مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و سوم/شماره ۳۶۶/هفته دوم اسفند ماه ۱۳۹٤

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۸/۹
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۱/۱۹

بررسی نتایج به دست آمده با تکنیک Immunohistochemistry (IHC) در ارزیابی افزایش بیان HER2 در بافت کارسینومای مهاجم مجرایی پستان با روش Fluorescence in situ hybridization (FISH)

دکتر آذر برادران[۱]، پروانه حاج علیخانی[۲]، محمد کاظم غیبی[۳]، دکتر محمدرضا مهاجری[۴]، علی مهرابی کوشکی[۵]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: کارسینومای پستان، شایع‌ترین سرطان در میان زنان است. ژن HER2 (Human epidermal growth factor receptor-۲) یک پروتو انکوژن است که گیرنده‌ی تیروزین کیناز خانواده‌ی Epidermal growth factor receptor را کد می‌کند و افزایش بیان آن، در برخی موارد کارسینومای پستان دیده می‌شود. مطالعه‌ی حاضر، با هدف ارزیابی تکنیک Immunohistochemistry (IHC) در شناسایی موارد مثبت پروتئین HER2 به روش Fluorescence in situ hybridization (FISH) و بررسی ارتباط متغیرهای آسیب‌شناختی بالینی با بیان ژن HER2 انجام شد.

روش‌ها: طی یک مطالعه‌ی مقطعی در سال ۱۳۹۳، ۱۹۰ نمونه از بیماران مبتلا به کارسینومای مهاجم مجرایی که نتایج IHC آن‌ها از نظر HER2 به صورت ++ یا +++ گزارش شده بود، جمع‌آوری و به روش FISH، میزان بیان HER2 بررسی شد. همچنین، ارتباط بین عوامل آسیب‌شناختی بالینی شامل سن، درجه‌ی تومور و وضعیت هورمون گیرنده با بیان ژن HER2 ارزیابی شد. داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS تجزیه و تحلیل گردید.

یافته‌ها: از ۱۹۰ نمونه‌ی مربوط به کارسینومای مهاجم پستان، از نظر HER2 در روش IHC، ۱۶۰ نمونه ++ و ۳۰ نمونه +++ بود. گیرنده‌ی استروژن (ER یا Estrogen receptor) در ۶۴/۲ درصد بیماران و گیرنده‌ی پروژسترون (PR یا Progesterone receptor) در ۷۴/۲ درصد آنان بیان شده بود. بلوک‌های مثبت روش FISH، از نظر HER2 در روش IHC، در ۲۷/۵ درصد ++ و ۸۳/۳ درصد +++ بود. موارد منفی گیرنده‌ی استروژن در بیماران HER2 مثبت، به طور معنی‌داری بیشتر بود (P < ۰/۰۰۱). بیماران HER2 مثبت از نظر گیرنده‌ی پروژسترون نیز بیشتر منفی بودند (P = ۰/۰۱۳).

نتیجه‌گیری: در این مطالعه نشان داده شد که روش IHC به تنهایی روش مناسبی برای ارزیابی بیان HER2 و تصمیم‌گیری جهت درمان با Trastuzumab حتی در موارد IHC برابر +++ نیست.

واژگان کلیدی: کارسینومای مهاجم پستان، Immunohistochemistry، ژن HER2، Fluorescence in-situ hybridization

ارجاع: برادران آذر، حاج علیخانی پروانه، غیبی محمد کاظم، مهاجری محمدرضا، مهرابی کوشکی علی. **بررسی نتایج به دست آمده با تکنیک Immunohistochemistry (IHC) در ارزیابی افزایش بیان HER2 در بافت کارسینومای مهاجم مجرایی پستان با روش Fluorescence in situ hybridization (FISH).** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۶۶): ۲۳۲۶-۲۳۲۱

مقدمه

سرطان پستان، از شایع‌ترین سرطان‌های غیر پوستی در میان زنان است. عوامل تعیین کننده‌ی پیش‌آگهی متنوع هستند و اندازه‌ی تومور، متاستاز به گره‌های لنفاوی، متاستاز دوردست، تهاجم موضعی، کارسینومای التهابی، زیر گروه‌های هیستولوژیک، درجه هیستوپاتولوژیک، وضعیت گیرنده‌های استروژن و پروژسترون و وضعیت ژن Human epidermal growth factor receptor-۲ (HER2) از مهم‌ترین آن‌ها می‌باشند (۱).

