

Institut za onkologiju Vojvodine, Sremska Kamenica
Odeljenje za patologiju i citodijagnostiku

Pregledni članak
Review article
UDK 618.19-006.6:615.27.07
DOI:10.2298/MPNS1002069I

TESTIRANJE RECEPTORA HUMANOG EPIDERMALNOG FAKTORA RASTA 2 U KARCINOMU DOJKE

HUMAN EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR 2 TESTING IN BREAST CANCER

Tatjana IVKOVIĆ-KAPICL i Slavica KNEŽEVIĆ-UŠAJ

Sažetak - Određivanje ekspresije humanog epidermalnog faktora rasta 2 u karcinomu dojke postalo je neophodan vodič za kliničku upotrebu Herceptina® (trastuzumab) i zlatni standard u dijagnostičkom algoritmu karcinoma dojke. Osnovne metode testiranja su imunohistohemijska, kojom se identifikuje povećana proteinska ekspresija humanog epidermalnog faktora rasta broj 2 na ćelijskoj membrani i *in situ* hibridizacija, korišćenjem fluorescencije (fluorescentna *in situ* hibridizacija) ili hromogena (hromogena *in situ* hibridizacija), kojom se determiniše postojanje genske amplifikacije. Postoje brojni faktori koji mogu da utiču na rezultate testiranja, a u vezi su sa antitelima/probama, opštom metodologijom rada i iskustvom. U mnogim zemljama postoje nacionalni vodiči za testiranje humanog epidermalnog faktora rasta broj 2 sa ciljem da se sve korišćene procedure standardizuju i tako osigura visoka pouzdanost nalaza. Opšta je preporuka da sve laboratorije u kojima se vrši testiranje humanog epidermalnog faktora rasta broj 2, bez obzira na korišćenu metodu, moraju biti uključene u sisteme unutrašnje i spoljašnje provere kvaliteta.

Ključne reči: Epidermalni faktor rasta; Rak dojke; Imunohistohemija; *In situ* hibridizacija; Genska amplifikacija; Kvalitet kontrole

Uvod

Porodicu receptora humanog epidermalnog faktora rasta (HER) čine četiri membranska proteina: receptor humanog epidermalnog faktora rasta HER1 (EGFR), HER2 (poznat i kao neu/c-erb B2), HER3 (c-erb-B3) i HER4 (c-erb-B3). Strukturno, HER receptori se sastoje od tri regiona: ekstracelularnog područja za vezivanje liganda (sa četiri subdomena I-IV), hidrofolbnog transmembranskog područja u kome se receptor vezuje za ćelijsku membranu i intracelularnog područja (izuzev HER3) sa aktivnošću tirozin-kinaze. U inaktivnom stanju HER receptori su monomeri. Vezivanjem liganda i aktivacijom receptora dolazi do njihove homo- i heterodimerizacije i aktivacije enzima tirozin-kinaze. Na taj način aktivira se kaskadni mehanizam biohemijskih promena u samoj ćeliji, što dovodi do ćelijske proliferacije, apoptoze, angiogeneze, promena u adhezivnosti i motilitetu ćelija. Poremećaj bilo koje faze ovog mehanizma može da dovede do prekomerne proliferacije, migracije ćelija i njihovog metastaziranja [1-3].

Klinički značaj amplifikacije gena receptora humanog epidermalnog faktora rasta HER2, lokalizovanog na hromozomu 17, u karcinomu dojke je ustanovljen pre dve decenije, kada su Slamon i saradnici objavili rezultate svog istraživanja [4]. Od tada je u brojnim studijama dokazano da HER2 genska amplifikacija ili povećana proteinska ekspresija predstavlja faktor loše prognoze udružen sa rapidnim tumorskim rastom, povećanim rizikom za pojavu recidiva nakon hirurškog tretmana, slab odgovor na konvencionalnu hemioterapiju, hormonsku terapiju i kraće preživljavanje [5-9]. Povećana ekspresija HER2 često je udružena sa drugim faktorima loše prognoze, kao što su porast veličina

tumora, loš stepen histološke diferencijacije, estrogen i progesteron negativan status, visok proliferativni indeks i aneuploidija [10,11]. HER2 genska amplifikacija ili povećana proteinska ekspresija viđa se kod 10-34% karcinoma dojke [1].

