



Küçük Hücreli Dışı Akciğer Karsinomlarının EGFR Mutasyon Analizinde Real-Time PCR Yöntemi ile Mutasyona Spesifik İmmünohistokimyanın Karşılaştırılması

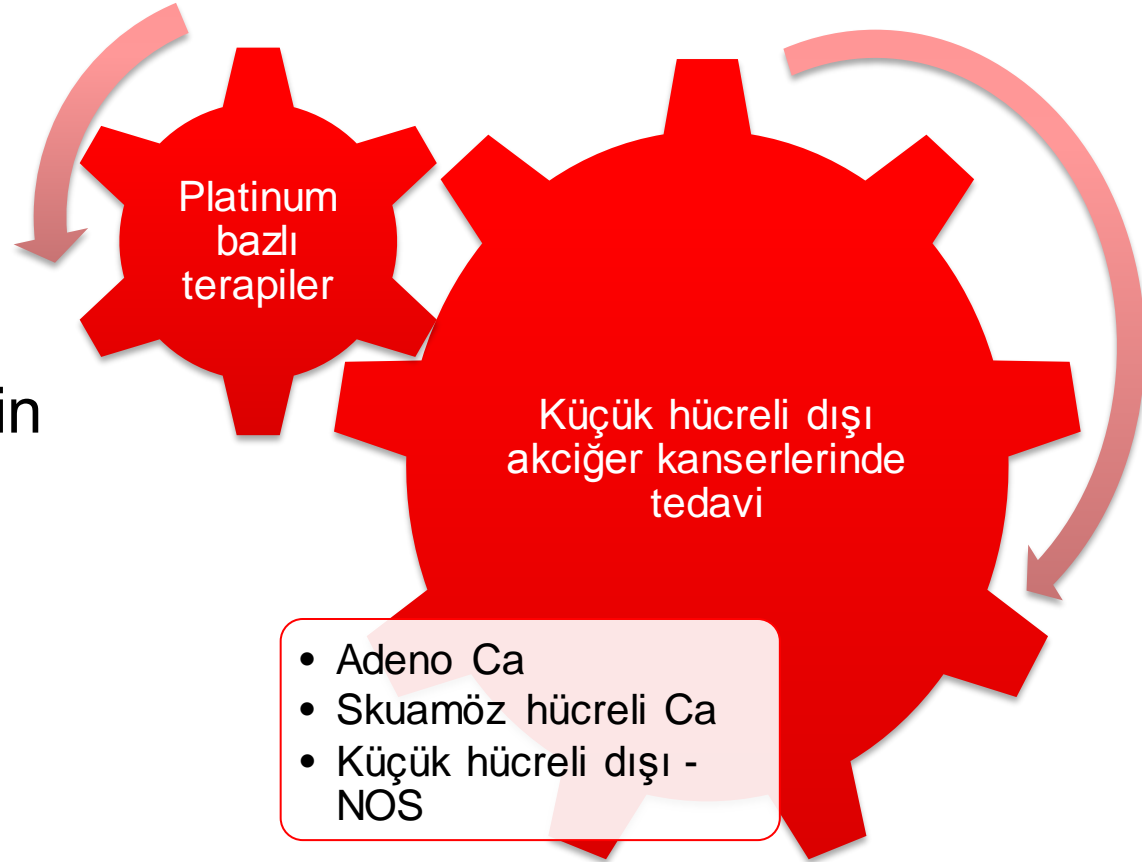


Dr.M.Çisel Aydın, Doç.Dr.Sevgen Önder, Prof.Dr.Gaye Güler Tezel

