

Her2 fehérje overexpresszió gyomorrákokban:

Hazai tapasztalatok

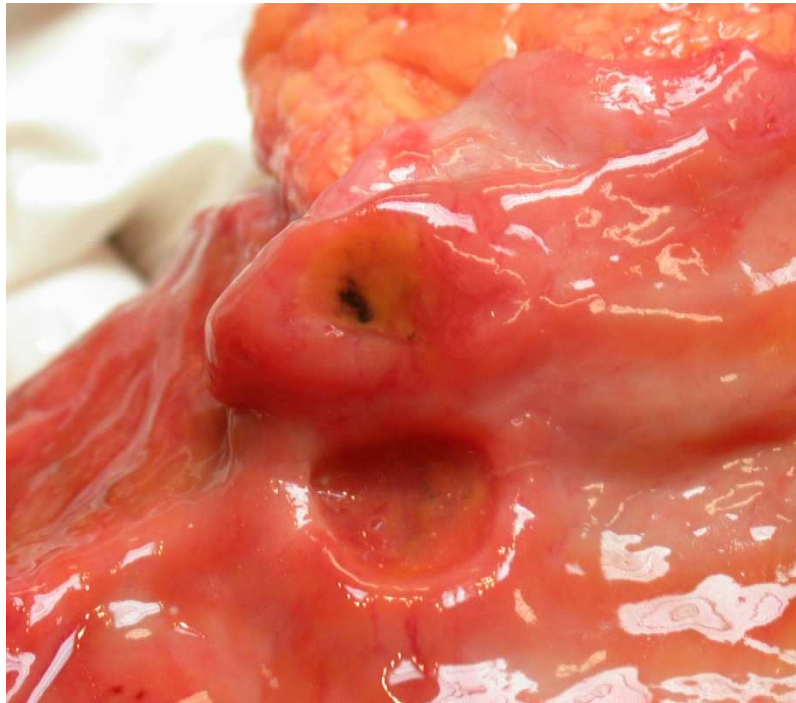
Dr. Lotz Gábor, Dr. Szirtes Ildikó,

Dr. Kiss András

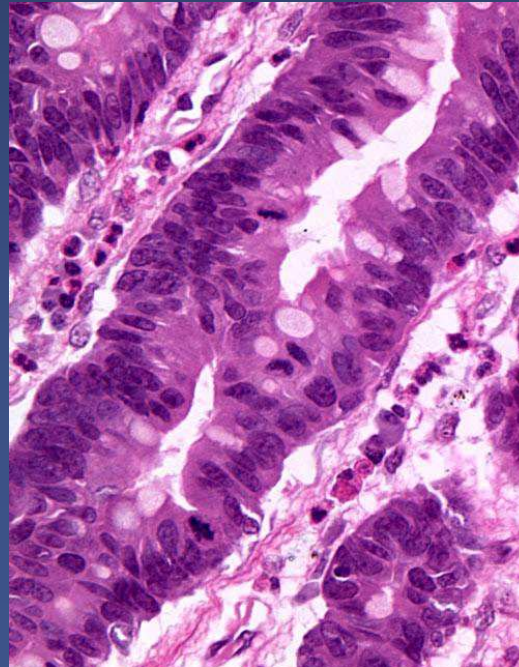
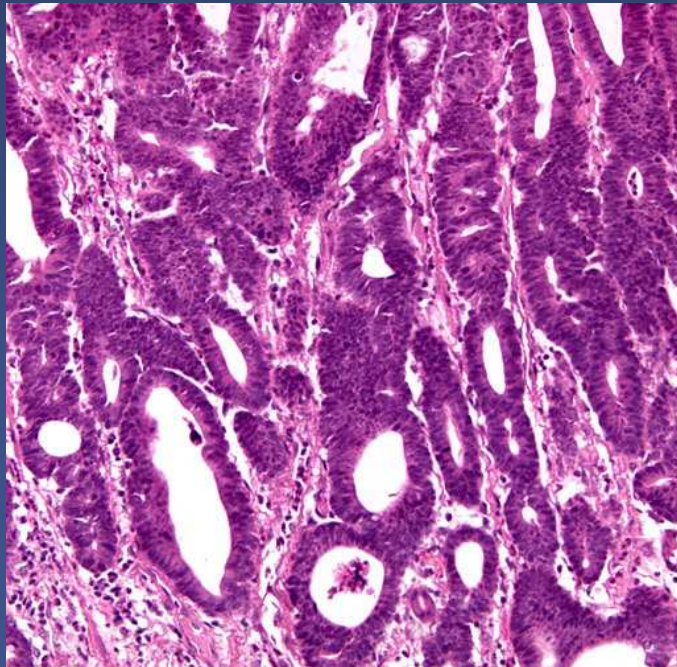
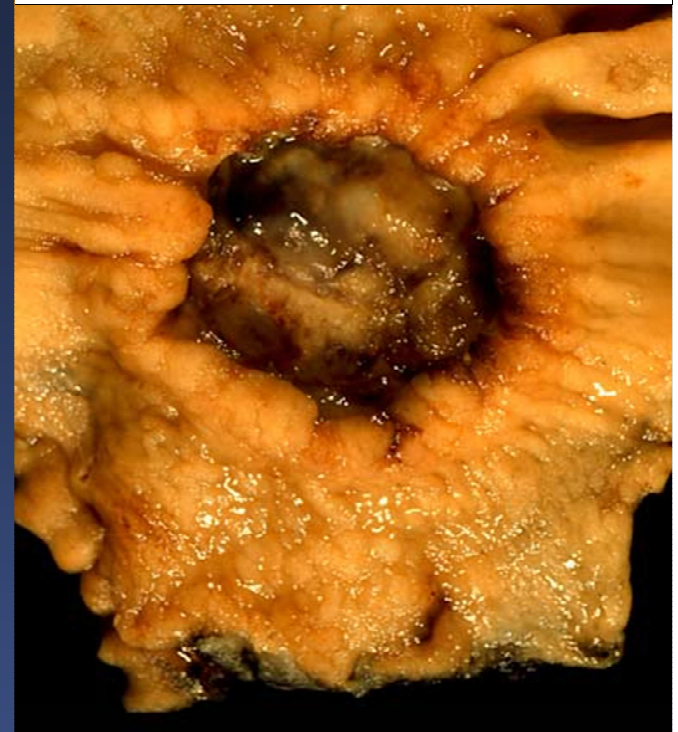
Prof. Tímár József, Prof. Kulka Janina

Semmelweis Egyetem

II. Pathológiai Intézet

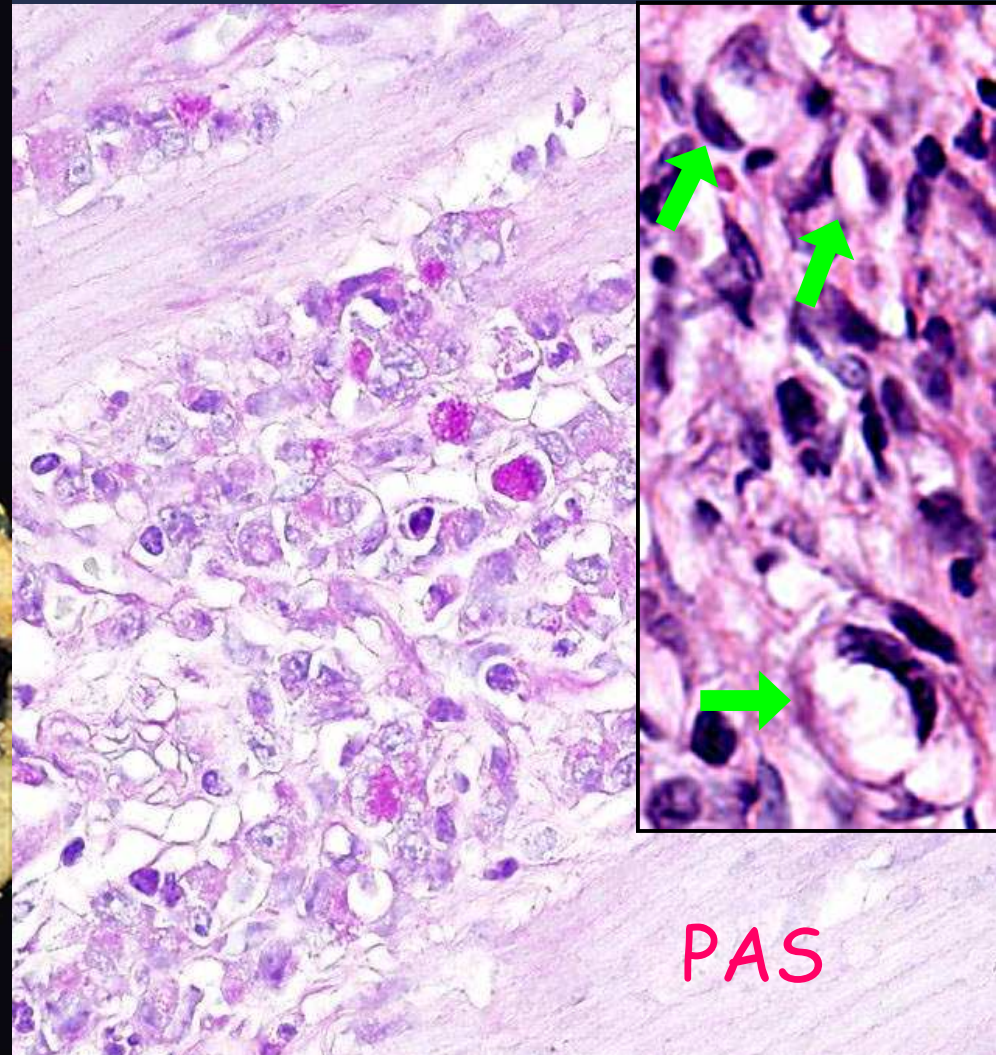


- Exophyticus
(kiemelkedő,
polipoid)
- Exulcerált
(felhányt szélű
„fekély”)

