

Μελέτη κατάστασης γονίδιου *c-erbB-2* με χρωμογόνο *in situ* υβριδισμό (CISH) σε καρκινώματα μαστού: σύγκριση με την ανοσοϊστοχημική μέθοδο

Κουνέλη Σ, Καπράνος Ν, Μαλάμος Ν, Κόκκα Ε, Κουρή-Μπαϊρακτάρη Ε

Evaluation of c-erbB-2 gene in breast cancer by chromogenic in situ hybridization: comparison with immunohistochemistry

Kounelis S, Kapranos N, Malamos N, Kokka E, Kouri-Bairaktari E.

Dpt of Pathology, Elena Venizelou Hospital Dpt of Pathology, Division of Molecular Pathology, Amalia Fleming Hospital Athens, Greece

AIM. *c-erbB-2* is of great importance for the selection of patients with breast cancer who will receive therapy with Herceptin. The purpose of this study is to evaluate *c-erbB-2* gene status with the recently developed technique of chromogenic *in situ* hybridization (CISH) and to compare the results with those of immunohistochemistry.

MATERIAL AND METHODS. Thirty three cases of breast carcinoma from women 39-79 years of age, that underwent mastectomy at Helena Venizelou Hospital and had an immunohistochemical *c-erbB-2* protein score of 1+, 2+ 3+ (HerceptTest™). The evaluation of *c-erbB-2* gene status was made on paraffin section with the CISH technique and the application of a digoxigenin-labeled DNA probe. Cases with 1-5 gene copies per nucleus were defined as negative, 5-10 copies per nucleus as low level amplification (LL) and 10-20 copies per nucleus as high level amplification (HL).

RESULTS.

	IHC -		IHC +	
CISH	1+	2+	3+	
Non – Amplified	8	9	0	
Amplified LL	0	2	3	
Amplified HL	1	2	8	
Concordance	8/9 (89%)	4/13 (30%)	11/11 (100%)	

CONCLUSION. Our results show that the discordance rate was highest (70%) in the immunohistochemical 2+ group and smaller (11%) in the 1+ group. Since

recent studies indicate that c-erbB-2 status may provide more precise information in relation to Herceptin therapy response, the additional evaluation of c-erbB-2 gene status by CISH is considered necessary especially in the 2+ group.

Key words: Breast cancer, chromogenic in situ hybridization, CISH, c-erbB-2.

ΣΚΟΠΟΣ: Το c-erbB-2 έχει μεγάλη σημασία για την επιλογή των ασθενών με καρκίνωμα μαστού που θα υποβληθούν σε θεραπεία με Herceptin. Ο σκοπός της παρούσης μελέτης είναι ο προσδιορισμός της κατάστασης του γονιδίου c-erbB-2 με την πρόσφατα αναπτυχθείσα τεχνική του χρωμογόνου *in situ* υβριδισμού (CISH) και η σύγκριση των ευρημάτων με αυτά της ανοσοϊστοχημικής τεχνικής.

ΥΛΙΚΟ – ΜΕΘΟΔΟΙ: Τριάντα τρεις περιπτώσεις καρκινώματος μαστού, γυναικών 39-79 ετών που υποβλήθηκαν σε μαστεκτομή στο Νοσοκομείο Έλενα Βενιζέλου και είχαν βαθμό ανοσοϊστοχημικής έκφρασης πρωτεΐνης c-erbB-2 1+, 2+ και 3+(HercepTest™). Ο προσδιορισμός της κατάστασης του γονιδίου c-erbB-2 έγινε σε τομές παραφίνης με την τεχνική CISH και τη χρήση δείκτη DNA σημασμένου με διγοξυγενίνη. Οι περιπτώσεις με 1-5 αντίγραφα γονιδίου (ΑΓ)/πυρήνα θεωρήθηκαν αρνητικές, με 5-10 ΑΓ/πυρήνα σε > 50% των κυτάρων ως χαμηλού βαθμού (ΧΒ) ενίσχυση του γονιδίου και με 10-20 ΑΓ/πυρήνα ή/και παρουσία γονιδιακών συμπλεγμάτων σε >50% των κυτάρων ως υψηλού βαθμού (ΥΒ) ενίσχυση.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ:

CISH	Ανοσο-		Ανοσο +	
	1+	2+	2+	3+
Ενίσχυση -	8	9		0
Ενίσχυση ΧΒ	0	2		3
Ενίσχυση ΥΒ	1	2		8
Συμφωνία	8/9 (89%)	4/13 (30%)		11/11 (100%)

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ: Τα ευρήματα μας δείχνουν ότι ο βαθμός διαφωνίας ήταν μεγαλύτερος (70%) στην ανοσοϊστοχημική ομάδα 2+ και μικρότερος (11%) στην ομάδα 1+. Δεδομένου ότι οι πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι η κατάσταση του γονιδίου προσφέρει ακριβέστερες πληροφορίες για την ανταπόκριση των ασθενών στη θεραπεία με Herceptin, θεωρείται σκόπιμη η επιπρόσθετη ανάλυση του γονιδίου με CISH ιδιαίτερα στην ομάδα 2+.