Interes za HER2 revitalizovan je otkrićem humanizovanog monoklalnog antitela protiv HER2 (Herceptin®/trastuzumab) koji je razvio Genentech (San Francisco, CA, USA), a koji je predstavila tržištu kompanija Roche (Nutley, NJ, USA) [12]. Trastuzumab deluje na više različitih načina, ali jedan od najznačajnijih mehanizama dejstva je aktivacija imunog odgovora organizma, koji putem antitelo-zavisne ćelijski posredovane citotoksičnosti (ADCC, *antibody-dependent cellular cytotoxicity*) dovodi do smrti tumorske ćelije [13]. Efikasnost ovog leka u tretmanu bolesnica sa agresivnom formom HER2 pozitivnih karcinoma dojke prvi put je dokazana 1998. godine, u kliničkoj studiji u kojoj je Herceptin korišćen kao druga i treća linija monoterapije kod žena sa metastatskom bolešću koje su prethodno bile tretirane hemioterapijom [3]. Primenjen u prvoj liniji metastatskog karcinoma dojke u kombinaciji sa taksanima Herceptin, dokazano je, poboljšava sve parametre kliničkog odgovora uključujući i preživljavanje [14,15]. U skorije vreme, prospektivne randomizirane studije koje je sproveo u Americi National Surgical Adjuvant Breast Project (NSABP) B-31 i Breast Cancer Interugroup Study (N-9831) u Evropi (HERceptin® Adjuvant trial (HERA) dokazale su da adjuvantna primena trastuzumaba u trajanju od 1 godine, nakon primenjene standardne hemioterapije, dovodi do smanjenja rizika od recidiva i smanjenja mortaliteta kod bolesnica sa HER2 pozitivnim ranim stadijumom karcinoma dojke [16-20].

Skraćenice

HER	- receptor za humani epidermalni faktor rasta
EGFR	- receptor za epidermalni faktor rasta
ADCC	- antitelo-zavisna ćelijski posredovana citotoksičnost
NSABP	- <i>National Surgical Adjuvant Breast Project</i>
HERA	- <i>HERceptin® Adjuvant trial</i>
IHH	- imunohistohemija
ISH	- <i>in situ</i> hibridizacija
FISH	- fluorescentna <i>in situ</i> hibridizacija
CISH	- hromogena <i>in situ</i> hibridizacija
UK NEQAS	- <i>United Kingdom National External Quality Assessment Service</i>
NordiQC	- <i>Nordic immunohistochemical Quality Control</i>
USCAP	- <i>United States and Canadian Academy of Pathology</i>
SISH	- silver <i>in situ</i> hibridizacija

S obzirom na to da je terapija Herceptinom efikasna samo kod bolesnica sa dokazanom tumorskom HER2 amplifikacijom izuzetno je značajan pravilan odabir bolesnica za tretman ovim lekom. Potencijalne posledice koje prozile iz lažnopoziitivnih, kao i lažnonegativnih rezultata veoma su ozbiljne a kreću se od visoke cene troškova neadekvatnog tretmana, mogućih neželjenih kardiotoksičnih efekata koji se opisuju u kombinovanoj primeni sa doksorubicinom, do lošijeg toka i ishoda bolesti za bolesnice kojima je terapija bila potrebna a nisu je primile [21,22].

Metode HER2 testiranja

Osnovne metode testiranja koje se koriste za određivanje HER2 statusa jesu imunohistohemijska (IHH), za povećanu proteinsku ekspresiju i *in situ* hibridizacija, korišćenjem bilo fluorescencije (FISH) ili hromogena (CISH). Iako bi testiranje moralo biti izrazito senzitivno i specifično, činjenica je da se u određivanju HER2 statusa, prvenstveno imunohistohemijskom metodom, mogu javiti značajne varijabilnosti. Ove varijacije u vezi su sa brojnim preanalitičkim i analitičkim faktorima, kao što su vreme fiksacije, vrsta primarnog antitela i korišćene metode, kao i subjektivne varijacije u interpretiranju nalaza i skorovanju [3]. Mnoge zemlje do danas su sačinile uputstva za procedure HER2 testiranja, protokole koji su formirani na nacionalnom nivou i prosleđeni svim dijagnostičkim centrima u zemlji. Iako se ovi nacionalni protokoli među sobom razlikuju u pojedinim segmentima, oni se kontinuirano upoređuju i unapređuju, kako bi se dobilo što više podataka o faktorima koji utiču na HER2 testiranje i odgovor na terapiju Herceptinom. Visok nivo reproducibilnosti i pouzdanosti HER2 testiranja, kao i precizan odabir bolesnica kandidatkinja za anti-HER2 terapiju krajnji je cilj ovih nastojanja [18, 23-27].

