiştir (18).

c-erbB-2 (Neu Ab12, Thermo Scientific) skorlaması ASCO/CAP 2007 önerileri doğrultusunda, membran boyanmaları değerlendirilerek yapılmıştır (10). Buna göre tümör hücrelerinin %10'undan fazlasında ve %30'unun altında, zayıf veya uniform olmayan yoğunlukta komplet membranöz boyanma olan olgular skor 2 kabul edilmiş ve çalışmaya dahil edilmiştir.

Silver in situ hibridizasyon ile değerlendirme: Boyanma sonuçları invaziv tümöral sahada ışık mikroskopunda (20x, 40x objektif kullanılarak) üretici firmanın kılavuzuna uygun olarak semikantitatif yöntem (yöntem 1) veya kantitatif yöntemle (yöntem 2 veya yöntem 2a) değerlendirilmiştir (19). Bu değerlendirmelerin ışığında HER-2 amplifikasyonu açısından 2 grup tanımlanmıştır: HER-2 amplifikasyonu olan grup (AP) ve HER-2 amplifikasyonu olmayan grup (AN) (negatif + "borderline" olgular).

İstatistiksel Analiz: Verilerin analizi SPSS (Statistical Package for Social Sciences, Chicago, IL, USA, Windows 11.5) paket programında yapılmıştır. Tanımlayıcı istatistikler sürekli ölçümlü değişkenler için ortalama ± standart sapma veya ortanca (minimum-maksimum) şeklinde, kalitatif değişkenler ise gözlem sayısı ve (%) olarak gösterilmiştir. Gruplar arasında yaş ortalamaları yönünden farkın önemliliği Student t testi ile metastatik lenf nodu sayısı ve en büyük metastatik lenf nodu çapına ait ortanca değerler yönünden farkın önemliliği ise Mann Whitney U testi ile değerlendirilmiştir. Kalitatif değişkenler Pearson Ki-Kare veya Fisher Tam Sonuçlu olasılık testi ile incelenmiştir. Sonuçlar p<0.05 için istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

80 adet olgudan, SISH yöntemi ile 24 (%30) olguda, HER-2 gen amplifikasyonu izlenmiş; 56 (%70) olguda gen amplifikasyonu izlenmemiştir.

AP grupta minimum yaş 25, maksimum yaş 78, ortanca yaş 50.0 ve ortalama hasta yaşı 50.3 (± 11.4) olarak bulunmuştur. AN grupta (n= 56), minimum yaş 30, maksimum yaş 88 iken ortanca yaş 54.0 ve ortalama hasta yaşı 56.7 (± 13.0) olarak hesaplanmıştır. HER-2 gen amplifikasyonu açısından gruplar arası ortalama yaş farkı, istatistiksel olarak anlamlı olmasına rağmen (p=0.039) (Tablo I) klinik olarak her iki grup da postmenopozal hasta grubunu temsil etmektedir

HER-2 gen amplifikasyonu olan 24 olgudan 5'inde (%20.8) mitotik skor 1, 14'ünde (%58.3) skor 2 ve 5'inde (%20.8) skor 3'tür. Amplifikasyon olmayan grupta ise olguların 25'inde (%44.6) mitotik skor 1, 18'inde (%32.1) mitotik skor 2 ve 13'ünde (%23.2) skor 3'tür. AP olgulardan 5'inde (%20.8) düşük mitotik skor (skor 1), 19'unda (%79.2) yüksek mitotik skor (skor 2+skor 3) tespit edilmiştir. AN grupta ise olguların 25'inde (%44.6) düşük mitotik skor, 31'inde (%55.4) yüksek mitotik skor bulunmuştur. AP ve AN gruplar arasında tümör mitotik skoru yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görülmüştür (p=0.044) (Tablo I).

