

# ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΟΥ ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΟΥ HER2 ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ SILVER IN SITU HYBRIDIZATION (SISH)

Ι. Μανώλης<sup>1</sup>, Π. Χατζηδάκη<sup>1</sup>, Μ. Μαρτζίκου<sup>1</sup>, Μ. Χαμουργιωτάκη<sup>1</sup>, Ε. Κόνιαρης<sup>1</sup>, Α. Μέλλου<sup>1</sup>, Γ. Καφίρη<sup>1</sup>, Φ. Ανθούλη<sup>2</sup>

1. Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής, Γ.Ν.Α. «Ιπποκράτειο»

2. Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή. Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί την πιο συχνή κακοήθεια στις γυναίκες του δυτικού κόσμου, ενώ μία στις οκτώ Αμερικανίδες γυναίκες θα αναπτύξει διηθητικό καρκίνωμα μαστού μία φορά στη ζωή της. Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη, απλή και οικονομική αρχική εξέταση για την ανίχνευση της πρωτεΐνης HER2 είναι η ανοσοϊστοχημεία. Τα τελευταία χρόνια, η αυτοματοποιημένη μέθοδος, Silver In Situ Hybridization (SISH) βοηθά στην ακριβή διάγνωση ενός αμφισβητούμενου ανοσοϊστοχημικά αποτελέσματος.

Σκοπός της μελέτης. Έγινε επιβεβαίωση θετικών ή αρνητικών αποτελεσμάτων με αμφισβητούμενο ανοσοϊστοχημικά σκορ HER (2+) με την μοριακή τεχνική SISH.

Υλικά και Μέθοδοι. Από αρχαιακό υλικό, χρησιμοποιήθηκαν 30 περιστατικά καρκίνου μαστού και μελετήθηκαν καταρχάς ανοσοϊστοχημικά.

Σύμφωνα με τον Αμερικάνικο Οργανισμό Φαρμάκων (FDA), συνιστάται ότι τα ανοσοϊστοχημικά αποτελέσματα HER2 (0+) και (1+) θα πρέπει να θεωρούνται HER2 αρνητικά ενώ εκείνα με σκορ HER2 (3+) θα πρέπει να θεωρούνται ως HER2 θετικά.

Αμφισβητούμενα/διφορούμενα αποτελέσματα θεωρούνται εκείνα με σκορ HER2 (2+). Στη μελέτη μας όσα εξ αυτών κρίθηκαν ως αμφισβητούμενα (2+), ελέγχθηκαν και μοριακά με την τεχνική SISH.

Αποτελέσματα. Από τα 30 περιστατικά καρκίνου μαστού που μελετήθηκαν, τα 21 είχαν

αμφισβητούμενο ανοσοϊστοχημικά σκορ (2+) και ο περαιτέρω μοριακός έλεγχος, με την τεχνική SISH ανέδειξε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό αυτών (16/21) είχαν αρνητικό αποτέλεσμα.

Συμπεράσματα. Ο καθορισμός της έκφρασης της πρωτεΐνης του ογκογονιδίου HER2 είναι σημαντικός διότι, αυτός καθορίζει την έκβαση της νόσου ενώ προσδιορίζει και τη λήψη στοχευμένης θεραπείας. Η μελέτη μας διαπίστωσε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των διφορούμενων περιστατικών, κρίθηκε τελικά αρνητικό.

## ΕΠΑΦΗ

Ιωάννης Μανώλης  
Γ.Ν.Α. «Ιπποκράτειο»  
imanolis@uniwa.gr  
6945850387

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί την πιο συχνή κακοήθεια στις γυναίκες στο δυτικό κόσμο. Υπολογίζεται ότι μία στις οκτώ Αμερικανίδες γυναίκες μπορεί να αναπτύξει διηθητικό καρκίνωμα μαστού μία φορά στη ζωή της. Τα χαμηλότερα ποσοστά καρκίνου μαστού εμφανίζονται στην Ασία και την Αφρική αλλά τα περιστατικά σταθερά αυξάνονται και τα χαμηλά ποσοστά επιβίωσης αποτελούν αιτία σοβαρής ανησυχίας. Ο καρκίνος του μαστού είναι μια ετερογενής ασθένεια που χαρακτηρίζεται από περίπου είκοσι ξεχωριστούς ιστολογικούς υπότυπους και τουλάχιστον τέσσερις διαφορετικούς μοριακούς υπότυπους, ο καθένας με διαφορετική απόκριση στη θεραπεία και κλινική έκβαση. [1] Το γονίδιο HER2 [επίσης γνωστό ως ERBB2 ή επιδερμικός υποδοχέας αυξητικού παράγοντα (EGFR 2)] κωδικοποιεί μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη 185 kDa, με δραστηριότητα τυροσίνης κινάσης. Το HER2 έχει υψηλή ομολογία αλληλουχίας με άλλα μέλη της οικογένειας EGFR. [2]

