

Meme karsinomlarında biyobelirteçlerin belirlenmesinde güçlükler ve yenilikler

Dr Sıtkı Tuzlalı

21. Ulusal Patoloji Kongresi

16-20 Kasım 2011, İZMİR

- Prognostik faktörler: Hastaların risk kategorilerine ayrılması
- Prediktif faktörler: Belli tedavi yaklaşımlarına olan duyarlılıklarının doğru biçimde öngörülmesi



Steroid reseptörleri
Her-2 (c-erb-B2)
Ki-67



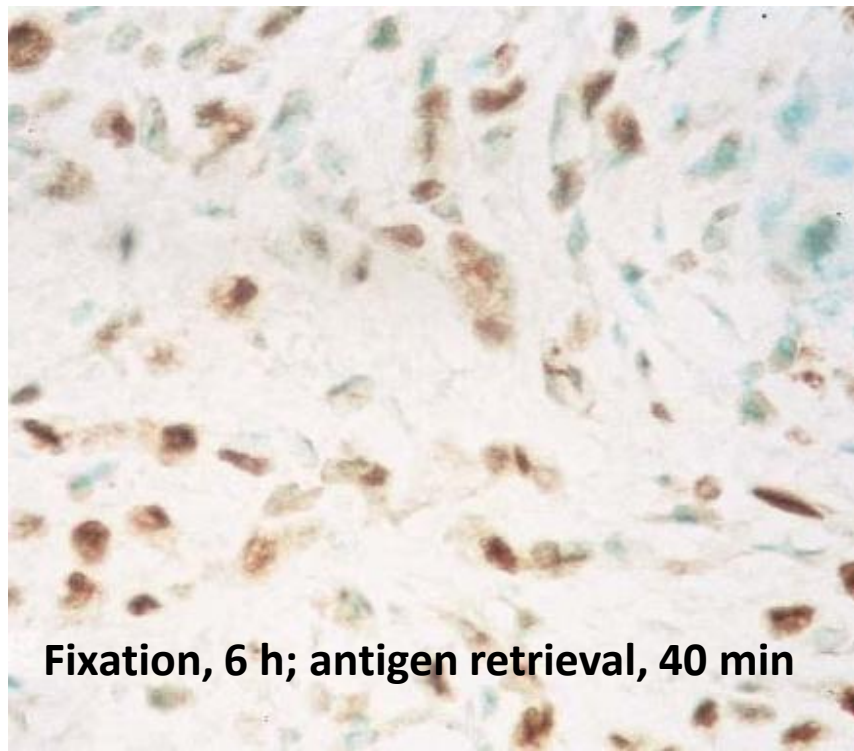
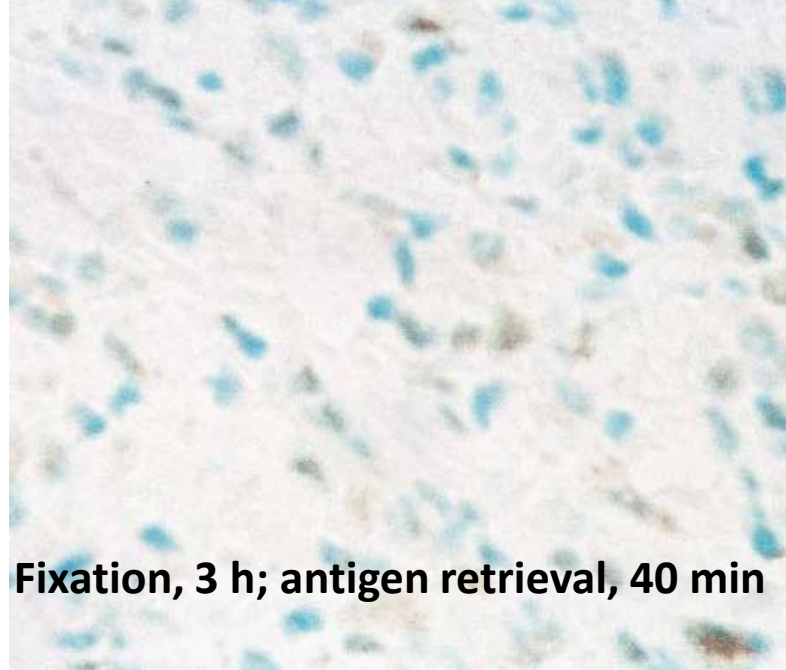
İMMÜNHİSTOKİMYA'DA SORUN KAYNAKLARI

- **PREANALİTİK:**
 - Fiksasyon süresi, fiksatif özelliği, takip
- **ANALİTİK**
 - Antikor, antijen retrieval, saptama sistemi
- **YORUM İLE İLGİLİ**
 - Sayma, skorlama, eşik değer

- Wolff AC 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
- Hammond MEH et al: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer. Arch Pathol Lab Med 2010; 134:907–922

FIKSASYON

- **Minimum Formalin Fixation Time for Consistent Estrogen Receptor Immunohistochemical Staining of Invasive Breast Carcinoma**
- *Neal S. Goldstein, MD, Monica Ferkowicz, MT(ASCP), PathA(AAPA), Eva Odish, HTL(IHQ), Anju Mani, MD, and Farnaz Hastah, MD*
- Am J Clin Pathol 2003;120:86-92



- *The minimum formalin fixation time for reliable immunohistochemical ER results is 6 to 8 hours in our laboratory, regardless of the type or size of specimen.*

Antijen retrieval

- **Study of interlaboratory reliability and reproducibility of estrogen and progesterone receptor assays in Europe. Documentation of poor reliability and identification of insufficient microwave antigen retrieval time as a major contributory element of unreliable assays.**
- **A Rhodes ve ark. Am J Clin Pathol 2001 Jan;115(1):44-58.**
- 105 lab, 2 yıl
- Antijen retrieval
- Primer antikor seçimi
- Detection system
- Otomasyon değerlendirildi

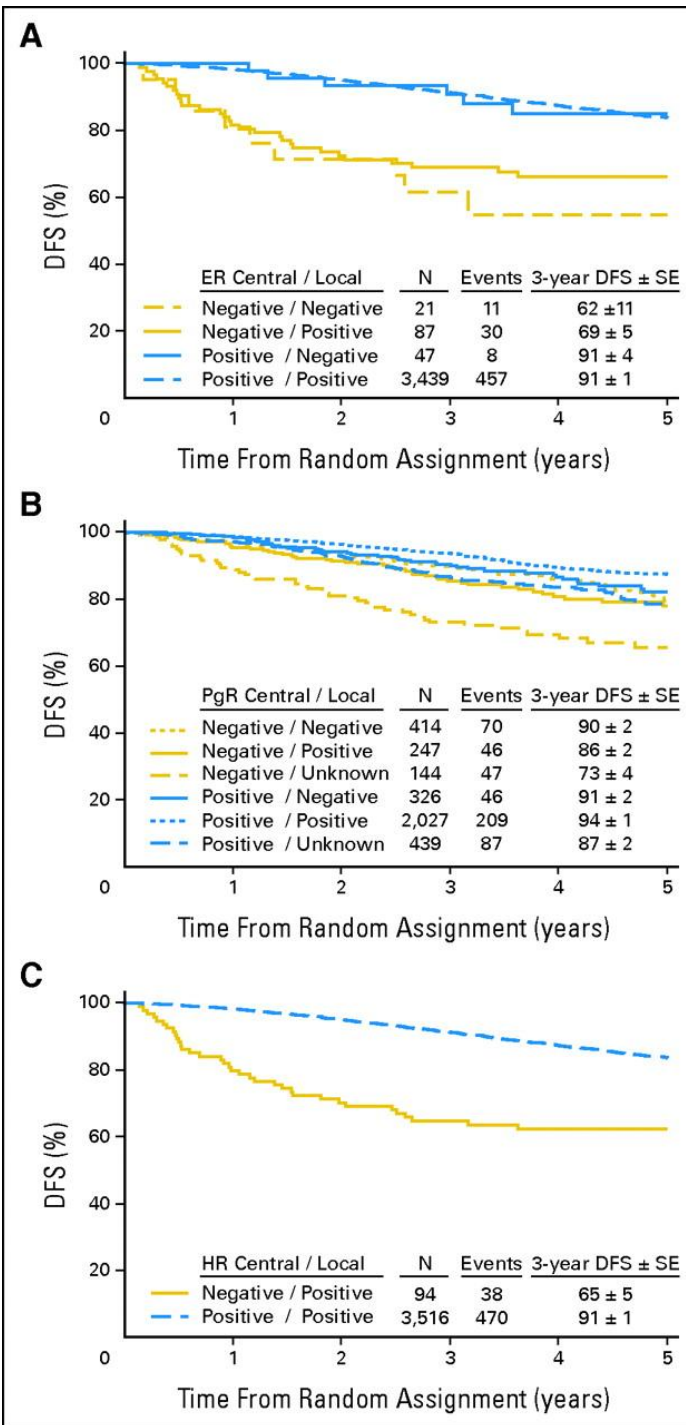
- Giuseppe Viale, Meredith M. Regan, Eugenio Maiorano, Mauro G. Mastropasqua, Patrizia Dell'Orto, Birgitte Bruun Rasmussen, Johnny Raffoul, Patrick Neven, Zsolt Orosz, Stephen Braye, Christian Öhlschlegel, Beat Thürlimann, Richard D. Gelber, Monica Castiglione-Gertsch, Karen N. Price, Aron Goldhirsch, Barry A. Gusterson, Alan S. Coates
- Prognostic and Predictive Value of Centrally Reviewed Expression of Estrogen and Progesterone Receptors in a Randomized Trial Comparing Letrozole and Tamoxifen Adjuvant Therapy for Postmenopausal Early Breast Cancer: BIG 1-98
- *Journal of Clinical Oncology*, Vol 25, No 25 (September 1), 2007: pp. 3846-3852

- Materyalin uygun koşullarda fiksasyon ve takibi
 - Tru-cut'in avantajları var
 - Frozen vakalarında bir parçanın derhal fikse edilmesi

Central Estrogen Receptor Status

Local Estrogen Receptor Status	0	1%-9%	≥ 10%	Total
Negative	24	8	73	105
Positive	66	54	5980	6100
Total	90	62	6053	6205

Central review confirmed 97% of tumors as hormone receptor–positive (ER and/or PgR ≥10%). Of 105 tumors locally ER-negative, 73 were found to have more than 10% positive cells, and eight had 1% to 9%. Of 6,100 tumors locally ER positive, 66 were found to have no staining, and 54 had only 1% to 9%. Discordance was more marked for PgR than ER. Patients with tumors reclassified centrally as ER-negative, or as hormone receptor–negative, had poor DFS. Centrally assessed ER and PgR showed prognostic value. Among patients with centrally assessed ER-expressing tumors, letrozole showed better DFS than tamoxifen, irrespective of PgR expression level.



Otomatize değerlendirme sistemleri

- [Turbin DA, Leung S, Cheang MC, Kennecke](#) ve ark.: **Automated quantitative analysis of estrogen receptor expression in breast carcinoma does not differ from expert pathologist scoring: a tissue microarray study of 3,484 cases.**
- [Breast Cancer Res Treat.](#) 2008 Aug;110(3):417-26.
Epub 2007 Oct 3.

- Nasıl deęerlendirmeli?
- "Pozitif"lik sınırı nedir?

ÖSTROJEN VE PROGESTERON RESEPTÖRÜ

- Değerlendirme invaziv tümörde yapılmalı
- İntranükleer boyanma pozitifdir
 - Sitoplazma/zemin boyanması olmamalı
- İnternal kontrol bulunmalı
- Pozitif kontrol bulunmalı

- **American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer**
- M. Elizabeth H. Hammond; Daniel F. Hayes; Mitch Dowsett; D. Craig Allred; Karen L. Hagerty; Sunil Badve; Patrick L. Fitzgibbons; Glenn Francis; Neil S. Goldstein; Malcolm Hayes; David G. Hicks; Susan Lester; Richard Love; Pamela B. Mangu; Lisa McShane; Keith Miller; C. Kent Osborne; Soonmyung Paik; Jane Perlmutter; Anthony Rhodes; Hironobu Sasano; Jared N. Schwartz; Fred C.G. Sweep; Sheila Taube; Emina Emilia Torlakovic; Paul Valenstein; Giuseppe Viale; Daniel Visscher; Thomas Wheeler; R. Bruce Williams; James L. Wittliff; Antonio C. Wolff
- Arch Pathol Lab Med. 2010;134:907–922
- Purpose.—To develop a guideline to improve the accuracy of immunohistochemical (IHC) estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PgR) testing in breast cancer and the utility of these receptors as predictive markers.
- Summary of Guideline Recommendations for ER and PgR Testing by IHC in Breast Cancer Patients
- Recommendation

- Pozitif ÖR/PR: Tümör hücrelerinin \geq %1'inin immünreaksiyon göstermesidir
- Boyanma yüzdesi ve yoğunluğu raporda belirtilir
- H-score, Allred score, Quick score gibi skorlama sistemleri kullanılabilir
- Negatif ÖR/PR: Tümör hücrelerinin $<$ %1'den azında immünreaktivite (Pozitif internal kontrol olmak kaydıyla)

H-skor sistemi

0 X negatif hücrelerin yüzdesi

+

1 X zayıf yoğunlukta boyanan hücrelerin yüzdesi

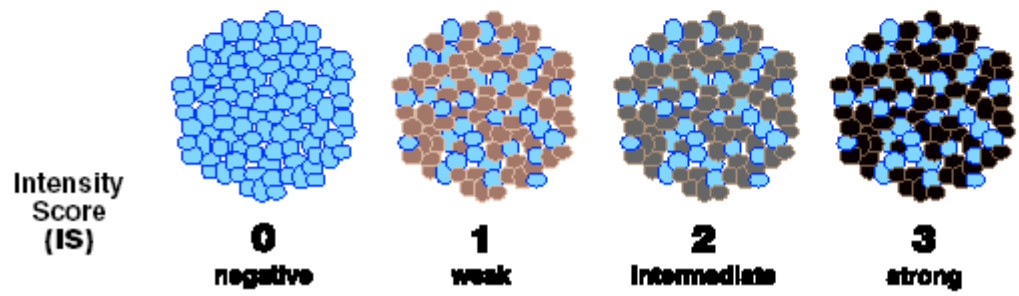
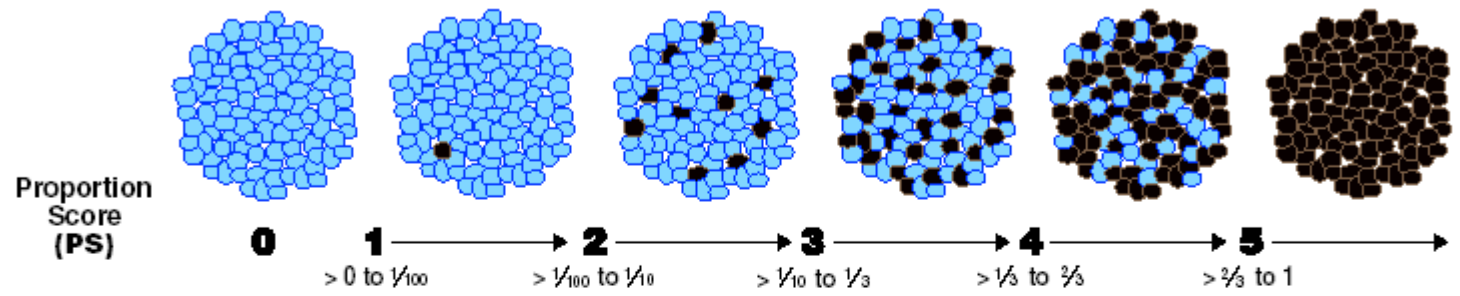
+

2 X orta yoğunlukta boyanan hücrelerin yüzdesi

+

3 X kuvvetli yoğunlukta boyanan hücrelerin yüzdesi

= H-skor



Total Score (TS) = PS + IS
 (TS range = 0, 2-8)

Scoring guidelines courtesy DC Allied, MD

Quick score

Score for proportion	Score for intensity
0 = no staining	0 = no staining
1 = < 1% nuclei staining	1 = weak staining
2 = 1-10% nuclei staining	2 = moderate staining
3 = 11-33% nuclei staining	3 = strong staining
4 = 34-66% nuclei staining	
5 = 67-100% nuclei staining	

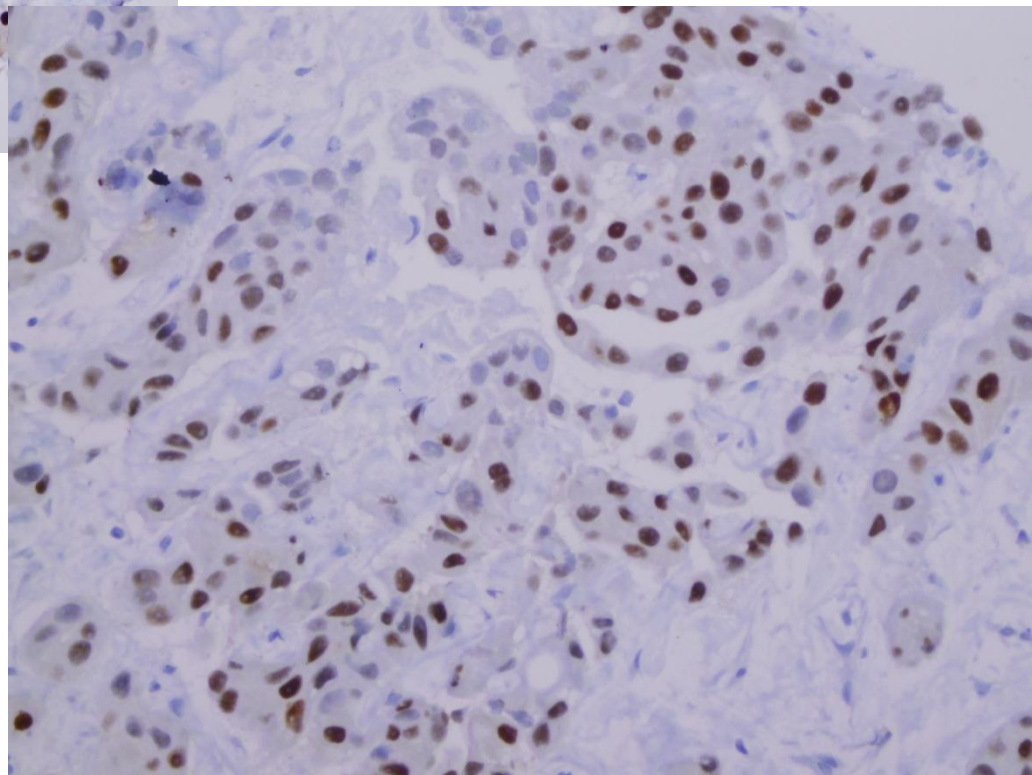
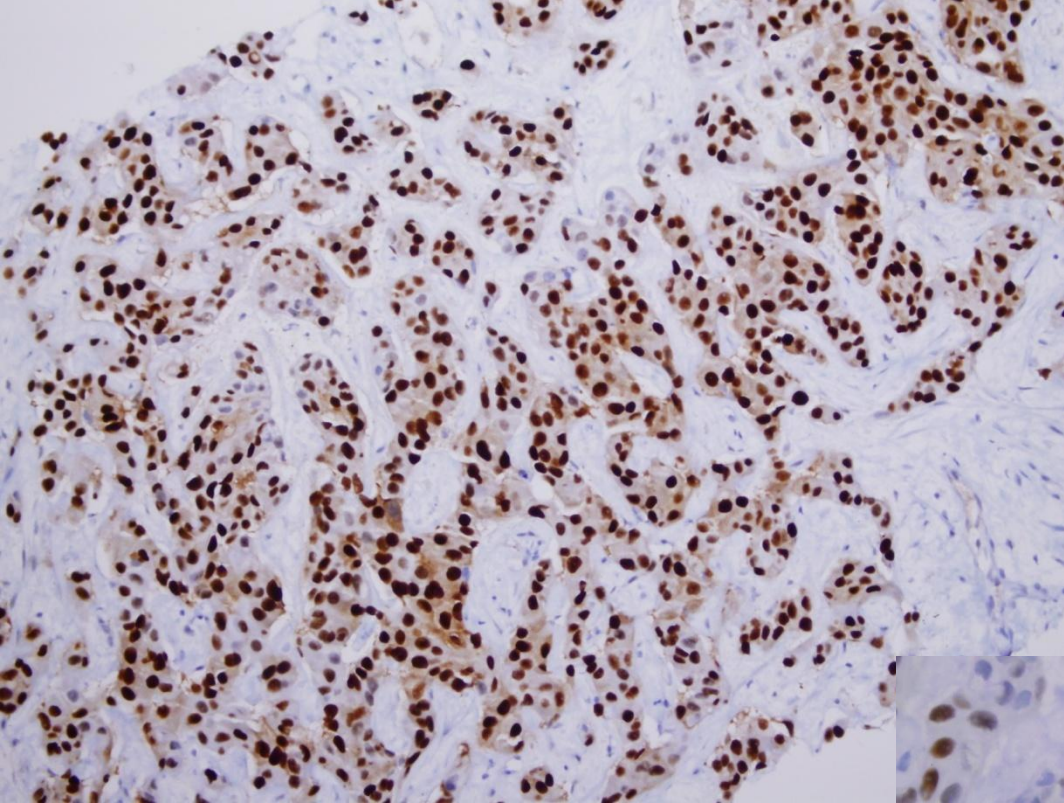
- **Şu durumlarda sonuç verilmemeli ya da farklı blokta tekrarlanmalıdır:**
- Eksternal kontroller beklendiği gibi olmadığında
- Örnek çoğunlukla artefakt içeriyorsa
- İnternal pozitif kontroller negatif ise
- Asit dekalsifikasyonu
- ER - /PR + ise
- İnternal kontrol içermeyen materyal uzun “soğuk iskemi” ya da “fiksasyona” maruz kalmışsa (6 saat ve 72 saat)