Opšte je prihvaćena preporuka da se HER2 testiranje izvodi kod svih bolesnica sa invazivnim karcinomom dojke u vreme dijagnostikovanja bolesti. Celishodnost ranog testiranja leži u činjenici da se HER2 pozitivnost razvija u ranom stadijumu

kancerogeneze, kao i da HER2 status primarnog tumora korelira sa metastatskim žarištima [3].

Uzimanje i obrada tkivnih uzoraka pre HER2 testiranja (tkivni procesing) može značajno da utiče na rezultat. Stoga, potrebno je standardizovati sve metodološke korake i korišćene procedure, uključujući: vreme od ekscizije do fiksacije tkiva, serijsko sečenje uzorka pre fiksacije, trajanje fiksacije, tip fiksacije i čuvanje parafinskih kalupa i pločica [3, 19-23].

Imunohistohemija

Imunohistohemija je primarna metoda utvrđivanja HER2 statusa kojom se, primenom anti-HER2 antitela, u svrhu terapijskog tretmana, odvajaju jasno pozitivni (skor 3+) od negativnih (skor 0/1+) slučajeva i, takođe, vrši trijaža graničnih (skor 2+) slučajeva koji zahtevaju dalje ispitivanje FISH ili CISH tehnikom, kako bi se utvrdilo da li pokazuju gensku amplifikaciju.

Od 2007. godine, po američkim i kanadskim preporukama za HER2 testiranje, pozitivni slučajevi karcinoma dojke (3+ skor) definišu se kao tumori sa kompletnim, jakim membranskim bojenjem u više od 30% tumorskih ćelija, dok se jako membransko bojenje u ≤30% tumorskih ćelija, kao i slabo do umereno kompletno membransko bojenje u najmanje 10% ćelija vrednuje skorom 2+. Skor 1+ podrazumeva nekompletno membransko bojenje u više od 10% tumorskih ćelija, dok skor 0 označava membransko bojenje u manje od 10% tumorskih ćelija [22,23] (Slika 1).

Tumačenje imunohistohemijskih bojenja može biti subjektivno i može uticati na rezultat HER2 testa, naročito kada je u pitanju diferencijacija između 2+ i 3+ rezultata [24]. Zato u većini nacionalnih protokola za HER2 testiranje, koji postoje u mnogim zemljama sveta, stoje jasne preporuke i standardi za tumačenje IHH rezultata. Sa druge strane, u svim laboratorijama u kojima se vrši HER2 testiranje mora postojati razrađen metodološki



Slika 1. HER2-pozitivna imunohistohemijska reakcija, skor 3
Fig. 1. HER2-positive immunohistochemical reaction, score 3

sistem sa najmanje 250 testiranih slučajeva godišnje, adekvatna kontinuirana edukacija patologa i tehničkog osoblja uključenih u rad, kao i stalna kontrola kvaliteta, unutrašnja i spoljašnja, koja se ostvaruje preko *United Kingdom National External Quality Assessment Service* (UK NEQAS, Sheffield, UK), *Nordic immunohistochemical Quality Control* (NordiQC) i *United States and Canadian Academy of Pathology* (USCAP) [3,14,19-24].

U cilju određivanja tačnog i pouzdanog HER2 statusa u karcinomu dojke, osim slučajeva sa 2+ imunohistohemijskim skorom, na CISH ili FISH se upućuju i slučajevi u kojima je dostupan uzorak tkiva mali, ili se radi o *core* bioptičkom materijalu pri indikovanju neoadjuvantnog tretmana, kao i svi diskutabilni, sporni i nejasni slučajevi: uzorci sa heterogenim bojenjem koje može da ometa interpretaciju, citoplazmatski ili retrakcioni artefakti koji mogu da sakrivaju membransko bojenje, bojenje normalnog epitela, kao i ekstenzivno nekompletno membransko bojenje [19-23]. U evaluaciji HER2 skora, patolozi kao pomoćni parametar procene ispravnosti IHH bojenja služe i morfološke karakteristike tumora. U slučajevima kada se u uzorku tumorskog tkiva dostavljenom iz druge laboratorije dobija neočekivana HER2 imunoreaktivnost, razlog najverovatnije leži u različitom režimu fiksacije [3, 19].