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi

Patoloji Anabilim Dalı

Akciğer Kanseri



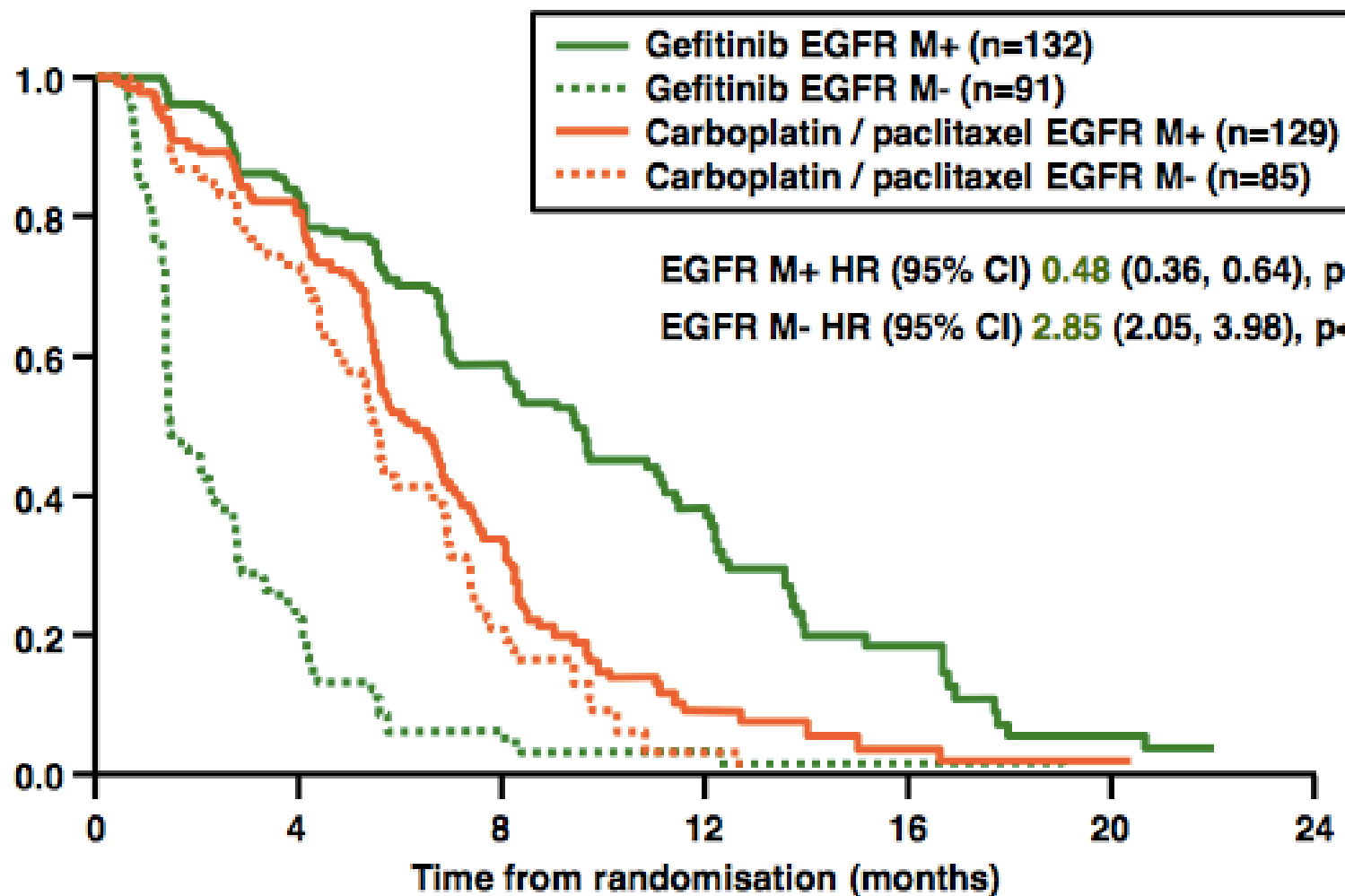
- Tüm dünyada halen kansere bağlı ölümlerin en sık nedeni
- 2004 yılından önce