۸۰ درصد کارسینوماهایی که هر دو گیرنده‌ی استروژن و پروژسترون آن‌ها مثبت است، به درمان هورمونی پاسخ می‌دهند؛ در

۱- استاد، گروه پاتولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- دانشجوی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- دانشجوی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران
۴- متخصص پاتولوژی، اصفهان، ایران
۵- کارشناس ارشد، گروه اپیدمیولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: علی مهرابی کوشکی
Email: mehrabi@mui.ac.ir

حالی که فقط ۴۰ درصد مواردی که دارای یکی از این دو گیرنده هستند، به درمان پاسخ می‌دهند. پاسخ به درمان هورمونی، در سرطان های فاقد گیرنده‌های استروژن و پروژسترون، کمتر از ۱۰ درصد است، اما پاسخ آن‌ها به شیمی‌درمانی مطلوب می‌باشد (۱).

کارسینومای پستان بر اساس وضعیت مولکولی به پنج زیر گروه لومینال A، لومینال B، دارای HER2، Basal-like و Normal breast-like تقسیم می‌شود (۲).

کارسینومای پستان با بیان HER2 بین ۲۰-۱۵ درصد کل موارد را شامل می‌شود (۶-۳). ژن HER2 از خانواده‌ی Epidermal growth factor receptor (EGFR) است و روی کروموزوم 17q21 قرار دارد. این ژن، باعث فعال شدن پیام‌های داخل سلولی برای رشد و تکثیر سلول می‌شود (۷). بیان بیش از حد ژن HER2، اغلب با پیش‌آگهی ضعیف‌تر در بیماران مبتلا به سرطان پستان همراه است و منجر به مقاومت در برابر برخی موارد شیمی‌درمانی می‌شود (۱۵-۷).

سه داروی trastuzumab، HER2 Lapatinib و Pertuzumab در دهه‌های اخیر در درمان موارد HER2 مثبت در سرطان‌های متاستاتیک پستان به کار رفته‌اند (۱۱). تعیین وضعیت HER2 برای تصمیم‌گیری صحیح درمانی ضروری در بیمار است.

Fluorescence in-situ hybridization (FISH) و نیز Immunohistochemistry (IHC)، دو روش مرسوم جهت تعیین وضعیت HER2 هستند (۱۲-۱۱). نتایج روش IHC به چهار گروه تقسیم می‌شود که شامل درجات ۰، +، ++ و +++ است. این درجات، بر حسب درصد سلول‌های توموری مثبت، کامل یا ناکامل رنگ گرفتن غشای سلول‌های تومورال و شدت رنگ پذیری سلول‌ها داده می‌شود. نتایج به صورت مثبت، منفی و نامعلوم یا غیر قابل تفسیر گزارش می‌گردد.

روش FISH، روشی معتبر جهت بررسی وضعیت HER2 است و نتایج آن به دو دسته‌ی مثبت و منفی تقسیم می‌شود (۱۲، ۳).

مطابق با توصیه‌ی سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA یا Food and Drug Administration) و انجمن کلینیکال انکولوژی امریکا/کالج پاتولوژیست‌های امریکا (American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists یا ASCO/CAP) نتایج ۰ و + در IHC به عنوان HER2 منفی، موارد با درجه‌ی +++، مثبت و موارد با درجه‌ی ++، مشکوک در نظر گرفته می‌شود و باید دوباره با روش FISH ارزیابی شوند (۱۱).

مطالعه‌ی حاضر با هدف ارزیابی روش IHC در شناسایی موارد مثبت پروتئین HER2 به روش FISH و بررسی ارتباط متغیرهای آسیب‌شناختی بالینی با بیان ژن HER2 انجام شد.