Η λειτουργία αυτών των υποδοχέων είναι η ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης, της διαφοροποίησης και της επιβίωσης. Η ανοσοϊστοχημεία είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη, απλή και οικονομικά αποτελεσματική εξέταση για την έκφραση πρωτεΐνης HER2. Ο Αμερικάνικος Οργανισμός Φαρμάκων (FDA) συνιστά τα ανοσοϊστοχημικά αποτελέσματα HER2 με σκορ 0+ και 1+ να θεωρούνται HER2 αρνητικά, ενώ εκείνα με βαθμολογία HER2 (3+) θα πρέπει να θεωρούνται ως HER2 θετικά. Οι HER2 διφορούμενες περιπτώσεις είναι εκείνες με σκορ HER2 (2+). Αυτό είναι κάτι που πρέπει να αξιολογηθεί περαιτέρω με την τεχνική του φθορίζοντα υβριδισμού (FISH), η οποία σαν διαδικασία είναι ακριβέστερη και πιο αξιόπιστη από την ανοσοϊστοχημεία. Ωστόσο, στα μειονεκτήματά της είναι: α) η ανάγκη για εξειδικευμένο χειριστή, β) η μακρά διαδικασία, γ) ο ειδικός εξοπλισμός και δ) η αδυναμία συντήρησης των δειγμάτων για μεταγενέστερη αναθεώρηση.[3] Μια πλήρως αυτοματοποιημένη μέθοδος, η Silver In Situ Hybridization (SISH) μπορεί να ξεπεράσει τα μειονεκτήματά του FISH και να έχει την ίδια ακρίβεια.

## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Από αρχαιακό υλικό, χρησιμοποιήθηκαν 30 περιστατικά καρκίνου μαστού και μελετήθηκαν καταρχάς ανοσοϊστοχημικά. Στη μελέτη μας όσα εξ αυτών κρίθηκαν ως αμφισβητούμενα (2+), ελέγχθηκαν και μοριακά με την τεχνική SISH. Το INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, έχει σχεδιαστεί για να ανιχνεύει ποσοτικά την ενίσχυση, του γονιδίου HER2 μέσω διχρωμικού χρωμογόνου in situ υβριδισμού (ISH), με φωτονικά μικροσκόπια, σε δείγματα ιστού μονιμοποιημένα σε φορμόλη και εμπεδωμένα σε κύβους παραφίνης. Κατά τη διάρκεια της τεχνικής του Dual in situ Hybridization, δηλαδή της διαδικασίας χρώσης διπλής υβριδποίησης (Dual ISH), οι ανιχνευτές με σήμανση DNP πραγματοποιούνται στις αντίστοιχες ειδικές αλληλουχίες DNA στόχου τους εντός των κυτταρικών πυρήνων. Η ανίχνευση του ανιχνευτή HER2 με σήμανση DNP πραγματοποιείται πρώτα χρησιμοποιώντας το kit ανίχνευσης ultraView SISH DNP, το οποίο περιέχει τους ακόλουθους διανομείς: ένα μονοκλωνικό αντίσωμα Rabbit anti-DNP, Multimer διάλυμα που περιέχει ένα δευτερεύον αντίσωμα κατσίκας, συζευγμένο με υπεροξειδάση (HRP), Silver ISH DNP Chromogen A (Silver A), Silver ISH DNP Chromogen B (Silver B) και Silver ISH DNP Chromogen C (Silver C). Μετά την επώαση με πρωτογενές συζυγές αντισώματος αντι-DNP κουνελίου και έπειτα με σύζευγμα δευτερογενούς αντισώματος HRP αντικουνελίου, εμφανίζεται η αντίδραση Silver in situ υβριδισμού (SISH).