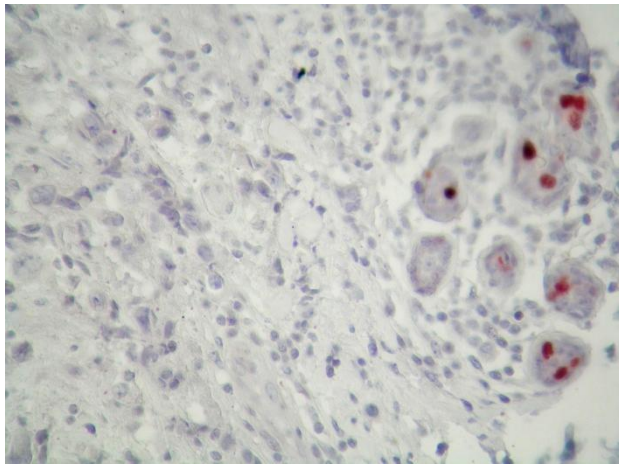
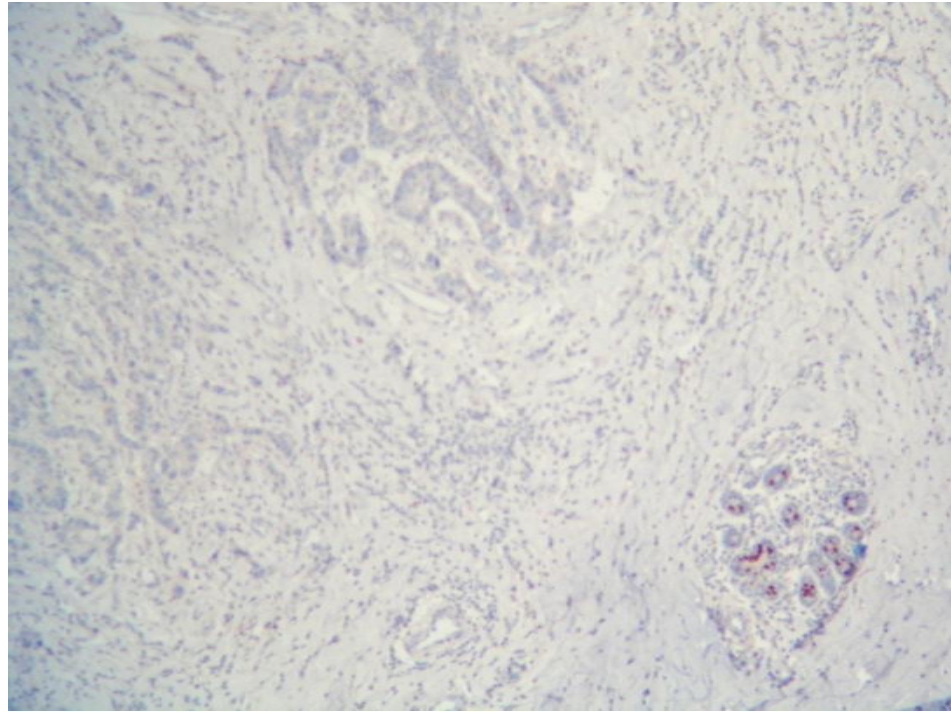
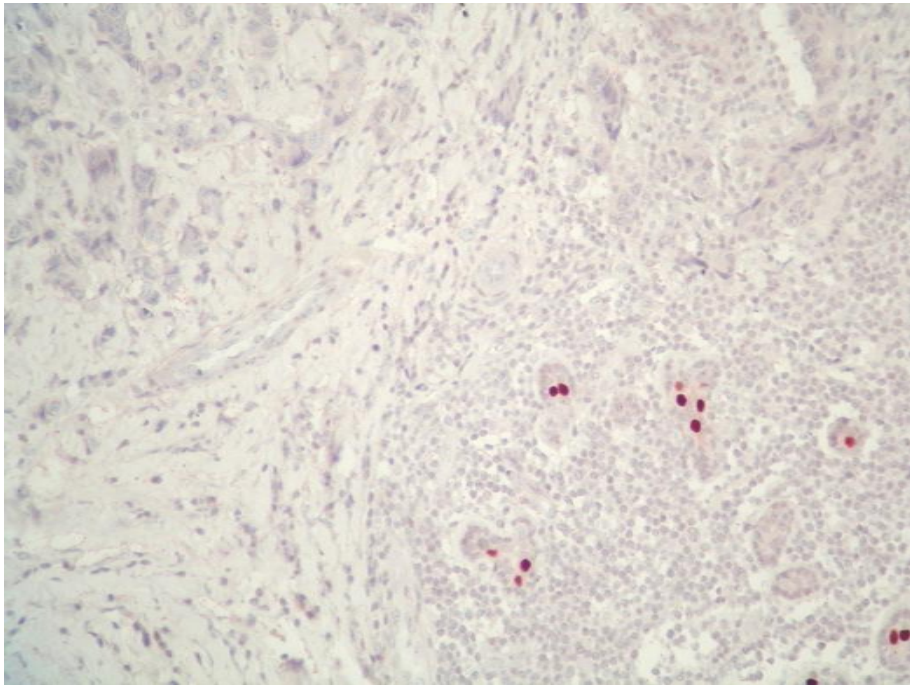
- Reseptör (-) vakalarda endokrin tedaviye yanıt yok
- % 1'lik bir pozitivite endokrin tedaviye yanıt olasılığı
- Pozitivite oranı ile endokrin tedaviye yanıt korele

Allred *et al. Mod Pathol* 1998;11:155-168
Goldhirsch *et al. Ann Oncol* 2005;16:1569-1583

Fenotip	İnsidens (%)	Tamoksifene yanıt (%)
ER+/PR+	58	77
ER+/PR-	23	27
ER-/PR+	4	46
ER-/PR-	15	11

- Tru-cut biopside % 0 ve morfolojik olarak heterojen ise,
- Tru-cut biopside 1-9 ise,
- Operasyon materyalinde tekrarla





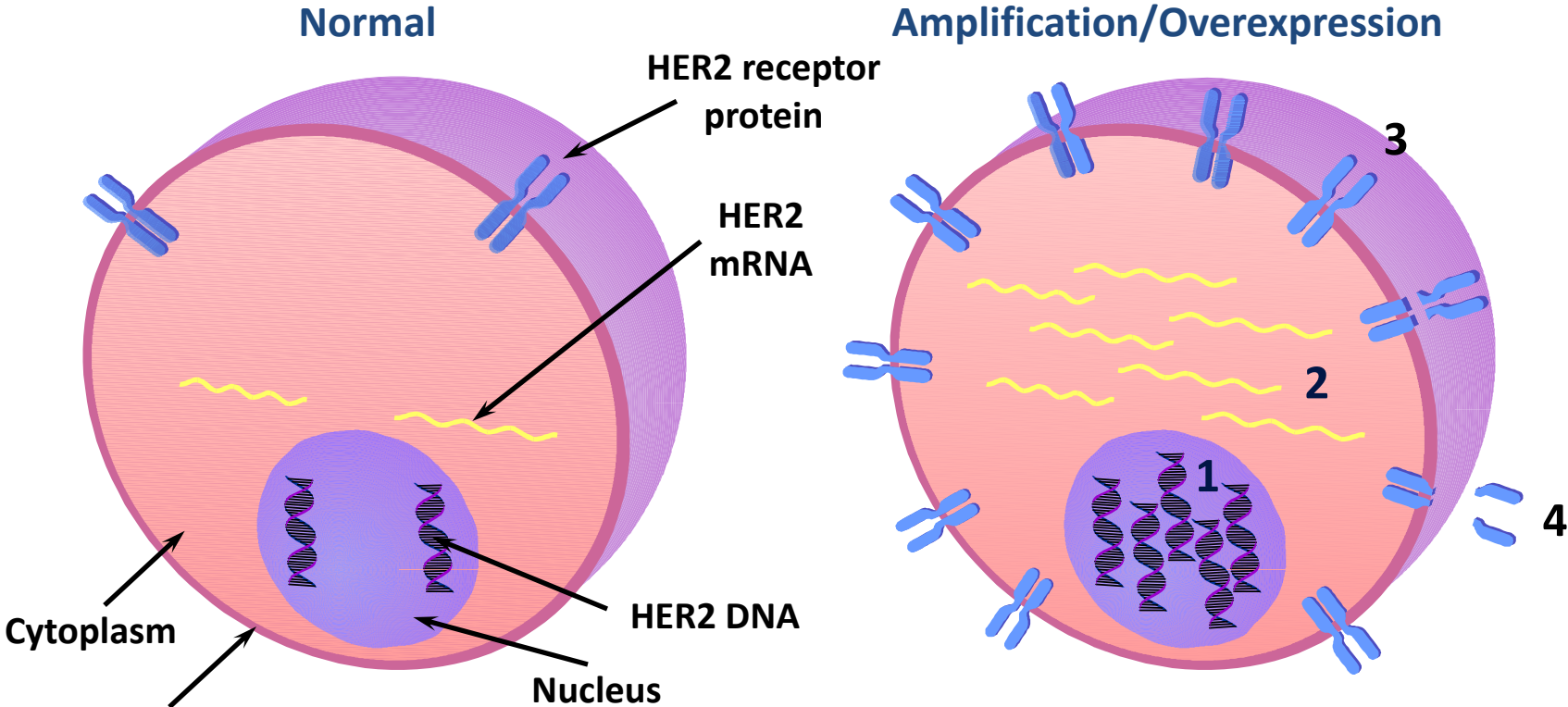
HER-2 (c erb B-2)

- **Human Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü-2 geni, kanserlerin bir kısmında amplifikasyona uğramış bir proto onkojendir.**
- **Kromozom 17q üzerinde lokalizedir.**
 - *HER2/ neu*
 - *c-erbB-2*

C-ERB B-2 ONKOGENİ

- Amplifikasyonu kötü prognoz ile ilişkili
- Tümör gradları ile pozitif, hormon reseptörleri ile negatif korelasyon gösterir
- CMF tedavisine yanıt düşük
- Erb B 2 + ise ÖR + vakaların bile endokrin tedaviye yanıtı düşük

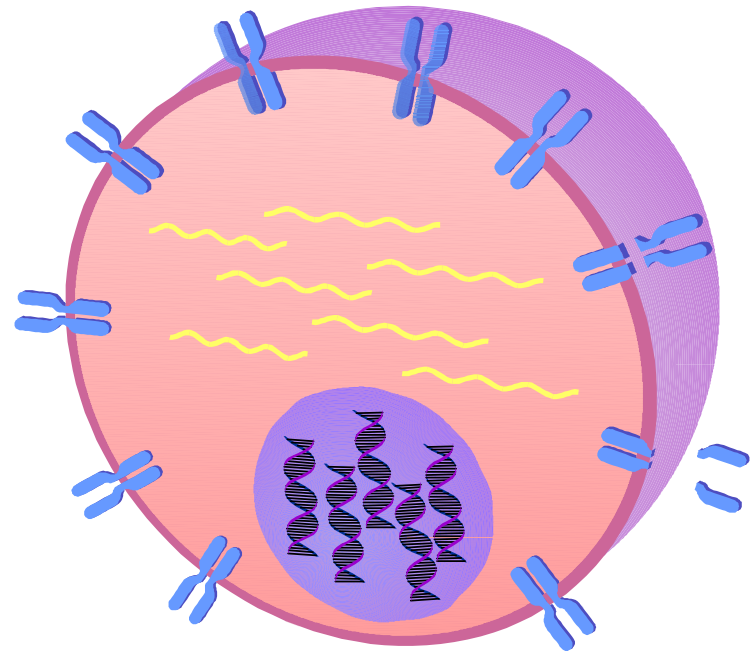
Indicators of increased HER2 production



- 1 = ↑ gene copy number
- 2 = ↑ mRNA transcription
- 3 = ↑ cell surface receptor protein expression
- 4 = ↑ release of receptor extracellular domain

YÖNTEMLER

- FISH (DNA)
- RT-PCR (mRNA)
- IHC (protein)

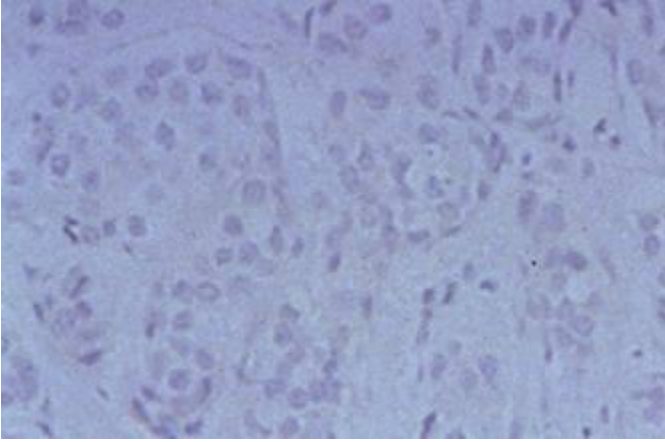


İmmunhistokimyasal skorlama

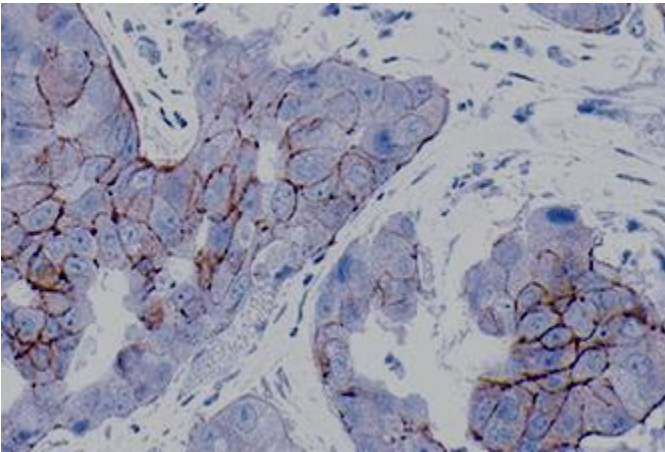
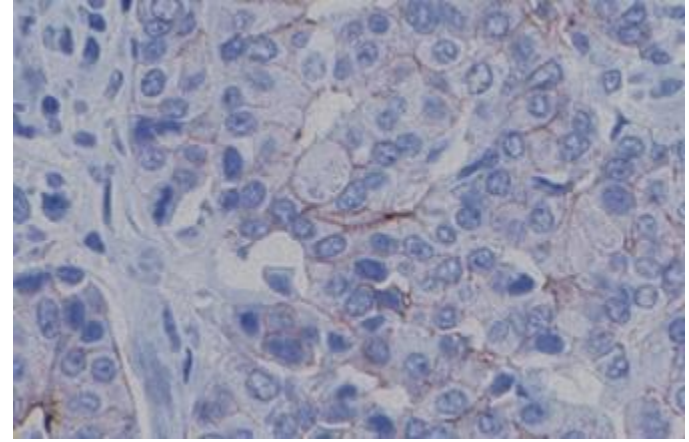
- **Skor 3:** İnvaziv karsinom hücrelerinin en az %30'unda tüm sitoplazmik membranı çevreleyen uniform tarzda kuvvetli boyanma
- **Skor 2:** Benzer şekilde invaziv karsinom hücrelerinin en az %10'unda sitoplazmik membranı tümüyle çevreleyen ancak orta şiddette boyanma var ise
- ya da %30'undan daha az ama kuvvetli membranöz boyanma
- **Skor 1:** Hücrelerde oranı ne olursa olsun membranı çevrelemeyen, varlığı zor saptanan, tam membranöz olmayan boyanmalarda, ya da hücrelerin % 10'dan azında tüm membranı çevreleyen, zayıf boyanma
- **Skor 0:** Hücrelerde immün boyanma olmaması

IHC skorlaması

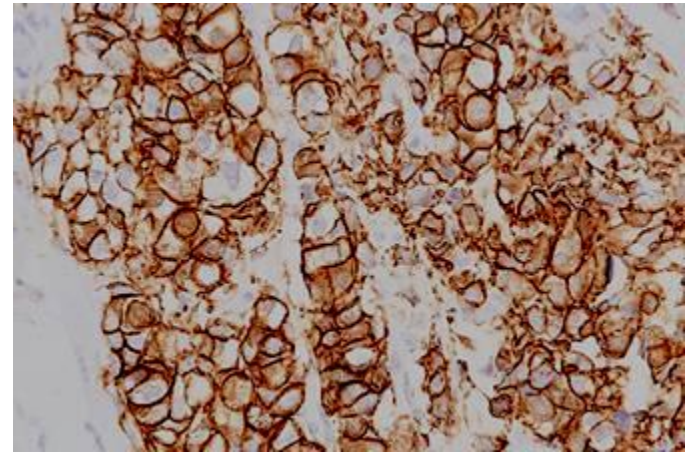
'0' (negatif)



'1+' (negatif)

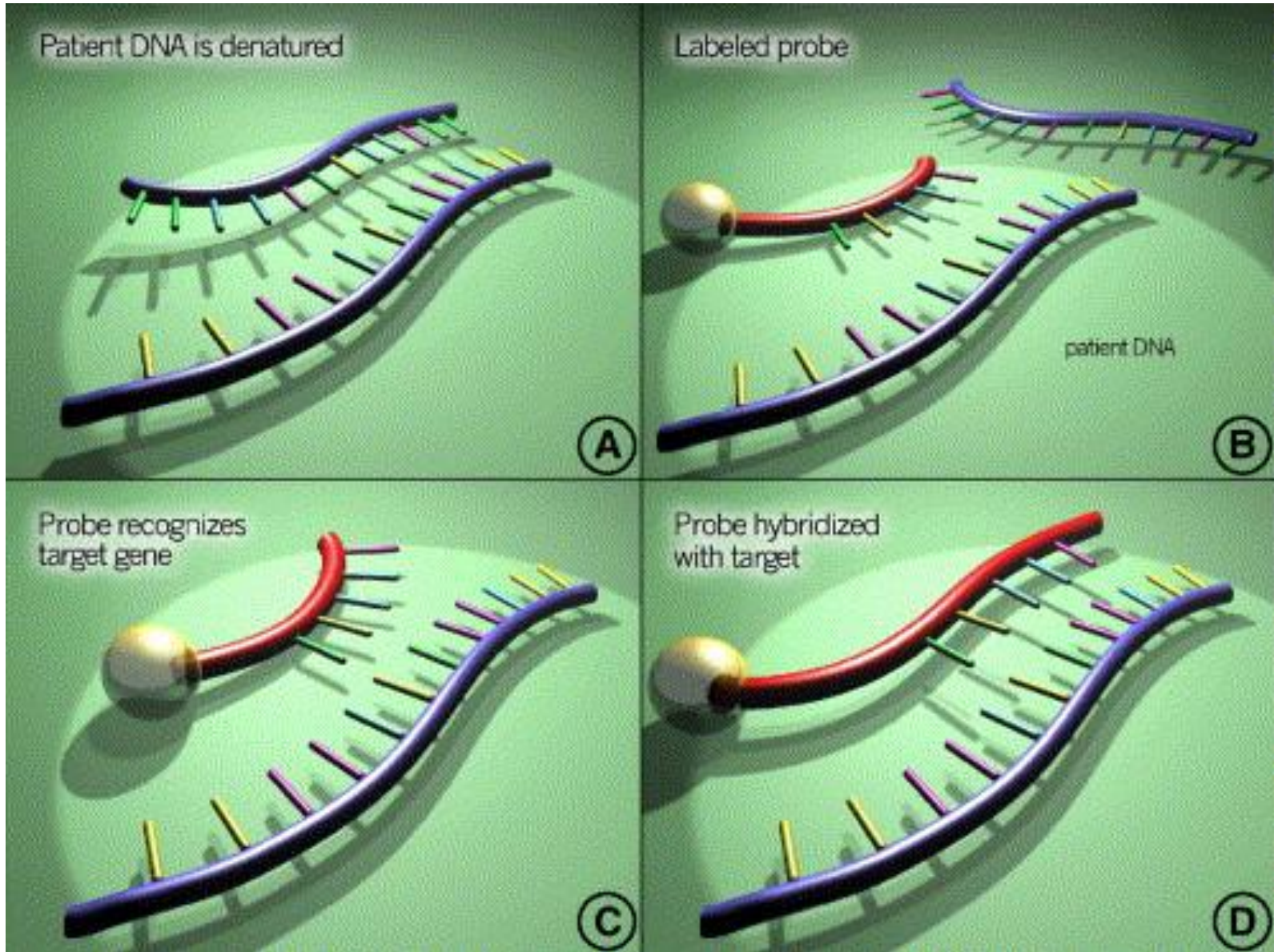


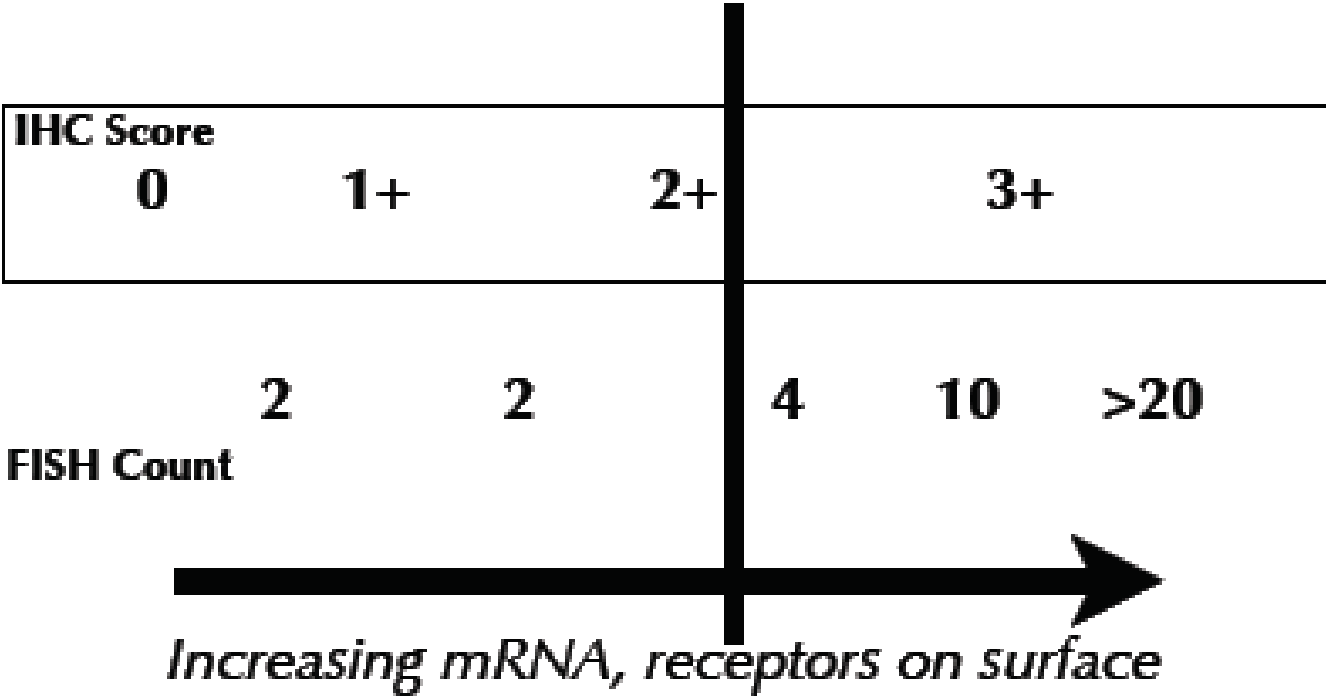
'2+' (şüpheli)