In-situ hibridizacija (ISH)

Godine 1969, Gall i Pradue su predstavili stručnoj javnosti tehniku poznatu kao *in situ* hibridizacija (ISH), kojom je omogućeno lokalizovanje nukleinskih kiselina u pojedinačnim ćelijama. Ova metoda se do današnjih dana razvila u standardno primenjivu fluorescentnu *in situ* hibridizaciju koja koristi fluorohrom-konjugovane nukleotide i sve šire korišćenu hromogenu *in situ* hibridizaciju [3, 25].

Fluorescentna in situ hibridizacija (FISH)

Dok imunohistohemija identifikuje HER2 proteinsku ekspresiju na ćelijskoj membrani, ISH determiniše HER2 gensku amplifikaciju.

Rezultati primene FISH u detekciji broja kopija HER2 gena u tkivnim uzorcima prvi put su objavljeni 1992. godine. Od tada je predstavljeno više komercijalnih sistema za HER2 FISH testiranje, a danas su u upotrebi tri: Pathvysion (*Abbott-Vysis, Downers Grove, Illinois, USA*), INFORMHER2 FISH (*Ventana Medical Systems*) koji se koristi u prognostičke svrhe i PharmDx HER2 FISH (*Dako Cytomation*) kojim se utvrđuje predikcija senzitivnosti na trastuzumab. Pathvysion i PharmDx HER2 FISH čine dvostruki sistem fluorescentno obeleženih proba, komplementarnih u odnosu na centromere HER2 gena ili hromozoma 17 (Ch17). Proba za hromozom 17 služi kao unutrašnja kontrola i marker polizomije ili monozomije (delecije) hromozoma [14].

Svi metodološki koraci, kao što su tkivna digestija, hibridizacija i ispiranje, moraju biti standardizovani, a protokoli za izvođenje striktno poštovani. Pravilan pretretman formalin-fiksiranih parafinskih rezova od primarnog je značaja za uspešno izvođenje ISH [26].

Brojanje se vrši u zoni tkivnog reza u kom najveći broj jedara (>50%) pokazuje signal. Broj hromozoma 17 i HER2 signala broje se u 20-60 nepreklapajućih jedara tumorskih ćelija, korišćenjem najmanje tri zasebna tumorska polja, ili više, ukoliko postoji heterogenost. Oštećenja izazvana prekomernom digestijom, mehaničkim dejstvom ili okrnjena jedra izuzimaju se pri skorovanju. Računa se prosečan odnos HER2 i Ch17 kopija.

Odnos HER2/Ch17 $\geq 2,00$ smatra se HER2 pozitivnim. Istovremeno, nema raspoloživih podataka o tačno utvrđenom nivou pozitivnosti za pojedinačne probe ISH. Kao granične kategorije navode se vrednosti HER2/Ch17 odnosa između 1,80 i 2,20, ili prosečni broj genskih kopija između 4,0 i 6,0 za pojedinačne HER2 probe. U *Pathvysion Vysis Kitu*, preporuka je da vrednost HER2/Ch17 odnosa između 1,80 i 2,20 treba oprezno interpretirati, s obzirom da se nalazi blizu graničnog nivoa pozitivnosti, i da je u izveštaju to potrebno navesti. Optimalan pristup za povećanje pouzdanosti testa, u ovakvim slučajevima bio bi povećanje izbrojanih ćelija na 60-120, ili ponavljanje testa [19-23,27].

Aberacije hromozoma 17 česte su u karcinomu dojke. One mogu biti delecije ili polizomije. Ove aberacije imaju značajan uticaj na određivanje i tumačenje rezultata HER2 genske amplifikacije. Stoga je merenje broja hromozomskih kopija, uporedo sa HER2, veoma značajno [28,29]. Učestalost slučajeva polizomije razlikuje se u sprovedenim studijama, prvenstveno zbog različite selekcije slučajeva za analizu, IHH skora i različitog nivoa graničnih vrednosti u FISH vrednovanju. U idealnim uslovima, polizomiju bi trebalo definisati na osnovu analize normalnog tkiva dojke u istom uzorku. Generalno, polizomija 17 može da vodi do povećanja proteinske ekspresije i u odsustvu HER2 genske amplifikacije. Zbog razlika u definisanju polizomije u različitim sprovedenim studijama, od značaja bi bila dalja validacija definisanja ove aberacije [19-23].