Λέξεις κλειδιά: Καρκίνωμα μαστού, χρωμογόνος *in situ* υβριδισμός, CISH, c-erbB-2.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το ογκογονίδιο c-erbB-2 (ή HER-2/neu) εντοπίζεται στο χρωματόσωμα 17q21 και ανήκει στην οικογένεια του υποδοχέα του ανθρωπίνου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα¹. Η ομόλογη πρωτεΐνη, η οποία έχει μοριακό βάρος 185 kDa, εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη όπου επιτελεί λειτουργία κινάσης τυροσίνης και εμπλέκεται στη διαμεταγωγή σημάτων που σχετίζονται με την κυτταρική αύξη-

ση^{2,3}. Η ενίσχυση του γονιδίου και η συνοδός υπερέκφραση της πρωτεΐνης c-erbB-2 έχει βρεθεί στο 10-34% των καρκινωμάτων μαστού και θεωρείται σημαντικός βιολογικός δείκτης κακής πρόγνωσης αλλά και ανταπόκρισης στη χημειοθεραπεία^{2,4}. Τα τελευταία χρόνια η κλινική σημασία του c-erbB-2 έχει ιδιαίτερα αυξηθεί λόγω της θεραπευτικής χρήσης του αντικαρκινικού φαρμάκου trastuzumab (Herceptin, Roche Ltd, Ελβετία), το οποίο αποτελεί

ανασυνδυασμένο ανδρώπινο μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του εξωκυτταρίου τμήματος της ομόλογης πρωτεΐνης. Η θεραπευτική αποτελεσματικότητα του trastuzumab εξαρτάται αποκλειστικά από την ύπαρξη ενίσχυσης ή/και υπερέκφρασης του C-erbB-2 και επομένως η ανάλυση του γονιδίου αυτού αποτελεί ήδη ένα βασικό διαγνωστικό στοιχείο στις ασθενείς με καρκίνωμα μαστού⁵.

Οι πρώτες μελέτες του c-erbB-2 βασίσθηκαν σε τεχνικές Southern και Western blot για τη μελέτη της γονιδιακής ενίσχυσης και πρωτεϊνικής υπερέκφρασης αντίστοιχα. Οι τεχνικές αυτές όμως ήταν περίπλοκες για καθημερινή διαγνωστική πρακτική στο κλινικό εργαστήριο και για το λόγο αυτό αντικαταστάθηκαν από τον φθορίζοντα *in situ* υβριδισμό (FISH) και την ανοσοϊστοχημεία. Η ανοσοϊστοχημική μέθοδος έχει κατά κανόνα χρησιμοποιηθεί στο Παθολογοανατομικό εργαστήριο για την ανίχνευση υπερέκφρασης της πρωτεΐνης c-erbB-2 σε υλικό αρχείου καρκινώματος μαστού. Δεδομένου ότι η δυνατότητα ανοσοϊστοχημικής ανίχνευσης της πρωτεΐνης εξαρτάται από την ύπαρξη ενίσχυσης του γονιδίου, η τεχνική FISH που προσδιορίζει τον αριθμό αντιγράφων του γονιδίου στον πυρήνα των καρκινικών κυττάρων άρχισε να αντικαθιστά την ανοσοϊστοχημεία ως μέθοδο ανάλυσης⁴. Η τεχνική FISH όμως απαιτεί τη χρήση φθορίζοντος μικροσκοπίου με όλα τα συνυπάρχοντα μειονεκτήματα αξιολόγησης και διατήρησης του σήματος υβριδισμού. Για το λόγο αυτό αναπτύχθηκε πρόσφατα η τεχνική του χρωμογόνου *in situ* υβριδισμού (CISH) στην οποία ο δείκτης DNA (DNA probe) ανιχνεύεται με απλή ανοσοϊστοχημικού τύπου αντίδραση, η οποία αξιολογείται στο απλό οπτικό μικροσκόπιο⁶. Ο σκοπός της παρούσης εργασίας ήταν να εφαρμόσουμε την πρόσφατα αναπτυχθείσα τεχνική CISH για τον προσδιορισμό της κατάστασης του γονιδίου c-erbB-2 σε καρκινώματα μαστού και να συγκρίνουμε τα ευρήματα με αυτά της ανοσοϊστοχημικής τεχνικής.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