روش‌ها

این مطالعه‌ی توصیفی- تحلیلی در سال ۱۳۹۳ در مرکز آموزشی- درمانی الزهرای (س) اصفهان انجام شد. جامعه‌ی آماری مورد مطالعه، بلوک‌های پارافینی نمونه‌های کارسینومای مهاجم مجرایی پستان بود که در سال‌های ۹۳-۱۳۹۱ در بخش پاتولوژی مرکز آموزشی- درمانی الزهرای (س) اصفهان بایگانی شده بود.

نمونه‌های بلوک پارافینی کارسینومای مهاجم پستان موجود در واحد پاتولوژی بیمارستان الزهرا (س) که دارای قسمت مهاجم (Invasive) کافی جهت بررسی بود و نیز نتایج آزمون FISH آن در دسترس قرار داشت، به مطالعه وارد شد. نمونه هایی که در تثبیت کننده‌ای غیر از فرمالین بافریزه تثبیت شده بودند، نمونه‌هایی که مدت زمان تثبیت آن‌ها کمتر از ۶ و بیش از ۷۲ ساعت بود، بیوپسی‌های سوزنی که دچار Edge artifact در سراسر بافت یا Crush artifact شده بود و نمونه‌های با رنگ‌پذیری قوی HER2 در سلول‌های پوششی داکت‌ها و لوبول‌های طبیعی در رنگ‌آمیزی IHC، از مطالعه خارج شد.

نمونه‌گیری در این مطالعه، به شیوه‌ی سرشماری بود و طی آن، کلیه‌ی نمونه‌های دارای معیارهای ورود از ابتدای سال ۱۳۹۱ تا پایان شهریور ماه ۱۳۹۳ مورد مطالعه قرار گرفت.

روش کار بدین صورت بود که پس از تصویب طرح، با مراجعه‌ی پژوهشگر به بایگانی واحد پاتولوژی بیمارستان و بررسی نمونه‌های پاتولوژی کارسینومای مهاجم مجرایی پستان، اطلاعات هر نمونه شامل سن، وضعیت مثبت یا منفی بودن گیرنده‌ی استروژن و پروژسترون و درجه‌ی تومور از میان نمونه‌های درجه‌ی ++ و +++، بیان ژن HER2 در روش IHC ثبت شد و سپس، نمونه‌ها از نظر وضعیت FISH مورد بررسی قرار گرفتند.

روش FISH روی همه‌ی نمونه‌های ++ و +++ انجام شد. بلوک‌های پارافینی انتخاب شده، شامل بافت کارسینومای مهاجم مجرایی بود که با روش FISH دو رنگی آنالیز شد. یک DNA probe به رنگ نارنجی با توالی ۲۱۸ kb شامل ژن HER2 و DNA probe دیگر به رنگ سبز شامل سانترومر کروموزوم ۱۷ بود.

کیت مورد استفاده جهت رنگ‌آمیزی، PathVysion HER2 DNA Probe kit (Abbott Molecular، آمریکا) بود که مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده، مورد استفاده قرار گرفت. نمونه‌ها پس از انجام تکنیک، با میکروسکوپ فلورسنت ارزیابی شد. سیگنال‌های سبز و نارنجی در هسته‌ی حدود ۸۰ سلول در دو محل ارزیابی گردید و میزان سیگنال ژن HER2 و سیگنال سانترومر کروموزوم ۱۷ ثبت شد. در صورتی که نسبت HER2/CEP17 بیشتر یا مساوی ۲ بود، مطابق توصیه‌ی FDA، نمونه از نظر بیان ژن HER2 مثبت تلقی می‌شد.

داده‌های مطالعه بعد از جمع‌آوری، در نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۲ (version 22, SPSS Inc., Chicago, IL) ثبت و با استفاده از آزمون‌های آماری χ^2 و t تجزیه و تحلیل شد.