Hromogena in situ hibridizacija (CISH)

Alternativna metoda FISH tehnici za utvrđivanje broja kopija HER2 gena jeste ISH koja koristi hromogeni metod detekcije [30-38]. Za razliku od već potvrđene FISH u kojoj se koriste dve boje, CISH se bazira na kolorimetrijskoj detekciji samo jedne probe. Nakon detaljne i pažljive optimizacije metode, kao tačka koja označava graničnu vrednost za definisanje HER2 amplifikacije prihvaćeno je šest ili više kopija. Tumori bez HER2 amplifikacije pokazuju 1-2 signala po ćeliji ili, u slučajevima hromozomskih aneuploidija, 3-5 kopija po ćeliji. Zbog DNA replikacije tokom S i G"/M faze ćelijskog ciklusa, mali procenat (10-30%) aneuploidnih tu-

morskih ćelija može da sadrži 5-8 signala po jedru (često kao signal-parovi). Ovakvi nalazi tumače se kao negativni, bez HER2 amplifikacije [30]. Ukoliko CISH ne pokazuje hibridizacioni signal, hibridizacija je neuspešna, iz tehničkih razloga [30].

Tipična genska amplifikacija CISH predstavlja peroksidaza-pozitivne nakupine (klastere) multiplih kopija gena, koji se lako identifikuju na mikroskopu sa 40 puta objektivskim povećanjem. U slučajevima sa visokom amplifikacijom gena ubrajaju se i oni sa deset i više kopija po ćeliji, u više od 50% tumorskih ćelija. Najkompleksnija kategorija u CISH je amplifikacija niskog stepena (6-10 kopija gena po ćeliji). U ovim slučajevima može biti korisno izvođenje hromozom 17 centromer CISH i poređenje broja kopija. U pojedinim zemljama, preporuka je da se u slučajevima graničnih vrednosti ili CISH niske amplifikacije vrši dodatno FISH testiranje.

Iako je CISH metoda bila osporavana od brojnih zagovornika FISH kao zlatnog standarda u definisanju HER2 statusa, danas je ona u sve široj upotrebi i dokazano se može koristiti kao validna alternativa FISH. U brojnim studijama sprovedenim širom sveta, u kojima su na velikim uzorcima tumora dojke poređene ove dve metode ISH, utvrđena je dobra korelacija. Kao najveća prednost CISH metode smatra se to što se rezultati mogu očitavati na standardnom svetlosnom mikroskopu, bez upotrebe objektiva sa uljnom imerzijom. FISH, sa druge strane, zahteva skupi fluorescentni mikroskop snabdeven sistemom za snimanje slike, s obzirom da se FISH pločice teško mogu arhivirati. Čuvanje CISH pločica je jednostavno izvodljivo i može biti od značaja za retrospektivnu analizu uzoraka, kako u svrhu istraživanja tako i za slučaj eventualnih izmena u preporukama za indikovanje Herceptina. Na primer, u skorašnjim podacima se navodi da žene sa tumorom u kom je ustanovljen povećan broj kopija HER2 gena zbog povećanog broja kopija h17 (polizomije) mogu parcijalno odgovarati na terapiju Herceptinom. Kao prednost CISH navodi se i mogućnost da se na pločici istovremeno, zahvaljujući hematoksilinskom bojenju, može vršiti i histološka inspekcija. U FISH metodi, s druge strane, uvid u histološku građu je veoma težak, a izbor pravog polja za brojanje kopija gena HER2 u tumorskim ćelijama može biti problematičan. Iako su najteže kritike CISH metode u vezi sa nemogućnošću procene prisustva polizomije hromozoma 17, ovo može biti prevaziđeno korišćenjem hromozom 17 centromerne CISH probe za uzorke koji pokazuju

nizak novo HER2 amplifikacije i CISH metode dvostrukog bojenja [39].

Nedavno je predstavljena komercijalna automatizovana verzija CISH koja koristi srebro kao hromogen (SISH).

Iako se CISH sve više koristi u patološkim laboratorijama i široko je prihvaćena metoda, naročito u Grčkoj, Portugaliji, Finskoj, Australiji, kao i kod nas u Srbiji, još uvek ne postoji zvaničan sistem održanja i kontrole kvaliteta među laboratorijama. U skorijoj budućnosti može se očekivati formiranje specijalizovanih organizacija za spoljašnju kontrolu kvaliteta HER2 CISH testiranja u Evropi [39].

Poređenje IHH metode i ISH u HER2 testiranju

Analiza podataka tri velike referentne laboratorije u Engleskoj pokazala je visok nivo podudarnosti između IHH i ISH metode u HER2 testiranju. S druge strane, u nekoliko studija utvrđeno je da su varijacije u interpretaciji nalaza niže za FISH nego IHH [40-46].