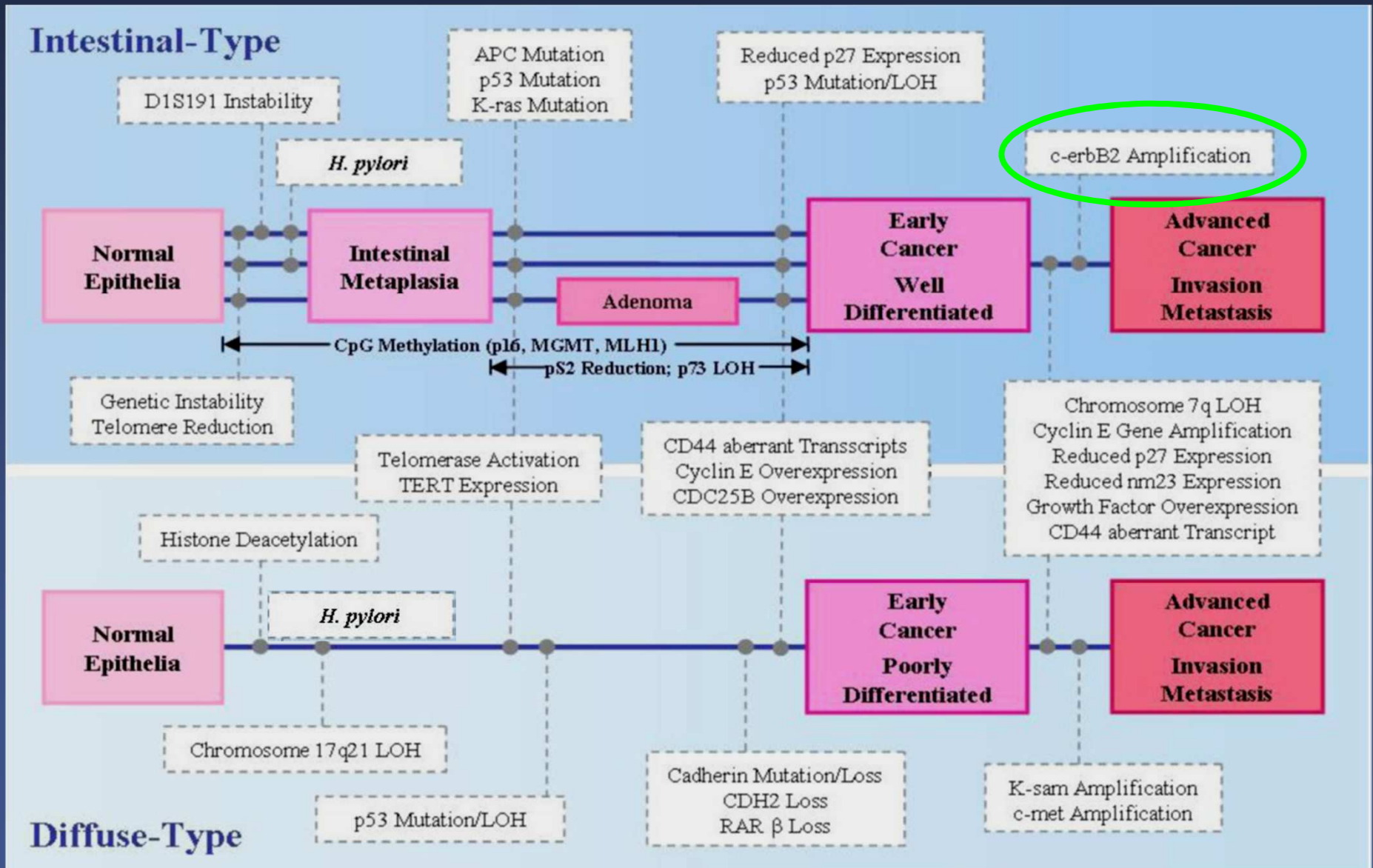


- Szövettanilag:
intestinális (bél)
típusú gyomor
adenocarcinoma

Linitis plastica: diffúzan infiltráló
szövettanilag:
diffúz, pecsétgyűrűsejtes



Carl-McGrath et al: Gastric adenocarcinoma: epidemiology, pathology and pathogenesis (Cancer Therapy Vol 5, 877-894, 2007)

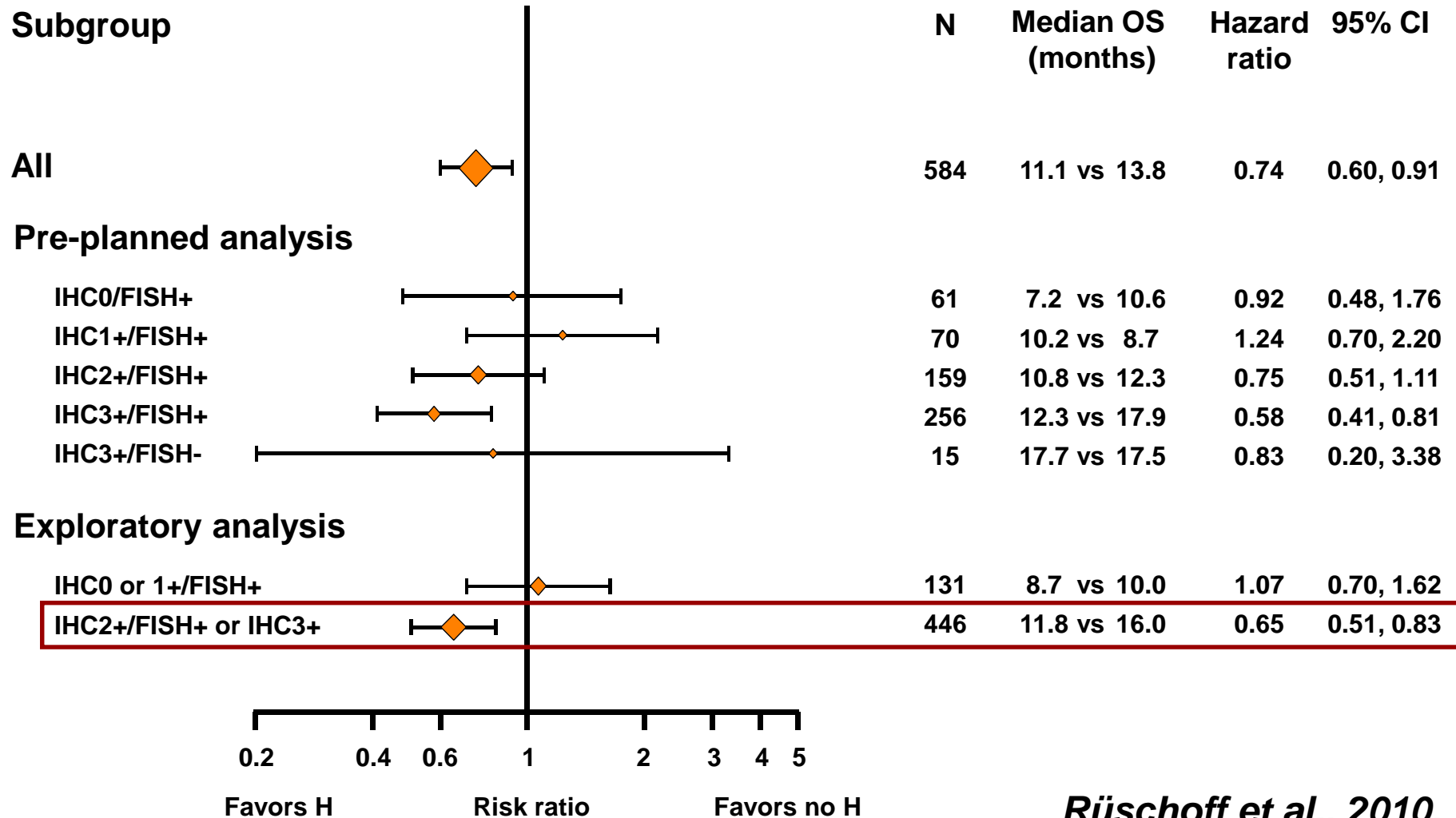


A Her2 státusz vizsgálatának jelentősége

c-erbB2 vagy Her2/neu:

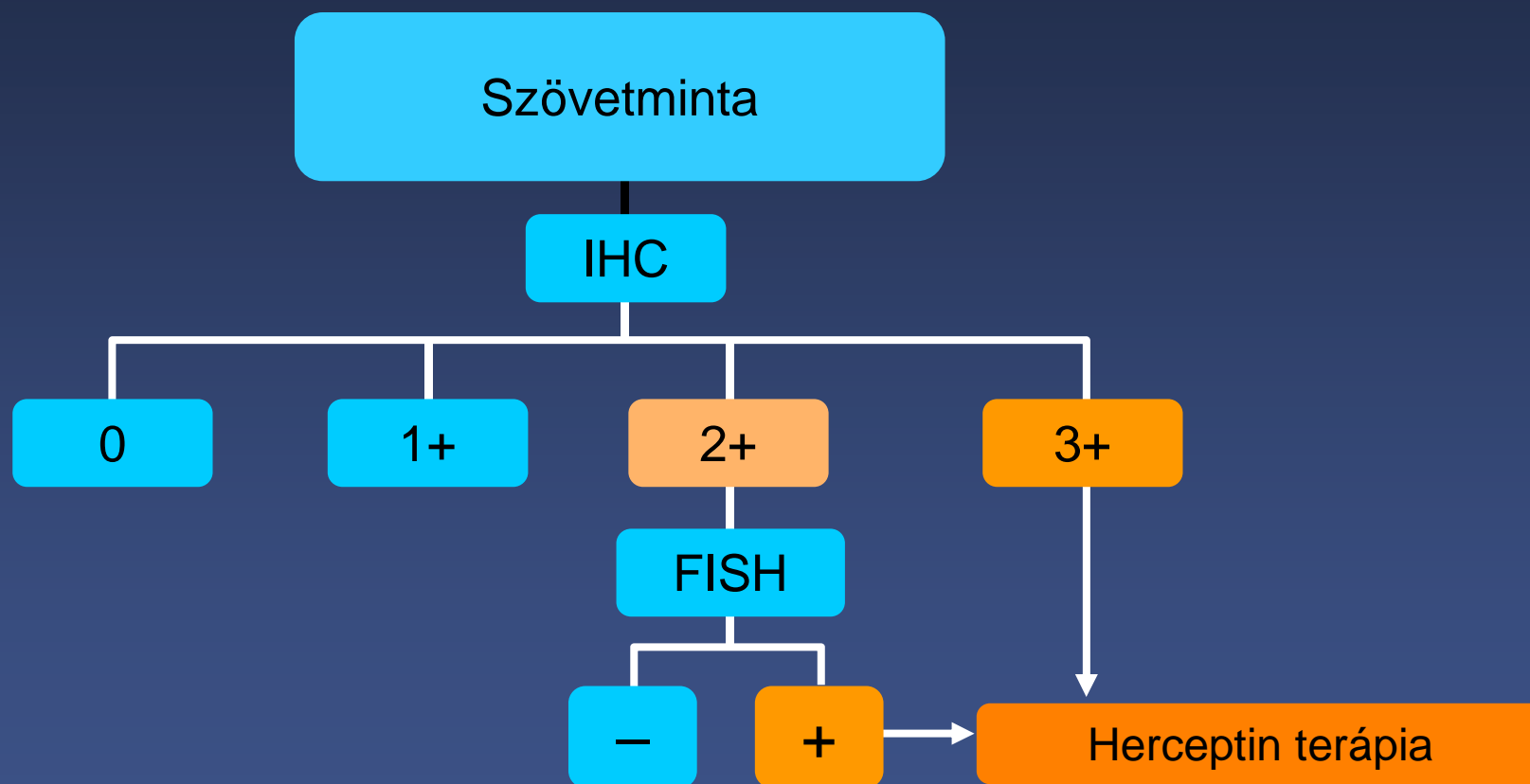
- gén: 17-es kromoszómán, EGF-R család tagja
- fehérje: 185 kD, transzmembrán, tirozinkináz aktivitású növekedési faktor receptor
- szerepe: sejtproliferáció, migráció, metastasis
- a Her2 státusz tekintetében leginkább vizsgált invazív emlőrákok kb. 20%-ában mutatható ki overexpressziója, melynek hátterében többnyire a Her2 gén amplifikációja (felsokszorozódása) áll
- kimutatásának jelentősége: célzott, molekuláris biológiai alapokon nyugvó anti-Her2 terápia (Herceptin®) emlő- és áttétes gyomorrák esetén

Efficacy: OS by HER2 status

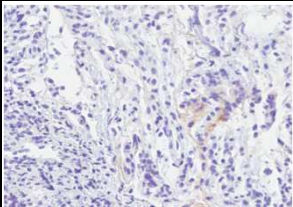
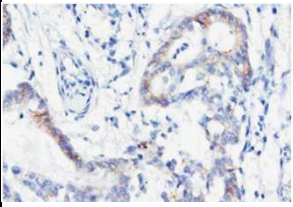
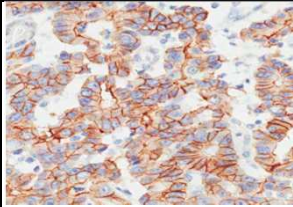
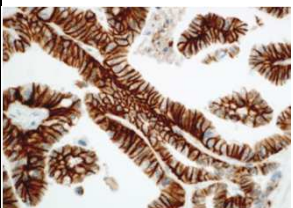


Rüschhoff et al., 2010.

Ajánlott HER2 diagnosztikai algoritmus



Her2 értékelési kritériumok gyomorrákban

	Score	Sebészi minta – festődési mintázat	Biopsziás minta – festődési mintázat	Fokozott Her2 expresszió értékelés
	0	Nincs specifikus festődés vagy bármilyen membránfestődés a tumorsejtek kevesebb mint 10%-ában	Nincs festődés illetve nincs membránfestődés egyetlen tumorsejtben sem	Negatív
	1+	Halvány/ alig észlelhető, vagy részleges membrán- festődés a tumorsejtek legalább 10%-ában	Tumorsejtcsoportok halvány/ alig észlelhető, vagy részleges membránfestődése, ezen sejtek százalékos arányától függetlenül	Negatív
	2+	Gyenge / közepes fokú komplett, basolateralis v. lateralis membránfestődés a tumorsejtek legalább 10%- ában	Tumorsejtcsoportok gyenge/ közepes fokú, komplett, baso- lateralis v. lateralis membrán- festődése, ezen sejtek százalékos arányától függetlenül	Kérdéses
	3+	Erős komplett, basolateralis v. lateralis membránfestődés a tumorsejtek legalább 10%- ában	Tumorsejtcsoportok erős, komplett, basolateralis v. lateralis membránfestődése, ezen sejtek százalékos arányától függetlenül	Pozitív

Herceptin EU SmPC: <http://www.ema.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/>

[Herceptin/emea-combined-h278en.pdf](http://www.ema.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/Herceptin/emea-combined-h278en.pdf)

Images: <http://www.herceptin.net/portal/eipf/pb/herceptin/trastuzumab/methodologies>

A gyomorrákok Her2 diagnosztikájának egyedi jellemzői

Mintagyűjtés

- Többszörös biopszia, legalább 5, de inkább 6-8 ajánlott (ld. tumor heterogenitás!)
- Rezekciós preparátum: intesztinális típusú ráknál negatív Her2 IHC esetén egy további blokkból is ajánlott a Her2 vizsgálat

Szöveti jellemzők

- A tumoron belüli Her2 expressziós heterogenitás igen nagy (kis Her2 pozitív fókuszok)
- Az egész minta különösen gondos áttekintése szükséges IHC és FISH esetén

Diagnosztikai algoritmus

- Hasonló az emlőrákhoz
 - Elsődlegesen IHC
 - Her2-pozitív: IHC 3+ vagy IHC 2+/FISH+
- FISH+ de IHC 0/1+ tumor: negatív!