یافته‌ها

در این مطالعه، ۱۹۰ نمونه‌ی بلوک پارافینی بافتی از بیماران مبتلا به کارسینومای مهاجم مجرایی پستان که نتیجه‌ی IHC آن‌ها ++ و +++ بود، جمع‌آوری شدند که از این تعداد، ۱۶۰ نمونه (۴۸/۲ درصد) ++ و ۳۰ نمونه (۱۵/۸ درصد) +++ بودند. میانگین سنی بیماران مورد مطالعه، ۴۳/۶۳ با دامنه‌ی ۲۷/۷۷ سال بود. از نظر درجه‌ی تومور، ۹۰ بیمار (۴۳/۳ درصد) در درجات ۱ و ۲ و ۴۵ بیمار (۲۵/۲ درصد) در درجه‌ی ۳ بودند و درجه‌ی ۵۵ نمونه مشخص نشده بود.

گیرنده‌ی استروژن در ۱۲۲ نمونه (۶۴/۲ درصد) و گیرنده‌ی پروژسترون در ۱۴۱ بیمار (۷۴/۲ درصد) بیان شده بود. تهاجم لنفوواسکولار در ۸۷ بیمار (۴۵/۷ درصد) دیده شد.

بیان ژن HER2 با روش FISH مطابق با معیارهای FDA در ۴۴ بیمار از ۱۶۰ نمونه (۲۷/۵ درصد) با IHC برابر ++ و ۲۵ نمونه از ۳۰ نمونه‌ی (۸۳/۳ درصد) با IHC برابر +++ دیده شد و به طور کلی، ۶۹ بیمار (۳۶/۳ درصد) از نظر ژن HER2 با روش FISH مثبت بودند.

میانگین سن بیماران HER2 مثبت و منفی، به ترتیب برابر ۱۰/۸ ± ۴۸/۸ و ۱۱/۱ ± ۴۸/۵ سال بود و طبق آزمون t، اختلاف معنی‌داری بین دو گروه وجود نداشت (P = ۰/۸۵۰). در جدول ۱ بیان ژن HER2 بر اساس خصوصیات بیماران آمده است. بر حسب آزمون χ^2، بیان ژن HER2 بر حسب تهاجم لنفی عروقی، وجود گیرنده‌های استروژن و پروژسترون و وضعیت HER2 در IHC اختلاف معنی‌دار داشت، اما بیان این ژن بر حسب محل تومور و درجه‌ی تومور، اختلاف معنی‌داری نشان نداد؛ به طوری که بیمارانی که تزاید ژن را در روش FISH نشان داده بودند، درجه‌ی بالاتری نسبت به موارد منفی در روش FISH نداشتند (P = ۰/۳۷۱).

بحث

در حال حاضر، افزایش بیان ژن HER2 به عنوان عاملی مؤثر در پیش‌آگهی و نحوه‌ی درمان بیماران با کارسینومای مهاجم مجرایی پستان شناخته شده است (۱۷-۱۶). داروی Trastuzumab به عنوان درمان ادجوانت یا نئوادجوانت در شیمی‌درمانی بیماران مبتلا به کارسینومای مهاجم مجرایی پستان استفاده می شود و تأثیر به سزایی در بهبود و پیش آگهی بیماران دارد. این دارو، اثری بر درمان بیمارانی که از نظر HER2 منفی هستند، ندارد و تنها عوارض کاردیوتوکسیک و هزینه‌ی چشم‌گیر را به آن‌ها تحمیل می‌کند (۱۸-۱۱). با توجه به هزینه‌ی زیاد و عوارض این درمان، نیاز به روشی دقیق، حساس و به صرفه از نظر اقتصادی جهت تعیین وضعیت بیان ژن HER2 وجود دارد (۲۰-۱۹).