U analizi odgovora na terapiju trastuzumabom kod bolesnica sa metastatskom bolešću, rezultati pojedinih analiza ukazuju na to da bi nešto bolji odgovor na terapiju Herceptinom mogle imati bolesnice kod kojih je HER2 pozitivan status određen FISH metodom, u odnosu na IHH. Podaci o poređenju IHH i FISH metoda u predikciji adjuvantnog tretmana još uvek ne postoje. Nejasni su i rezultati o odgovoru na terapiju trastuzumabom kod bolesnica sa graničnim vrednostima HER2 genske amplifikacije i hromozomskom 17 polizomijom. Još uvek je teško odrediti koja od ovih metoda može bolje da predvidi odgovor na anti-HER2 terapiju. Tačan mehanizam koji određuje osetljivost na trastuzumab još uvek nije poznat, što je od izuzetne važnosti ako se uzme u obzir da oko 60% HER2 pozitivnih bolesnica sa metastatskim karcinomom dojke reaguje na terapiju [14]. Dodatno, ne zna se da li navedeno važi i za noviji HER2 usmereni terapijski agens Lapatinib (*TykerbTM GlaxoSmithKline*) [14].

Princip HER2 testiranja, čini se, složeniji je nego što se u početku mislilo, prvenstveno zbog činjenice da na terapiju trastuzumabom ne reaguju sve HER2 pozitivne bolesnice, kao i da ne postoji zlatni standard test, kojim bi se sasvim pouzdano mogle izdvojiti bolesnice koje će sigurno imati koristi od primenjene terapije trastuzumabom. Herceptin i pored svega ostaje moćna terapija izbora za HER2 pozitivne bolesnice sa karcinomom dojke, a tačno i pouzdano HER2 testiranje preduslov efikasnog tretmana [47-49].