Átfutási idő

- Rövidebb átfutási idő lehet szükséges (a gyomorrákok általában gyorsabban progrediálnak, mint az emlőcarcinomák)

Értékelési kritériumok

- Erős bazolaterális, laterális vagy komplett membránfestődés a tumorsejtek $\geq 10\%$ -ában: pozitív (IHC)
- Nincs százalékosan meghatározott alsó határértéke a pozitivitásnak biopsziákban

Table 1. HER2 over-expression in gastric cancer: results of a literature survey of studies with ≥ 100 patients

Study (first author, year)	n	Country	Over-expression, %	Prognostic
Yonemura, 1991 [16]	260	Japan	11.9	yes
Roh, 1992 [17]	109	Korea	31.0	yes
Yonemura, 1992 [18]	220	Japan	10.0	yes
Uchino, 1993 [19]	214	Japan	9.8	yes
Lee, 1996 [20]	225	Korea	27.4	yes
Shun, 1997 [21]	112	Taiwan	30.3	yes
Ooi, 1997 [22]	396	Japan	10.1	-
Ishikawa, 1997 [23]	375	Japan	10.4	-
Wu, 1997 [24]	163	Taiwan	26.4	yes
Allgayer, 2000 [25]	189	Germany	53.4	yes
Ougolkov, 2000 [26]	116	Japan	16.0	-
Sanz-Ortega, 2000 [27]	143	Spain	31.0	yes
Wang, 2002 [28]	100	Taiwan	32.0	yes
Ghaderi, 2002 [29]	146	Iran	16.4	-
Takehana, 2002 [30]	352	Japan	8.2	yes
Pinto-de-Sousa, 2002 [31]	157	Portugal	15.3	yes
Lee, 2003 [32]	841	Korea	17.0	-
Yano, 2006 [33]	200	Japan	23.0	-
Park, 2006 [34]	182	Korea	15.9	yes
Hofmann, 2008 [35]	168	China/ Mexico/ Germany	10.7	-
Barros-Silva, 2009 [36]	463	Portugal	9.3	-
Marx, 2009 [37]	166	Germany	16.9	-
Yu, 2009 [38]	1,143	China	28.0	-
Zhang, 2009 [39]	102	China	18.6	yes

- A közölt tanulmányokban a Her2-t túlexpresszáló gyomorrákok aránya 8,2% és 53,4% között változik

Table 1. HER2 over-expression in gastric cancer: results of a literature survey of studies with ≥ 100 patients

Study (first author, year)	n	Country	Over-expression, %	Prognostic
Yonemura, 1991 [16]	260	Japan	11.9	yes
Roh, 1992 [17]	109	Korea	31.0	yes
Yonemura, 1993 [18]	220	Japan	10.0	yes

- A közölt tanulmányokban a Her2-t túlexpresszáló gyomorrákok aránya 8,2% és 53,4% között változik

Table 2. HER2 amplification in gastric cancer: results of a literature survey of studies with ≥ 100 patients

Study (first author, year)	Test	n	Country	Amplification, %	Prognostic
Ishikawa, 1997 [23]	FISH	105	Japan	18.1	-
Tanner, 2005 [40]	CISH	231	Finland	17.3	yes
Yano, 2006 [33]	FISH	199	Japan	27.1	-
Hofmann, 2008 [35]	FISH	168	China/Mexico/Germany	17.4	-
Marx, 2009 [37]	FISH	166	Germany	16.0	-

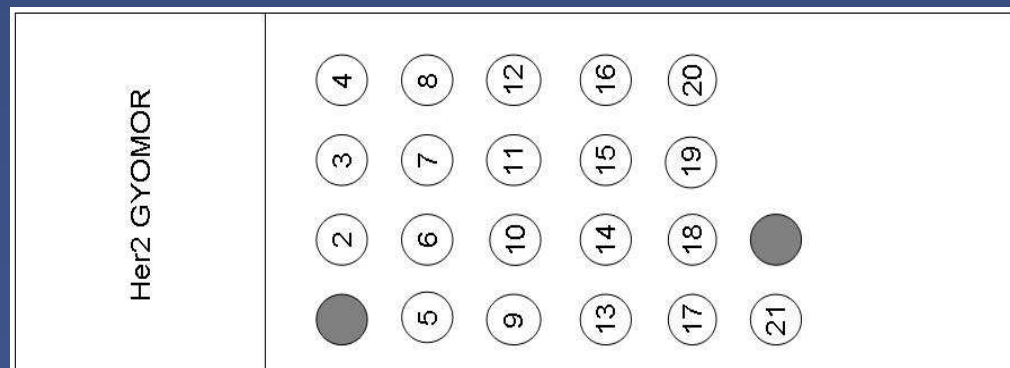
Takemura, 2002 [30]	FISH	332	Japan	8.2	yes
Pinto-de-Sousa, 2002 [31]	FISH	157	Portugal	15.3	yes
Lee, 2003 [32]	FISH	841	Korea	17.0	-
Yano, 2006 [33]	FISH	200	Japan	23.0	-
Park, 2006 [34]	FISH	182	Korea	15.9	yes
Hofmann, 2008 [35]	FISH	168	China/ Mexico/ Germany	10.7	-
Barros-Silva, 2009 [36]	FISH	463	Portugal	9.3	-
Marx, 2009 [37]	FISH	166	Germany	16.9	-
Yu, 2009 [38]	FISH	1,143	China	28.0	-
Zhang, 2009 [39]	FISH	102	China	18.6	yes

- Her2 amplifikáció a gyomorrákokban: 16% és 27,1% között változik a közölt adatok szerint

A Semmelweis Egyetem II. Pathologiai Intézetének összehasonlító antitestvizsgálata

Anyag és módszer

- Esetszám: 77 beteg
 - a) 20 gyomorbiopsziás minta, 57 gyomorrezekciós preparátum
 - b) 50 intesztinalis típusú adenocarcinoma
 - 17 pecsétgyűrűsejtes adenocarcinoma
 - 3 kevert típusú (kétkomponensű: intesztinális+diffúz)
 - 6 anaplasztikus carcinoma
 - 1 sarcomatoid carcinoma
- Szöveti mikrosorozat (Tissue MicroArray; TMA) blokkok - 4 db,
3-5 µm vastag metszetek készítése



A Semmelweis Egyetem II. Patológiai Intézetének összehasonlító antitestvizsgálata

Anyag és módszer

- Her2 diagnosztikai eszközök:

a) Her2 IHC primer antitestek:

- **Spring Bioscience** anti-c-erbB-2/HER-2 (antitest klón: **SP3**)
Nyúl monoklonális antitest - a receptor extracelluláris doménje ellen
- **Dako HercepTest™**
Nyúl poliklonális antitest - intracitoplazmatikus domén ellen
- **Ventana PATHWAY** anti-HER-2-neu (antitest klón: **4B5**)
Nyúl monoklonális antitest - intracitoplazmatikus domén ellen

b) Her2 FISH (referencia):

ZytoLight HER2/CEN17 Dual Color Probe Kit (ZytoVision)

Her2/neu gén: **zöld fluoreszcencia**

17-es kromoszóma centromer: **narancs-vörös fluoreszcencia**

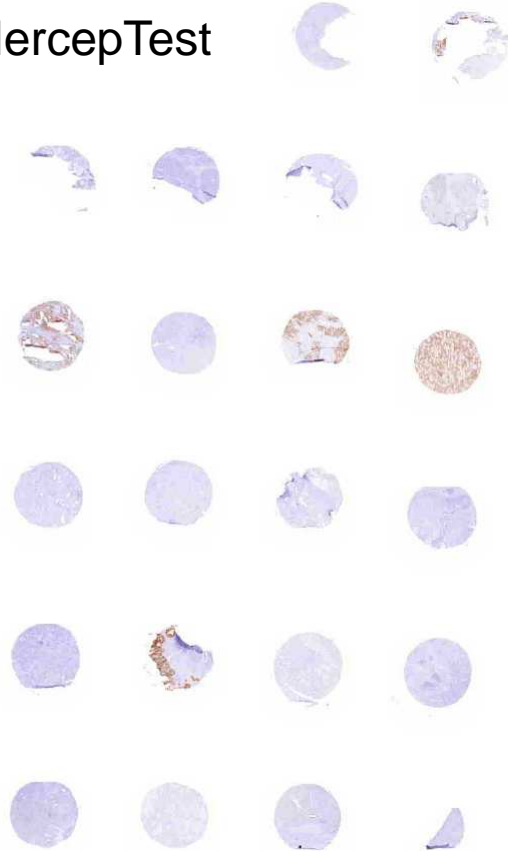
A Semmelweis Egyetem II. Patológiai Intézetének összehasonlító antitestvizsgálata Eredmények

- Mindhárom primer antitest értékelhető eredményeket adott a TMA metszeteken
- a HercepTest gyári protokollját módosítani kellett a megfelelő festődés érdekében