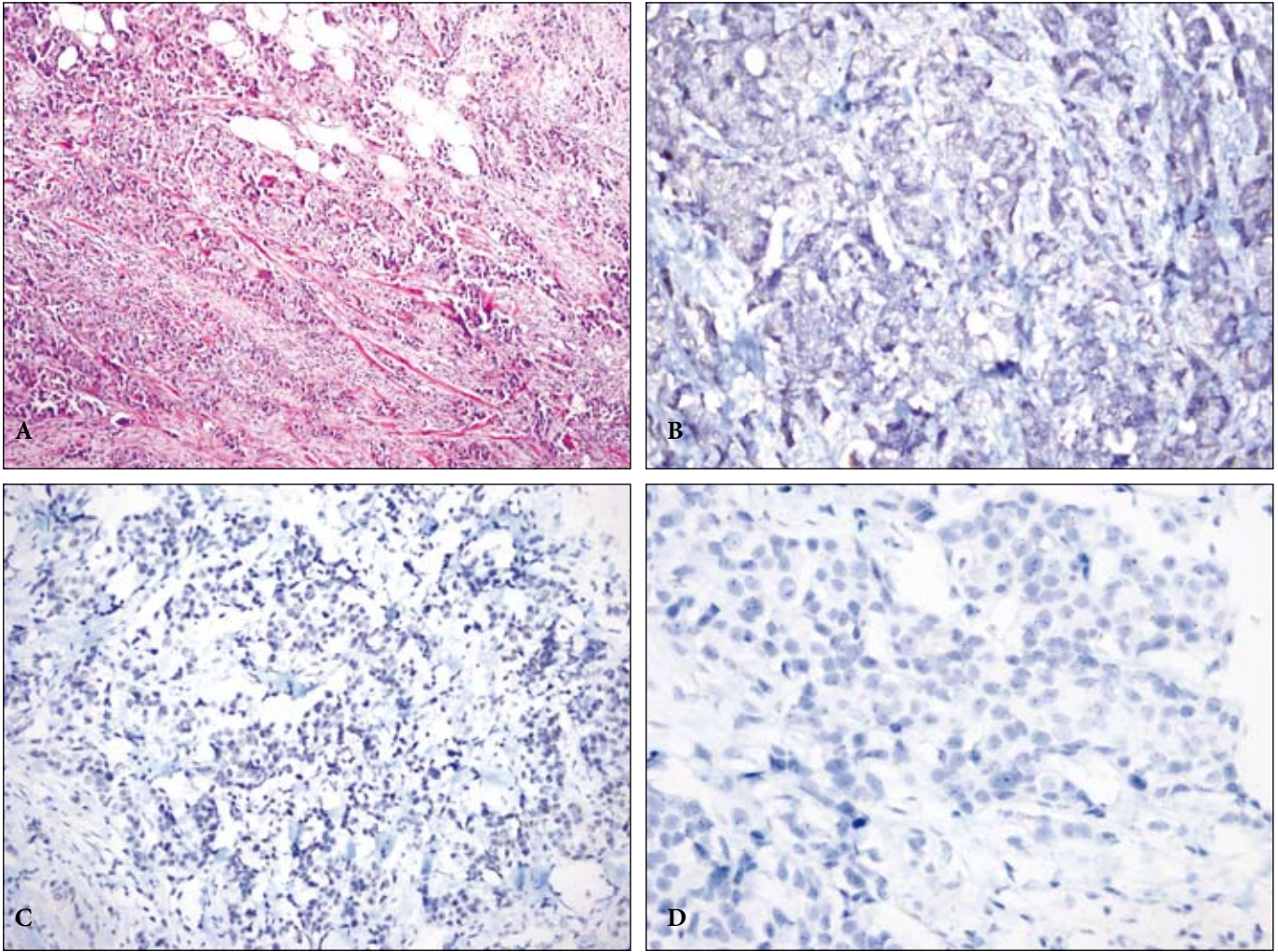
AP 24 olgudan 13'ünde (%56.5), AN 56 olgudan ise 16'sında (%28.6) lenfovasküler invazyon saptanmıştır. AP ve AN gruplar arasında lenfovasküler invazyon bulunması yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark görülmüştür (p= 0.019) (Tablo I).