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

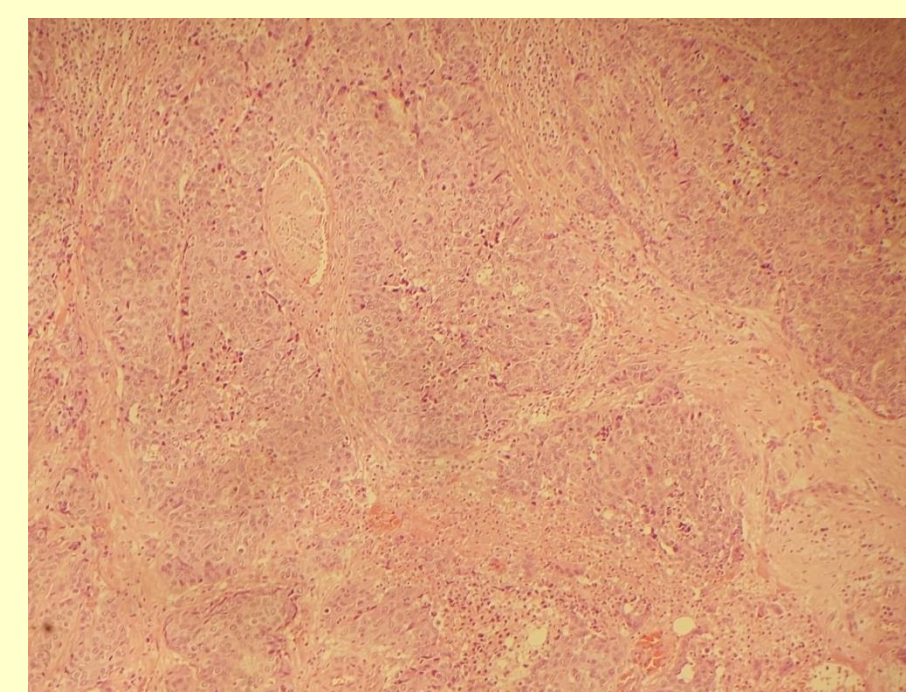
Από τα 30 περιστατικά καρκίνου μαστού που μελετήθηκαν, τα 21 είχαν αμφισβητούμενο ανοσοϊστοχημικά σκορ (2+).

Ο περαιτέρω μοριακός έλεγχος, με την τεχνική SISH ανέδειξε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό αυτών (16/21) είχαν αρνητικό αποτέλεσμα.

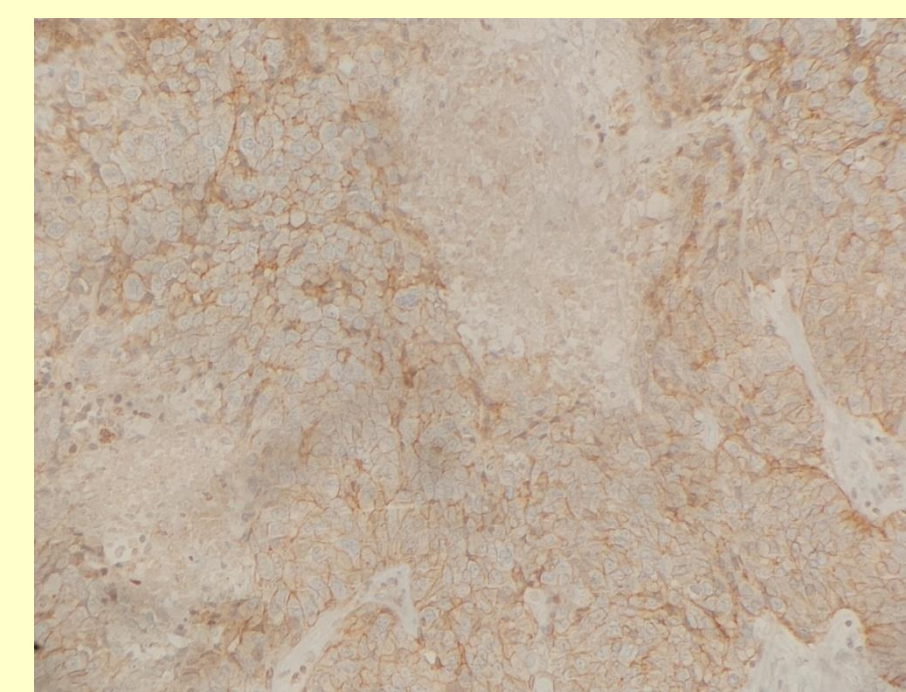
Στην μελέτη μας ο μέσος όρος ηλικίας εμφάνισης της νόσου ήταν τα 59 έτη. Με θετική έκφραση των οιστρογονικών υποδοχέων (ER) βρέθηκαν τα 25 περιστατικά. Με θετική έκφραση των προγεστερονικών υποδοχέων (PR) βρέθηκαν τα 26 περιστατικά.