SP3



HercepTest



4B5

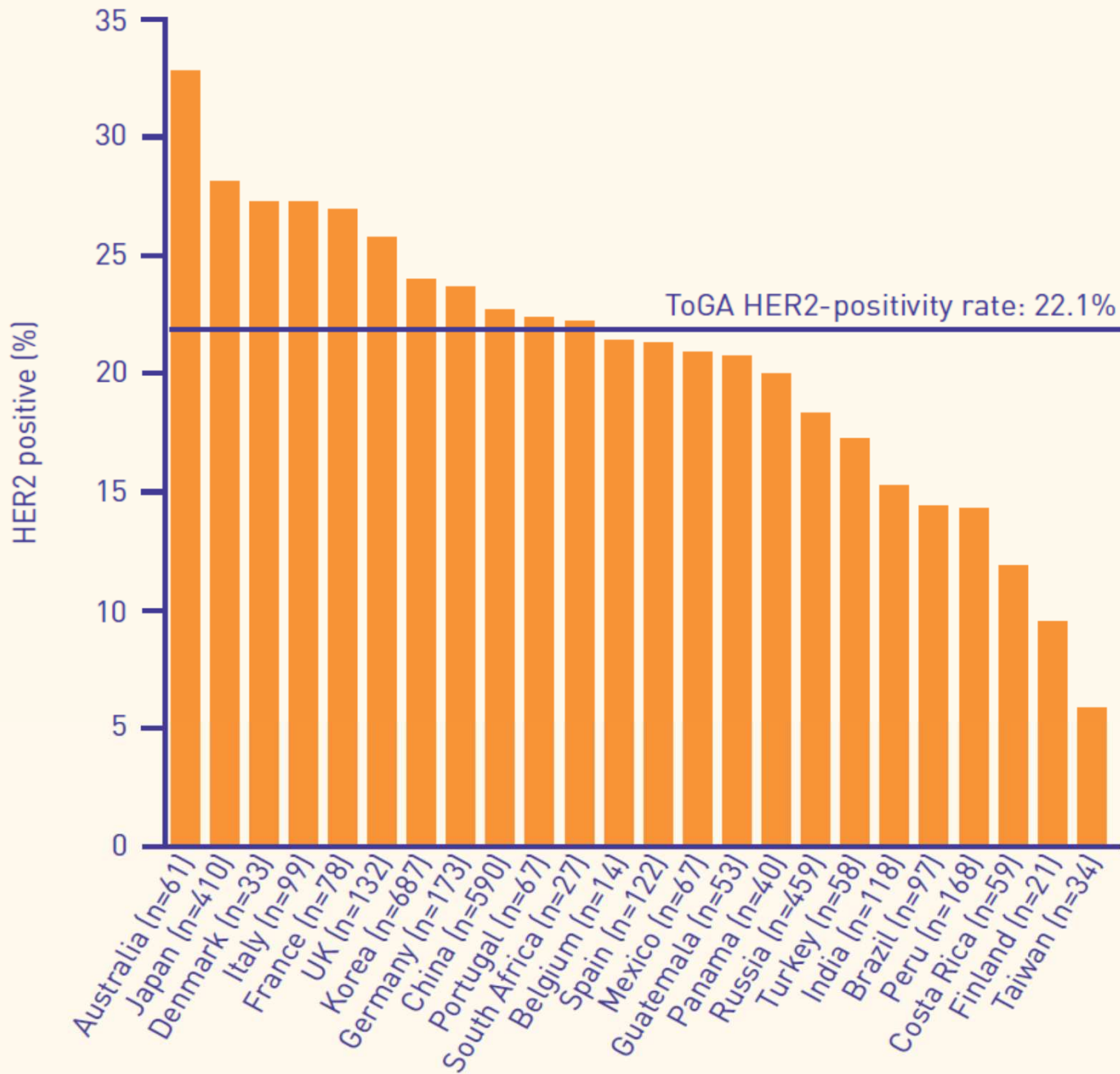


A Semmelweis Egyetem II. Pathologiai Intézetének összehasonlító antitestvizsgálata Eredmények

IHC score	Összes eset Her2 IHC (77 / 100%)			Intestinalis típusú adenocarcinoma (50 / 65%)			Sigillocellularis adenocarcinoma (17 / 22%)			Kétkomponensű: intestinalis + diffúz (3 / 4%)			Anaplasticus cc , sarcomatoid cc (7 / 9%)		
	SP3	H.T.	4B5	SP3	H.T.	4B5	SP3	H.T.	4B5	SP3	H.T.	4B5	SP3	H.T.	4B5
0	51%	66%	62%	26%	38%	36%	17%	21%	17%	1,3%	-	2,6%	6,4%	7,8%	6,4%
1+	27%	17%	22%	19%	13%	14%	5%	1,3%	5%	-	2,6%	-	2,6%	-	2,6%
2+	13%	6,5%	2,6%	12%	5%	2,6%	-	-	-	1,3%	-	-	-	1,3%	-
3+	9%	10,5%	13%	8%	9%	12%	-	-	-	1,3%	1,3%	1,3%	-	-	-
0/1+	78%	83%	84%	45%	51%	50%	22%	22%	22%	1,3%	2,6%	2,6%	9%	7,8%	9%
2/3+	22%	17%	16%	20%	14%	15%	-	-	-	2,6%	1,3%	1,3%	-	1,3%	-

A Semmelweis Egyetem II. Patológiai Intézetének összehasonlító antitestvizsgálata Eredmények

IHC score	Összes eset Her2 IHC (77 / 100%)			Nem-amplifikált, nem-poliszómiás FISH (42 / 54,5%)			Nem-amplifikált, poliszómiás FISH (25 / 32,5%)			Amplifikált FISH (10 / 13%)		
	SP3	H.T.	4B5	SP3	H.T.	4B5	SP3	H.T.	4B5	SP3	H.T.	4B5
0	39	51	48	26	32	30	12	19	18	1	-	-
1+	21	13	17	12	8	11	9	4	6	-	1	-
2+	10	5	2	4	2	1	4	2	1	2	1	-
3+	7	8	10	-	-	-	-	-	-	7	8	10



IHC score	Összes eset Her2 IHC (77 / 100%)		
	SP3	H.T.	4B5
0	51%	66%	62%
1+	27%	17%	22%
2+	13%	6,5%	2,6%
3+	9%	10,5%	13%
0/1+	78%	83%	84%
2/3+	22%	17%	16%

A Semmelweis Egyetem II. Pathologiai Intézetének összehasonlító antitestvizsgálata Eredmények

- **Szenzitivitás és specificitás**

(a 2+ esetek pozitívnak vételével)