AP ve AN gruplar arasında, ortalama metastatik lenf nodu sayısı, metastatik lenf nodu varlığı (metastaz varlığı) ve sayısı yönünden (10'nun üzerinde metastatik lenf noduna sahip olmak) istatistiksel olarak anlamlı fark görülmüştür (p= 0.001, p=0.017, p=0.01) (Tablo I).

HER-2 gen AP ve AN gruplar arasında tümör boyutu (p=0.336), histolojik grade (p=0.486), tümör nükleer grade (0.061), tümör steroid reseptör ekspresyonu (p= 1.000), en büyük metastatik lenf nodu çapı (p= 0.539), tümör nekrozu bulunması (p= 0.688) yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (Tablo I).

Tablo I: SİSH, HER-2 gen amplifikasyonu ve prognostik parametreler ilişkisi

| Değişkenler | SİSH (-) (n=56) | SİSH (+) (n=24) | p |
|--------------------------------------|-----------------|-----------------|--------|
| Yaş | 56.7 \pm 13.0 | 50.3 \pm 11.4 | 0.039 |
| Steroid reseptör | | | 1.000 |
| Negatif | 7 (%12.5) | 3 (%12.5) | |
| Pozitif | 49 (%87.5) | 21 (%87.5) | |
| Ortalama metastatik LN sayısı | 1 (0-18) | 10 (0-49) | <0.001 |
| N0 Metastaz yok | 21(47.7) | 3 (15.8) | <0.017 |
| N0 + N1+N2 (N <10) | 41 (%83.2) | 9 (%47.4) | <0.001 |
| N3 (N \geq 10) | 3 (%6.8) | 10 (%52.6) | <0.001 |
| En büyük metastatik LN çapı | 1.8 (0.5-4.0) | 1.8 (0.9-3.5) | 0.539 |
| Tümör histolojik grade | | | 0.486 |
| Düşük grade (Gr1+ Gr2) | 35 (62.5) | 13 (%54.2) | |
| Yüksek grade (G3) | 21 (%37.5) | 11 (%45.8) | |
| Lenfovasküler invazyon | 16 (%28.6) | 13 (%56.5) | 0.019 |
| T Evresi (Boyutu) | | | 0.336 |
| T1+T2 (\leq 5cm) | 48 (%85.7) | 18 (%75.0) | |
| T3 (> 5 cm) | 8 (%14.3) | 6 (%25.0) | |
| Mitoz | | | 0.044 |
| Düşük mitotik skor (Skor 1) | 25 (%44.6) | 5 (%20.8) | |
| Yüksek mitotik skor (Skor 2+ 3) | 31 (%55.4) | 19 (%79.2) | |
| Nekroz | 14 (%25.0) | 5 (%20.8) | 0.688 |
| Tümör nükleer grade | | | 0.061 |
| Düşük grade (grade 1+ grade 2) | 36 (%64.3) | 10 (%41.7) | |
| Yüksek Grade (grade 3) | 20 (%35.7) | 14 (%58.3) | |



Şekil 1: (A) İnvaziv duktal karsinom, grade 3 olgu (H&E, x100), (B) İHK ile tümör hücrelerinin %30'undan azında inkomplet zayıf boyanma görülmüş ve c-erbB-2 skor 2 olarak değerlendirilmiştir (DAB, x200), (C) SISH ile HER-2'de küçük büyük kümelenmeler (x200), (D) Kr-17 ile hücrelerde 1-2 granül şeklinde normal paternde boyanma izlenmiştir (x400). Semikantitatif yöntemle, 20 hücrede tespit edilen HER-2 / Kr-17 sinyal sayısı > 4 olduğundan olguda HER-2 amplifikasyonu vardır şeklinde değerlendirilmiştir.