جدول ۱. توزیع فراوانی بیان ژن HER2 بر حسب مشخصات تومور

متغیر	بیان HER2 در روش FISH	مثبت	منفی	مقدار P
محل	چپ	۳۸ (۵۵/۱)	۵۲ (۴۳/۰)	۰/۱۱۰
	راست	۳۱ (۴۴/۹)	۶۹ (۵۷/۰)	
درجه	۱ و ۲	۲۹ (۴۲/۰)	۶۱ (۵۰/۴)	۰/۳۷۱
	۳	۱۸ (۲۶/۱)	۲۷ (۲۲/۳)	
	نامشخص	۲۲ (۳۱/۹)	۳۳ (۲۷/۳)	
تهاجم لنفی عروقی	دارد	۳۵ (۵۰/۷)	۵۲ (۴۳/۰)	< ۰/۰۰۱
	ندارد	۳۴ (۴۹/۳)	۶۲ (۵۱/۲)	
گیرنده‌ی استروژن	مثبت	۳۳ (۴۷/۸)	۸۹ (۷۳/۶)	< ۰/۰۰۱
	منفی	۳۶ (۵۲/۲)	۳۲ (۲۶/۴)	
گیرنده‌ی پروژسترون	مثبت	۴۲ (۶۰/۹)	۹۹ (۸۱/۸)	۰/۰۱۳
	منفی	۲۷ (۳۹/۱)	۲۲ (۱۸/۲)	
IHC	+++	۴۴ (۶۳/۸)	۱۱۶ (۹۵/۹)	< ۰/۰۰۱
	+++	۲۵ (۳۶/۲)	۵ (۴/۱)	

FISH: Fluorescence in situ hybridization; IHC: Immunohistocehmistry

روش استاندارد طلایی برای ارزیابی ژن HER2 در میان پاتولوژیست‌ها، مورد تردید است؛ چرا که هر روش فواید و مشکلات خاص خود را دارد. برخی از مطالعات، روش IHC را به عنوان اولین قدم برای غربال‌گری بیان ژن HER2 توصیه کرده‌اند (۲۱، ۱۶). رنگ‌آمیزی IHC برای ارزیابی ژن HER2 راحت و به نسبت ارزان است. با این حال، وجود برخی تفاوت‌ها در روش انجام این رنگ‌آمیزی، حساسیت و ویژگی آن را تحت تأثیر قرار می‌دهد. عواملی مانند نحوه‌ی تثبیت بافت و روش نمره‌دهی و آنتی‌بادی انتخابی، ممکن است بر حساسیت آزمایش تأثیر بگذارد. به علاوه، در مواردی که نتیجه ی IHC رنگ پذیری مثبت ضعیف است، انجام روش FISH جهت تأیید بیان ژن HER2 ضروری می‌باشد (۱۱). در برخی مطالعات، نتیجه‌ی IHC 2+ در بررسی HER2 در تطابق با FISH همخوانی ۹۲/۶-۶/۷ درصد داشته است (۲۴-۱۲).

در مطالعه‌ی پژومند و همکاران بر روی جمعیتی از بیماران ایرانی، تنها ۳۶ درصد نمونه‌های با HER2 برابر ++ در IHC در روش FISH مثبت بودند (۲۰). در مطالعه‌ی Lee و همکاران، ۱۷۳۵ مورد سرطان پستان تحت بررسی قرار گرفت که بیان ژن HER2 در ۱۴ درصد آن‌ها دیده شد (۲۵). در تعدادی مطالعات دیگر، بیان ژن HER2 در حدود ۳۵-۳۰ درصد موارد با HER2 برابر ++ در IHC گزارش شده است (۲۷-۲۶).

بنا بر برخی مطالعات، کارسینومای مهاجم پستان با IHC برابر +++ از نظر HER2 با درجه‌ی بالاتر تومور و عدم بیان گیرنده‌های استروژن و پروژسترون، آنوپلوئیدی DNA و Ki-67 بالاتر همراه است (۲۹-۲۸). در مطالعه‌ی Ji و همکاران با بررسی ارتباط میان عوامل خطر مختلف و بیان ژن HER2 در سرطان پستان، موارد مثبت (PR) Progesterone receptor و (ER) Estrogen receptor بیشتر با HER2 منفی همراه بودند و پیش‌آگهی بهتری داشتند (۱۱).