'1+' (negatif)

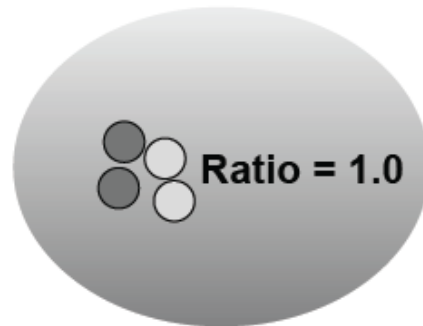
FISH METHOD



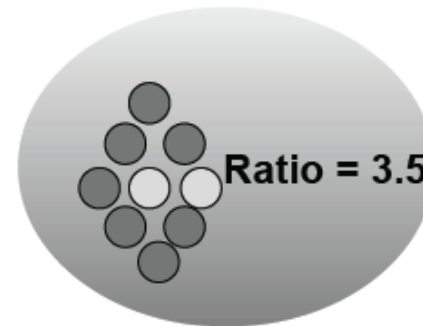


HER-2 Gene Amplification Detected by FISH

HER-2 gene
Chromosome 17

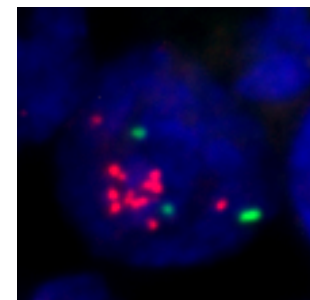
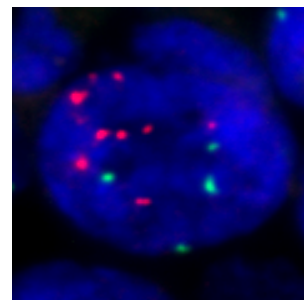
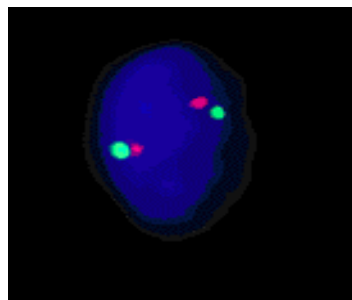
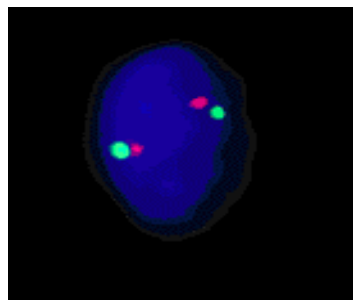
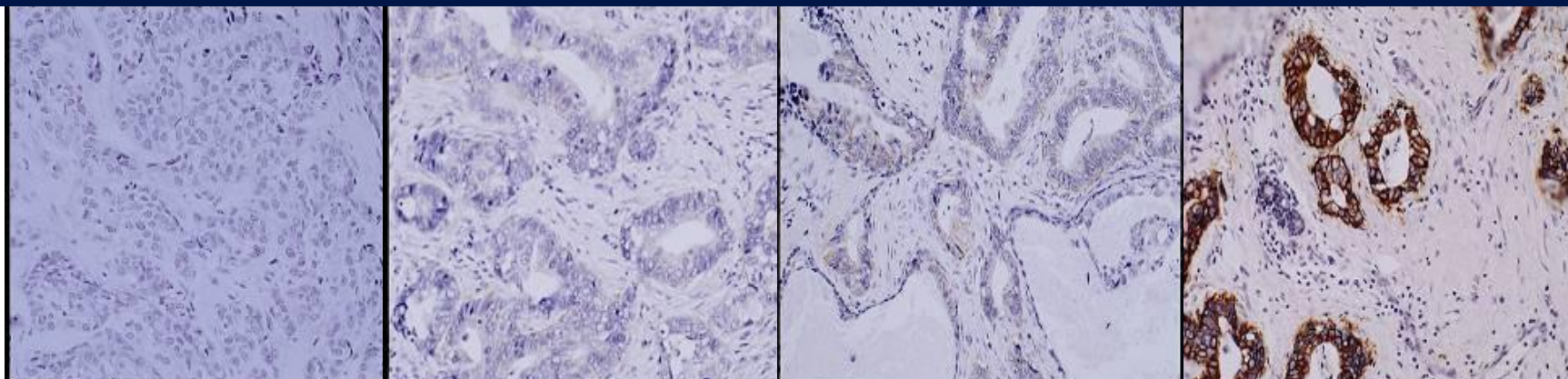


**Non-Amplified
Tumor**

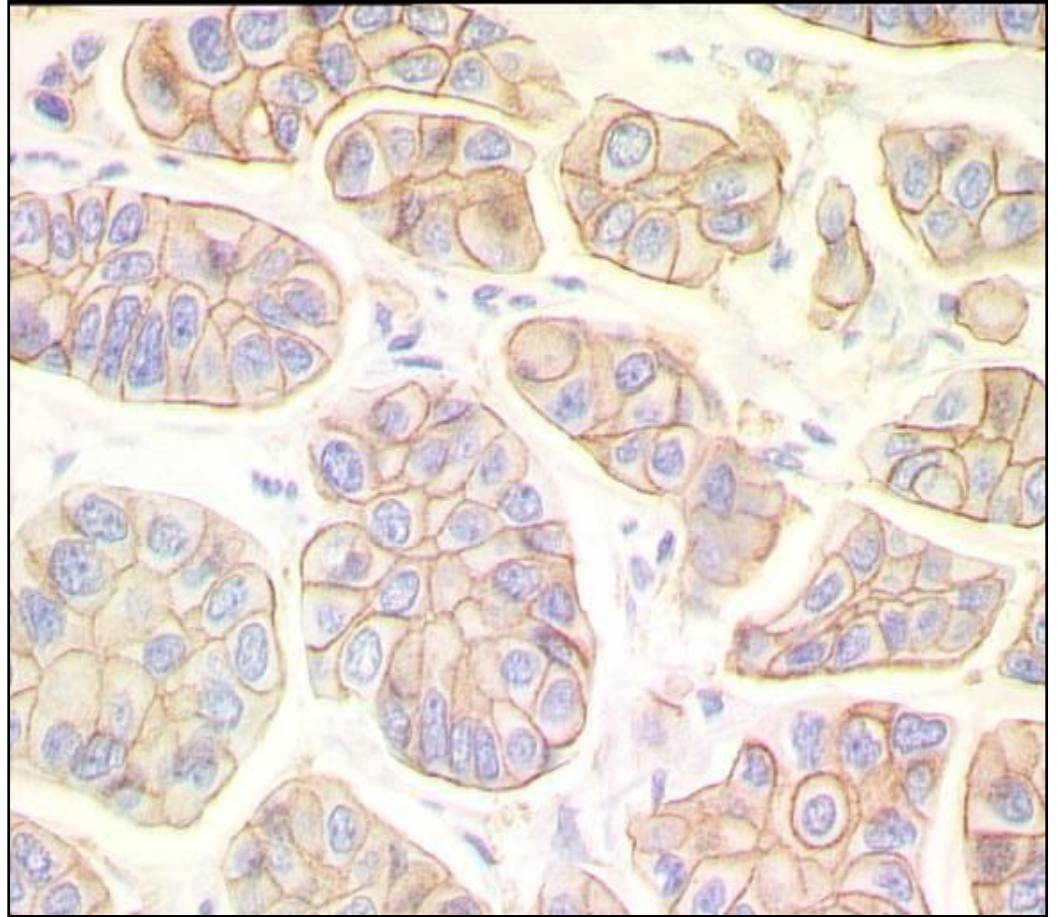
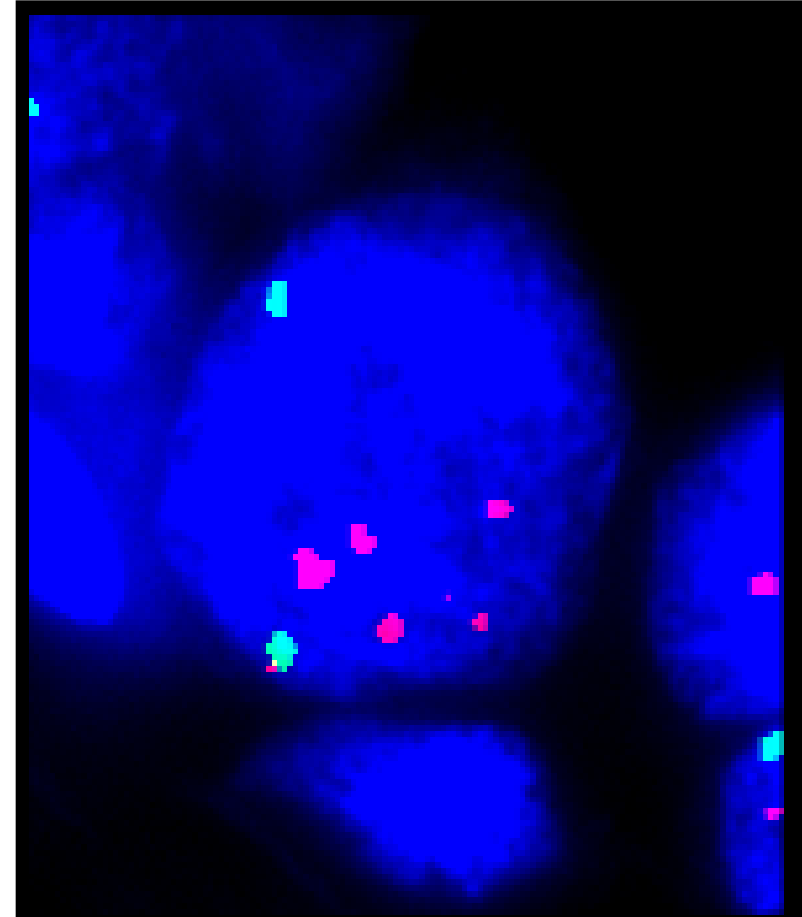


Amplified Tumor

Pozitif veya negatif HER2 durumu



Düşük düzeyde amplifikasyon



İHK ve İSH'da pozitif ve negatiflik:

- **Pozitif**

- İHK Skoru 3+, veya
- FISH HER2 / CEP17 oranı ≥ 2.2 , veya
- FISH HER2 gen kopya sayısı >6.0

- **Belirsiz (Equivocal)**

- İHK Skoru 2+ , veya
- FISH HER2 / CEP17 oranı 1.8 –2.2 , veya
- FISH HER2 gen kopya sayısı 4.0 –6.0

- **Negatif**

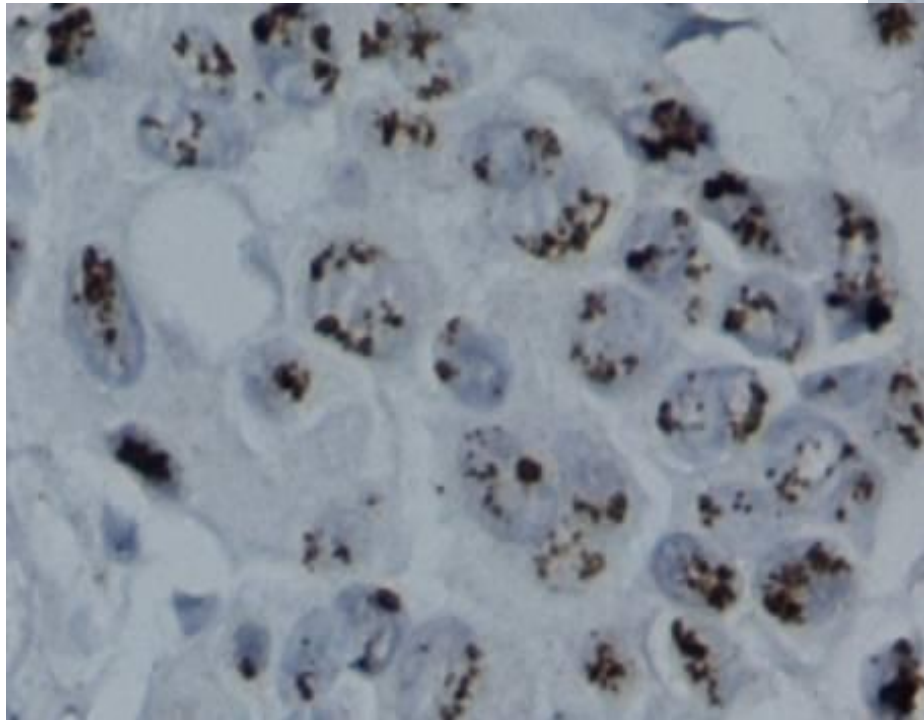
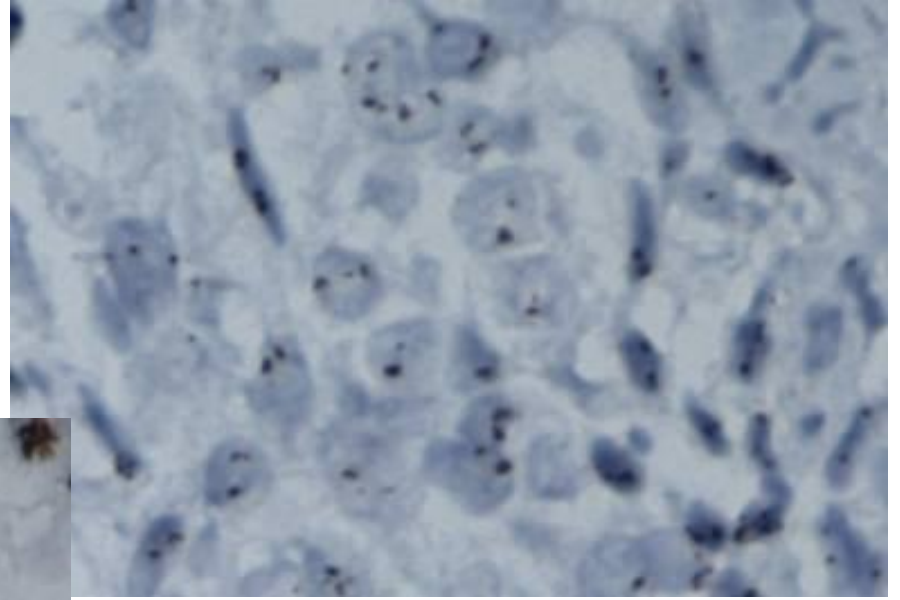
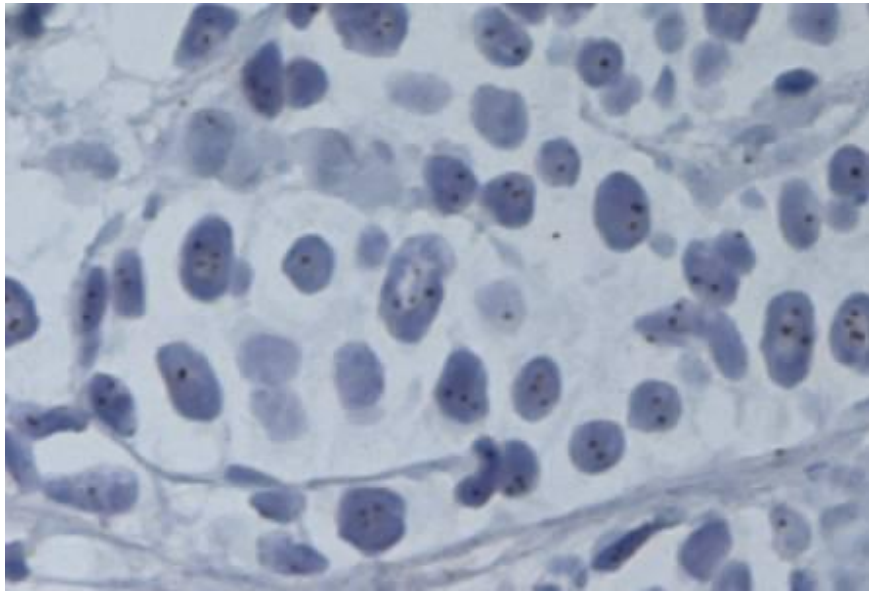
- IHC Score 0 or 1+ , veya
- FISH HER2 / CEP17 oranı <1.8 , veya
- FISH HER2 gen kopya sayısı <4.0

İN SİTU HİBRİDİZASYON

- FISH
- CISH
- SISH

KROMOJENİK İN SİTU HİBRİDİZASYON (CISH)

- Bu yöntem FISH ile aynı prensip ile uygulanır ancak floresan yerine kromojenik substrat (peroksidaz/alkalen fosfataz reaksiyonu) kullanılır.



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

**M. Dietel • I. O. Ellis • H. Höfler • H. Kreipe • H. Moch •
A. Dankof • K. Kölbl • G. Kristiansen**

Table 2 Detailed demonstration of FISH vs SISH *HER2* gene amplification status obtained from 99 consecutively examined invasive breast cancer cases

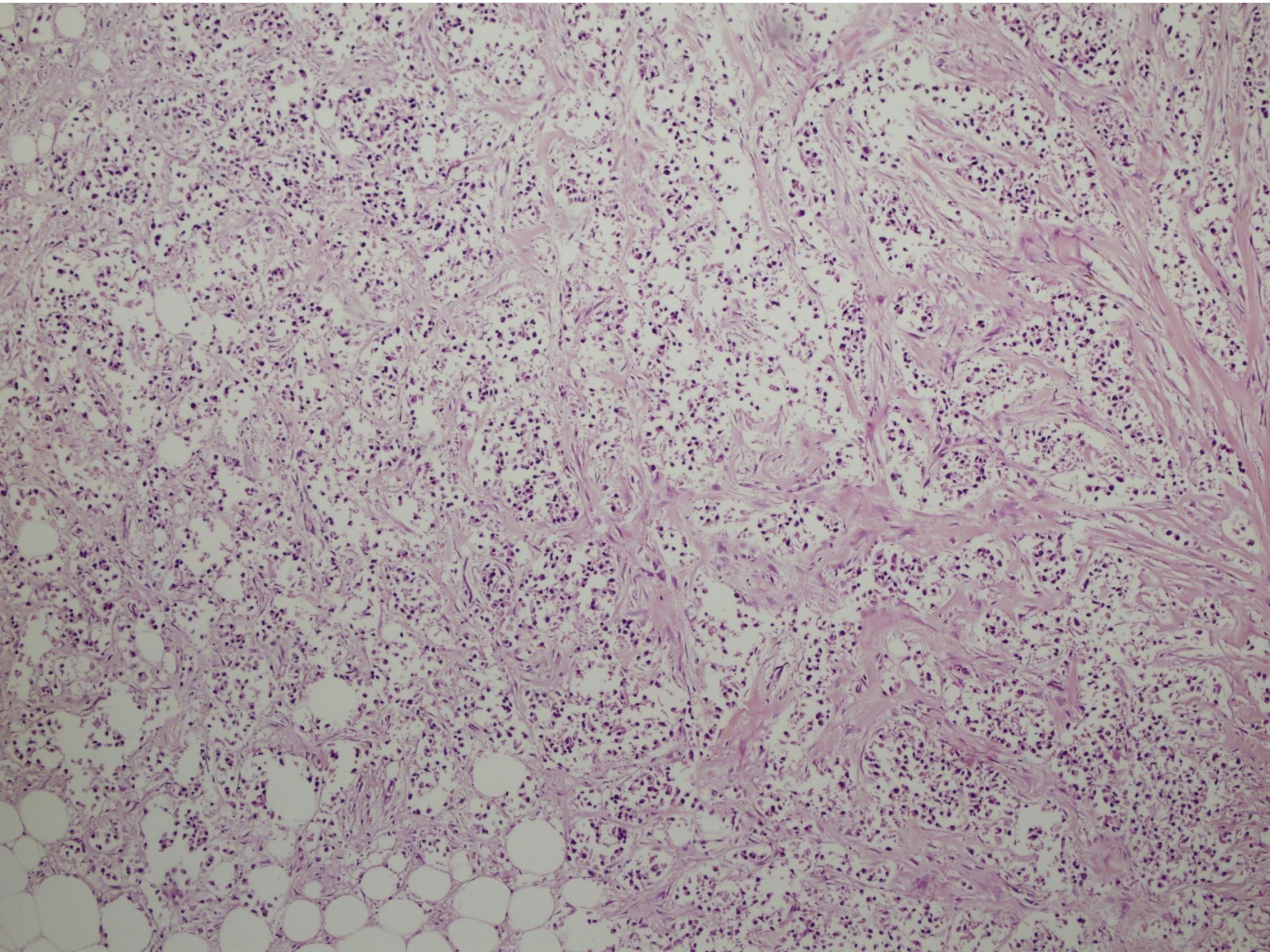
<i>HER2</i> gene amplification status		FISH			
		Positive	Equivocal	Negative	Total
Consensus SISH	Positive	9	0	2	11
	Equivocal	0	3	0	3
	Negative	2	0	83	85
	Total	11	3	85	99