TARTIŞMA

Patolojik prognostik bir parametre ve moleküler belirteç olan HER-2/Neu (c-erbB-2) gen durumu aynı zamanda tedavi planlanmasını yönlendirecek verilerden biridir (10). Yapılan çalışmalarda, yaklaşık olarak invaziv meme karsinomlarının %15-25'inde (10-30), HER-2 gen amplifikasyonu olduğu saptanmıştır (6,9,10). Çalışmamıza dahil edilen, immünohistokimyal yöntemle c-erbB-2 skor 2 olarak değerlendirilmiş olan 80 adet olgudan 24 (%30) adet olguda SISH ile HER-2 gen amplifikasyonu olduğu tespit edilmiştir. 57 olguda ise 56 (%70) SISH ile HER-2 gen amplifikasyonu olmadığı tespit edilmiştir. Bu sonuç literatürle uyumludur (11). Yani SISH yöntemi HER-2 gen amplifikasyonunu değerlendirmede kullanılabilir güncel bir yöntemdir.

Biz 80 adet olguyu AP olan ve AN şeklinde kategorize ederek bu farklı grupları, hasta yaşı, tümör boyutu, histolojik grade, nükleer grade, mitotik skor, steroid reseptör ekspresyonu, lenfovasküler invazyon, nekroz ve metastatik lenf nodu varlığı, lenf nodu sayısı ve en büyük metastatik lenf nodu çapı gibi patolojik prognostik parametreler ile olan ilişkileri yönünden kıyasladık.

Hasta yaşını değerlendirmek için yapılan çalışmalarda bu konuda birbirinden farklı ve hatta birbirine zıt sonuçlar bildirilmiştir. Gençlerde prognoz daha kötü olduğunu (20) veya gençlerde prognoz daha iyi olduğunu (21) ileri süren yayınlar mevcuttur. Bazı yayınlarda ise yaş ile prognoz arasında ilişki bulunmadığı bildirilmiştir. Çalışmamızda SISH ile AP grupta ortalama hasta yaşı 50.3 (± 11.4); AN grupta ise 56.7 (± 13.0) olarak bulunmuştur.

İki grup arasında, ortalama hasta yaşı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark olmasına rağmen her ikisi de postmenopozal hasta grubunu temsil ettiğinden, klinik olarak kullanılabilir bir veri değildir fakat yine de HER-2 gen amplifikasyonu postmenopozal dönemdeki daha genç hasta popülasyonunda beklenebilir.

Tümör boyutu, bağımsız bir prognostik parametredir ve en önemli parametrelerden biridir (3,22). Van de Vijver ve ark., 189 kişilik olgu serisinde, İHK ile HER-2 overekspresyonu ile tümör boyutu ilişkisini incelemişler ve HER-2 ekspresyonunun artan tümör boyutu ile ilişkili olduğunu fakat lenf nodu tutulumu ile ilişkili olmadığını bulmuşlardır. Ayrıca, ortalama 37 aylık takipleri sonrasında toplam hayatta kalım süresinde azalma olduğunu fakat bu azalmanın tümör boyutu eşitlendiğinde önemini yitirdiğini tespit etmişlerdir (23). Çalışmamızda ise, SISH ile tespit ettiğimiz HER-2 gen amplifikasyonu ile tümör boyutları arasında istatistiksel anlamlı ilişki bulunmamıştır.

c-erbB-2 (HER-2) amplifikasyonunun prognostik değerine ilişkin yapılmış ilk çalışmalardan biri Berger ve ark., yaptığı çalışmadır. 51 olgulu bu çalışmada, c-erbB-2 amplifikasyonu ile tümör nükleer grade'i ve nodal tutulum arasında istatistiksel anlamlı ilişki tespit edilmiştir (24). Çalışmamızda ise, HER-2 gen amplifikasyonu olan gruptaki tümörlerin çoğu (%58.3) yüksek nükleer grade'e sahipken; bu durum, HER-2 gen amplifikasyonu olmayan grupla kıyaslandığı zaman, HER-2 gen amplifikasyonu ile tümör nükleer grade'i arasında istatistiksel anlamlı ilişki tespit edilmemiştir.