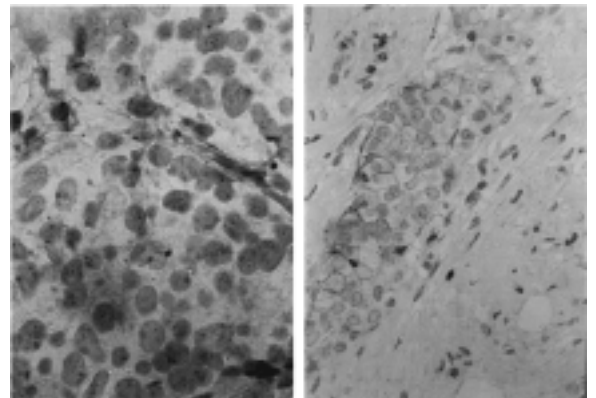
Το υλικό της μελέτης αποτέλεσαν 33 περιπτώσεις καρκινώματος μαστού, γυναικών ηλικίας 39-79 ετών που υποβλήθηκαν σε μαστεκτομή στο Νοσοκομείο Έλενα Βενιζέλου και είχαν βαθμό ανοσοϊστοχημικής έκφρασης πρω-

τεΐνης c-erbB-2 1+, 2+ και 3+. Από αυτά τα 28 ήταν πορογενούς και τα 5 λοβιακού τύπου. Ο ανοσοϊστοχημικός προσδιορισμός της πρωτεΐνης c-erbB-2 έγινε σε τομές παραφίνης με το μονοκλωνικό αντίσωμα CB-11 και με τη χρήση της τεχνικής αβιδίνης-βιοτίνης υπεροξειδάσης. Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της ανοσοϊστοχημικής μεθόδου έγινε με το σύστημα HercepTestTM όπου ανάλογα με το αποτέλεσμα της χρώσης οι περιπτώσεις υποδιαιρούνται σε 4 κατηγορίες. 0: πλήρης απουσία χρώσης ή μεμβρανική χρώση σε λιγότερο από 10% των κυττάρων, 1+: Ασθενής ή ασυνεχής χρώση >10% των κυττάρων, 2+: Ασθενής-μέτρια και συνεχή χρώση >10% των κυττάρων, 3+: Έντονη και συνεχή χρώση > 10% των κυττάρων. Οι κατηγορίες 0 και 1+ θεωρούνται ως αρνητικές και οι κατηγορίες 2+ και 3+ ως θετικές.

Τεχνική CISH

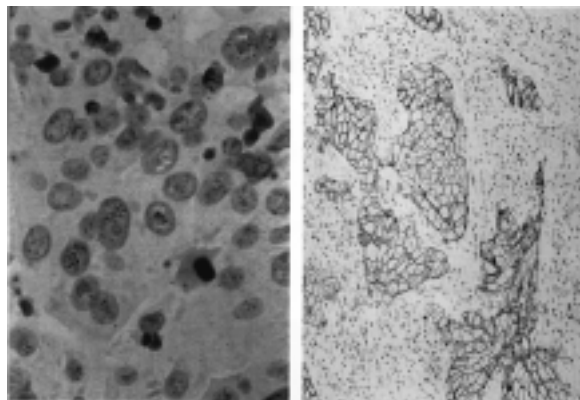
Η τεχνική χρωμογόνου *in situ* υβριδισμού (CISH) που εφαρμόσθηκε για την ανίχνευση της κατάστασης του γονιδίου c-erbB-2 είναι η ακόλουθη:

Τομές παραφίνης πάχους 5 μm μετά από αποπαραφίνωση σε ξυλόλη, τοποθετήθηκαν σε οινόπνευμα 100 (2X5 min) και ακολούθως επεξεργάσθηκαν σε φούρνο μικροκυμάτων θερμοκρασίας 96°-100° C για 10-15 min εντός διαλύματος Tris-EDTA pH7. Οι τομές επώασθηκαν με πεψίνη σε θερμοκρασία 37° C για 3-6 min και μετά από ξέπλυμα σε H₂O ακο-