در مطالعه‌ی ما، عوامل بالینی و آسیب شناختی در ۱۹۰ بیمار مبتلا به کارسینومای مجرایی مهاجم با IHC برابر ++ و +++ بررسی شد تا عوامل خطر بیان ژن HER2 بهتر مشخص شود. در تحقیق حاضر، تنها ۲۷/۵ درصد موارد با IHC مساوی ++، ژن HER2 را بیان کردند که در مقایسه با سایر مطالعات، درصد کمتری بود. مشابه سایر مطالعات، ارتباط معکوس بین بیان گیرنده های هورمونی و بیان HER2 وجود داشت، اما درجه‌ی تومور و محل تومور ارتباطی با بیان HER2 نداشت.

در انجام این مطالعه، محدودیت هایی وجود داشت؛ مانند این که پروتئین‌های Ki-67 و P53 در این مطالعه بررسی نشدند؛ در حالی که در برخی مطالعات مشاهده شده است که P53 مثبت و درصد بالاتر Ki-67، با خطر بیشتر بیان ژن HER2 همراه می‌باشند. از طرفی، تعداد نمونه‌های IHC برابر +++ نسبت به موارد ++ کمتر بود. در یک متاآنالیز، بیان شده است که موارد HER2 که در روش IHC برابر ۰ و + است، نباید به طور کامل از نظر HER2 منفی تلقی شود و موارد +++ نیز نباید به طور کامل از نظر HER2 مثبت تلقی گردد (۳۰). در مطالعه‌ی حاضر نیز ۱۶/۷ درصد از بیماران با IHC برابر +++ از نظر HER2 در بررسی به روش FISH منفی بودند.

نتیجه‌گیری نهایی این که برای ارزیابی ژن HER2 در بیماران مبتلا به کارسینومای مهاجم مجرایی، روش IHC حتی در موارد +++، روش مناسبی نیست و روش دیگری برای ارزیابی HER2 مورد نیاز است. از این رو، تحقیقات در گروه‌های بزرگ‌تر و بررسی عوامل خطر بیشتر در جمعیت های مورد مطالعه توصیه می‌شود.

References

1. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster J. Robbins and Cotran pathologic basis of disease. 8th ed. Philadelphia, PA: Saunders; 2010. p. 1089-90.
2. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. Nature 2000; 406(6797): 747-52.
3. Mohammadi Torbati P, Fard Esfehani P. Androgen Receptor Analysis in Relation to Estrogen and Progesterone Receptors as well as Histological Grade for Ductal Carcinoma In Situ of the Breast. Iran J Pathol 2006; 1(4): 149-54.
4. Lopez-Guerrero JA, Lombart-Cussac A, Noguera R, Navarro S, Pellin A, Almenar S, et al. HER2 amplification in recurrent breast cancer following breast-conserving therapy correlates with distant metastasis and poor survival. Int J Cancer 2006; 118(7): 1743-9.
5. Moelans CB, de Weger RA, Van der Wall E, van Diest PJ. Current technologies for HER2 testing in breast cancer. Crit Rev Oncol Hematol 2011; 80(3): 380-92.
6. Owens MA, Horten BC, Da Silva MM. HER2 amplification ratios by fluorescence in situ hybridization and correlation with immunohistochemistry in a cohort of 6556 breast cancer tissues. Clin Breast Cancer 2004; 5(1): 63-9.
7. Ithimakin S, Day KC, Malik F, Zen Q, Dawsey SJ, Bersano-Begey TF, et al. HER2 drives luminal breast cancer stem cells in the absence of HER2 amplification: implications for efficacy of adjuvant trastuzumab. Cancer Res 2013; 73(5): 1635-46.
8. Ravdin PM, Chamness GC. The c-erbB-2 proto-oncogene as a prognostic and predictive marker in breast cancer: a paradigm for the development of other macromolecular markers--a review. Gene 1995; 159(1): 19-27.
9. Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L, et al. Efficacy and safety