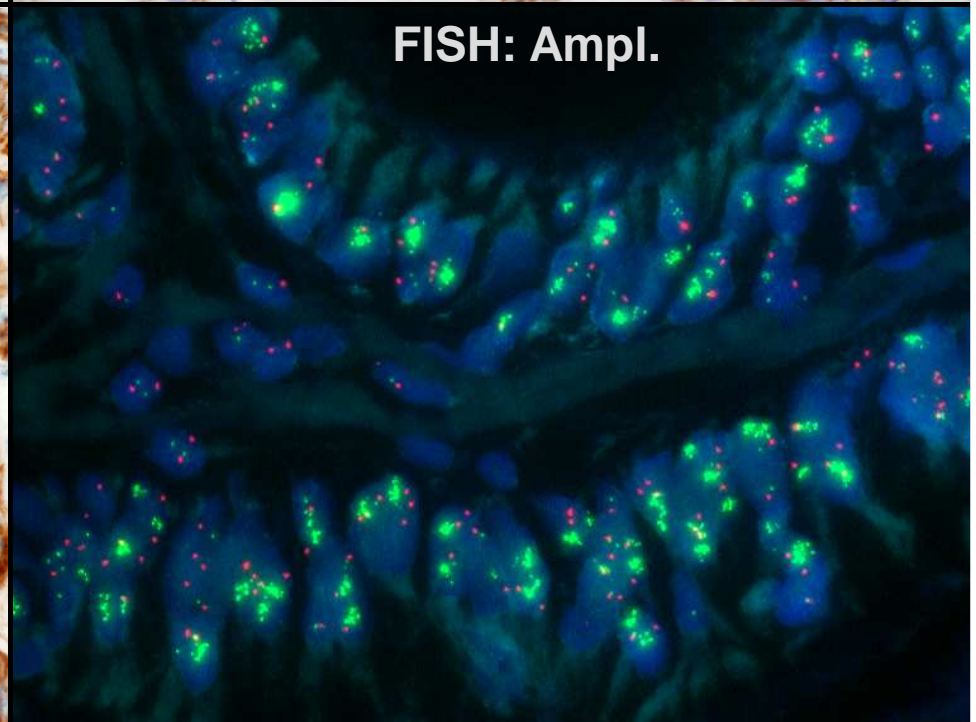
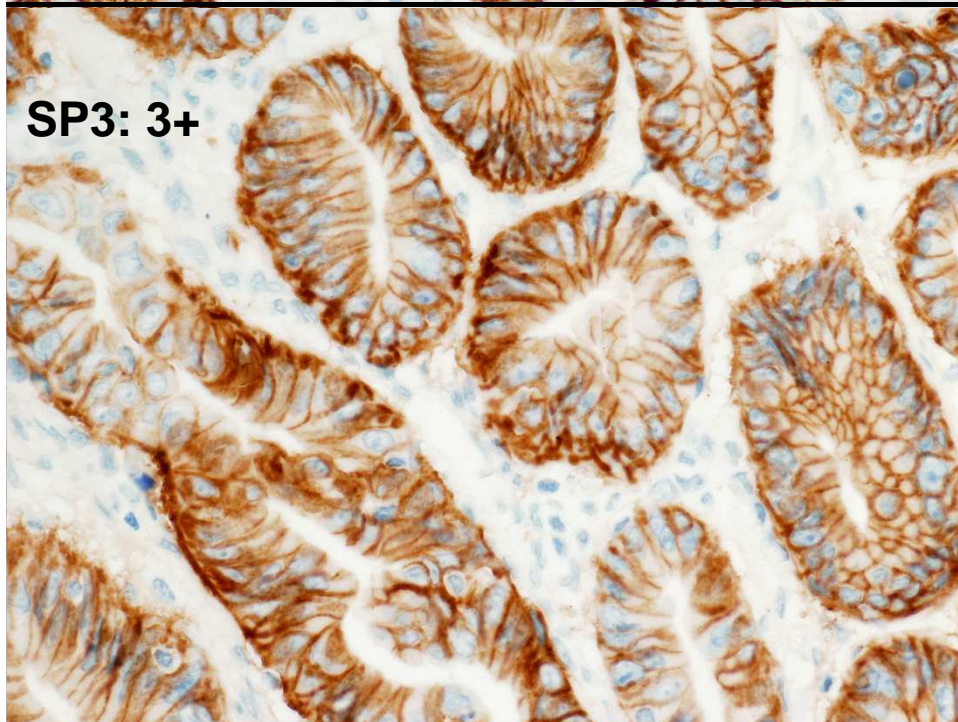
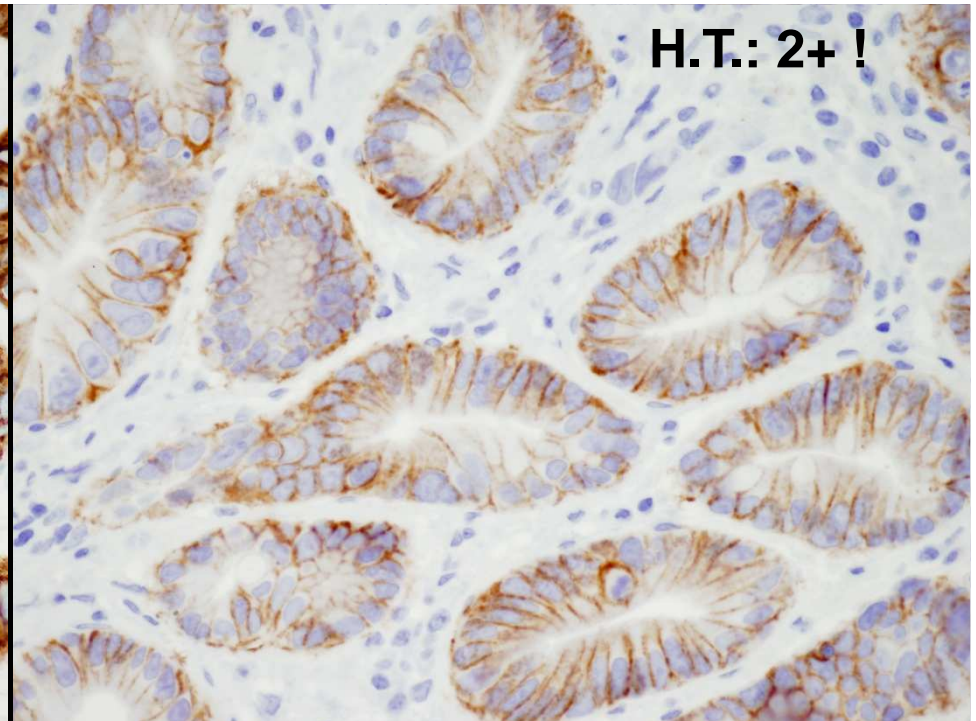
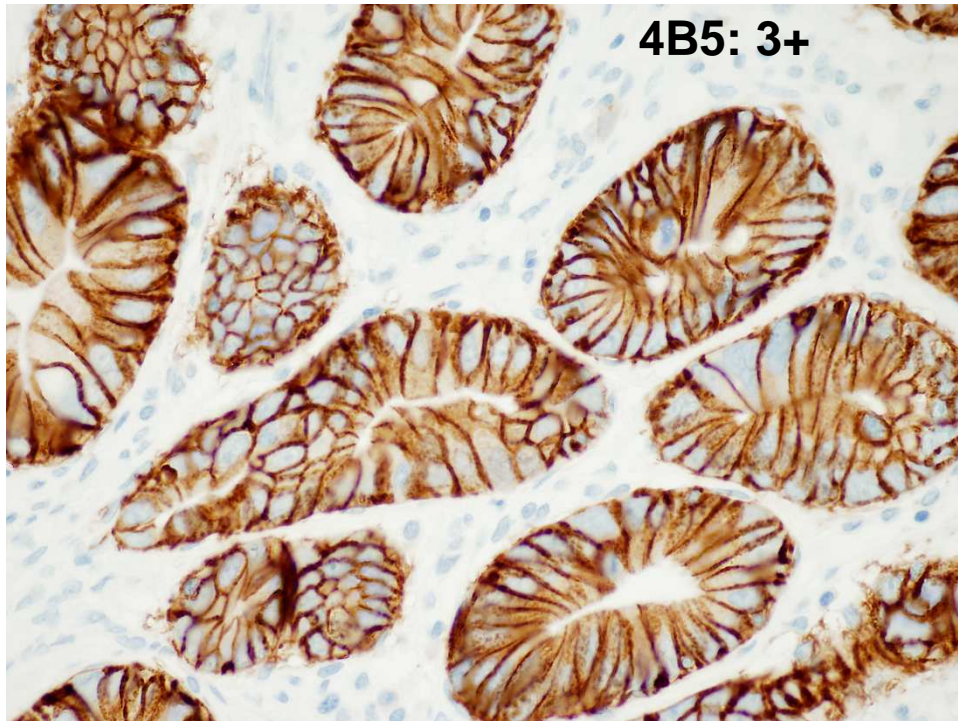
- **Spring SP3:** Szenzitivitás: 90% ; Specificitás: 88%
- **HercepTest:** Szenzitivitás: 90% ; Specificitás: 94%
- **Pathway 4B5:** Szenzitivitás: 100% ; Specificitás: 97%