Τα 21 περιστατικά είχαν δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Ki67) μεγαλύτερο από 20%. Τα 8 περιστατικά είχαν ποσοστό έκφρασης του Ki67, ανάμεσα στο 10 – 19%, ενώ μόλις ένα περιστατικό είχε 1 – 9%.

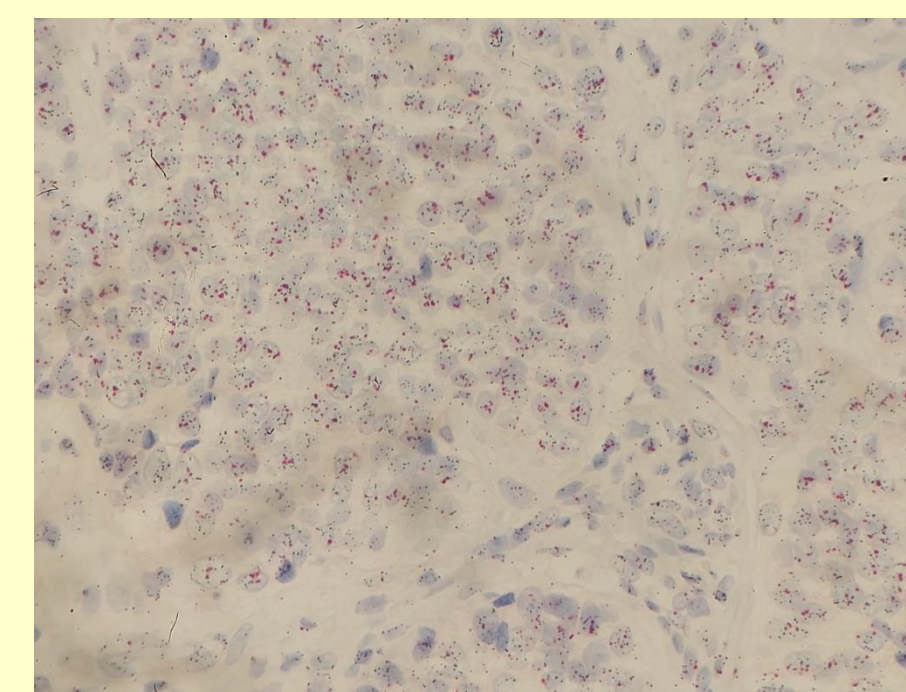
Σε κάθε SISH που πραγματοποιήθηκε, μετρήθηκε: α) ο αριθμός κεντρομεριδίων, β) ο αριθμός σημάτων του ενισχυμένου ογκογονιδίου αλλά και γ) ο αριθμός σημάτων ανά καρκινικό κύτταρο. Στα θετικά SISH ο αριθμός κεντρομεριδίων είχε μέσο όρο τα 44, ο αριθμός σημάτων τα 130 και ο αριθμός σημάτων ανά καρκινικό κύτταρο τα 8. Ο αριθμός σημάτων ανά καρκινικό κύτταρο προς τον αριθμό κεντρομεριδίων θα πρέπει να βγαίνει μεγαλύτερος από 2,1 ούτως ώστε το αποτέλεσμα της τεχνικής SISH να θεωρηθεί θετικό.