Çalışmamızda, AP olgulardan 13'ü (%54.2) düşük hisyolojik grade'e (grade 1 + grade 2) sahipken; 11 olgu (%45.8) yüksek histolojik grade'e sahip bulunmuştur. AN grupla kıyaslandıkları zaman tümör histolojik grade'i yönünden iki grup arasında istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır. Tsuda ve ark., ise, histolojik grade ve onun bileşenleri olan tübül formasyonu ile mitoz skorunun bağımsız prognostik parametreler olduğunu tespit etmiştir. Ayrıca, c-erbB-2 amplifikasyonu tümör boyutu ve nodal tutulum ile ilişkisi olmadığını, fakat histolojik grade, nükleer grade ve mitoz skoru ile güçlü bir korelasyon gösterdiğini belirtmişlerdir. Nodal tutulum ve histolojik gradesabit tutulduğuz zaman ise c-erbB-2'nin prognostik değerinin azaldığını bildirmişlerdir (25). Heintz ve ark., ise HER-2 amplifikasyonu ile artmış mitotik skor ve ER-PR negatifliği arasında güçlü korelasyon tespit etmişlerdir (26). Bu çalışmaya benzer şekilde biz de, SISH ile HER-2 gen amplifikasyonu tespit edilen gruptaki tümörlerin yüksek mitotik skora sahip olduğunu ve bu sonucun amplifikasyon olmayan grupla kıyaslandığı zaman aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğunu tespit

ettik (p=0.044). HER-2 geninin epidermal growth faktör ailesinin üyelerinden bir tanesi ve hücre proliferasyonunda görevli olduğu düşünülürse bu sonuç beklenen bir sonuçtur.

Östrojen (ER) ve progesteron (PR) reseptör ekspresyonuna bakıldığı zaman ise çalışmamızda, HER-2 gen amplifikasyonu ile arasında pozitif veya negatif istatistiksel anlamlı sonuç bulunmamıştır.

Çalışmamızdaki en önemli bulgulardan biri lenf nodu tutulumu ile HER-2 gen amplifikasyonu arasında tespit ettiğimiz güçlü korelasyondur. Şöyle ki, amplifikasyon olan grupta lenf nodu tutulumu olmayan (N0) hasta oranı %15.8 iken, amplifikasyon izlenmeyen grupta bu oran %47.7'dir. Amplifikasyon olan gruptaki ortalama metastatik lenf nodu sayısı 10'ken, amplifikasyon olmayan gruptaki ortalama metastatik lenf nodu sayısı 1'dir. Ayrıca amplifikasyon görülen grupta, 10'nun üzerinde metastatik lenf nodu tutulum (N3) oranı %52.6' iken, amplifikasyon görülmeyen grupta bu oran çok düşük düzeyde, %6.7 düzeyindedir. Amplifikasyon görülen ve görülmeyen gruplar arasında bu her üç lenf nodu metastazı durumu açısından, istatistiksel fark anlamlıdır (p<0.001, p= 0.017, p<0.001) (Tablo I). Bu sonuçlar, HER-2 gen ve ürünlerinin tümör yayılımı ve tümör hücre motilitesinde etkili ve görevli olduğu ve dolayısıyla tümör metastaz olasılığında artışa neden olduğu görüşünü destekler. Lenf nodu tutulumu ve HER-2 amplifikasyonu arasındaki ilişkiye yönelik literatürde farklı sonuçlar mevcuttur. Tiwari ve ark., 61 olgu üzerinde yaptıkları çalışmada, HER-2 amplifikasyonunu tespit etmek için southern blot yöntemini kullanmışlar ve çalışmamıza benzer şekilde yaş, tümör boyutu ve hormon reseptör durumu yönünden amplifiye grup ile amplifiye olmayan grup arasında fark olmadığını fakat lenf nodu tutulumu ve HER-2 amplifikasyonu açısından anlamlı fark olduğunu tespit etmişlerdir. Amplifikasyon görülen grubun %94'ünde tanı anında metastatik hastalık olduğunu dolayısıyla HER-2'nin tümörün erken yayılımıyla ilişkili olduğunu ve bu nedenle kötü prognoz belirteci olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir (27).