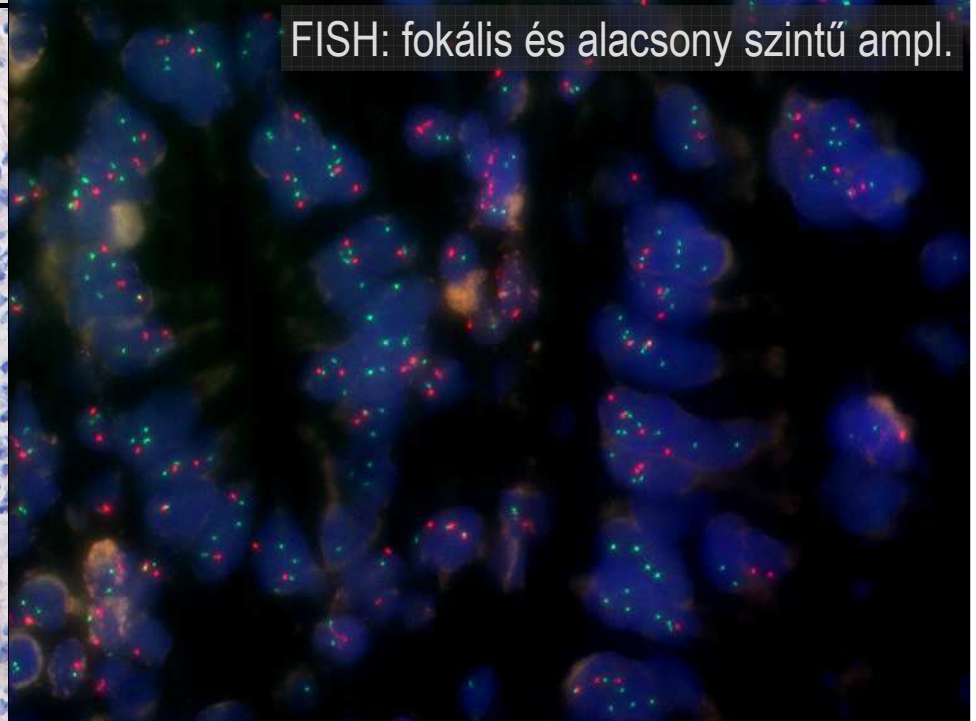
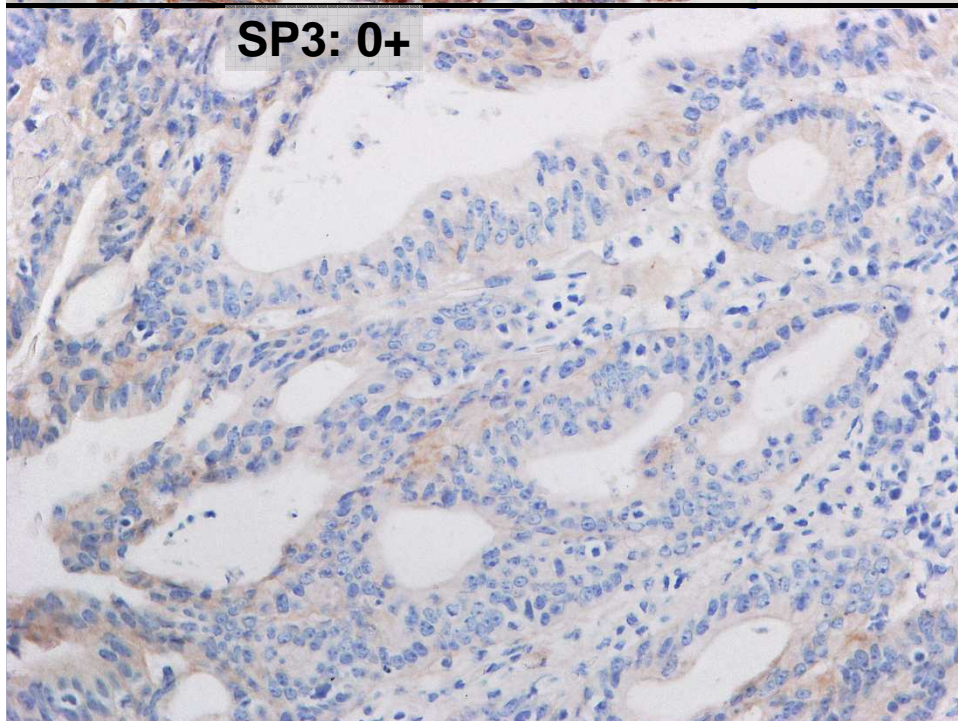
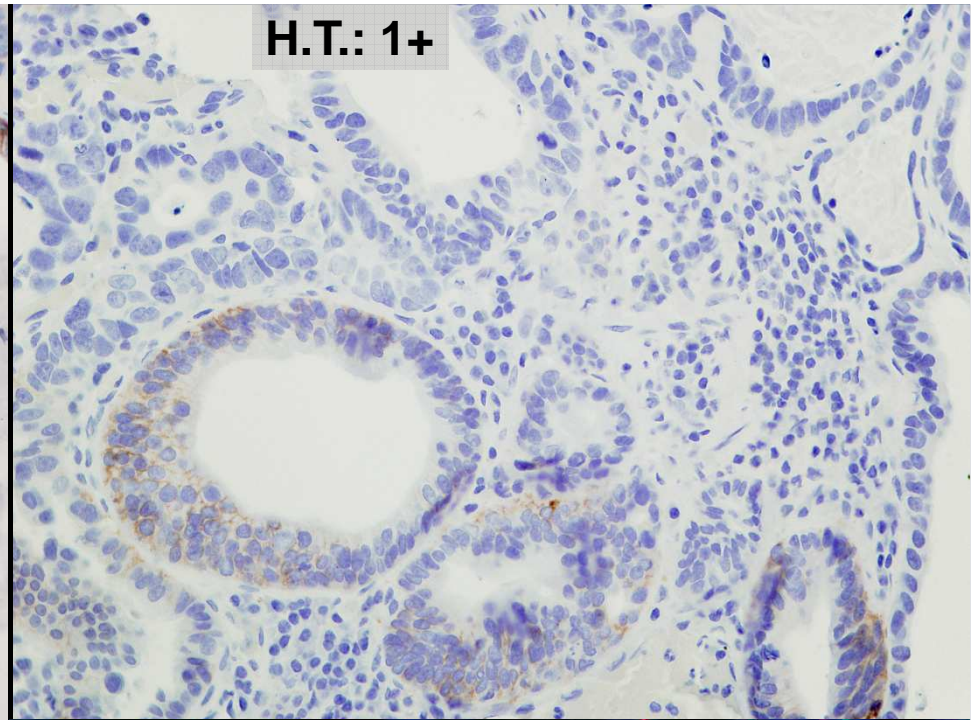
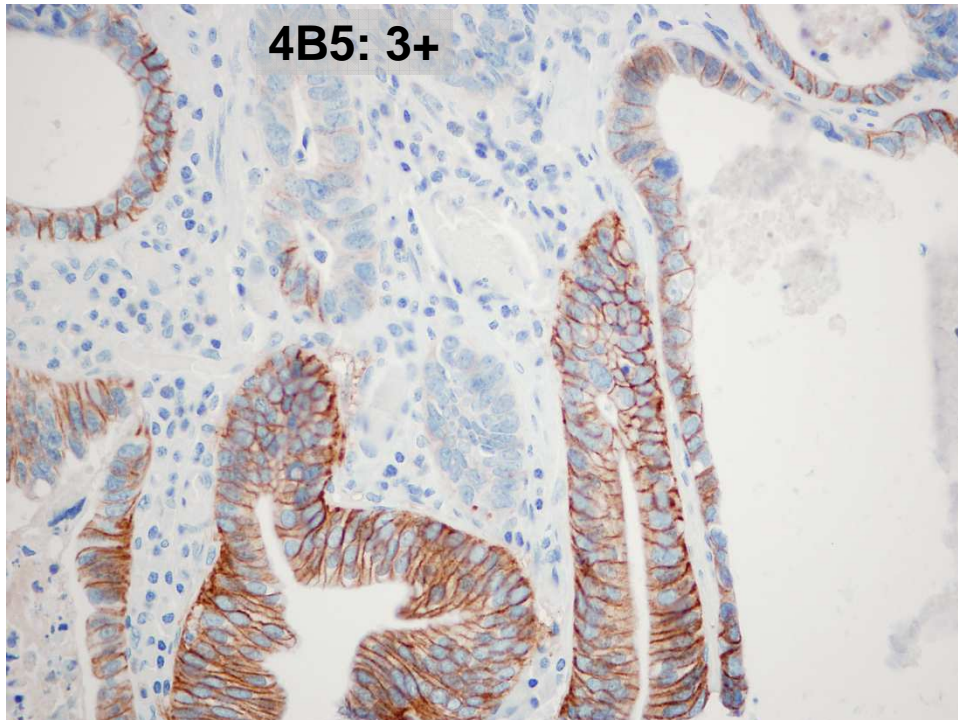
- **Konkordancia**

(Mint hogy a 4B5 bizonyult a legszenzitívebb és legspecifikusabb antitestnek, ezért a FISH, mint referenciamódszer mellett az SP3 és a HercepTest esetében a 4B5-höz viszonyított konkordanciát is kiszámoltuk)

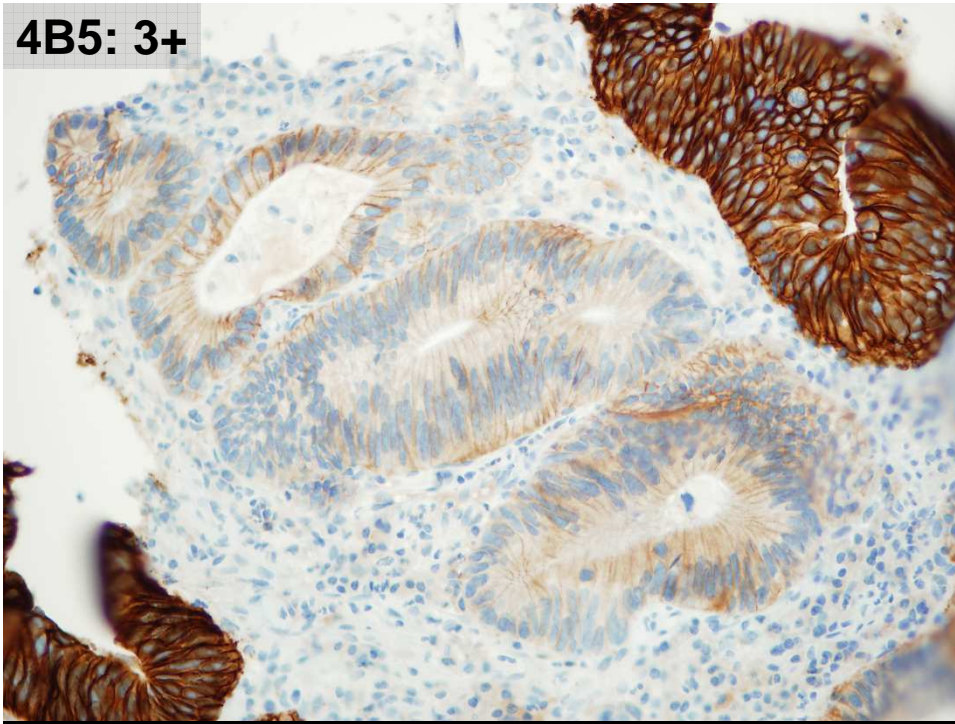
- **SP3** $\kappa = 0,60$ (FISH-el) és $\kappa = 0,53$ (4B5-el)
- **HercepTest**
 $\kappa = 0,78$ (FISH-el) és $\kappa = 0,76$ (4B5-el)
- **4B5** $\kappa = 0,89$ (FISH-el)