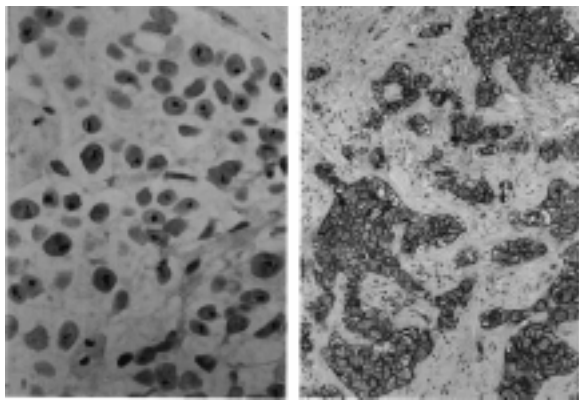


Εικόνα 1. C-erbB-2 σε καρκίνωμα μαστού. Με την τεχνική CISH (αριστερά) παρατηρούμε κυρίως δύο αντίγραφα του γονιδίου σε κάθε κύτταρο. Η ανοσοϊστοχημική χρώση (δεξιά) είναι ασθενής (2+).

λούθησε αφυδάτωση και στέγνωμα στον αέρα. Ακολούθησε ταυτόχρονη αποδιάταξη δείκτου DNA (probe) και κυτταρικού DNA σε θερμοκρασία 96° C για 5 min, μετά από τοποθέτηση 15 μl έτοιμου δείκτου DNA στην ιστολογική τομή και καλυπτρίδας. Ο δείκτης έναντι c-erbB-2 (Zymed, San Francisco, CA, USA) ήταν σημασμένος με διγοξυγενίνη και είχε παρασκευασθεί με την τεχνολογία αφαίρεσης των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών (Subtraction Probe Technology) η οποία αυξάνει την ειδικότητα του δείκτου. Ακολούθησε ολονύκτιος υβριδισμός σε θερμοκρασία 37° C και μεθυ-



Εικόνα 2. C-erbB-2 σε καρκίνωμα μαστού. Με την τεχνική CISH (αριστερά) παρατηρούμε 10-20 αντίγραφα του γονιδίου στα περισσότερα κύτταρα. Η ανοσοϊστοχημική χρώση (δεξιά) είναι έντονη (3+).



Εικόνα 3. C-erbB-2 σε καρκίνωμα μαστού. Με την τεχνική CISH (αριστερά) παρατηρούμε μεγάλα γονιδιακά συμπλέγματα στα περισσότερα κύτταρα. Η ανοσοϊστοχημική χρώση (δεξιά) είναι έντονη (3+).

βριδική έκπλυση σε 0,5XSSC σε υδατόλουτρο 75° C για 5 min. Οι τομές τοποθετήθηκαν ακολούθως σε 3% υδατικό διάλυμα H₂O₂ για την ανάλωση της δραστηριότητας της ενδογενούς υπεροξειδάσης. Ακολούθησε ανίχνευση του σήματος υβριδισμού με τη χρήση του Spot-Light CISH polymer detection Kit (Zymed), η οποία έχει εν συντομία ως εξής. Τοποθέτηση των τομών σε blocking reagent 10 min σε θερμοκρασία δωματίου (ΘΔ) και ακολούθως σε mouse anti-Digoxigenin και Polymerized HRP Goat anti-Mouse για 45 min το καθένα σε ΘΔ. Τέλος οι τομές τοποθετήθηκαν σε διάλυμα DAB για 30 min και μεταχρώσθηκαν ελαφρά με αιμοτοξυλίνη. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε τομή καρκινώματος μαστού στην οποία ο δείκτης αντικατεστάθη από PBS.

Αξιολόγηση σημάτων υβριδισμού

Η αξιολόγηση της αντιδράσεως υβριδισμού έγινε με οπτικό μικροσκόπιο Nikon Microphot FX (Nikon, Kogaku KK, Japan) με τη χρήση αντικειμενικών φακών 40X και 60X. Οι περιπτώσεις με 1-5 αντίγραφα γονιδίου (ΑΓ)/πυρήνα θεωρήθηκαν αρνητικές, με 5-10 ΑΓ/πυρήνα σε > 50% των κυττάρων ως χαμηλού βαθμού (ΧΒ) ενίσχυση του γονιδίου και με 10-20 ΑΓ/πυρήνα ή/και παρουσία γονιδιακών συμπλεγμάτων σε >50% των κυττάρων ως υψηλού βαθμού (ΥΒ) ενίσχυση.

Στατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα της τεχνικής CISH και της ανοσοϊστοχημικής ανάλυσης του c-erbB-2 καθώς και των παθολογοανατομικών χαρακτηριστικών των περιπτώσεων των καρκινωμάτων μαστού καταχωρήθηκαν σε στατιστικό πρόγραμμα ηλεκτρονικού υπολογιστή (Statistica for Windows, StatSoft, Tulsa, USA) και ακολούθησε στατιστική ανάλυση με τη χρήση των δοκιμασιών Fisher exact test. Κάθε τιμή στατιστικού σφάλματος (P) ίση ή μικρότερη από 0,05 θεωρήθηκε σημαντική.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Από τις 33 περιπτώσεις καρκινώματος μαστού που μελετήθηκαν με CISH οι 17 (51,5%) ήταν αρνητικές (Εικ. 1), οι 5 (15%) παρουσίαζαν χαμηλού βαθμού ενίσχυση και οι 11 (33,5%) υψηλού βαθμού ενίσχυση του γονιδίου c-erbB-2. Από τις 5 περιπτώσεις με χαμηλού βαθμού ενίσχυση οι 3 παρουσίαζαν πολ-

λαπλά (5-10) αντίγραφα του γονιδίου και οι 2 συνύπαρξη γονιδιακών συμπλεγμάτων. Από τις 11 περιπτώσεις με υψηλού βαθμού ενίσχυση, η 1 οφειλόταν σε πολλαπλά αντίγραφα (10-20) (Εικ. 2), οι δύο σε γονιδιακά συμπλέγματα μόνο (Εικ. 3), και οι υπόλοιπες 8 σε συνύπαρξη των δυο παραπάνω μορφών γονιδιακής ενίσχυσης.

Η σύγκριση των ευρημάτων της τεχνικής CISH με αυτά της ανοσοϊστοχημικής τεχνικής φαίνεται αναλυτικά στον πίνακα 1. Όπως παρατηρούμε μεγάλου βαθμού συμφωνία μεταξύ των δύο τεχνικών ανίχνευσης βρέθηκε κυρίως στην ομάδα 3+ και σε μικρότερο βαθμό στην ομάδα 1+ ($P=0,0002$). Αντίθετα, μεγάλου βαθμού διαφωνία παρατηρήθηκε στην ανοσοϊστοχημική ομάδα 2+, όπου από τις 13 περιπτώσεις δετικής ανοσοϊστοχημικής χρώσης οι 9 (70% των περιπτώσεων) ήταν αρνητικές όσον αφορά την ενίσχυση του γονιδίου.

Συζήτηση

Οι δύο πιο συχνά χρησιμοποιούμενες τεχνικές για την ανάλυση του *c-erbB-2* είναι η εκτίμηση της πρωτεϊνικής υπερέκφρασης με ανοσοϊστοχημεία και η εκτίμηση της ενίσχυσης του γονιδίου με την τεχνική του φθορίζοντος *in situ* υβριδισμού (FISH). Και οι δύο τεχνικές παρουσιάζουν πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα⁷⁻⁹. Συγκεκριμένα η ανοσοϊστοχημική ανάλυση είναι σχετικά οικονομική και ταχεία, δεν απαιτεί ιδιαίτερο εξοπλισμό και το σπουδαιότερο προσδιορίζει άμεσα την πρωτεΐνη *c-erbB-2* που είναι και ο στόχος της θεραπείας με Herceptin. Εν τούτοις η ποσοτικοποίηση της πρωτεϊνικής έκφρασης επηρεάζεται σημαντικά από αριθμό παραγόντων, όπως η μονιμοποίηση και η επεξεργασία των ιστών, οι τεχνικές επανάκτησης της αντιγονικότητας, η ευαισθησία και ειδικότητα των κυκλοφορούντων στο εμπόριο αντισωμάτων και τα διάφορα συστήματα αξιολόγησης της δετικής χρώσης. Η τεχνική FISH έχει χρησιμοποιηθεί εναλ-