Akciğer Kanserinde Tanı

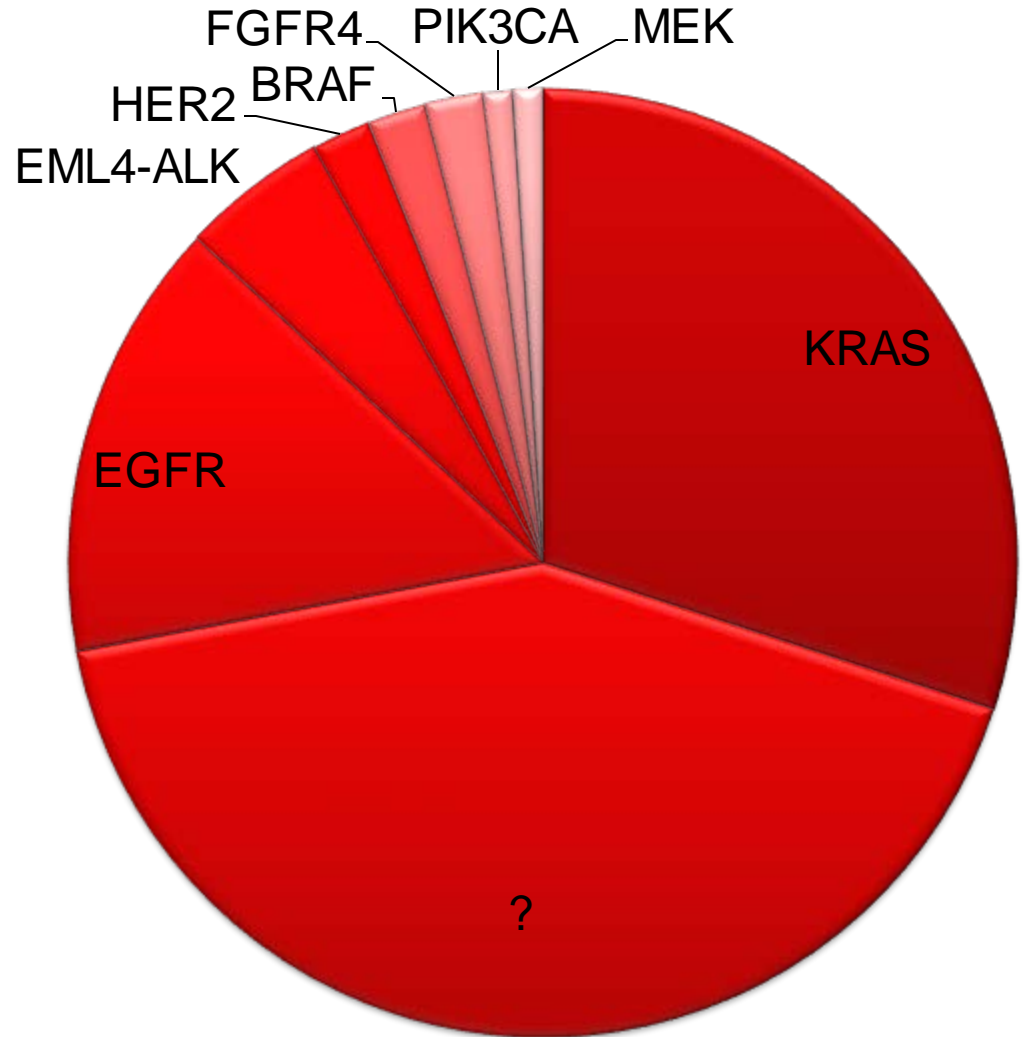
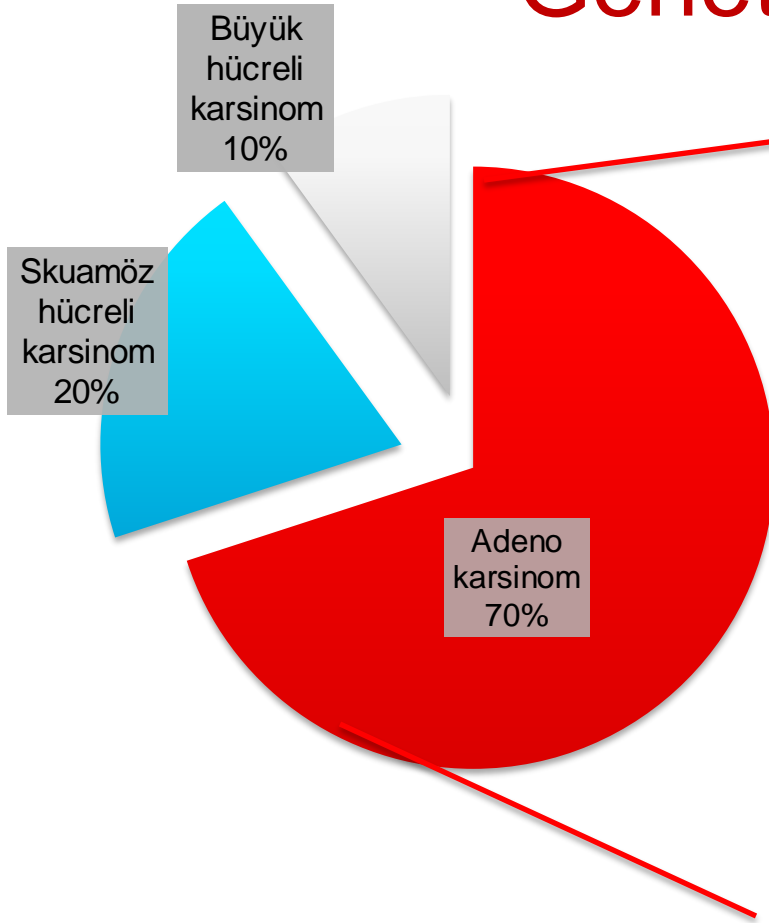
- 2005'ten bu yana
 - Küçük hücreli karsinom
 - Küçük hücreli dışı karsinomun alt tipi SCC ? ADK ?
- Akciğer kanserinde (tüm alt tipler dahil) en sık izlenen mutasyonlar
 - TP53 %53.6, KRAS %16.1, STK11%9.8, EGFR %7.2,
 - KEAP1 %6.6, NFE2L2 %4.5
- En sık izlenen mutasyonların büyük bir kısmının sağkalıma büyük bir etkisi yok