1,00-0,81	kitűnő
0,80-0,61	jó
0,60-0,41	közepes
0,40-0,21	gyenge
0,20-0,00	rossz

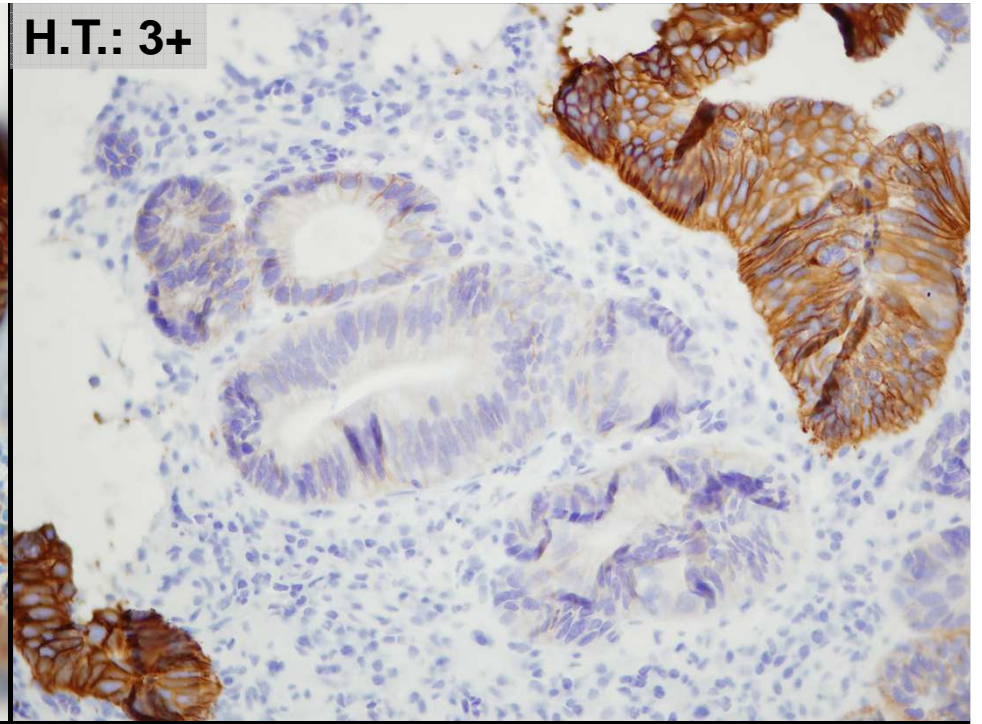




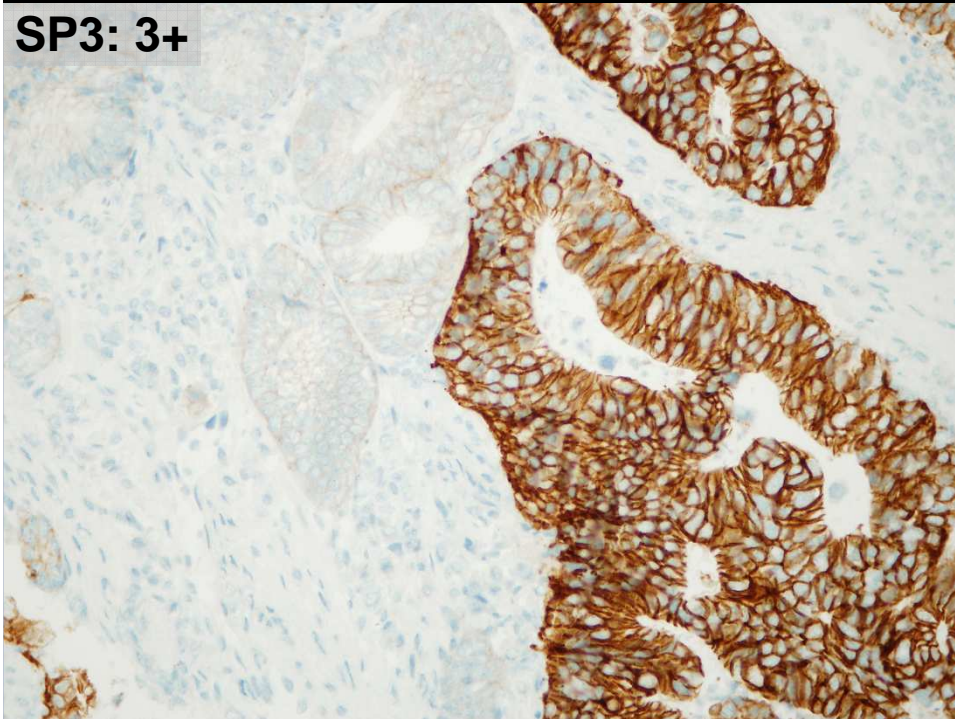
4B5: 3+



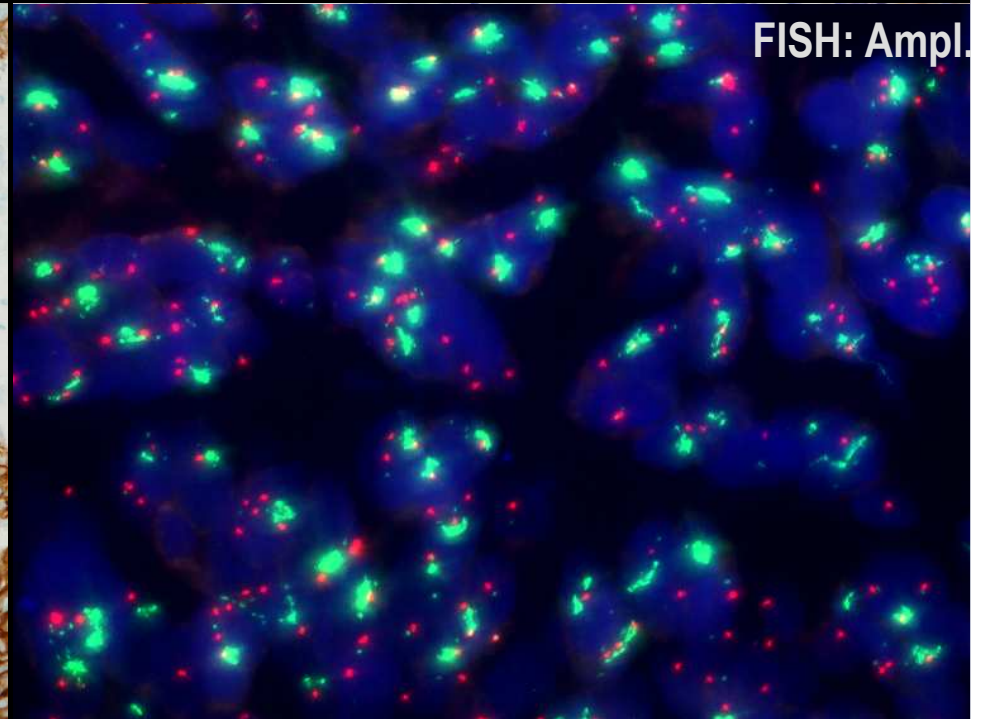
H.T.: 3+



SP3: 3+



FISH: Ampl.



Következtetések

- Mindhárom antitest alkalmas a rutin diagnosztikai felhasználásra
 - Az **SP3** használatával több eset kap 2+ besorolást, ami többlet FISH/SISH/CISH igényt és költséget jelent
 - a **HercepTest** érzékenyebb a minták preanalitikai eredetű (pl. fixálásbeli) eltéréseire, technikailag nehezebb megfelelően beállítani, de az általánosan elterjedt olcsóbb antitestekhez képest jelentős diagnosztikai előnyökkel bír.
Sajnos költségeit tekintve nem várható hazai elterjedése
 - A **Ventana PATHWAY 4B5** bizonyult összehasonlításunkban a legszenzitívebb és legspecifikusabb antitestnek. Emellett alkalmazásával drámaian lecsökken a kérdéses besorolású (2+ score) esetek száma, és így az ISH igény. Rutin diagnosztikai beállítása egyszerű. Automatizált felhasználáshoz ajánlott kiszerezésben forgalmazza a gyártó, de kézi alkalmazása is lehetséges.



Köszönetnyilvánítás



- A S.E. II. Patológiai Intézet vezetőinek és munkatársainak,

külön köszönettel:

Prof. Schaff Zsuzsa
Dr. Győrffy Hajnalka
Pekár Zoltánné Magdi
Somogyi Éva
Samodai Erika
Vörös Gyuláné Ilcsi
Gregor Viktória
részére



- Reagensellátás és a logisztikai háttér biztosításáért a Roche / Ventana munkatársainak, **különösen:** Dr. Pavuk Anita, Dr. Nagy András, Bíró Orsolya és Dr. Kollár György **részére**

TÁMOP-4.2.1/B-09/1
KMR 2010-0001

TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0013