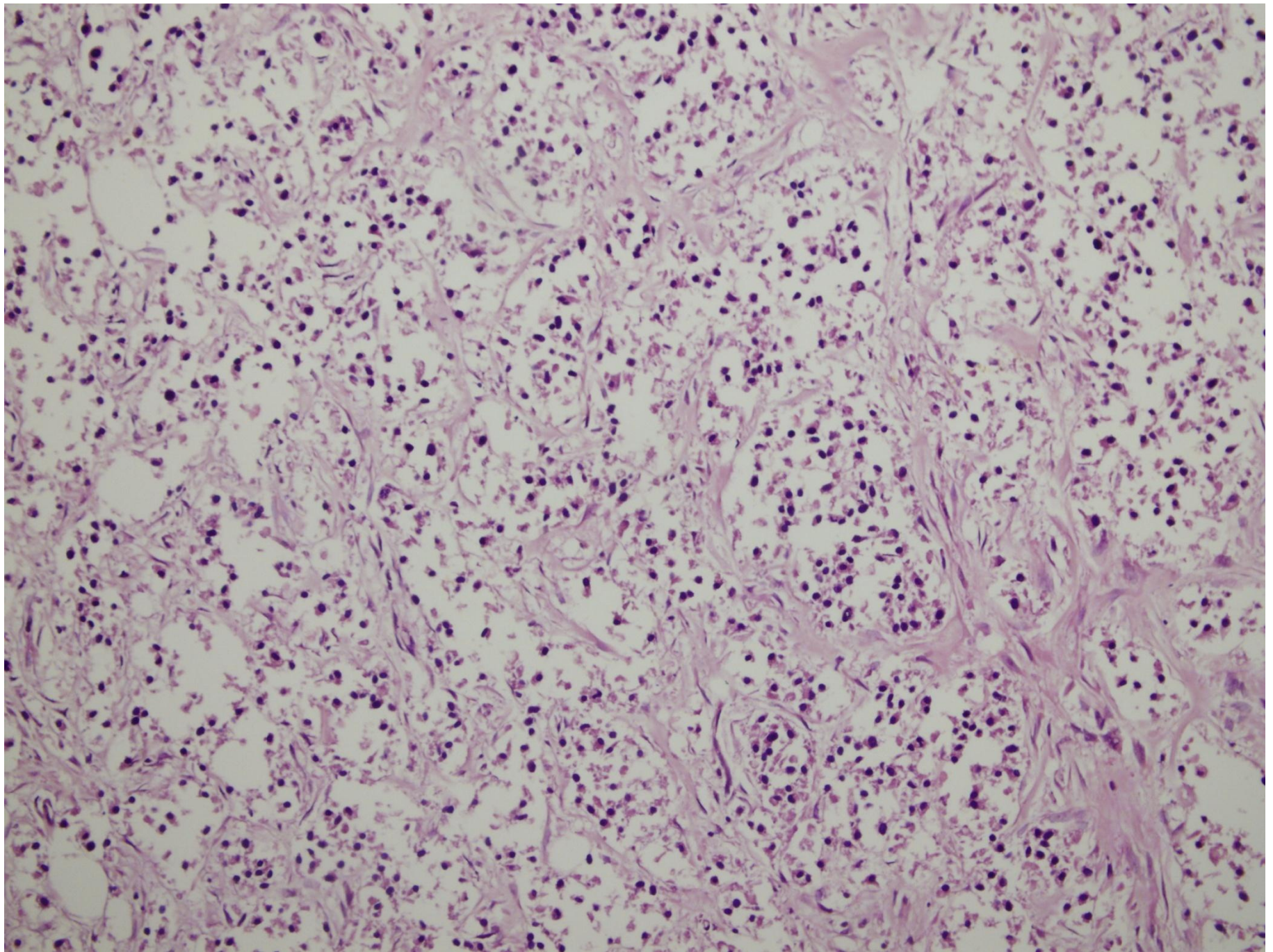
Yöntemlerin karşılaştırılması

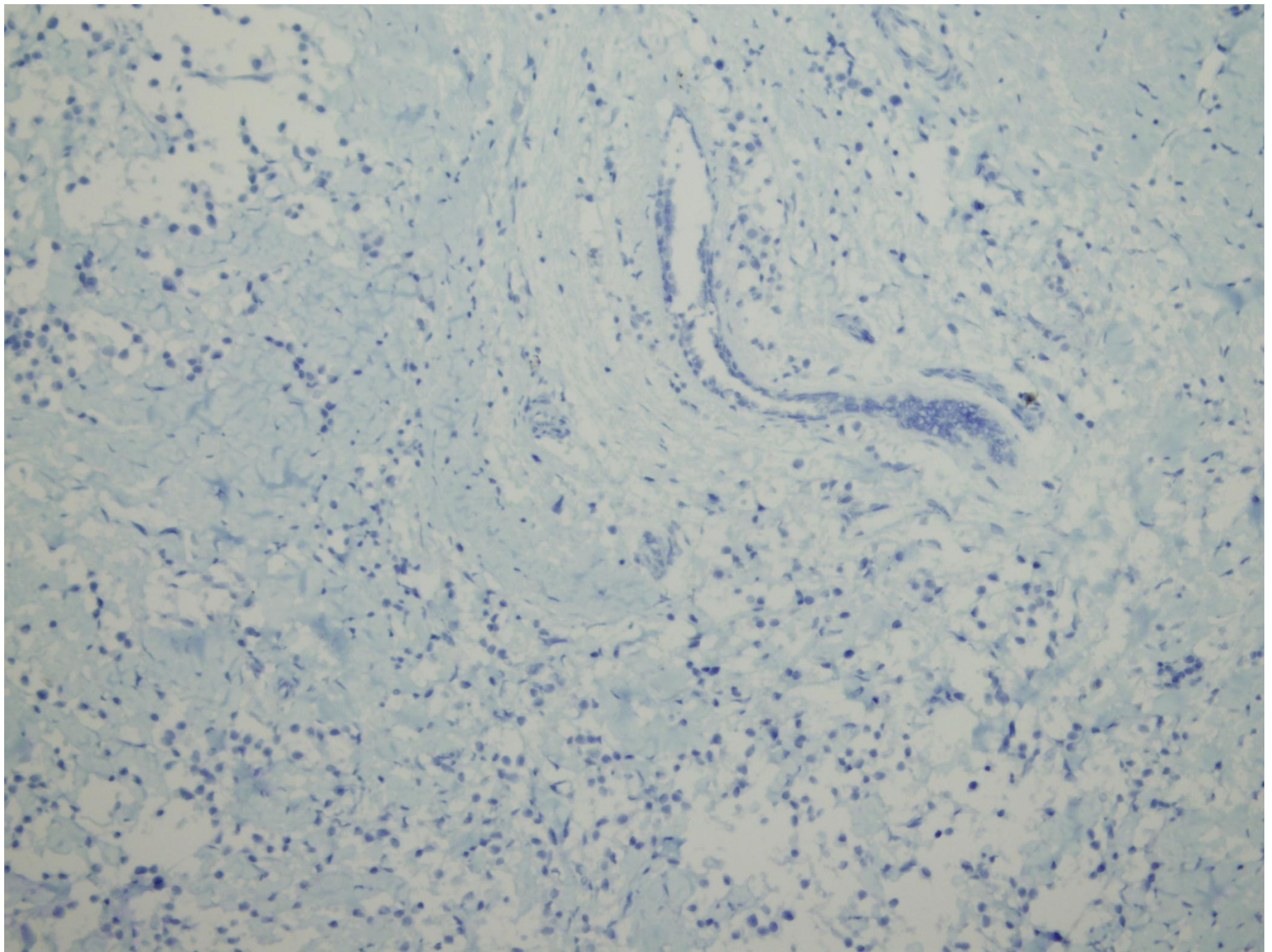
	IHC	FISH	CISH, SISH
Avantaj	Sensitif, spesifik	Sensitif, spesifik	Sensitif, spesifik
	Yaygın	DNA daha stabil	FISH'den ucuz
	Ucuz, kolay, çabuk	Objektif kantitatif	Sadece ışık mikroskobu
	Yıllarca saklanır	Her2+ de amp. belirler	Doku morfolojisi görülür
	Doku morfolojisi görülür		Relatif hızlı
			Yıllarca saklanır
Dezav	Test protokolü sabit olmalı	Pahalı	Tecrübe azlığı
	Subjektif skora	Sinyalin zamanla kaybı Arşivlenemez	Kr. 17 sayısının intrinsik kontrolü yoktu. Son yıllarda mevcut
		İnvaziv alanların saptanması zor olabilir	

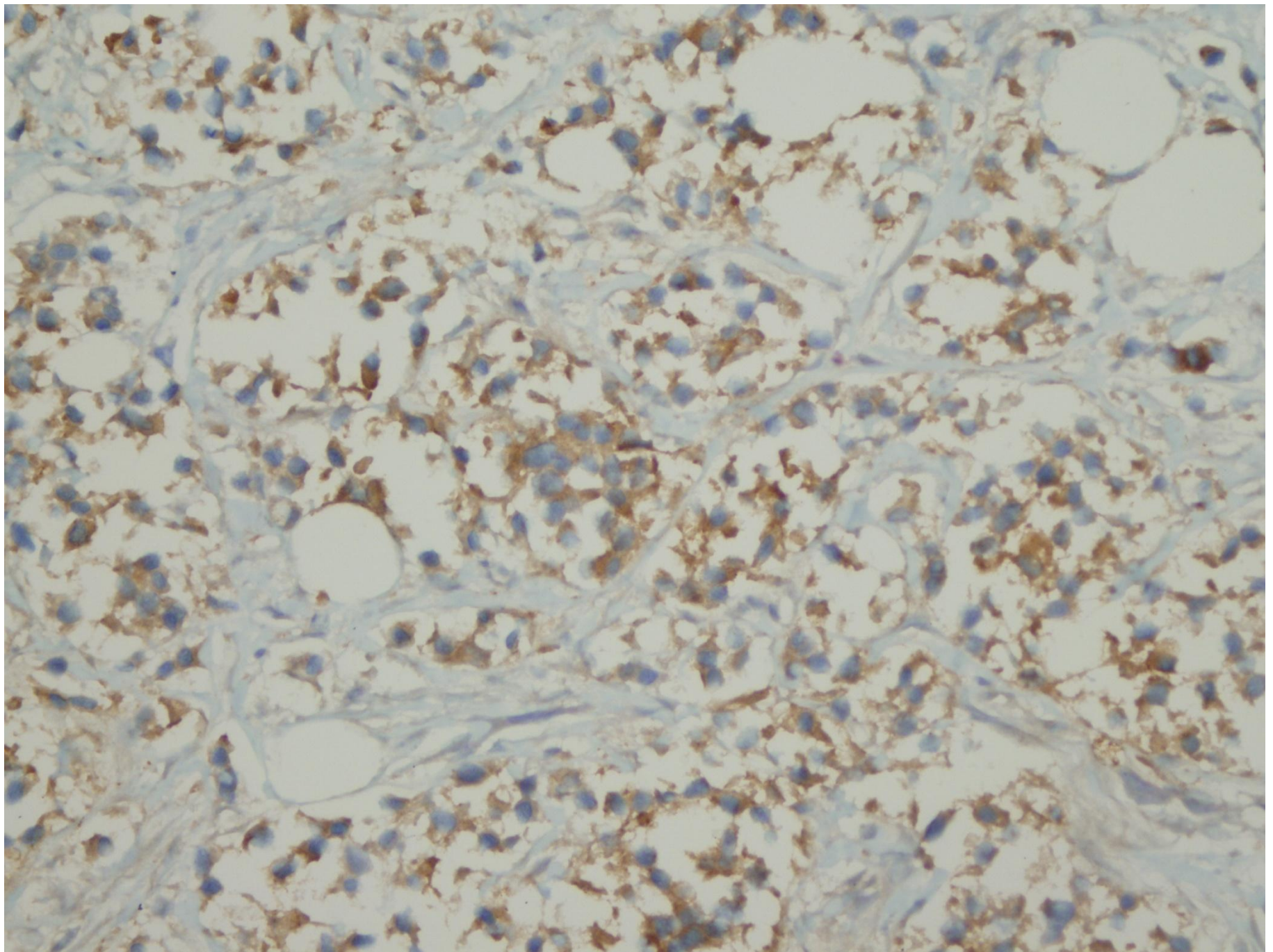
CISH/SISH AVANTAJLARI

- Otomatize olabilir
- Işık mikroskobu yeterli
- Hızlı
 - FISH (bir gece hibridizasyon)
 - SISH (6 saat)
- Arşivleme ve yeniden değerlendirme
- Görüntü analiz sistemleri geliştirilmekte

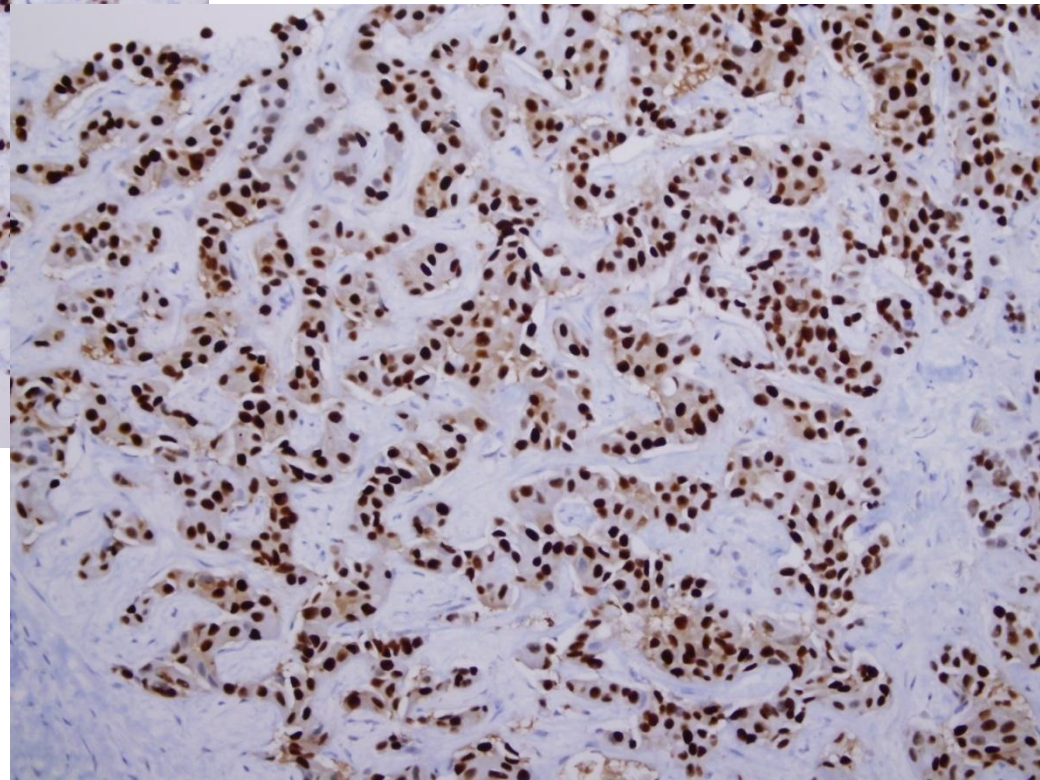
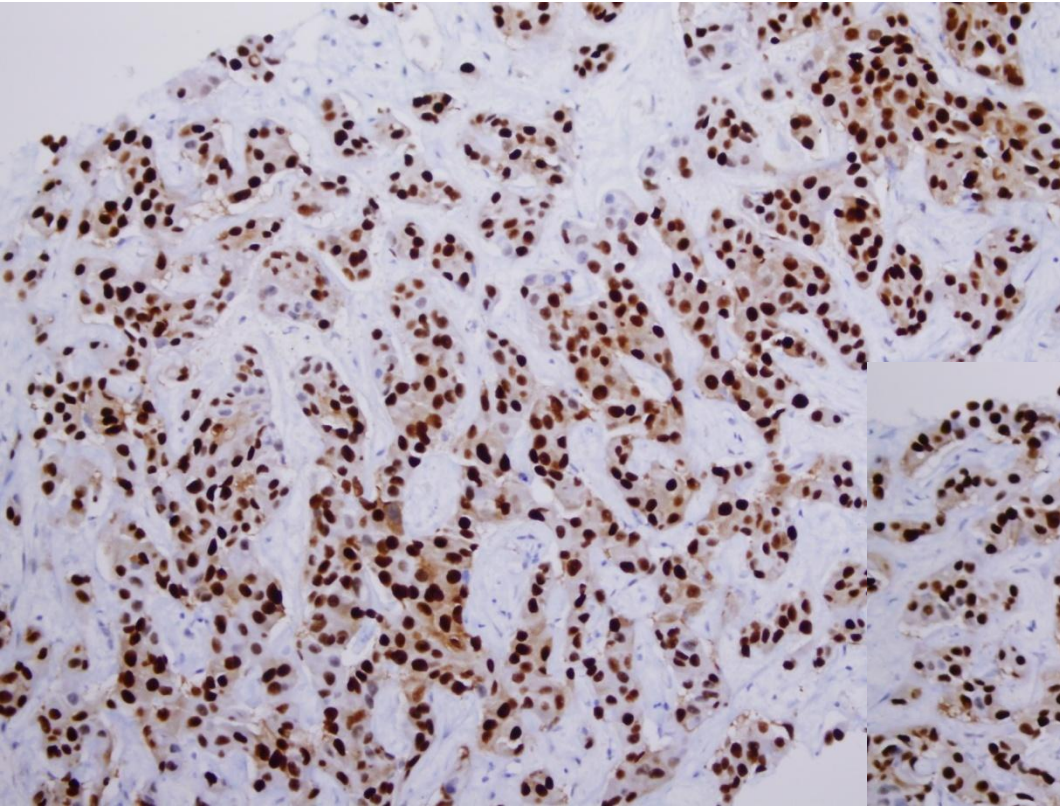




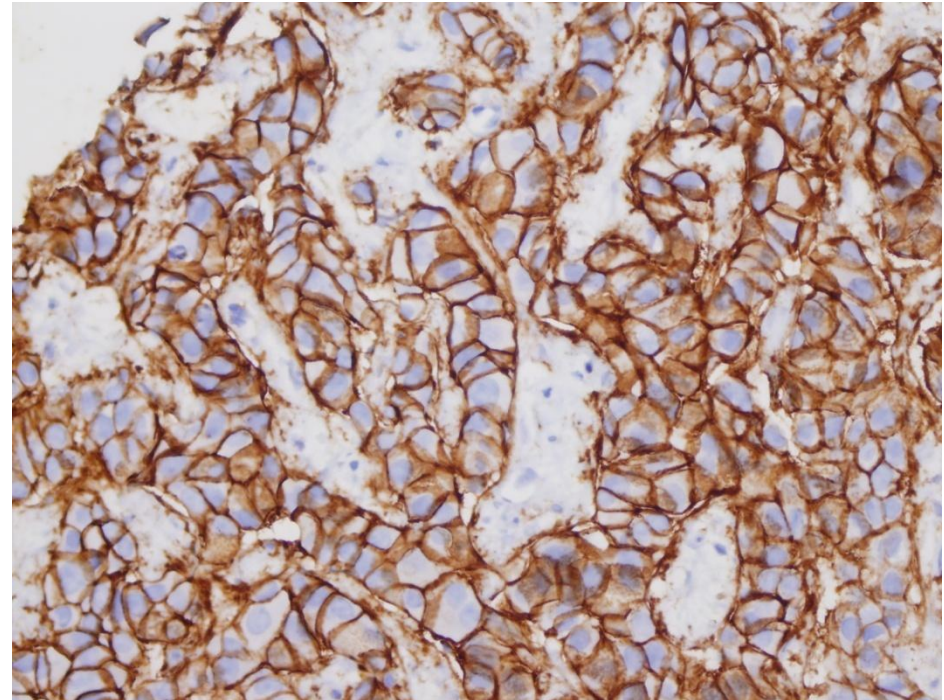
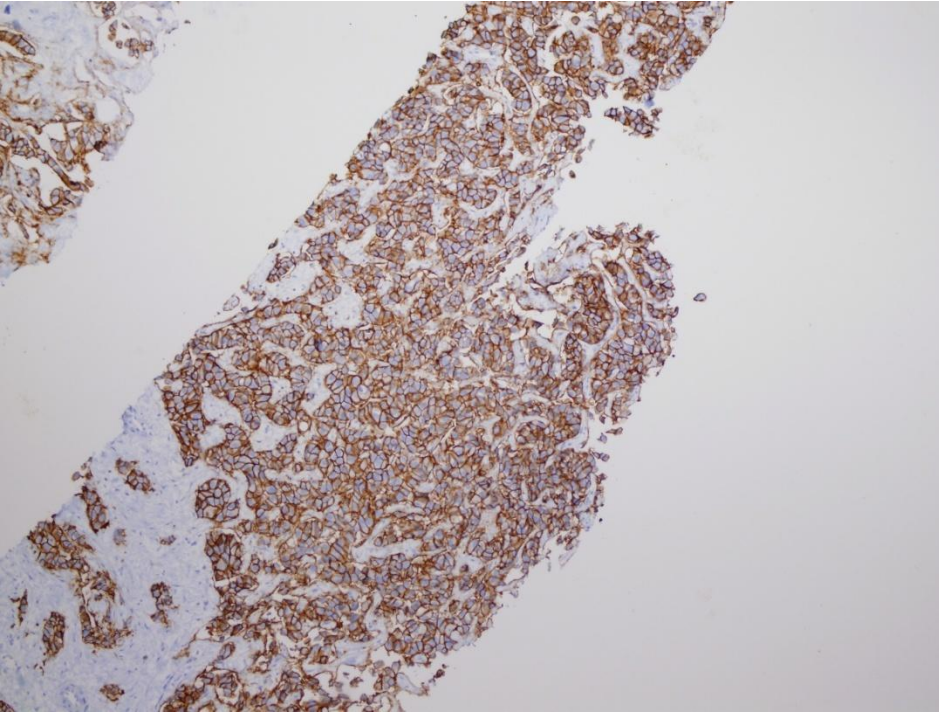