Lenfovasküler invazyon HER-2 gen amplifikasyonu ile anlamlı ilişki tespit ettiğimiz bir diğer parametredir. Artmış lenfovasküler invazyon oranı, HER-2 amplifikasyonu olan grupta, bu yöntemin erken tümör yayılım mekanizması olarak kullanıldığını işaret eder. Tümör nekrozu ve en büyük metastatik lenf nodu çapı ise, HER-2 amplifikasyonu ile arasında önemli bir ilişki tespit etmediğimiz patolojik prognostik parametrelerdir.

Bu çalışmanın belirli sayıda olgu üzerinden yürütüldüğü göz ardı edilmemelidir. Bu durum, bazı prognostik faktörler ile HER-2 amplifikasyonu arasındaki olası negatif/pozitif anlamlı korelasyonu tespit etmemizi engellemiş olabilir. Dolayısıyla, daha geniş olgu serilerinde, HER-2 gen amplifikasyonunun prognostik parametreler ile olan ilişkisinin araştırılması faydalı olacaktır. Sonuçların klinik korelasyonu da, patolojiyi kiliniğe daha da yaklaştırmış olan bu yeni prognostik moleküler belirteç sayesinde, anlamlı olacaktır. Ayrıca bu çalışmada kullandığımız, standart yöntemlerle korelasyonu yüksek, arşivlenebilir, maliyeti nispeten ucuz, otomatize ve değerlendirmesi ışık mikroskopunda yapıldığından daha pratik bir yöntem olduğunu düşündüğümüz SISH yöntemi güncel pratikte de güvenle kullanılabilir.