Literatura

1. Ross SJ, Fletcher JA. The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. *Oncologist* 1998;3:237-52.
2. Schnitt SJ. Breast cancer in the 21st century: new opportunities and new challenges. *Mod Pathol* 2001;14(3):213-8.
3. Lewis F, Jackson P, Lane S, Coast G, Hanby AM. Testing for HER2 in breast cancer. *Histopathology* 2004;45:207-17.
4. Slamon DJ, Clark DM, Wong SG. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987;235:177-82.
5. Slamon DJ, Clark GM. Amplification of C-ERB-B2 and aggressive breast tumors? *Science* 1998;240:1795-8.
6. De Potter CR. The neu oncogene: more than a prognostic indicator? *Hum Pathol* 1994;25:1264-8.
7. Heintz NH, Leslie KO, Rogers LA, et al. Amplification of the c-erb B-2 oncogene in prognosis of breast adenocarcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 1990;114:160-3.
8. Paik S, Bryant J, Park C, Fisher B, Tan-Chiu E, Hyams D, et al. ErbB-2 and response to doxorubicin in patients with axillary lymph-node positive, hormone receptor-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:1361-70.
9. Carlmagno C, Perone F, Gallo C, De Laurentiis M, Lauria R, Morabito A, et al. C-erbB-2 overexpression decreases the benefit of adjuvant tamoxifen in early-stage breast cancer without axillary lymph node metastasis. *J Clin Oncol* 1996;14:2702-8.
10. Prati R, Apple SK, He J, Gornbein JA, Chanh HR. Histopathologic characteristics predicting HER-2/neu amplification in breast cancer. *Breast J* 2005;11(6):433-9.
11. Huang HJ, Neven P, Drijkoningen M, Paridaens R, Wildiers H, Van Limberger E, et al. Association between tumour characteristics and HER-2/neu by immunohistochemistry in 1362 women with primary operable breast cancer. *J Clin Pathol* 2005;58:611-6.
12. Goldenberg MM. Trastuzumab, a recombinant DNA-derived humanized monoclonal antibody: a novel agent for the treatment of metastatic breast cancer. *Clin Ther* 1999;21:309-18.
13. Nahta R, Esteva FJ. Molecular mechanisms of trastuzumab resistance. *Breast Cancer Res* 2006;8:215.
14. Marty M, Cognetti F, Maraninchi D, Sznuder R, Mauriac L, Taubiana-Hulin M, et al. Randomized phase II trial of the efficacy and safety of trastuzumab combined with docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer administered as first-line treatment. *J Clin Oncol* 2005;23:4265-74.
15. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001;15:344(11):783-92.
16. Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE, Davidson NE, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005;353:1673-84.
17. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005;353:1659-72.
18. Badve SS. Standardisation of HER2 testing-inconsistency raises questions. *Connect Dako* 2008;11:58-60.
19. Dhesy-Thind B, Pritchard KI, Messersmith H, O'Malley F, Elavathil L, Trudeau M. HER2/neu in systematic therapy for women with breast cancer: a systematic review. *Breast Cancer Res Treat* 2008;109:209-29.
20. Yeon C, Pegram MD. Anti-erbB-2 antibody trastuzumab in the treatment of HER2-amplified breast cancer. *Invest New Drugs* 2005;23:391-409.
21. Amar S, Moreno-Aspitia, Perez EA. Issues and controversy in the treatment of HER2 positive metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2008;109:1-7.
22. Press MF, Sauter G, Bernstein L, Villalobos IE, Miralcher M, 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.
23. Bilous M, Dowsett M, Hanna W, Isola J, Lebeau A, et al. Current perspectives on HER2 testing: a review of national testing guidelines. *Mod Pathol* 2003;16(2):173-82.
24. Ellis IO, Bartlett J, Dowsett M, Humphreys S, Jasani B, et al. Best practice no 176: updated recommendations for HER2 testing in the UK. *J Clin Pathol* 2004;57:233-7.
25. Walker RA, Bartlett JMS, Dowsett M, Ellis IO, Hanby AM, et al. HER2 testing in the UK: further update to recommendations. *J Clin Pathol* 2008;61:818-24.
26. Wolff AC, Hammond EH, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, et al. 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;25:118-45.
27. Hanna W, O'Malley FP, Barnes P, Berendt R, Gaboury L, et al. Practice guideline series: updated recommendations from the Canadian National Consensus Meeting on HER2/neu testing in breast cancer. *Curr Oncol* 2007;14:149-53.
28. Hsu C, Ho DM, Yang C, Lai A, Yu I, Chiang H. Inter-observer reproducibility of Her-2/neu protein overexpression in invasive breast carcinoma using the DAKO HercepTest. *Am J Clin Pathol* 2002;118:693-8.
29. Bartlett JMS. Fluorescence in situ hybridization. Chapter 6. In: Roulston JE, Bartlett JMS, eds. *Methods in molecular medicine: molecular diagnosis of cancer*. Vol. 79. Totowa, NJ: Humana Press; 2004.
30. Bartlett JMS, Forsyth A. HER2 FISH in breast cancer. Chapter 7. In: Roulston JE, Bartlett JMS, eds. *Methods in molecular medicine: molecular diagnosis of cancer*. Vol. 79. Totowa, NJ: Humana Press; 2004.
31. Persos DL, Bui MM, Lowery MC, Mark HL, Yung J, et al. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for determination of HER-2/neu amplification in breast cancer: a multicenter portability study. *Ann Clin Lab Sci* 2000;30:41-8.
32. Ma Y, Lespagnard L, Durbecq V, Paesmans M, Desmedt C, et al. Polysomy 17 in HER-2/neu status elaboration in breast cancer: effect on daily practice. *Clin Cancer Res* 2005;11(12): 4393-9.
33. Hyun CL, Lee HE, Kim KS, Kim SW, Kim JH, et al. The effect of chromosome 17 polysomy on HER-2/neu status in breast cancer. *J Clin Pathol* 2008;61:317-21.