λακτικά στην ανίχνευση μεταβολών του γονιδίου *c-erbB-2*. Η τεχνική αυτή είναι λιγότερο εξαρτημένη από τους παραπάνω παράγοντες που έχουν αφορούν την επεξεργασία των ιστών, επειδή το DNA είναι πιο σταθερό από τις πρωτεΐνες, η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων πιο αντικειμενική σε σχέση με την ανοσοϊστοχημεία αφού αφορά την καταμέτρηση του αριθμού των φθορίζοντων σημάτων και όχι την εκτίμηση της έντασης της χρώσης και επιπλέον το όριο δετικότητας έχει προσδιορισθεί. Μελέτες αναφέρουν ότι οι αναλύσεις που βασίζονται στην ανοσοϊστοχημεία είναι πιο επιδεκτικές σε διακυμάνσεις μεταξύ των παρατηρητών ($K=0,67$) σε σχέση με αυτές της τεχνικής FISH ($K=0,973$)¹⁰. Παρά την υπεροχή της σε σχέση με την ανοσοϊστοχημεία η τεχνική FISH παρουσιάζει σημαντικά μειονεκτήματα, όπως η προσωρινότητα του σήματος και χρησιμοποίηση ακριβούς εξοπλισμού (μικροσκόπιο με σύστημα φθορισμού, ειδικά φίλτρα, ψηφιακή κάμερα καταγραφής) που δεν διευκολύνουν την εφαρμογή της μεθόδου στην καθημερινή διαγνωστική πρακτική.

Πρόσφατα αναπτύχθηκε εναλλακτικά η τεχνική του χρωμογόνου *in situ* υβριδισμού (CISH), η οποία συνδυάζει τα πλεονεκτήματα της ανοσοϊστοχημείας και της τεχνικής FISH⁶. Η τεχνική αυτή επιτρέπει την αναγνώριση και ποσοτικοποίηση των αντιγράφων του γονιδίου *c-erbB-2* με τη χρήση δείκτη DNA, στην οποία η αντίδραση υβριδισμού ανιχνεύεται με αντίδραση υπεροξειδάσης και χρωμογόνο υπόστρωμα. Η μέθοδος αυτή έχει πολλά και σημαντικά πλεονεκτήματα όπως, αξιόπιστη εφαρμογή σε τομή παραφίνης, είναι πιο οικονομική από την τεχνική FISH, δεν απαιτεί τη χρήση πολύπλοκων συστημάτων μικροσκοπίας φθορισμού, και τέλος το σήμα του παραμένει σταθερό με την πάροδο του χρόνου. Η τεχνική CISH επιτρέπει την εύκολη συσχέτιση του σήματος με τα μορφολογικά χαρακτηριστικά, γεγονός ιδιαίτερης σημασίας σε περιπτώσεις με εκτεταμένη

Πίνακας 1. Συγκριτική απεικόνιση των ευρημάτων της ανοσοϊστοχημικής τεχνικής και του χρωμογόνου *in situ* υβριδισμού (CISH) στην ανάλυση του *c-erbB-2* στα καρκινώματα του μαστού

CISH	Ανοσο-			Σύνολο
	1+	2+	3+	
Ενίσχυση -	8	9	0	17
Ενίσχυση XB	0	2	3	5
Ενίσχυση YB	1	2	8	11
Συμφωνία	8/9 (89%)	4/13 (30%)	11/11 (100%)	

ανάπτυξη *in situ* καρκινώματος, δεδομένου ότι υπάρχουν περιπτώσεις με έντονα θετικό 3+ *in situ* στοιχείο και μετρίως θετικό ή αρνητικό διηθητικό στοιχείο¹¹. Σε μία πρόσφατη μελέτη οι Tanner και συν⁶, αναφέρουν υψηλό βαθμό συμφωνίας μεταξύ των τεχνικών FISH και CISH ως προς την εκτίμηση του αριθμού των αντιγράφων του γονιδίου c-erbB-2.

Στην παρούσα μελέτη όλοι οι όγκοι που ταξινομήθηκαν στην ομάδα 3+ εμφάνιζαν ενίσχυση του γονιδίου c-erbB2, ενώ οι ανοσοϊστοχημικές ομάδες 1+ και 2+ παρουσίαζαν βαθμό διαφωνίας 11% και 70% αντίστοιχα. Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με αυτά άλλων μελετών που συσχετίζουν την ανοσοϊστοχημεία με την τεχνική FISH. Συγκεκριμένα οι Kakar και συν, διαπίστωσαν υψηλή συμφωνία μεταξύ των δύο τεχνικών τόσο στο σύνολο των περιπτώσεων (88%) όσο και στις περιπτώσεις που ανήκαν στην ανοσοϊστοχημική ομάδα 3+, ενώ στην ομάδα 2+ η συμφωνία ήταν χαμηλή (35%)¹². Παρόμοια ευρήματα αναφέρουν και άλλες ερευνητικές μελέτες^{11,13-15}.