of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. J Clin Oncol 2002; 20(3): 719-26.
10. Reis-Filho JS, Pusztai L. Gene expression profiling in breast cancer: classification, prognostication, and prediction. Lancet 2011; 378(9805): 1812-23.
11. 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(7): 896-904.
12. Mutlu H, Karaca H, Akca Z, Torun YA. Should fish test be performed to all patients with breast cancer? Med Sci (Turkey) 2013; 2(2): 539-47.
13. Reddy JC, Reimann JD, Anderson SM, Klein PM. Concordance between central and local laboratory HER2 testing from a community-based clinical study. Clin Breast Cancer 2006; 7(2): 153-7.
14. Saez A, Andreu FJ, Segui MA, Bare ML, Fernandez S, Dinares C, et al. HER-2 gene amplification by chromogenic in situ hybridisation (CISH) compared with fluorescence in situ hybridisation (FISH) in breast cancer-A study of two hundred cases. Breast 2006; 15(4): 519-27.
15. Cuadros M, Villegas R. Systematic review of HER2 breast cancer testing. Appl Immunohistochem Mol Morphol 2009; 17(1): 1-7.
16. Yoon N, Do IG, Cho EY. Analysis of HER2 status in breast carcinoma by fully automated HER2 fluorescence in situ hybridization (FISH): comparison of two immunohistochemical tests and manual FISH. APMIS 2014; 122(9): 755-60.
17. Rosa FE, Silveira SM, Silveira CG, Bergamo NA, Neto FA, Domingues MA, et al. Quantitative real-time RT-PCR and chromogenic in situ hybridization: precise methods to detect HER-2 status in breast carcinoma. BMC Cancer 2009; 9: 90.
18. Blackwell KL, Burstein HJ, Storniolo AM, Rugo H, Sledge G, Koehler M, et al. Randomized study of Lapatinib alone or in combination with trastuzumab in women with ErbB2-positive, trastuzumab-refractory metastatic breast cancer. J Clin Oncol 2010; 28(7): 1124-30.
19. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. Arch Pathol Lab Med 2007; 131(1): 18-43.
20. Pazhoomand R, Keyhani E, Banan M, Najmabadi H, Khodadadi F, Iraniparast A, et al. Detection of HER2 status in breast cancer: comparison of current methods with MLPA and real-time RT-PCR. Asian Pac J Cancer Prev 2013; 14(12): 7621-8.
21. Dietel M, Ellis IO, Hofler H, Kreipe H, Moch H, Dankof A, et al. Comparison of automated silver enhanced in situ hybridisation (SISH) and fluorescence ISH (FISH) for the validation of HER2 gene status in breast carcinoma according to the guidelines of the American Society of Clinical Oncology and the College of American Pathologists. Virchows Arch 2007; 451(1): 19-25.
22. Vanden B, I, Vanhentenrijk V, Drijkoningen M, Wlodarska I, Vandenberghe P, De Wolf-Peeters C. Real-time reverse transcription-PCR and fluorescence in-situ hybridization are complementary to understand the mechanisms involved in HER-2/neu overexpression in human breast carcinomas. Histopathology 2005; 46(4): 431-41.
23. Press MF, Sauter G, Bernstein L, Villalobos IE, Mirlacher M, Zhou JY, et al. Diagnostic evaluation of HER-2 as a molecular target: an assessment of accuracy and reproducibility of laboratory testing in large, prospective, randomized clinical trials. Clin Cancer Res 2005; 11(18): 6598-607.
24. Carlsson J, Nordgren H, Sjostrom J, Wester K, Villman K, Bengtsson NO, et al. HER2 expression in breast cancer primary tumours and corresponding metastases. Original data and literature review. Br J Cancer 2004; 90(12): 2344-8.
25. Lee AH, Key HP, Bell JA, Hodi Z, Ellis IO. Breast carcinomas with borderline (2+) HER2 immunohistochemistry: percentage of cells with complete membrane staining for HER2 and the frequency of HER2 amplification. J Clin Pathol 2011; 64(6): 490-2.
26. Chibon F, de M, I, Sierankowski G, Brouste V, Bonnefoi H, Debled M, et al. Prediction of HER2 gene status in Her2 2+ invasive breast cancer: a study of 108 cases comparing ASCO/CAP and FDA recommendations. Mod Pathol 2009; 22(3): 403-9.
27. Dieci MV, Barbieri E, Bettelli S, Piacentini F, Omarini C, Ficarra G, et al. Predictors of human epidermal growth factor receptor 2 fluorescence in-situ hybridisation amplification in immunohistochemistry score 2+ infiltrating breast cancer: a single institution analysis. J Clin Pathol 2012; 65(6): 503-6.
28. Liu C, Zhang H, Shuang C, Lu Y, Jin F, Xu H, et al. Alterations of ER, PR, HER-2/neu, and P53 protein expression in ductal breast carcinomas and clinical implications. Med Oncol 2010; 27(3): 747-52.
29. Hanley K, Wang J, Bourne P, Yang Q, Gao AC, Lyman G, et al. Lack of expression of androgen receptor may play a critical role in transformation from in situ to invasive basal subtype of high-grade ductal carcinoma of the breast. Hum Pathol 2008; 39(3): 386-92.
30. Bahreini F, Soltanian AR, Mehdipour P. A meta-analysis on concordance between immunohistochemistry (IHC) and fluorescence in situ hybridization (FISH) to detect HER2 gene overexpression in breast cancer. Breast Cancer 2015; 22(6): 615-25.