Probability of PFS





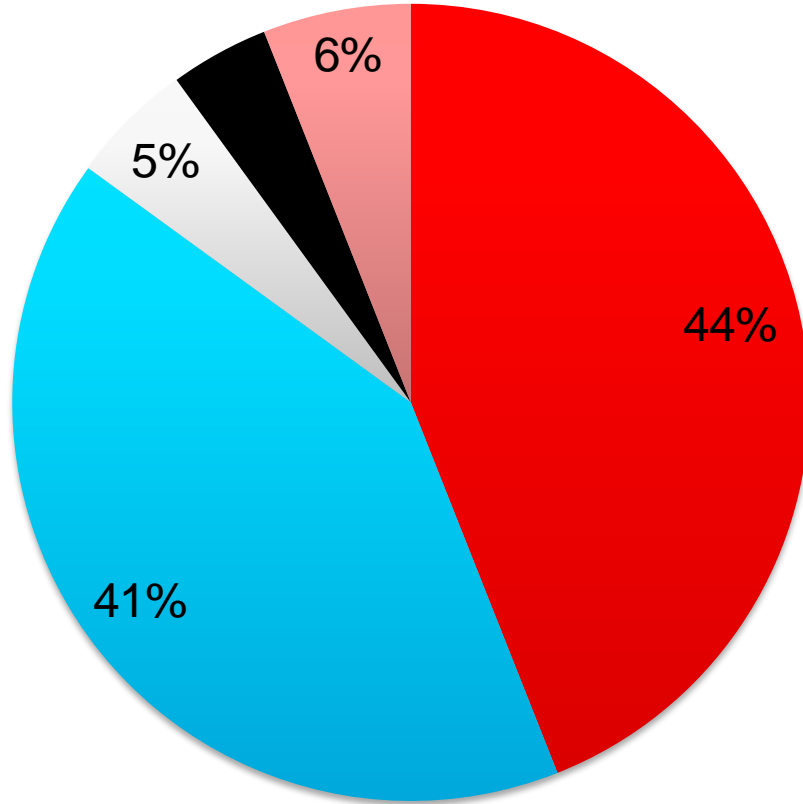
Genetik Alterasyonlar



Pao et al., 2009



EGFR Mutasyon Dağılımı



- ekzon 19 del
- ekzon 21 L858R mut
- ekzon 20 insertions
- ekzon 18 G719X
- ekzon 18-21 nadir missense mut



EGFR Tirozin Kinaz Mutasyonlarını Nasıl Saptayabiliriz?