Σύμφωνα με τα ευρήματα μας από τους 15 όγκους που εμφάνιζαν ενίσχυση του γονιδίου με την τεχνική CISH οι 5 είχαν χαμηλού βαθμού και οι 10 υψηλού βαθμού ενίσχυση. Οι Xing και συν σε μελέτη τους με την τεχνική FISH έκαναν παρόμοιο διαχωρισμό και διαπίστωσαν ότι οι ασθενείς με νεοπλασμάτα που παρουσίαζαν χαμηλού βαθμού ενίσχυση του γονιδίου c-erbB-2 είχαν σημαντικά μικρότερη συχνότητα υποτροπών σε σχέση με αυτούς που παρουσίαζαν υψηλού βαθμού ενίσχυση¹⁶. Η σημασία αυτού του διαχωρισμού μπορεί να είναι σημαντική για την βιολογική συμπεριφορά των όγκων και παραμένει να διευκρινισθεί σε μεγαλύτερες σειρές ασθενών.

Όσον αφορά την προγνωστική και προβλεπτική αξία του c-erbB-2 σε σχέση με τις τεχνικές που χρησιμοποιούνται, οι περισσότερες μελέτες στηρίζονται στην ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης. Σε πρόσφατες όμως μελέτες^{17,18} αναφέρεται ότι η ανάλυση της κατάστασης του γονιδίου με FISH μπορεί να προβλέψει καλλίτερα την ανταπόκριση στην αντι-HER-2/neu θεραπεία συγκρινόμενη με την ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης. Σε άλλη μελέτη¹⁹ αναφέρεται ότι οι δυο τεχνικές έχουν την ίδια προγνωστική και προβλεπτική αξία. Τέλος οι Pauletti και συν., διαπίστωσαν ότι η κατάσταση του γονιδίου με την τεχνική FISH παρέχει σημαντικότερες προγνωστικές

πληροφορίες όσον αφορά τον διαχωρισμό των όγκων σε χαμηλού και υψηλού κινδύνου και ότι οι όγκοι που εμφανίζουν υπερέκφραση της πρωτεΐνης και αρνητικό FISH συμπεριφέρονται ως να ήταν ανοσοϊστοχημικά και FISH αρνητικοί²⁰.

Συμπερασματικά η τεχνική CISH φαίνεται να αποτελεί μία ειδική, ευαίσθητη και εύκολα εφαρμοζόμενη τεχνική η οποία μπορεί αξιόπιστα να αντικαταστήσει την τεχνική FISH²¹. Η τεχνική CISH μπορεί να χρησιμοποιηθεί μαζί με την ανοσοϊστοχημεία στην εκτίμηση της κατάστασης του γονιδίου c-erbB-2, για την καλύτερη επιλογή ασθενών με καρκίνωμα μαστού που θα υποβληθούν σε θεραπεία με Herceptin.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Schechter AL, Hung MC, Vaidyanathan L, Weinberg RA, Yang-Feng TL, Francke U, Ulrich A, Coussens L. The neu gene: an erbB-homologous gene distinct from and unlinked to the gene encoding the EGF receptor. *Science* 229:976-978, 1985.
2. Hynes NE, Stern DF. The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1198:165-184, 1994.
3. Akiyama T, Sudo C, Ogawara H, Toyoshima K, Yamamoto T. The product of the human c-erbB-2 gene: a 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. *Science* 232:1644-1646, 1986.
4. Ross JS, Fletcher JA. Her-2/neu (c-erbB-2) gene and protein in breast cancer. *Am J Clin Pathol* 112:S53-S67, 1999.
5. Shak S. Overview of the trastuzumab (Herceptin) anti HER2 monoclonal antibody clinical program in HER-2 overexpressing metastatic breast cancer. Herceptin Multinational Investigator Study Group. *Semin Oncol* 6:71-77, 1999.
6. Tanner M, Gancberg D, Di Leo A, Larsimont D, Rouas G, Piccart MJ, Isola J. Chromogenic *in situ* hybridization: a practical alternative for fluorescence *in situ* hybridization to detect HER-2/neu oncogene amplification in archival breast cancer samples. *Am J Pathol* 157:1467-1472, 2000.
7. Wang S, Saboorian MH, Frenkel EP, Haley BB, Siddiqui MT, Gokaslan S, Wians FH Jr, Hynan L, Ashfaq R. Assessment of HER-2/neu status in breast cancer. Automated Cellular Imaging System (ACIS)-assisted quantitation of immunohistochemical assay achieves high accuracy in comparison with fluorescence