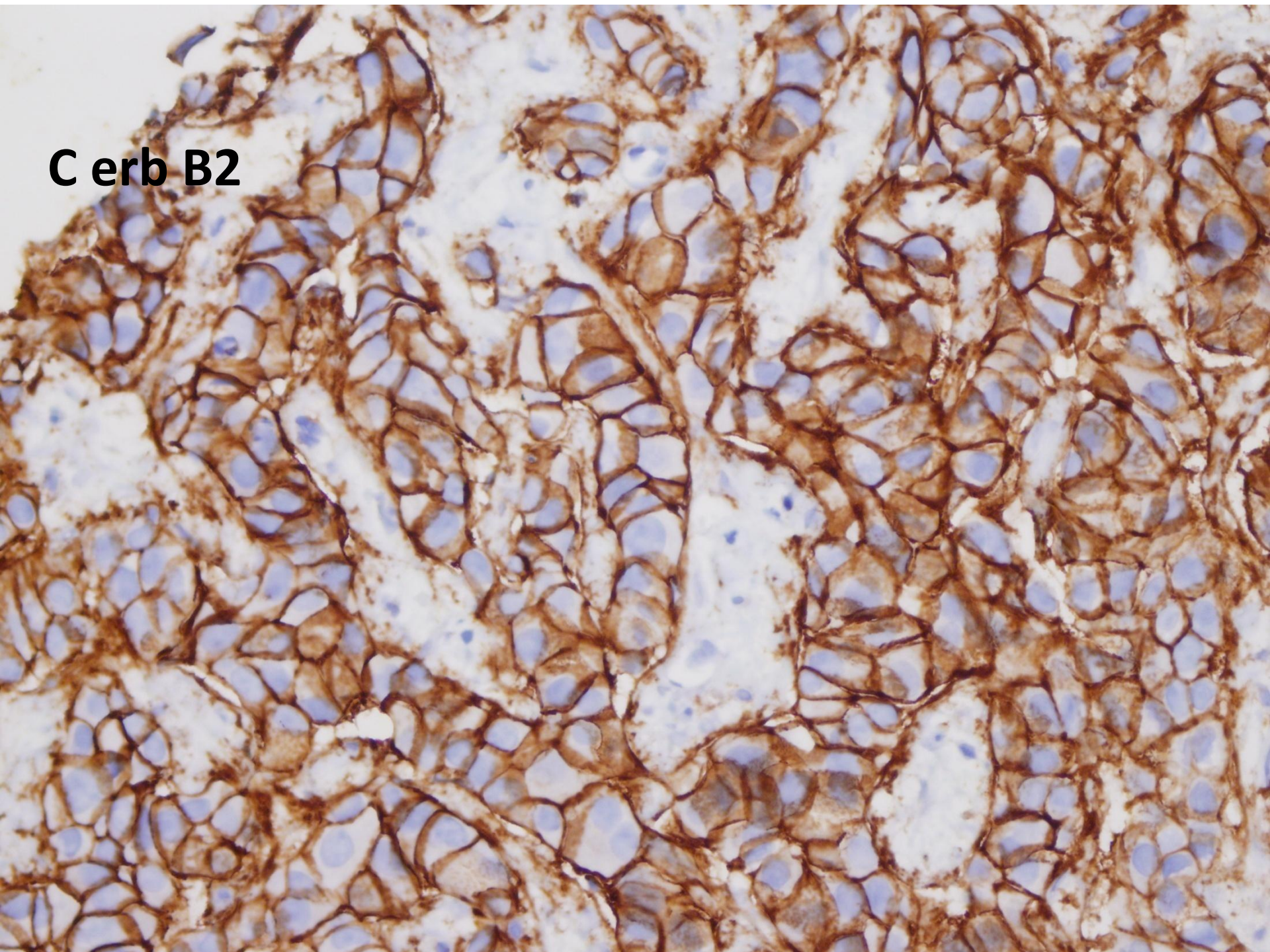
Progesteron reseptörü

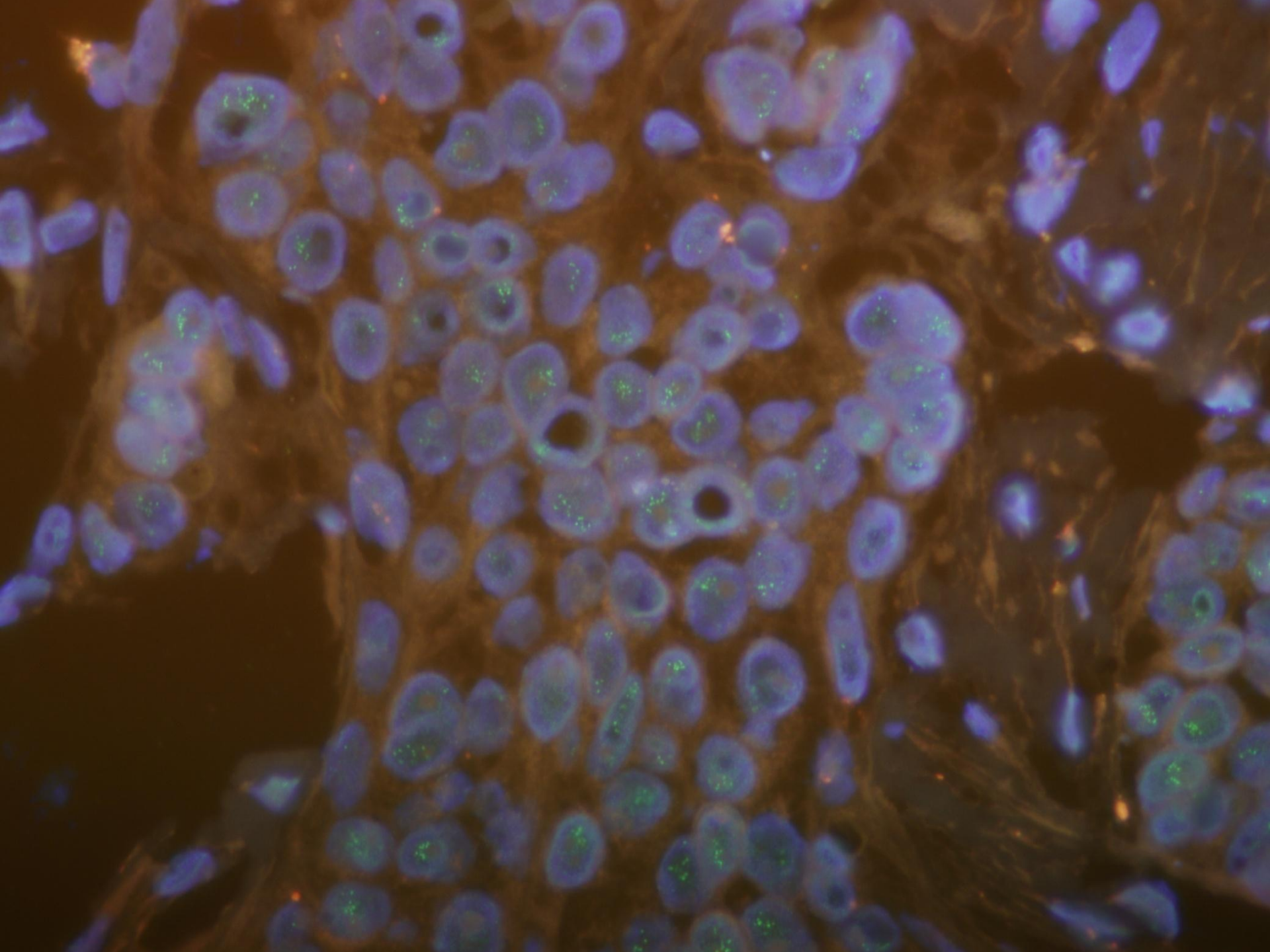


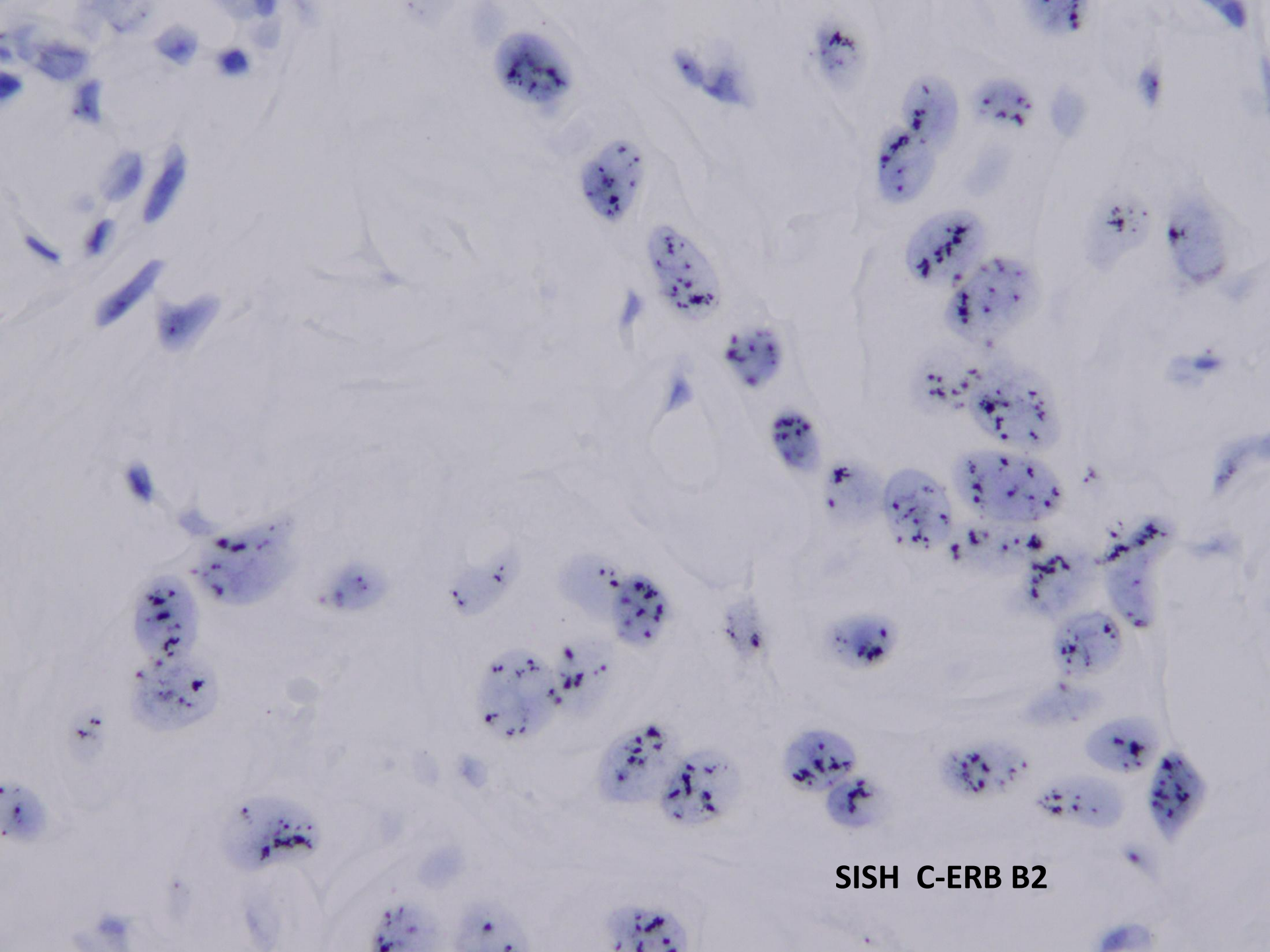
C-erb B2



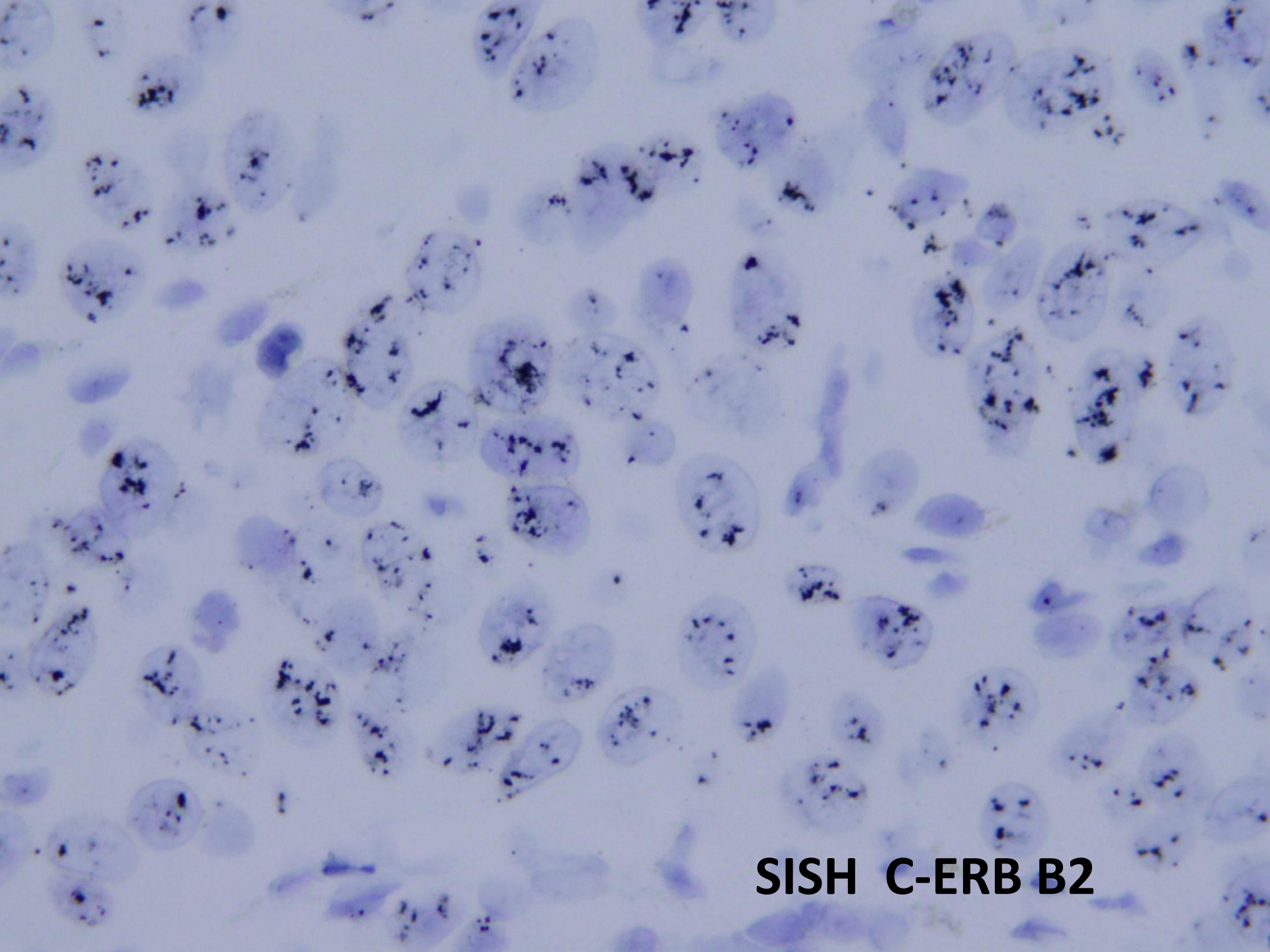
C erb B2



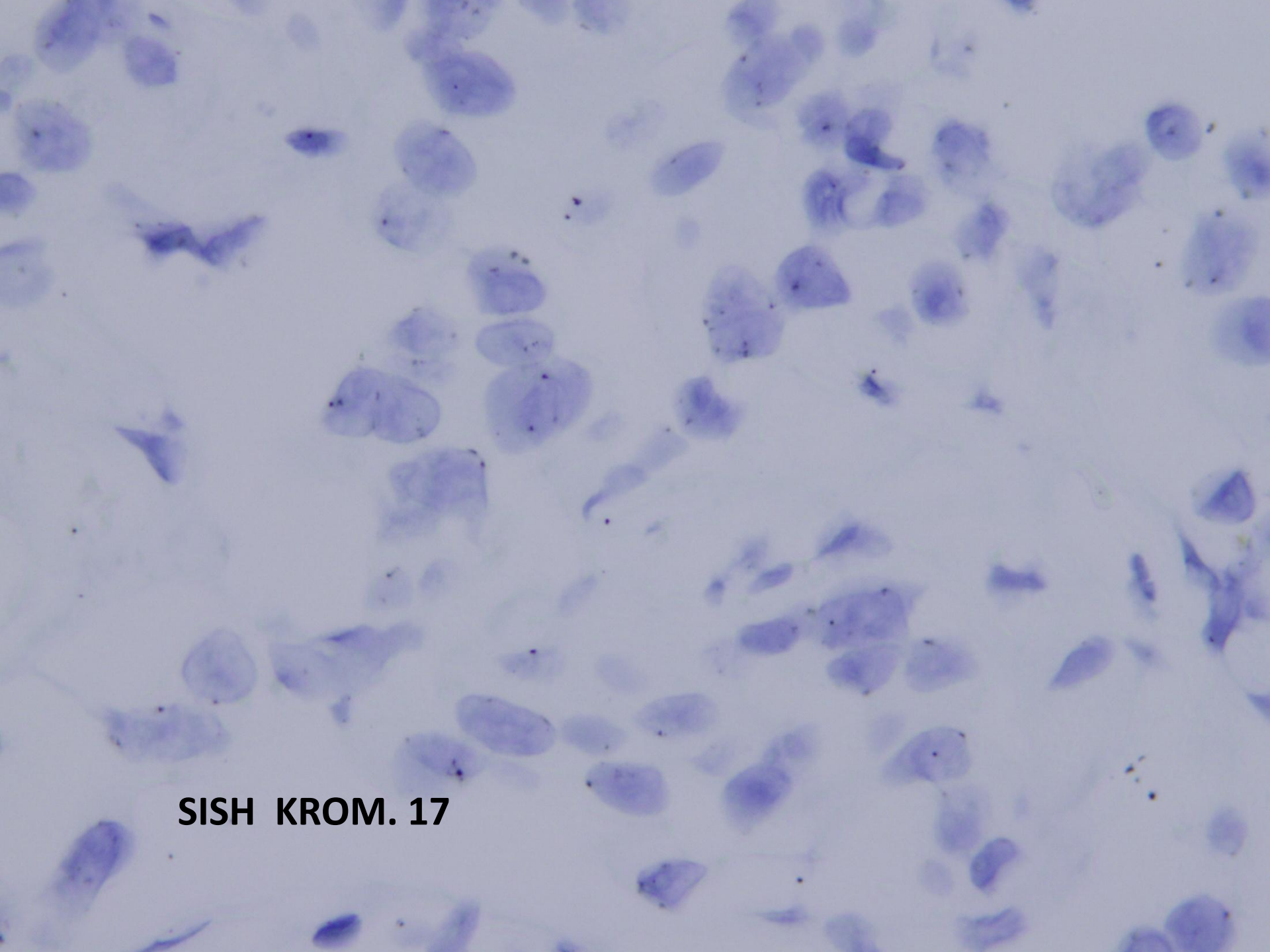




SISH C-ERB B2

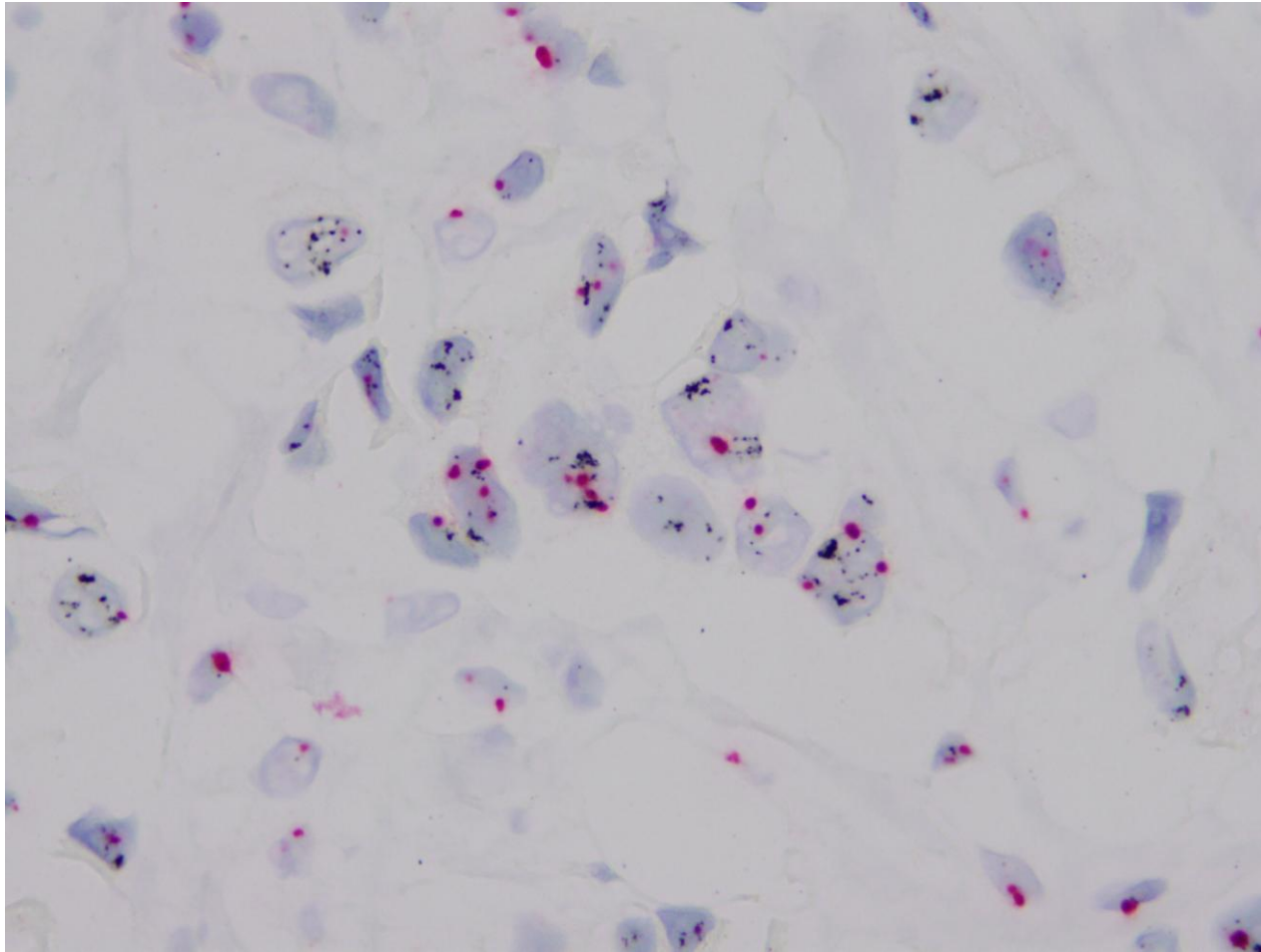


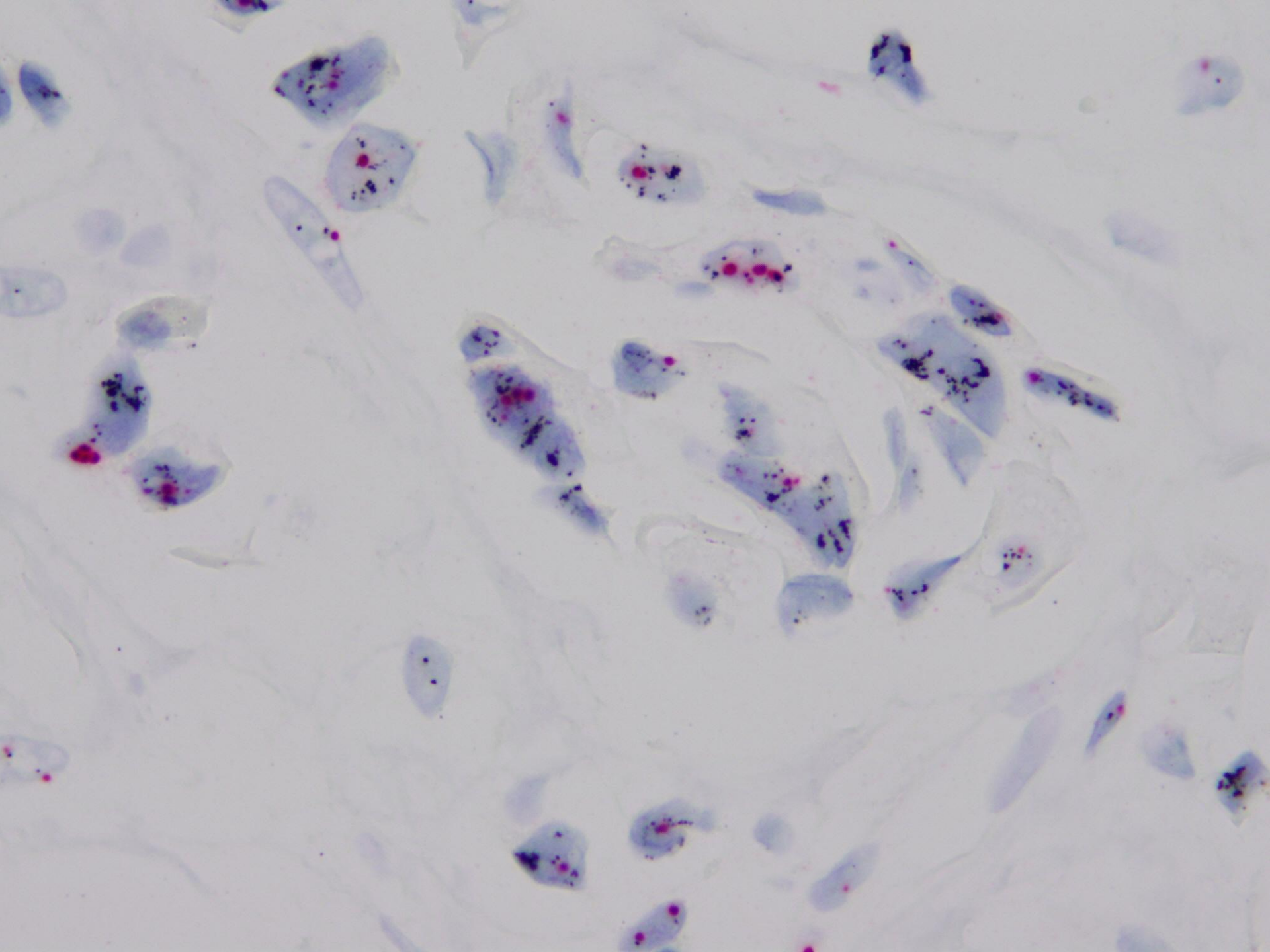
SISH C-ERB B2

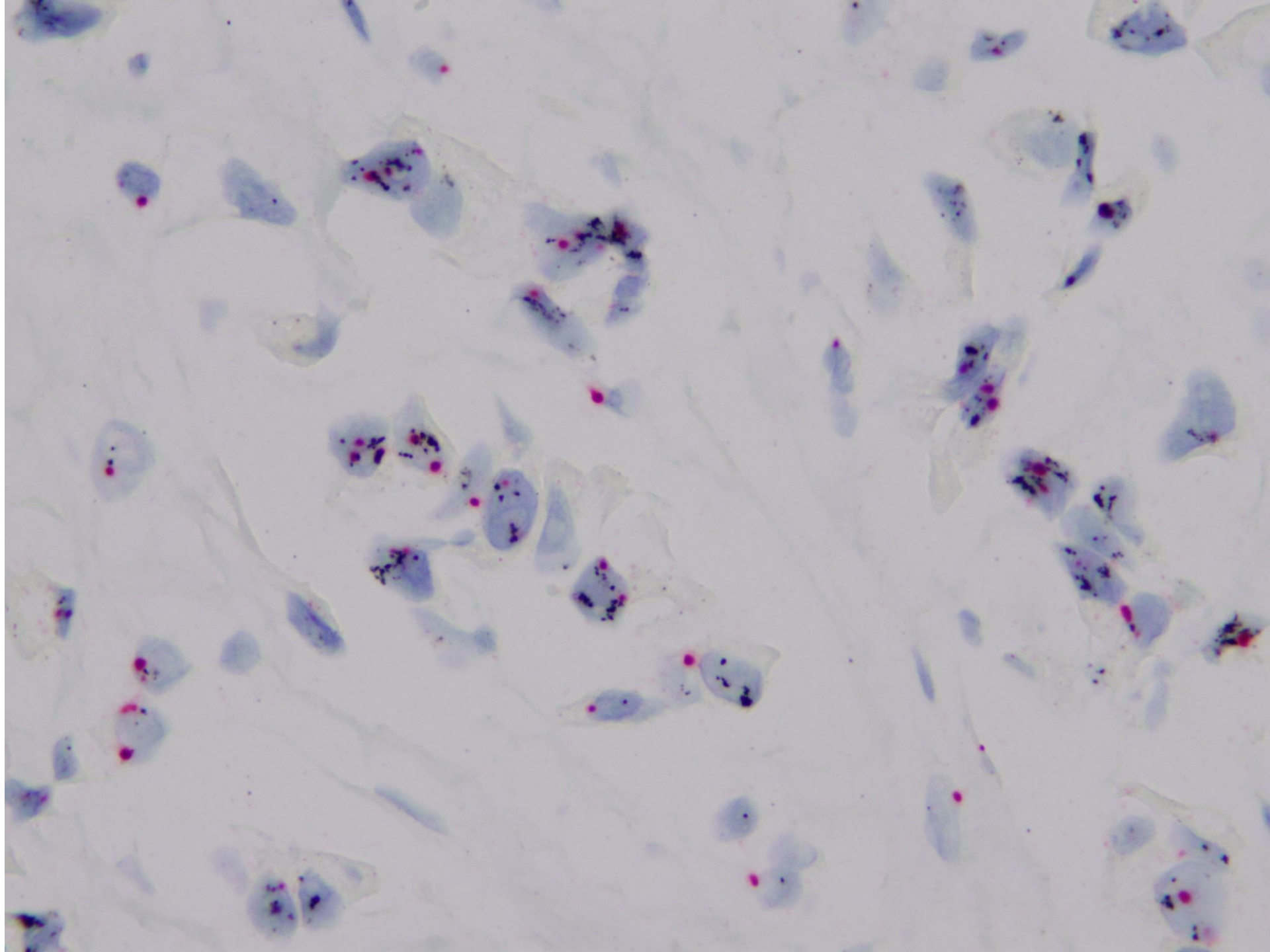


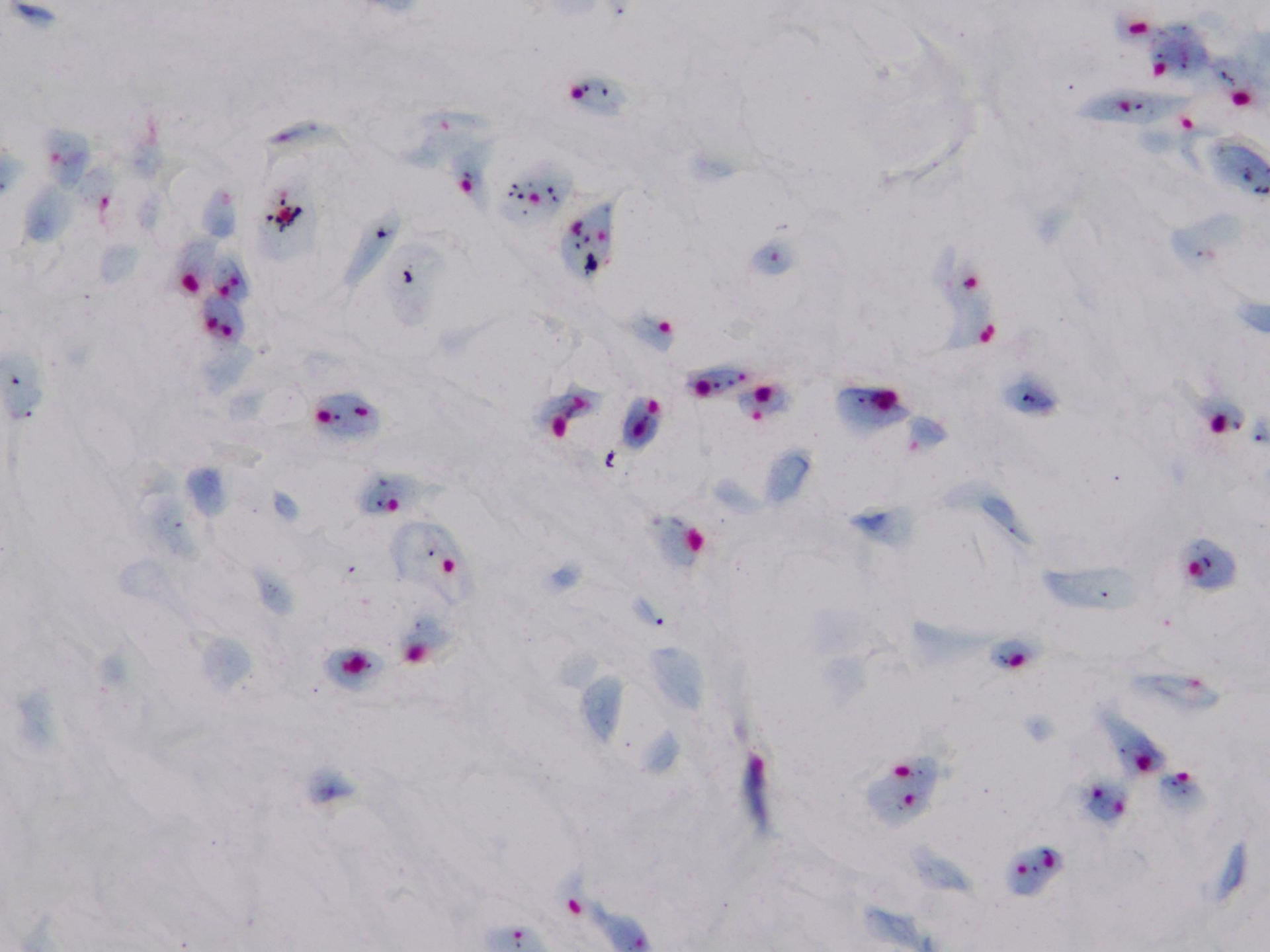
SISH KROM. 17

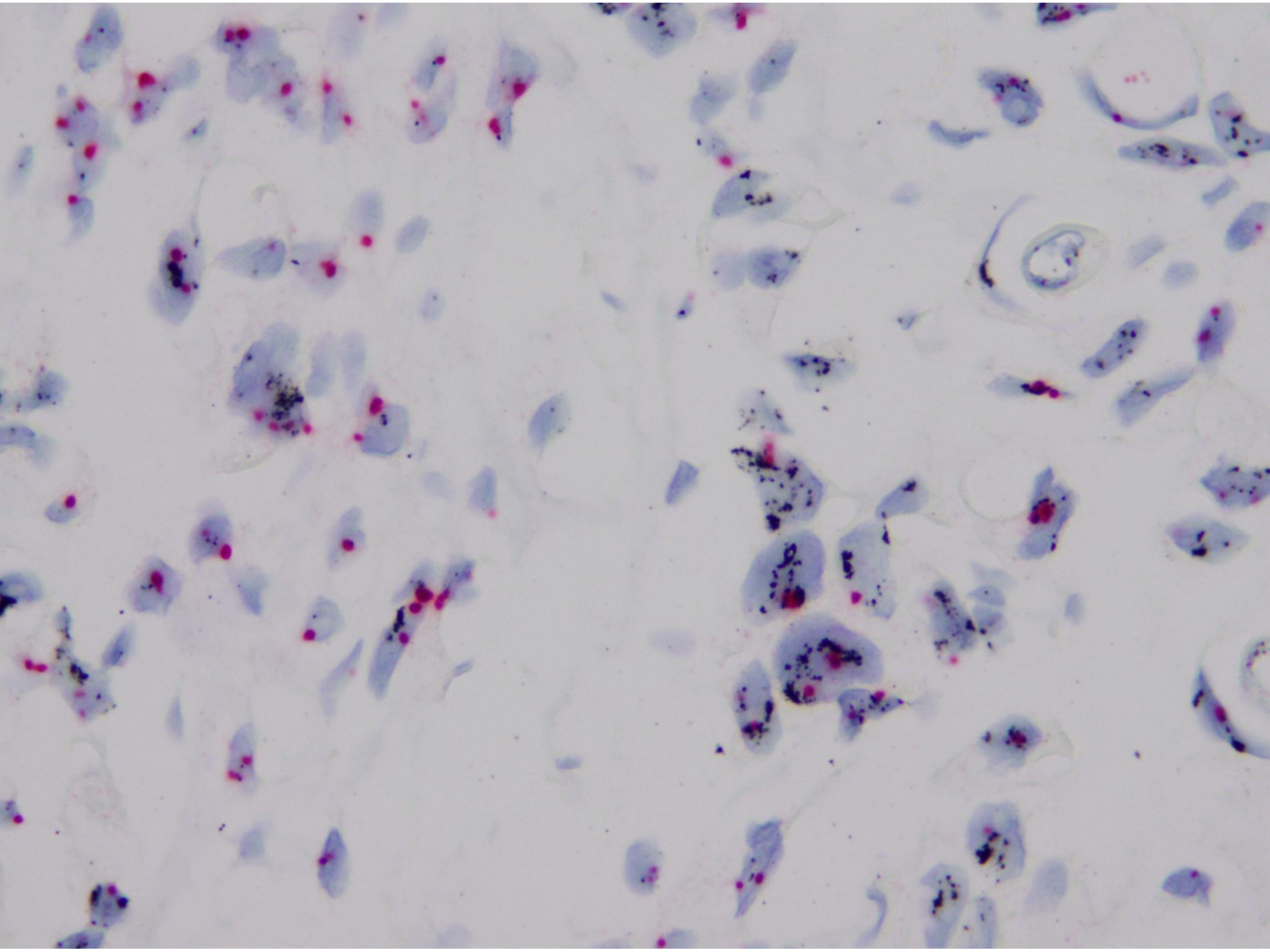
Dual SISH



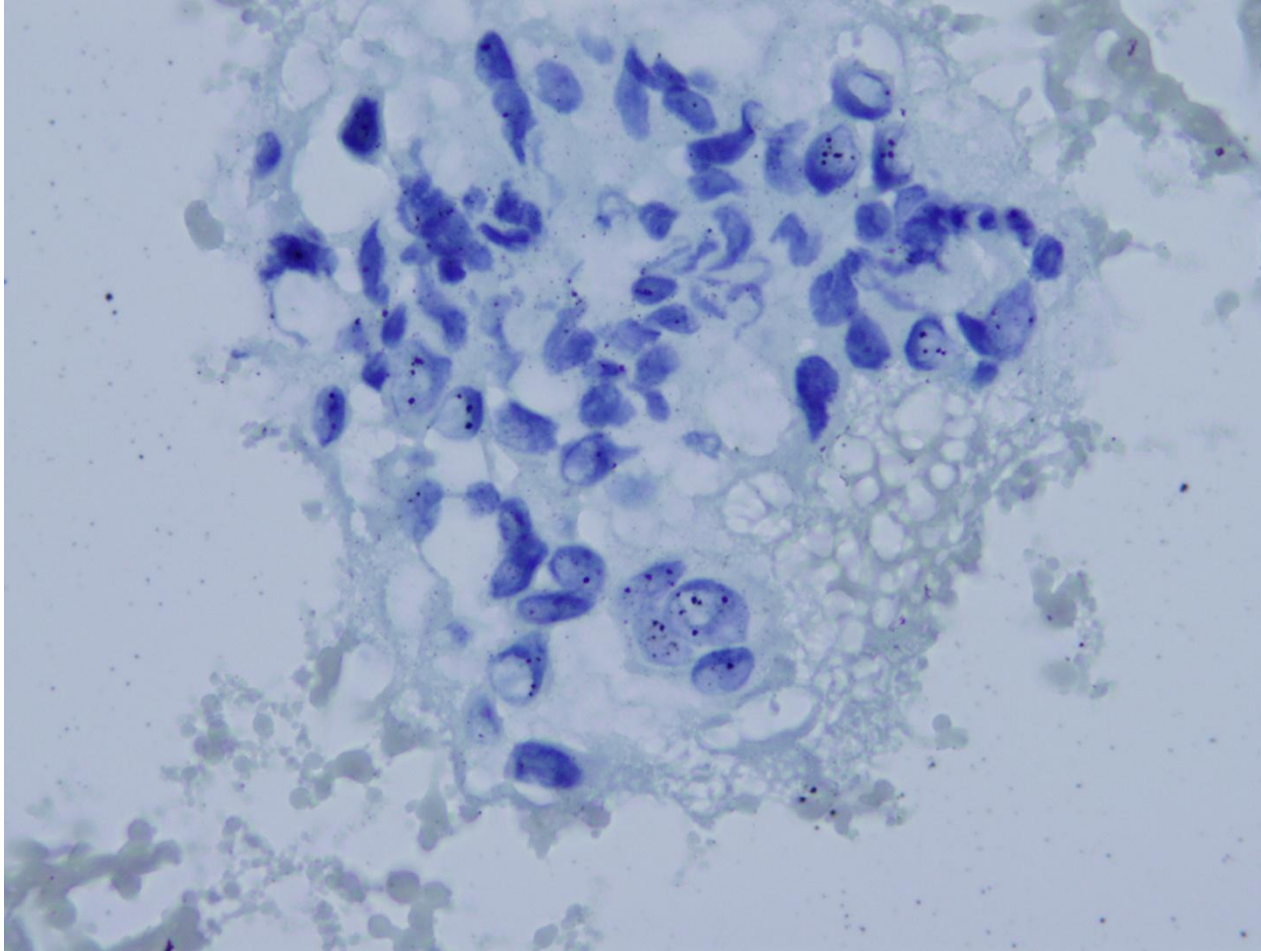


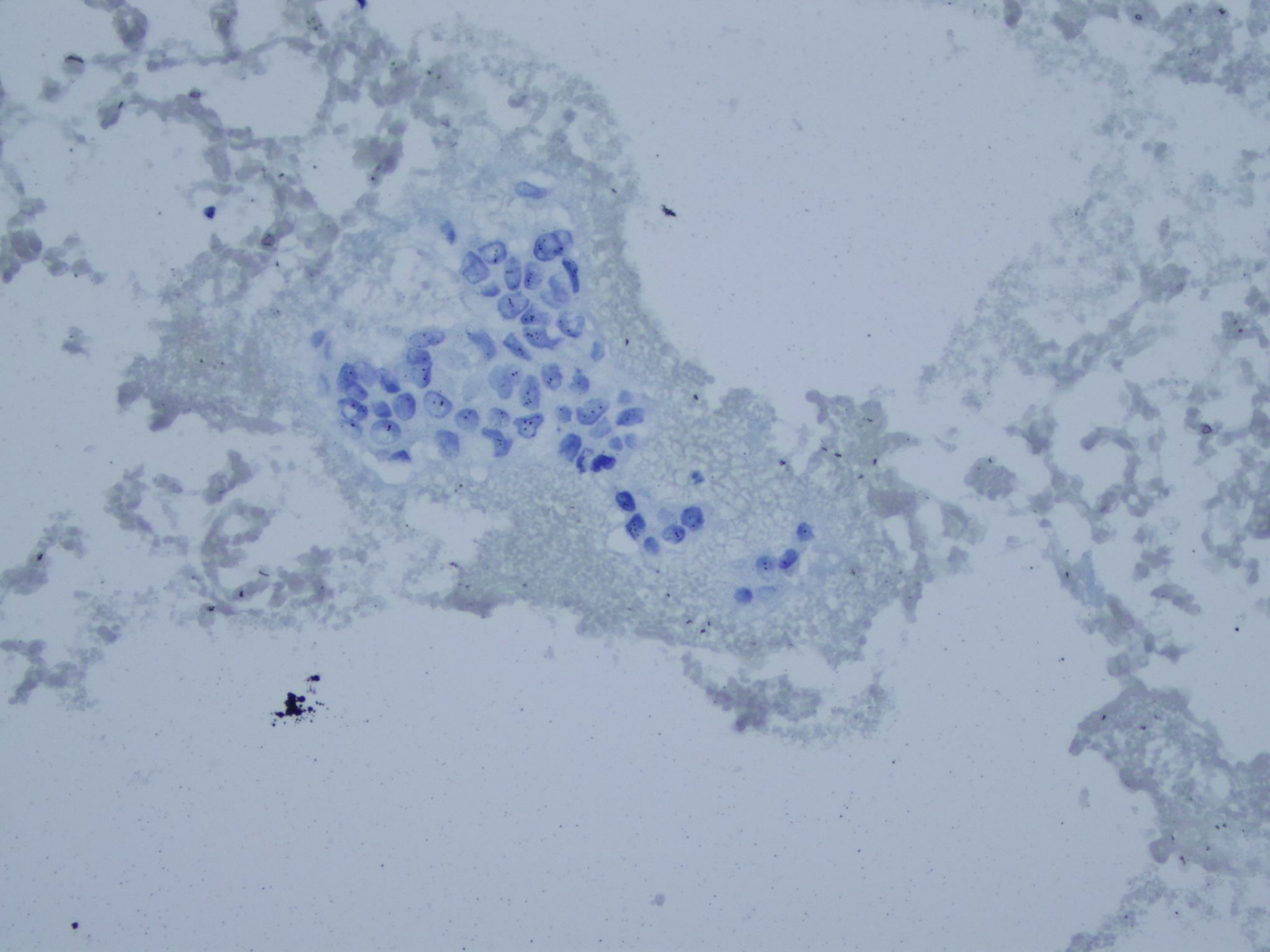


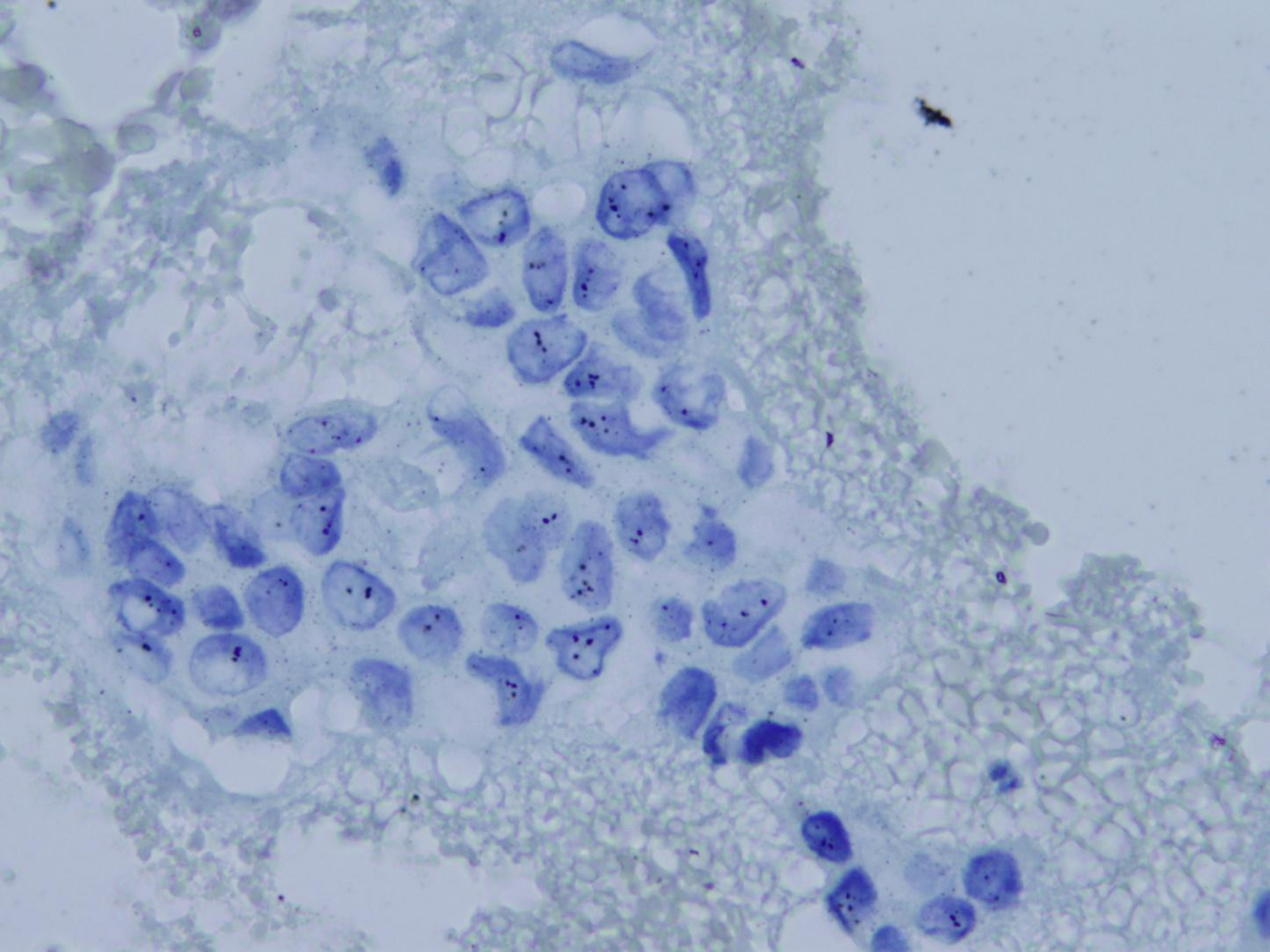




SİTOLOJİK MATERYALDE KULLANIM









*“Konuşsana lan, pozitif ya da negatif de, hedefe yönelecez
.....”*

IHC

Score 0/1+ Negative

No membrane staining or membrane staining in $<10\%$ of invasive tumour cells/faint incomplete membrane staining in $>10\%$ of invasive tumour cells

Score 2+ Equivocal

Weak to moderate complete membrane staining in $>10\%$ of invasive tumour cells, or strong complete membrane staining in $<30\%$

Score 3+ Positive

Strong, complete membrane staining in $>30\%$ of invasive tumour cells

ISH

HER2 ratio <1.8 or HER2 gene copy <4.0

Non-amplified – Negative

HER2 ratio 1.8–2.2 or HER2 gene copy 4.0–6.0

Borderline

HER2 ratio >2.2 or HER2 gene copy >6.0

Amplified – Positive

Count additional cells or retest

Ratio 1.8–1.99

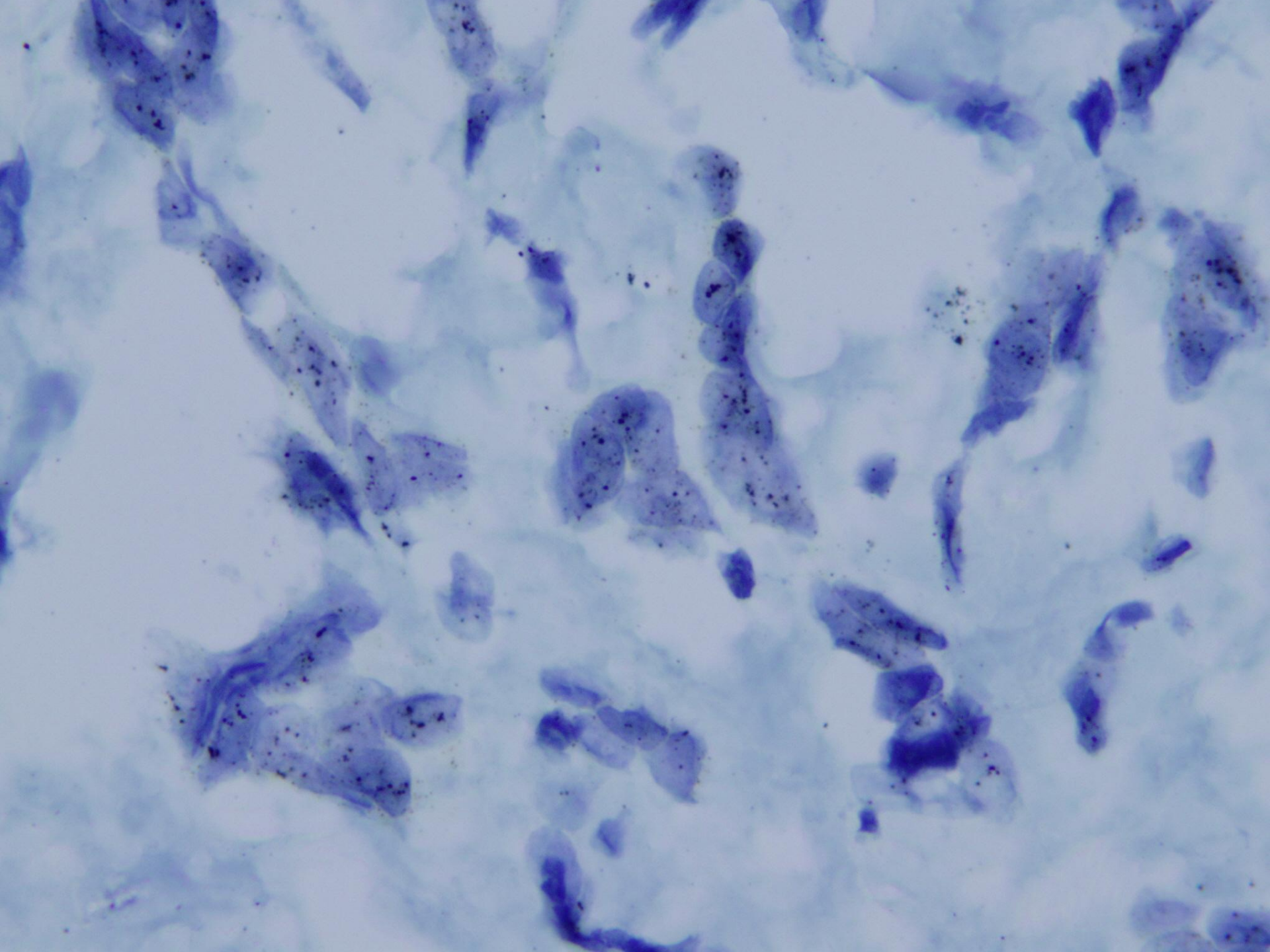
Borderline consider negative

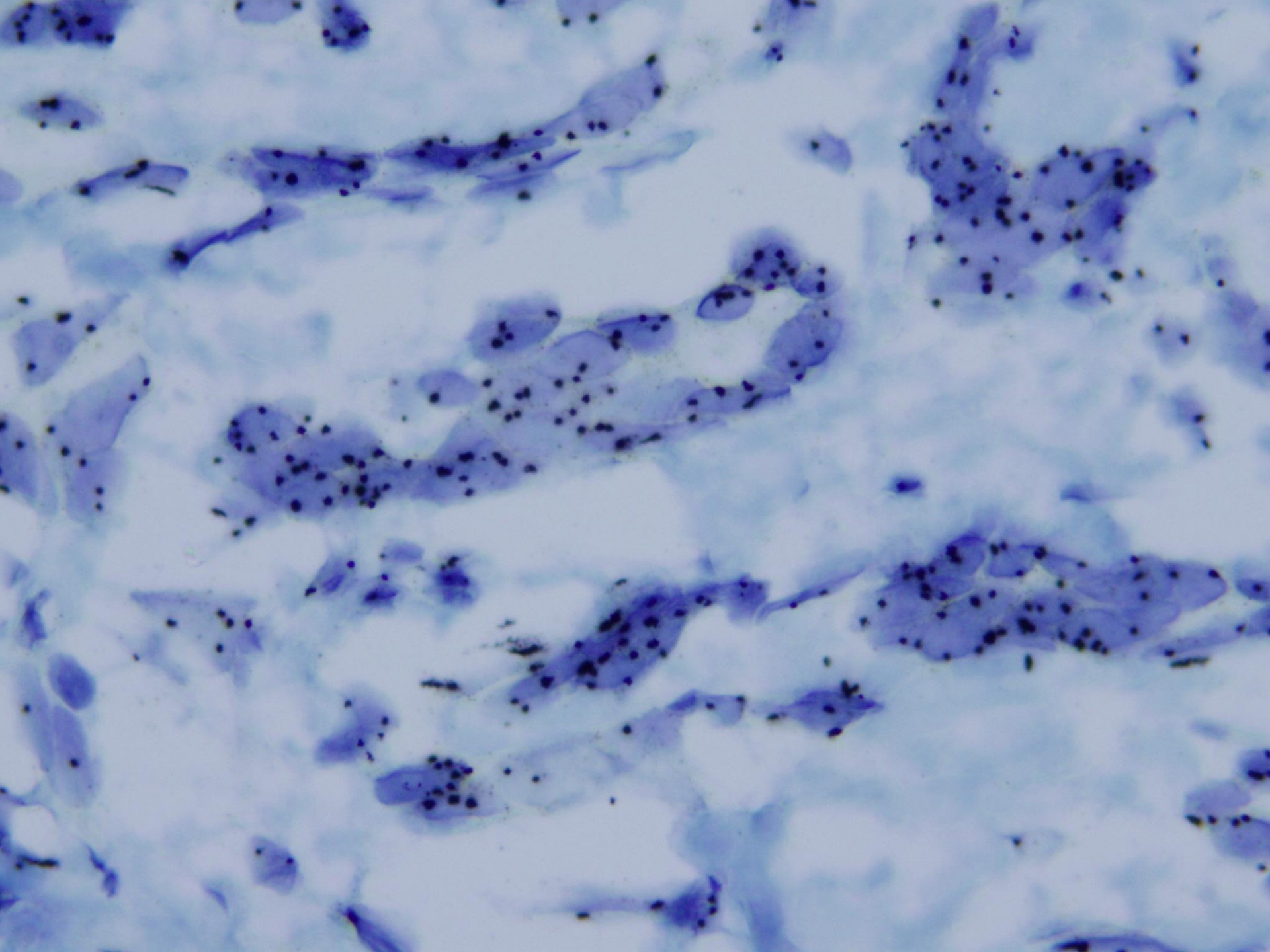
Ratio 2.0–2.20

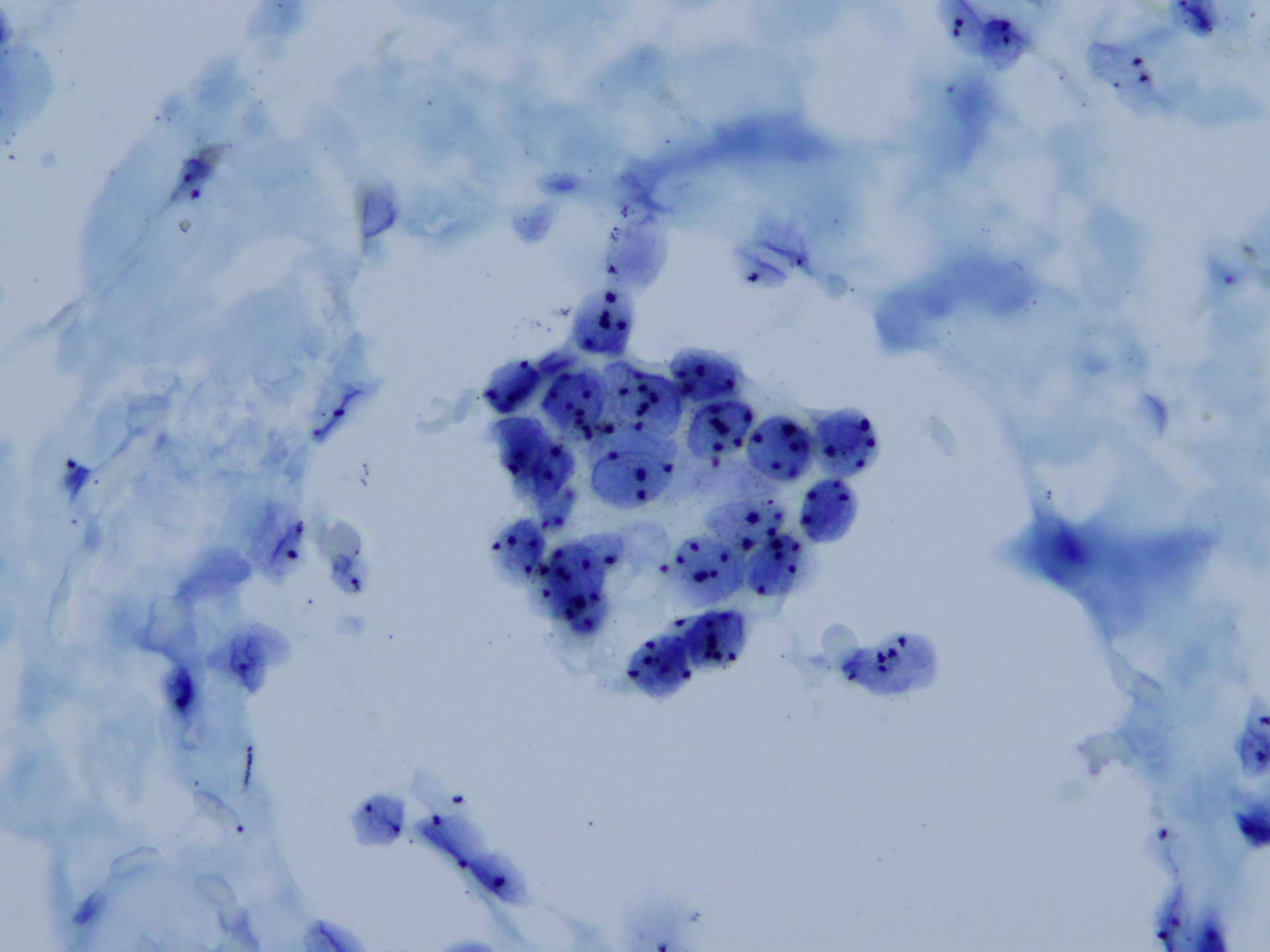