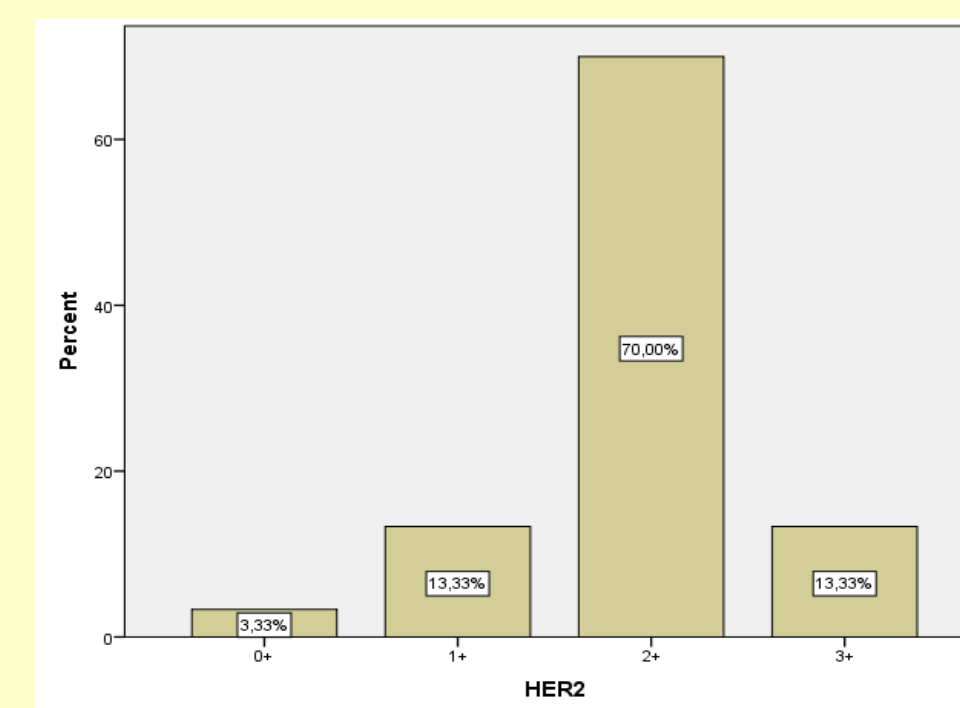
Εικόνα 1. Πορογενές αδενοκαρκίνωμα μαστού μη ειδικού τύπου.



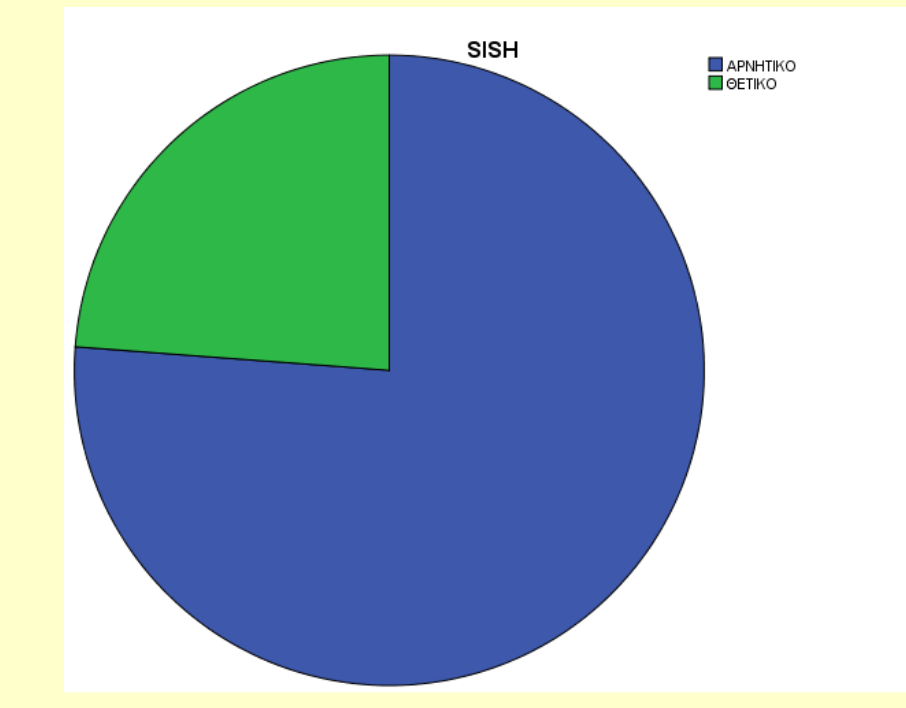
Εικόνα 2. Ανοσοϊστοχημική έκφραση ογκογονιδίου HER2 (2+).