- in situ hybridization assay as the standard. *Am J Clin Pathol* 116:495-503, 2001.
8. 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* 14:677-685, 2001.
 9. Schnitt SJ, Jacobs TW. Current status of HER2 testing: caught between a rock and a hard place. *Am J Clin Pathol* 116:806-810, 2001.
 10. Bartlett JM, Going JJ, Mallon EA, Watters AD, Reeves JR, Stanton P, Richmond J, Donald B, Ferrier R, Cooke TG. Evaluating HER2 amplification and overexpression in breast cancer. *J Pathol* 195:422-428, 2001.
 11. Ridolfi RL, Jamehdor MR, Arber JM. HER-2/neu testing in breast carcinoma: a combined immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization approach. *Mod Pathol* 13:866-873, 2000.
 12. Kakar S, Puangsuvan N, Stevens JM, Serenas R, Mangan G, Sahai S, Mihalov ML. HER-2/neu assessment in breast cancer by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization: comparison of results and correlation with survival. *Mol Diagn* 5:199-207, 2000.
 13. Lebeau A, Deimling D, Kaltz C, Sendelhofert A, Iff A, Luthardt B, Untch M, Lohrs U. Her-2/neu analysis in archival tissue samples of human breast cancer: comparison of immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. *J Clin Oncol* 19:354-363, 2001.
 14. Jimenez RE, Wallis T, Tabaszka P, Visscher DW. Determination of Her-2/Neu status in breast carcinoma: comparative analysis of immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization. *Mod Pathol* 13:37-45, 2000.
 15. Thomson TA, Hayes MM, Spinelli JJ, Hilland E, Sawrenko C, Phillips D, Dupuis B, Parker RL. HER-2/neu in breast cancer: interobserver variability and performance of immunohistochemistry with 4 antibodies compared with fluorescent in situ hybridization. *Mod Pathol* 14:1079-1086, 2001.
 16. Xing WR, Gilchrist KW, Harris CP, Samson W, Meisner LF. FISH detection of HER-2/neu oncogene amplification in early onset breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 39:203-212, 1996.
 17. Mass RD, Sanders C, Charlene K, et al. The concordance between the clinical trials assay (CTA) and fluorescence in situ hybridization (FISH) in the Herceptin pivotal trials [abstract]. *Proc Am Soc Clin Oncol* 19:291A, 2000.
 18. Buehler JM, Bangemann N, Evers K, et al. Effective HER-2/neu diagnosis in breast cancer by a combination of immunohistochemistry and FISH. [Abstract] *Proc Am Soc Clin Oncol* 19:294A, 2000.
 19. Seidman AD, Fornier MN, Esteva FJ, Tan L, Kaptain S, Bach A, Panageas KS, Arroyo C, Valero V, Currie V, Gilewski T, Theodoulou M, Moynahan ME, Moasser M, Sklarin N, Dickler M, D'Andrea G, Cristofanilli M, Rivera E, Hortobagyi GN, Norton L, Hudis CA. Weekly trastuzumab and paclitaxel therapy for metastatic breast cancer with analysis of efficacy by HER2 immunophenotype and gene amplification. Weekly trastuzumab and paclitaxel therapy for metastatic breast cancer with analysis of efficacy by HER2 immunophenotype and gene amplification.
 20. Pauletti G, Dandekar S, Rong H, Ramos L, Peng H, Seshadri R, Slamon DJ. Assessment of methods for tissue-based detection of the HER-2/neu alteration in human breast cancer: a direct comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. *J Clin Oncol* 18:3651-3664, 2000.
 21. Kumamoto H, Sasano H, Taniguchi T, Suzuki T, Moriya T, Ichinohasama R. Chromogenic in situ hybridization analysis of HER-2/neu status in breast carcinoma: application in screening of patients for trastuzumab (Herceptin) therapy. *Pathol Int* 51:579-584, 2001.

Corresponding Author:

Kounelis S.,

8-14 Voulgaroktonou str., 114 71 Athens,

Tel. 010 6401136, 010 6437245 Fax: 010 6432328

Υπεύθυνος αλληλογραφίας:

Κουνέλη Σοφία

Βουλγαροκτόνου 8-14, 114 71 Αθήνα

Τηλ. 010 6401136, 010 6437245 Fax: 010 6432328