Borderline consider positive

Ratio 1.8–2.2 or HER2 gene copy 4.0–6.0

Equivocal HER2 gene amplification result – patients with ratio ≥ 2.0 were eligible for the adjuvant trastuzumab trials.







- Caterina Marchio, Maryou B Lambros, Patrizia Gugliotta, Ludovica Verdun Di Cantogno, Cristina Botta, Barbara Pasini, David SP Tan, Alan Mackay, Kerry Fenwick, Narinder Tamber, Gianni Bussolati, Alan Ashworth, Jorge S Reis-Filho and Anna Sapino
- Does chromosome 17 centromere copy number predict polysomy in breast cancer? A fluorescence in situ hybridization and microarray-based CGH analysis.
- J Pathol 2009; 219: 16 – 24

- Gerçek kromozom 17 polizomisi çok seyrek. FISH ile >3.0 olan vakalarda genellikle sentromerik bölgeye eklenmeler ya da amplifikasyon söz konusudur.
- CGH ile 18 polizomik vakanın sadece birinde (5.5%) polizomi saptandı.
- *Caterina Marchio, Maryou B Lambros ve ark. 2009*

- FISH ile polizomik ve amplifikasyon göstermeyen (HER2:CEP17 oranı <2) 12 vakanın ikisinde CGH ile amplifikasyon saptandı.
- *Caterina Marchio, Maryou B Lambros ve ark. 2009*

- Yeh I-T, Martin MA, Robetorye RS, et al. Clinical validation of an array CGH test for HER2 status in breast cancer reveals that polysomy 17 is a rare event. *Mod Pathol* 2009; 22:1169–1175
- Moelans CB, de Weger RA, van Diest PJ. Absence of chromosome 17 polysomy in breast cancer: analysis by CEP17 chromogenic in situ hybridization and multiplex ligation-dependent probe amplification. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 120:1–7

External QA programmes ensure consistency between laboratories