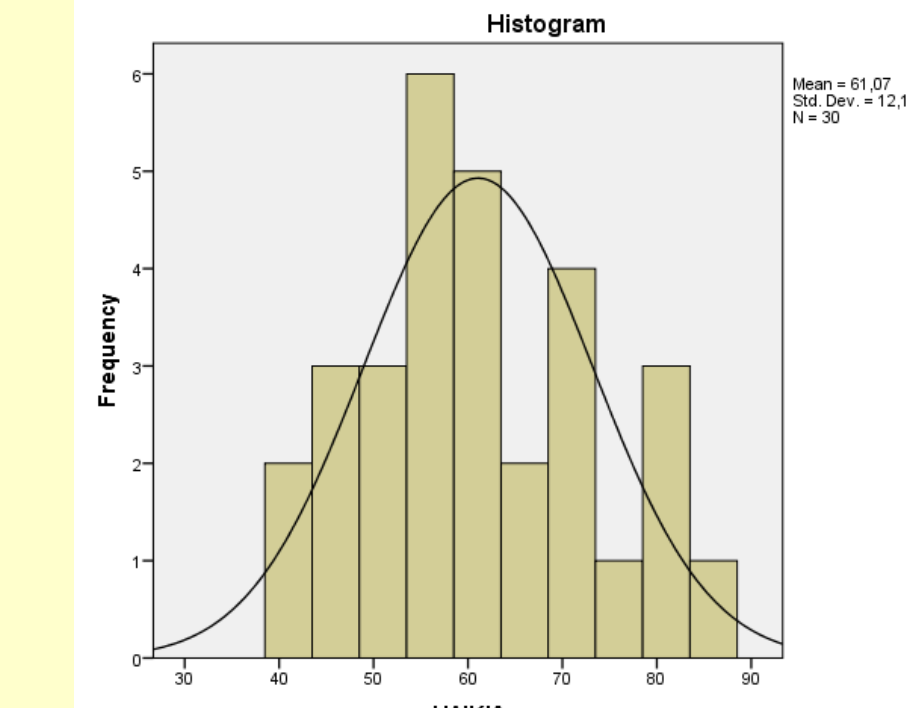
Εικόνα 3. Θετική έκφραση ογκογονιδίου HER2 με την τεχνική SISH.



Διάγραμμα 1. Ανοσοϊστοχημική έκφραση Ογκογονιδίου HER2.



Διάγραμμα 2. Έκφραση ογκογονιδίου HER2 με SISH.



Διάγραμμα 3. Μέσος όρος ηλικίας.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ενίσχυση του πρωτό – ογκογονιδίου HER2 και η πρωτεϊνική υπερέκφραση του παρατηρείται στο 20-40% των ασθενών με καρκίνο του μαστού, παίζει καθοριστικό ρόλο στη βιολογική συμπεριφορά. Ως εκ τούτου, είναι εξαιρετικά σημαντικό να καθοριστεί η ακριβής κατάσταση του ογκογονιδίου HER2, διότι από την έκβαση της θα κριθεί αν ο ασθενής θα λάβει ειδική, στοχευμένη θεραπεία. Τα πλεονεκτήματα του SISH περιλαμβάνουν υψηλή ευαισθησία, για την ανίχνευση των αντιγράφων ενός γονιδίου, την ποσοτικοποίηση των στόχων του DNA με την υψηλή ανάλυση και την αντίθεση της βαφής, με υψηλή αντίθεση οπτικοποίησης του σήματος ξεχωριστά και τον προσδιορισμό της μορφολογίας του θέματος. Επιπλέον, η μικροσκοπήση γίνεται σε φωτονικό μικροσκόπιο και μπορούν να αποθηκευτούν.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο καθορισμός της έκφρασης της πρωτεΐνης του ογκογονιδίου HER2 είναι σημαντικός διότι, αυτός καθορίζει την έκβαση της νόσου και προσδιορίζει τη λήψη στοχευμένης θεραπείας. Η μελέτη μας διαπίστωσε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των διφορούμενων περιστατικών, κρίθηκε τελικά αρνητικό.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] American Cancer Society, 2015; Ferlayetal., 2015.
- [2] Duffy MJ: Predictive markers in breast and other cancers: a review. ClinChem 51:494-503, 2005.
- [3] Ji Y, Sheng L, Du X, Qiu G, Chen B, Wang X. Clinicopathological variables predicting HER-2 gene status in immunohistochemistry - equivocal (2+) invasive breast cancer. J Thorac Dis 2014; 6:896-904.