Journal of Isfahan Medical School

Vol. 33, No. 366, 2nd Week, March 2016

Received: 10.11.2015

Accepted: 08.02.2016

Evaluation of Immunohistochemistry Technique in Detecting HER2 Overexpression in Invasive Ductal Breast Carcinoma Using Fluorescence in-situ Hybridization Method

Azar Baradaran MD[1], Parvaneh Hajalikhani[2], Mohammad Kazem Gheybi[3], Mohammad Reza Mohajeri MD[4], Ali Mehrabi-Koushki MSc[5]

Original Article

Abstract

Background: Breast cancer is the most common cancer among women. HER2 gene is a proto-oncogene that encodes the receptor of tyrosine kinase from epidermal growth factor receptor (EFGR) family. It is an important prognostic factor with a determinant role in treatment of breast cancer. There is no globally accepted method for determining the status of this gene and the method of choice is still a matter of debate. We aimed to evaluate the validity of immunohistochemistry (IHC) method in predicting HER2 status using fluorescence in-situ hybridization (FISH) method and also, to investigate some clinicopathological variables associated with HER2 amplification.

Methods: In this cross-sectional study, 190 formalin-fixed and paraffin-embedded tissue specimens of invasive breast carcinoma with HER2 of ++ and +++ in IHC evaluation were enrolled. FISH method was performed on all these samples and the relationship of HER2 status and clinicopathological variables was evaluated.

Findings: The studied population included 160 specimens of ++ and 30 specimens of +++ HER2 in IHC evaluation. The estrogen and progesterone receptors (ER and PR) were expressed in 64.2% and 74.2% of the specimens, respectively. HER2 amplification on FISH method was found in 27.5% and 83.3% of specimens of ++ and +++ HER2 in IHC evaluation, respectively. Tumors with HER2 amplification were more likely to be negative for estrogen (52.2% vs. 26.4%, $P < 0.001$) and progesterone (39.1% vs. 18.2 %, $P = 0.013$) receptors.

Conclusion: This study showed that immunohistochemistry is not a good method for evaluating HER2 status and decision making about trastuzumab therapy even in patients with +++ HER2.

Keywords: Invasive breast carcinoma, Human epidermal growth factor receptor-2 (HER2), Immunohistochemistry (IHC), Fluorescent in situ hybridization (FISH)

Citation: Baradaran A, Hajalikhani P, Gheybi MK, Mohajeri MR, Mehrabi-Koushki A. **Evaluation of Immunohistochemistry Technique in Detecting HER2 Overexpression in Invasive Ductal Breast Carcinoma Using Fluorescence in-situ Hybridization Method.** J Isfahan Med Sch 2016; 33(366): 2321-6

1- Professor, Department of Pathology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Student of Medicine, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- Student of Medicine, School of Medicine, Boushehr University of Medical Sciences, Boushehr, Iran
4- Pathologist, Isfahan, Iran
5- Department of Epidemiology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Ali Mehrabi Koushki MSc, Email: mehrabi@mui.ac.ir