Body	Host country	External QA scheme	Accreditation	Website
UK NEQAS ICC & ISH	UK	✓		www.ukneqasicc.ucl.ac.uk
Clinical Pathology Accreditation	UK	Accredits UK NEQAS ICC & ISH schemes	✓	www.cpa-uk.co.uk
UK Accreditation Service	UK		✓	www.ukas.com
CAP	USA	✓	✓	www.cap.org
Canadian QA	Canada	✓		www.qmpls.org www.cancercare.on.ca
NordiQC	Norway Denmark Sweden Finland	✓		www.nordiqc.org
Association Française d'Assurance Qualité en Anatomie Pathologique	France	✓		www.afaqap.org
Royal College of Pathologists of Australasia Quality Assurance Programs	Australia New Zealand	✓		www.rcpaqap.com.au

- Meme tümöründe ideal tanı ve tedavinin yolu multidisipliner çalışmadan geçer
- Hedefe yönelik tedavide önem taşıyan proteinlerin korunmasında cerrahinin sorumluluğu patoloji bölümleri kadar büyüktür
- Bunların belirlenmesi oldukça hassas yöntemlerdir
- Doğru tanı için
 - laboratuvar kalite ve standardizasyonu
 - patolog deneyimi
 - meslek içi eğitim şarttır

HER2 Testlerinde Kalite Kontrolü

- İHK ve FISH ile HER2 testi için yerel ve merkezi laboratuvarlar arası uyum çok zayıfken (%74, %67), merkezi ve referans laboratuvarları arasında uyum çok yüksek (94.3%,95.2%)
- Uzmanlığına güvenebilmek için yılda İHK için en az 250 kez bu testi uyguluyor olmaları gerektiği belirtilmektedir
- FISH için bu sayı yılda en az 100 vaka
- İnternal kalite kontrolü
- Eksternal kontrolü

- Cerrahi materyal mümkün olan en kısa sürede (1 saat içerisinde) fiksatif konmalıdır.
- Fiksatif yeterli miktarda olmalıdır.
- 6 saatten az ya da 48 saatten fazla fiksasyon protein kaybına neden olur.