34. Isola J, Tanner M. Chromogenic in situ hybridization in tumor pathology. Chapter 10. In: Roulston JE, Bartlett JMS, eds. *Methods in molecular medicine: molecular diagnosis of cancer*. Vol. 79. Totowa, NJ: Humana Press; 2004.
35. 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 hybridization (FISH) in breast cancer: a study of two hundred cases. *Breast* 2006;15:519-27.
36. Marquez A, Wu R, Zhao J, Yu Y, Tao J, Shi Z. Detection of EGFR gene amplification and protein expression by chromogenic in situ hybridization (CISH) and immunohistochemistry (IHC) in a series of archival human cancers. *Diagn Mol Pathol* 2004;13:1-8.
37. Zhao J, Wu R, Au A, Marquez A, Yibing Y, Zuerong S. Determination of HER2 gene amplification by chromogenic in situ hybridization (CISH) in archival breast carcinoma. *Mod Pathol* 2002;15(6):657-65.
38. Hanna WM, Kwok K. Chromogenic in-situ hybridization: a viable alternative to fluorescence in-situ hybridization in the HER2 testing algorithm. *Mod Pathol* 2006;19:481-7.
39. Tanner M, Gancberg D, Di Leo A, Larsimont D, Rouas G, et al. 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* 2000;157:1467-72.
40. Bhargava R, Lal P, Chen B. Chromogenic in situ hybridization for the detection of HER-2/neu gene amplification in breast cancer with an emphasis on tumors with borderline and low-level amplification. *Am J Pathol* 2005;123:237-43.
41. Gong Y, Gilcrease M, Sneige N. Reliability of chromogenic in situ hybridization for detecting HER-2 gene status in breast cancer: comparison with fluorescence in situ hybridization and assessment of interobserver reproducibility. *Mod Pathol* 2005;18:1015-21.
42. Vocaturo A, Novelli F, Benevolo M, Piperno G, Marandino F, et al. Chromogenic in situ hybridization to detect HER-2/neu gene amplification in histological and ThinPrep-processed breast cancer fine-needle aspirates: a sensitive and practical method in the trastuzumab era. *Oncologist* 2006;11:878-86.
43. Di Palma S, Collins N, Bilous M, Sapino A, Mottolese M, et al. A quality assurance exercise to evaluate the accuracy and reproducibility of chromogenic in situ hybridization for HER2 analysis in breast cancer. *J Clin Pathol* 2008;61:757-60.
44. Dowsett M, Bartlett J, Ellis IO. Correlation between immunohistochemistry (herceptTest) and fluorescence in situ hybridization (FISH) for HER-2 in 426 breast carcinomas from 37 centres. *J Pathol* 2003;199:418-23.
45. Dybdal N, Lieberman G, Anderson S. Determination of HER2 gene amplification by fluorescence in situ hybridization and concordance with the clinical trials: immunohistochemical assay in women with metastatic breast cancer evaluated for treatment with trastuzumab. *Breast Cancer Res Treat* 2005;93:3-11.
46. Paik S, Bryant J, Tan-Chin E. Real-world performance of HER2 testing-National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project experience. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:852-4.
47. Kumar Pal S, Pegram M. HER2 targeted therapy in breast cancer...beyond Herceptin. *Rev Endocr Metab Disord* 2007;8:269-77.
48. Valabrega G, Montemurro F, Aglietta M. Trastuzumab: mechanism of action, resistance and future perspectives in HER2-overexpressing breast cancer. *Ann Oncol* 2007;18:977-84.
49. Baselga J. Evolving options and future challenges for targeted therapies in ErbB2 (HER2)-positive breast cancer. *Eur J Cancer Suppl* 2008;6(5):1-6.

Summary

Introduction

Testing for human epidermal growth factor receptor-2 in breast cancer at the time of primary diagnosis is now the standard of care. Positivity for epidermal growth factor receptor-2 in breast cancer is a prognostic factor regarding tumor aggressiveness and a predictive factor for response to Herceptin. Accurate assessment is essential to ensure that all patients who may benefit from Herceptin are correctly identified.

Assay method

The principal testing methods used for determination of epidermal growth factor receptor-2 status are immunohistochemistry for protein overexpression and in situ hybridization using either fluorescence or a chromogen. Immunohistochemical testing method allows identification of epidermal growth factor receptor-2 positive patients (3+) who may benefit from Herceptin therapy, whereas negative patients (0/1+) can be excluded. A proportion of specimens defined as equivocal by

immunohistochemistry (2+) must be retested by in situ hybridization to determine their status. Chromogen in situ hybridization is a method for determination of gene amplification using a peroxidase-based chromogenic reaction, which can be viewed using a conventional bright field microscope and it determines the actual degree of gene amplification. Various factors can affect the results achieved with these assays, including the assay antibody/probe, the methodology and the experience of personnel. Many countries implemented national testing guidelines in an attempt to standardize testing procedures and make results more accurate.

Conclusion

The key point underlined by this review is that whatever method is used to test HER2 status, the technology must be validated first, and there must be regular internal and external quality assurance procedures.

Key words: Epidermal Growth Factor; Breast Neoplasms; Immunohistochemistry; In Situ Hybridization; Gene Amplification; Quality Control

Rad je primljen 24. XI 2009.

Prihvaćen za štampu 28. XII 2009.

BIBLID.0025-8105;(2009):LXII:1-2:69-74.