KAYNAKLAR

1. **Schnitt SJ, Milis RR, Handy AM, et al:** The Breast in: Mills SE, Carter D, Reuter VE (Eds). Sternberg's Diagnostic Surgical Pathology, Lippincott William &Wilkins, Philadelphia, 2004
2. **Heimann R, Hellman S:** Aging, progression, and phenotype in breast cancer. *J Clin Oncol* 1998, 16:2686-2692
3. **Rosen's Breast Pathology, 3rd Edi.** Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2009
4. **Ross JS, Fletcher JA:** The HER-2/ neu oncogene in breast cancer: prognostic factor and target for therapy. *Stem Cells* 1998, 16: 413-428
5. **Piccart M, Lohrisch C, Di Leo A, Larsimont D:** The Predictive value of HER2 in breast cancer. *Oncology* 2001, 61:73-82
6. **Bozzetti C, Nizzoli R, Guazzi A, Flora M, Bassano C, Crafa P, Naldi N, Cascinu S:** HER-2/neu amplification detected by fluorescence in situ hybridization in fine needle aspirates from primary breast cancer. *Ann Oncol.* 2002, 13:1398-1403
7. **Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL:** Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987, 235:177-182
8. **Seshadri R, Firgaira FA, Horsfall DJ, McCaul K, Setlur V, Kitchen P:** Clinical significance of HER-2/neu oncogene amplification in primary breast cancer. The South Australian Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol.* 1993, 11:1936-1942
9. **Dowsett M, Hanna WM, Kockx M, Penault-Llorca F, Rüschoff J, Gutjahr T, Habben K, van de Vijver MJ:** Standardization of HER2 testing: results of an international proficiency-testing ring study. *Mod Pathol.* 2007, 20:584-591, Epub 2007 Mar 30
10. **Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, Dowsett M, Fitzgibbons PL, Hanna WM, Langer A, McShane LM, Paik S, Pegram MD, Perez EA, Press MF, Rhodes A, Sturgeon C, Taube SE, Tubbs R, Vance GH, van de Vijver M, Wheeler TM, Hayes DF:** American Society of Clinical Oncology/ College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2007, 25:118-145, Epub 2006 Dec 11
11. **Hanna WM, Kahn HJ, Pienkowska M, Blondal J, Seth A, Marks A:** Defining a test for HER-2/neu evaluation in breast cancer in the diagnostic setting. *Mod Pathol* 2001, 14:677-685
12. **Bilous M, Dowsett M, Hanna W, Isola J, Lebeau A, Moreno A, Penault-Llorca F, Rüschoff J, Tomasic G, van de Vijver M:** Current perspectives on HER2 testing: a review of national testing guidelines. *Mod Pathol.* 2003 Feb;16(2):173-182.
13. **Wang S, Saboorian MH, Frenkel E, Hynan L, Gokaslan ST, Ashfaq R:** Laboratory assessment of the status of Her-2/neu protein and oncogene in breast cancer specimens: comparison of immunohistochemistry assay with fluorescence in situ hybridization assays. *J Clin Pathol.* 2000, 53:374-381
14. **Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H, Barnes MJ, Schnitt SJ:** HER-2/neu protein expression in breast cancer evaluated by immunohistochemistry. A study of interlaboratory agreement. *Am J Clin Pathol.* 2000, 113:251-258
15. **Couturier J, Vincent-Salomon A, Nicolas A, Beuzebec P, Mouret E, Zafrani B, Sastre-Garau X:** Strong correlation between results of fluorescent in situ hybridization and immunohistochemistry for the assessment of the ERBB2 (HER-2/neu) gene status in breast carcinoma. *Mod Pathol* 2000, 13:1238-1243
16. **Ridolfi RL, Jamehdor MR, Arber JM:** HER-2/neu testing in breast carcinoma: a combined immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization approach. *Mod Pathol* 2000, 13:866-873
17. **Carbone A, Botti G, Gloghini A, Simone G, Truini M, Curcio MP, Gasparini P, Mangia A, Perin T, Salvi S, Testi A, Verderio P:** Delineation of HER2 gene status in breast carcinoma by silver in situ hybridization is reproducible among laboratories and pathologists. *J Mol Diagn.* 2008, 10:527-536, Epub 2008 Oct 2
18. **Moinfar F:** Essentials of Diagnostic Breast Pathology. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2007
19. **Interpretation Guideline Inform HER-2.** Ventana Medical Systems, 2007, France
20. **Nixon AJ, Neuberg D, Hayes DF, Gelman R, Connolly JL, Schnitt S, Abner A, Recht A, Vicini F, Harris JR:** Relationship of patient age to pathologic features of the tumor and prognosis for patients with stage I or II breast cancer. *J. Clin Oncol.* 1994, 12: 888-894
21. **Rutqvist LE, Wallgren A:** Influence of age on outcome in breast carcinoma. *Acta Radiol Oncol.* 1983, 22:289-294
22. **Tavassoli FA:** Pathology of the Breast. 2nd ed. Norwalk Appleton Lange, Stanford, 1992
23. **van de Vijver MJ, Peterse JL, Mooi WJ, Wisman P, Lomans J, Dalesio O, Nusse R:** Neu-protein overexpression in breast cancer. Association with comedo-type ductal carcinoma in situ and limited prognostic value in stage II breast cancer. *N Engl J Med* 1988, 319:1239-1245
24. **Berger MS, Locher GW, Saurer S, Gullick WJ, Waterfield MD, Groner B, Hynes NE:** Correlation of c-erbB-2 gene amplification and protein expression in human breast carcinoma with nodal status and nuclear grading. *Cancer Res* 1988, 48:1238-1243
25. **Tsuda H, Hirohashi S, Shimosato Y, Hirota T, Tsugane S, Watanabe S, Terada M, Yamamoto H:** Correlation between histologic grade of malignancy and copy number of c-erbB-2 gene in breast carcinoma. A retrospective analysis of 176 cases. *Cancer.* 1990, 65:1794-1800
26. **Heintz NH, Leslie KO, Rogers LA, Howard PL:** Amplification of the c-erbB-2 oncogene and prognosis of breast adenocarcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 1990,114:160-163
27. **Tiwari RK, Borgen PI, Wong GY, Cordon-Cardo C, Osborne MP:** HER-2/neu amplification and overexpression in primary human breast cancer is associated with early metastasis. *Anticancer Res.* 1992, 12:419-425