- **Implementation of American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists HER2 Guideline Recommendations in a Tertiary Care Facility Increases HER2 Immunohistochemistry and Fluorescence In Situ Hybridization Concordance and Decreases the Number of Inconclusive Cases**
- *Lavinia P. Middleton, MD; Kathy M. Price, MA; Pamela Puig, MT; Lori J. Heydon, MT; Emily Tarco, MT; Nour Sneige, MD; Kaye Barr, HT; Michael T. Deavers, MD*
(Arch Pathol Lab Med. 2009;133:775–780)

The number of FISH inconclusive cases decreased from 10.8% to 3.4% (a 64% reduction)

- HER2 testing in the UK: recommendations for breast and gastric in-situ hybridisation methods
- J M S Bartlett, J Starczynski, Neil Atkey, E Kay, A O'Grady, Michael Gandy, Merdol Ibrahim, Bharat Jasani, I O Ellis, S E Pinder, R A Walker
- J Clin Pathol 2011;64:649e653.
doi:10.1136/jcp.2011.089847 649

İN SİTU HİBRİDİZASYON

- Yıllık 100 vaka meme
- Yıllık 50 vaka mide
- En az % 10'unda dual skorlama (iki kişi)
- Zor vakalar daima ikinci bir göz
- Sentromerik probe olmadan yapılan kabul edilmemekte
- *Bartlett ve ark 2011*

Çalışma merkezlerinde IHC HER2 yoğunluğuna göre vakaların dağılımı

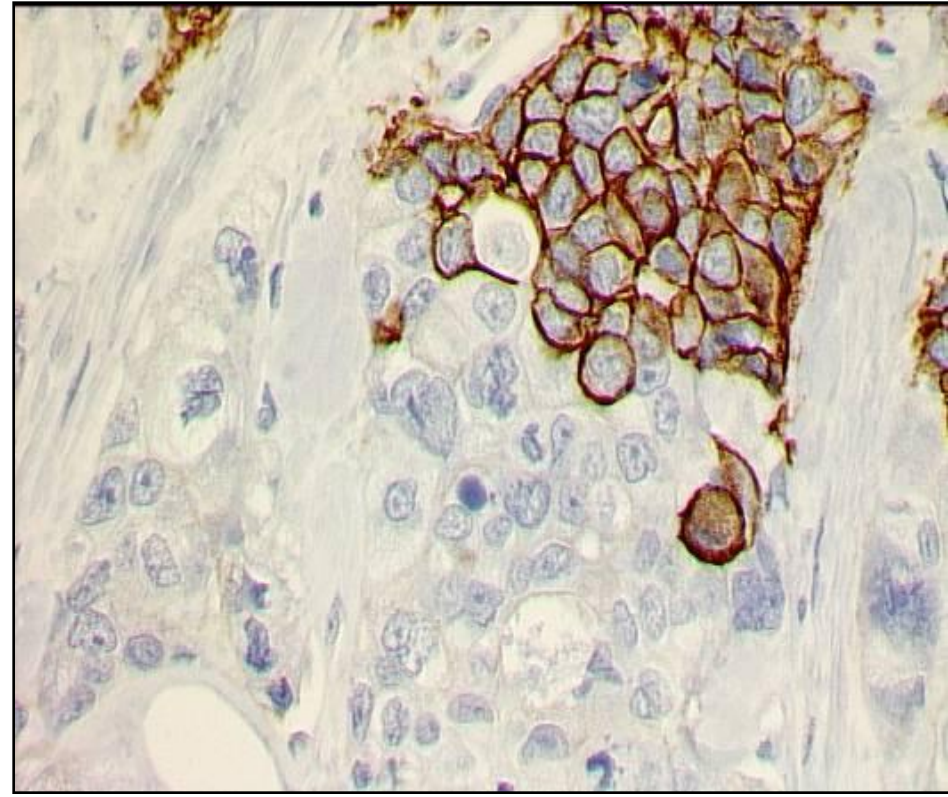
	0	+	++	+++	Toplam
Sayı	112	9	10	31	162
Yüzde	69.1	5.6	6.2	19.1	100.0
Sayı	69	27	9	31	136
Yüzde	50.7	19.9	6.6	22.8	100.0
Sayı	42	13	18	23	96
Yüzde	43.8	13.5	18.8	24.0	100.0
Sayı	148	16	16	20	200
Yüzde	74.0	8.0	8.0	10.0	100.0
Sayı	78	1	66	14	159
Yüzde	49.1	0.6	41.5	8.8	100.0
Sayı	449	66	119	119	753
Yüzde	59.6	8.8	15.8	15.8	100.0

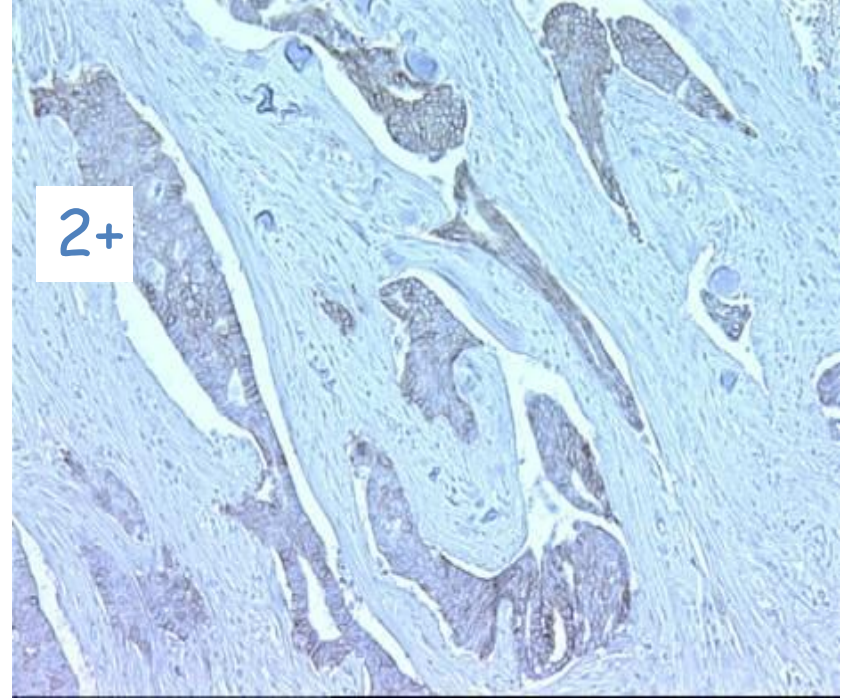
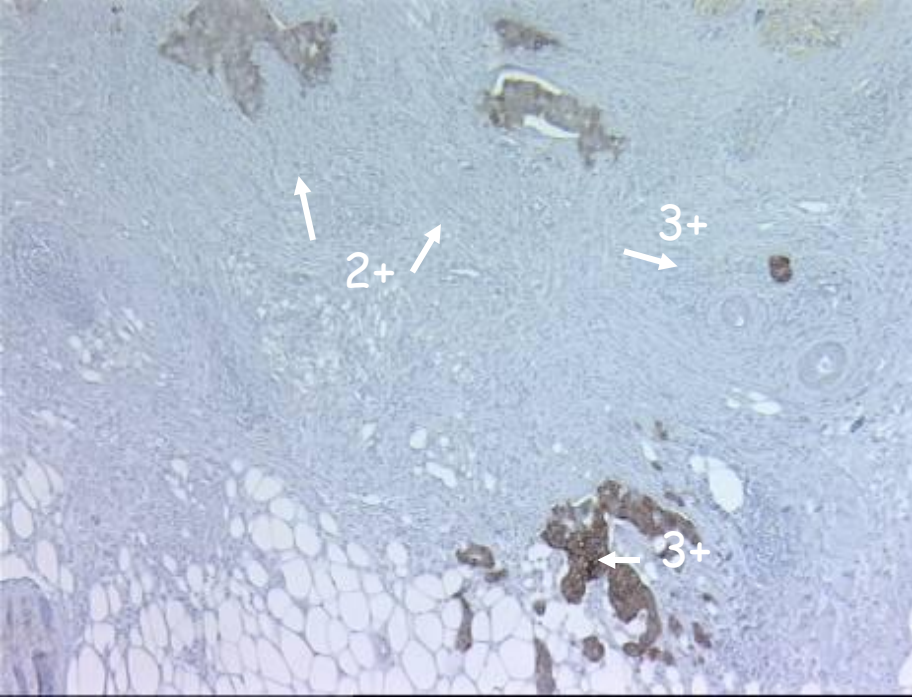
İn situ hibridizasyon yapılan vakaların sonuçları

IHC	Sayı	Yüzde	SISH		FISH	
			(+)	(-)	(+)	(-)
0	449	59.6	-	1	-	-
+	66	8.8	-	-	-	1
++	119	15.8	3	15	13	60
+++	119	15.8	-	-	1	2

(++) kategorisindeki 119 vakanın 91'inde SISH/FISH çalışması uygulanmış ve 16 vakada (% 17.6) gen amplifikasyonu tespit edilmiştir

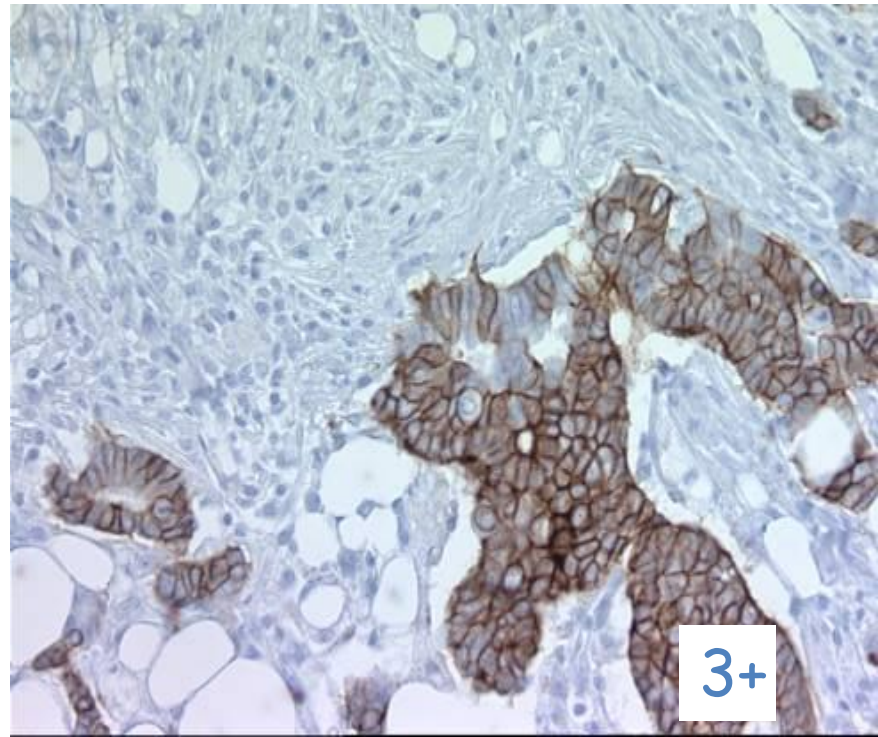
- Heterojen boyanma
- En kuvetli odak skorlanır





HETEROJEN TÜMÖR

- Seyrek
- 3+ odak %10'dan az
- Diğer lamlarda veya ganglion metastazlarında tekrar çalışılır



HÜCRE PROLİFERASYONU

- Mitotik indeks
- Ki-67 antigen
- Proliferasyon ile ilişkili mRNA ekspresyonu:
 - Ki-67, survivin, STK15, CCNB1, MYBL2

Ki-67

- Hücre siklusunun G1, S, and G2 fazlarında eksprese edilir.
- Mitotik fazda peak yapar.
- G0'da görülmez.

- Tümör grade'i ile korele.
- Reseptör pozitif tümörlerde daha düşük.

- a cut-off of 13.25% Ki67 positive staining was used to discriminate between the subtypes, meaning that a higher score defines luminal B tumors with a worse prognosis

Cheang MCU, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, Watson M, Davies S, Bernard PS, Parker JS et al: Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. Journal of the National Cancer Institute 2009, 101 736–750

- Stuart-Harris R, Caldas C, Pinder SE & Pharaoh P: Proliferation markers and survival in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients.
- Breast [Volume 17, Issue 4](#) , Pages 323-334, August 2008

- Eighty-five studies involving 32,825 patients were analysed. Ki-67 (43 studies, 15,790 patients), MI (20 studies, 7021 patients), and LI (11 studies, 7337 patients) were associated with significantly shorter overall and disease free survival, using results from univariate and multivariate analyses from the individual studies. PCNA (11 studies, 2677 patients) was associated with shorter overall survival by multivariate analysis only, because of lack of data. There was some evidence for publication bias, but all markers remained significant after allowing for this. Ki-67, MI, PCNA and LI are associated with worse survival outcomes in early breast cancer. However, whether these proliferation markers provide additional prognostic information to commonly used prognostic indices remains unclear.

- Ki67 nüksüz sağkalım ve genel sağkalımın kuvvetli bir göstergesidir.
- Ancak tedavi öncesindeki yüksek skorlarda patolojik tam regresyon şansı yüksektir ve bu hastalardaki uzun vadeli sağkalımın göstergesidir (Jones et al. 2009).

- St Galen 2009 konsensusunda Ki-67 prognostik parametre olarak kabul edilmiş ve tedavi yaklaşımlarında aşağıdaki şekilde sınıflanması önerilmiştir:
 - Düşük Ki-67 indeksi: \leq % 15
 - İntermedyer Ki-67 indeksi: % 16-30
 - Yüksek Ki-67 indeksi: \geq % 30
- *Goldhirsch A, & Panel members: Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2009. Annals of Oncology Advance Access published June 17, 2009*

- Antikor, klon
- Değerlendirme (heterojenite, hot spot?)

- Mitch Dowsett, Torsten O. Nielsen, Roger A'Hern, John Bartlett, R.Charles Coombes, Jack Cuzick, Matthew Ellis, N.Lynn Henry, Judith C. Hugh, Tracy Lively, Lisa McShane, Soon Paik, Frederique Penault-Llorca, Ljudmila Prudkin, Meredith Regan, Janine Salter, Christos Sotiriou, Ian E. Smith, Giuseppe Viale, Jo Anne Zujewski, Daniel F. Hayes
- **Assessment of Ki67 in Breast Cancer:
Recommendations from the International Ki67 in Breast
Cancer Working Group**
- J Natl Cancer Inst 2011;103:1–9
- *Manuscript received March 14, 2011; revised September 1, 2011; accepted September 2, 2011.*

- Ki-67 indeksini düşürürler:
- Gece fikse edilmeden bekletilmesi
- Frozen inceleme için dokunun dondurulması
- Bouin ve etanol kullanımı
- EDTA ya da asit dekalsifikasyon kullanımı

Meme kanserinde Ki 67 belirlenmesinde öneriler

PREANALİTİK

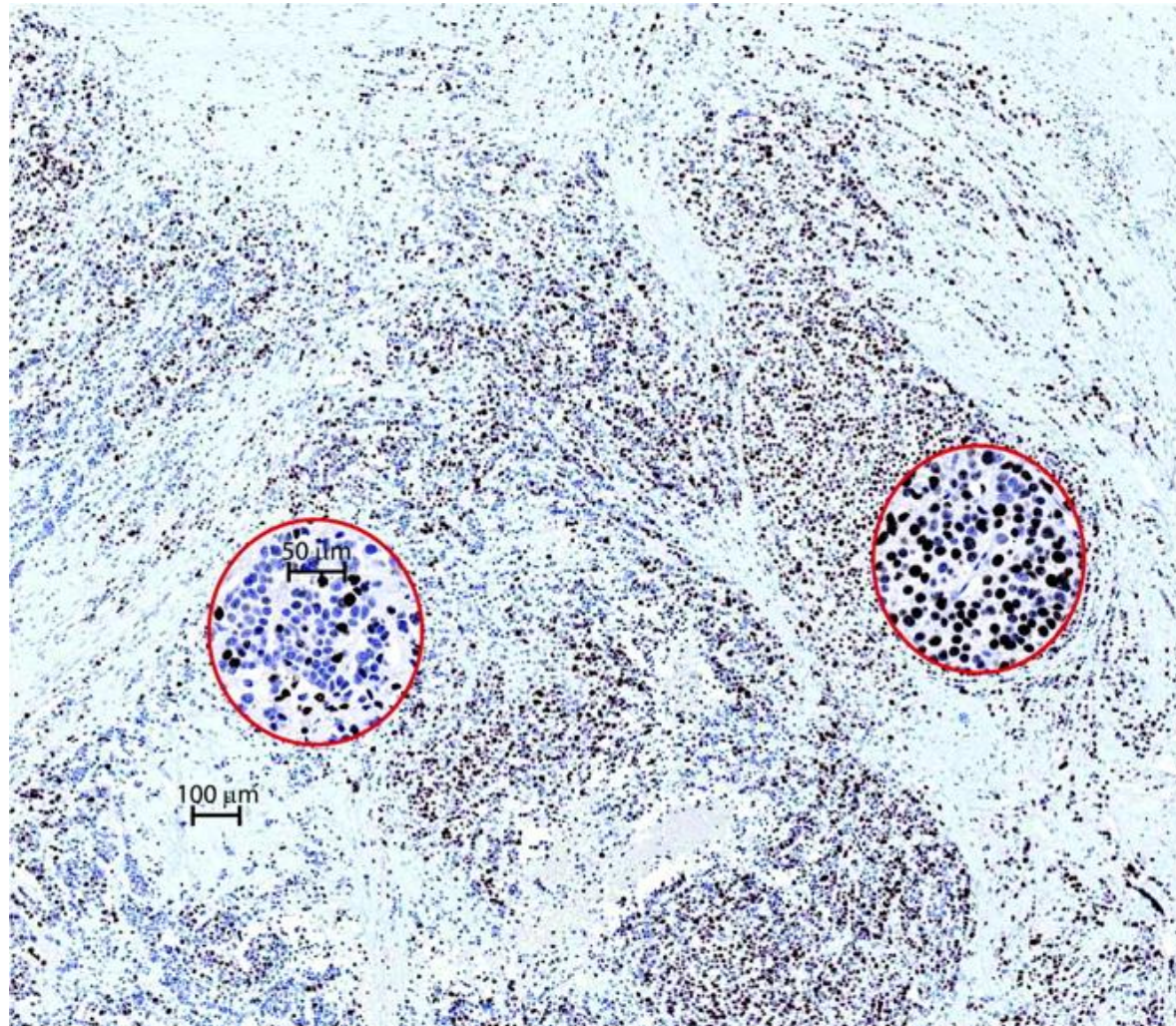
- Kor biyopsi ve eksizyon materyalinin kesitleri kabul edilir. Kıyaslamalı skorlar için aynı tür materyal kullanılmalıdır.
- TMA epidemiyolojik çalışmalar ve klinik çalışmalar için kabul edilebilir.
- Tamponlu formalinde fiksasyon konusunda steroid reseptörleri için yayınlanmış rehberler aynen izlenmelidir
- Kesit hazırlandıktan sonra oda ısısında 14 günden fazla saklanmamalıdır. Daha uzun süre saklandıktan sonra elde edilen sonuçlar ihtiyatla karşılanmalıdır.

ANALİTİK

- Her turda bilinen pozitif ve negatif kontroller bulunmalıdır. Nonmalign hücreler ve mitotik figürlerdeki pozitif çekirdeklerin varlığı her bir kesitin kalitesi konusunda kanıttır.
- Antijen retrieval gereklidir. Veriler mikrodalga fırında işlemin kullanılmasını desteklemektedir.
- Günümüzde MIB1 antikoru desteklenmektedir.

- İki tür heterojenite:
- 1- Tümörün uç kısımlarında boyanmada artış
 - Üç alan sayın
- 2-Homojen boyanma içerisinde artmış bölgeler
 - Sadece bunları sayanlar
 - Bunları genel ortalamaya katanlar
 - Gözardı edenler

Variable levels of Ki67 staining in breast cancer.



Dowsett M et al. JNCI J Natl Cancer Inst 2011;jnci.djr393

YORUM VE SKORLAMA

- Genel görünümde saptanan boyanma spektrumunu yansıtan en az üç BBA (x 40 objektif) seçilmelidir.
- Prognostik değerlendirme için tümörün invaziv ucu skorlandırılmalıdır.
- Kor biopsi ile kesitler arasında farmakodinamik kıyaslamalar yapılacaksa, kesit tümüyle değerlendirilmeli.
- Belirgin “hot spot” alanları varsa toplam skora dahil edilmelidir.
- Sadece nükleer boyanma pozitif kabul edilir. Boyanma yoğunluğu önemsizdir.
- Herhangi bir protokol daha düşük sayıyı kabul edilebilir bulmadıkça, skora en az 500 malign invaziv hücreyi kapsamalıdır (hatta tercihen 1000)
- Görüntü analiz yöntemlerinin klinik pratikte kullanımı kanıtlanmalıdır.

Oncotype DX[®] 21-Gene Recurrence Score (RS) Assay

16 Cancer and 5 Reference Genes From 3 Studies

PROLIFERATION

Ki-67
STK15
Survivin
Cyclin B1
MYBL2

ESTROGEN

ER
PR
Bcl2
SCUBE2

$$\begin{aligned}
 \text{RS} = & + 0.47 \times \text{HER2 Group Score} \\
 & - 0.34 \times \text{ER Group Score} \\
 & + 1.04 \times \text{Proliferation Group Score} \\
 & + 0.10 \times \text{Invasion Group Score} \\
 & + 0.05 \times \text{CD68} \\
 & - 0.08 \times \text{GSTM1} \\
 & - 0.07 \times \text{BAG1}
 \end{aligned}$$

GSTM1

BAG1

INVASION

Stromelysin 3
Cathepsin L2

CD68

REFERENCE

Beta-actin
GAPDH
RPLPO
GUS
TFRC

HER2

GRB7
HER2

Category

RS (0 -100)

Low risk

RS <18

Int risk

RS 18 - 30

High risk

RS ≥ 31

- ATAC (Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination) çalışmasında ÖR, PR, Ki-67 ve her-2'nin birlikte kullanılmasının prognozla ilgili olarak GHI-RS (genomic health recurrence score) ile benzer bilgiyi sağladığını göstermiştir.
- [Cuzick J, Dowsett M, Pineda S, Wale C, Salter J, Quinn E, Zabaglo L, Mallon E, Green AR, Ellis IO, Howell A, Buzdar AU, Forbes JF: Prognostic Value of a Combined Estrogen Receptor, Progesterone Receptor, Ki-67, and Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Immunohistochemical Score and Comparison With the Genomic Health Recurrence Score in Early Breast Cancer. *J Clin Oncol.* 2011 Oct 11 \[Epub ahead of print\]](#)

- Klasik histolojik grade ve Nottingham prognostik skor kullanımı da benzer veriyi sağlamaktadır.
- [Rakha EA, Reis-Filho JS, Baehner F, Dabbs DJ, Decker T, Eusebi V, Fox SB, Ichihara S, Jacquemier J, Lakhani SR, Palacios J, Richardson AL, Schnitt SJ, Schmitt FC, Tan PH, Tse GM, Badve S, Ellis IO](#) . *Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade.* [Breast Cancer Res.](#) 2010;12(4):207

- Oncotype DX (Genomic Health, Redwood City, CA) kor biopsi materyalinde “değerlendirilemez” kategorisi % 6-17 arasında değişmektedir.