- RT-PCR ya da diğer mutasyon tespit eden moleküler teknikler
- Mutasyon spesifik immunohistokimya



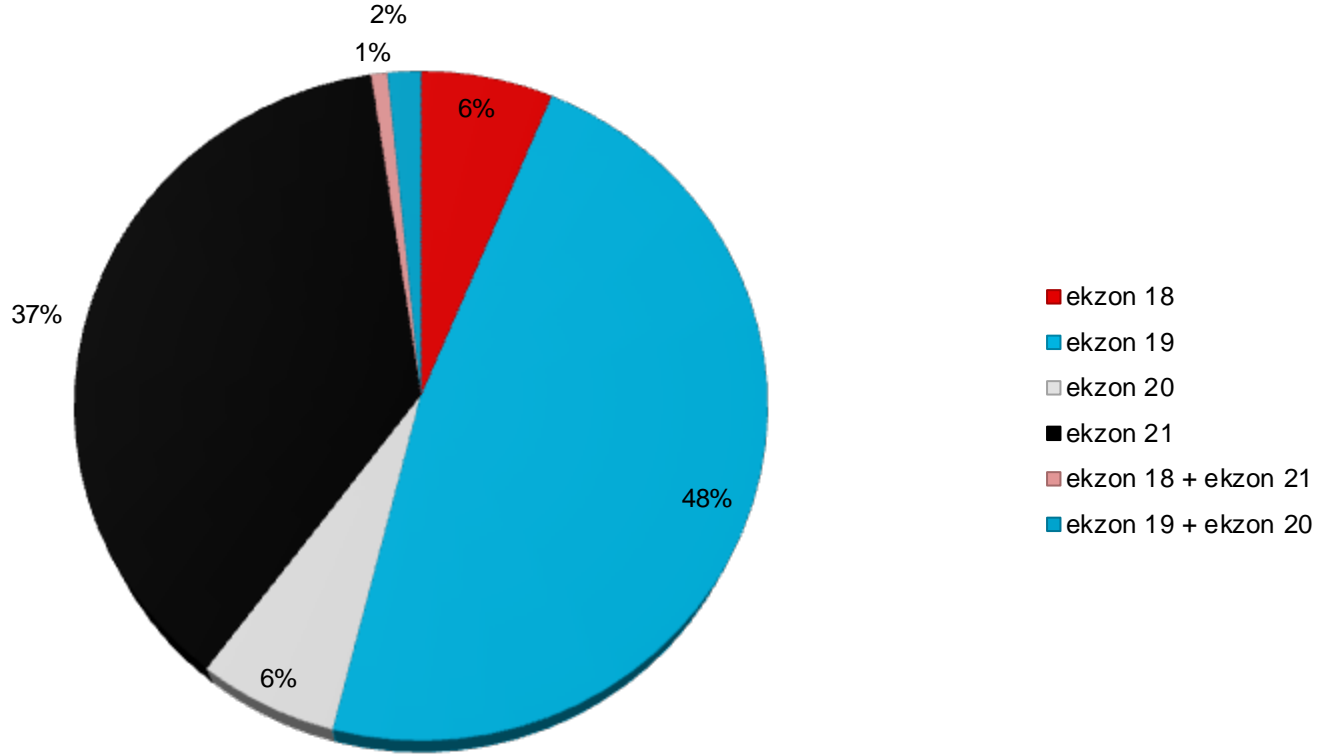
Moleküler Yöntemler

- Moleküler yöntemlerin çoğu wild tip DNA arasından mutant olan DNA'nın amplifikasyonunu baz almakta
- Direkt sekans en sık kullanılan tarama yöntemi
- Mutant DNA'yı saptamak için mevcut örneğin en az %20'si tümör hücresinden oluşmalı
- DNA ekstraksiyonu öncesi makrodiseksiyon veya lazer mikrodiseksiyon test için kullanılacak materyal içerisindeki tümör hücre oranını arttırabilir
- Ancak bu yöntemler zaman alıcı, oldukça emek istemekte ve deneyimli çalışanlar tarafından yapılması gerekmekte



Hacettepe Deneyimi EGFR Mutasyon Analizi

EGFR mutasyon dağılımı





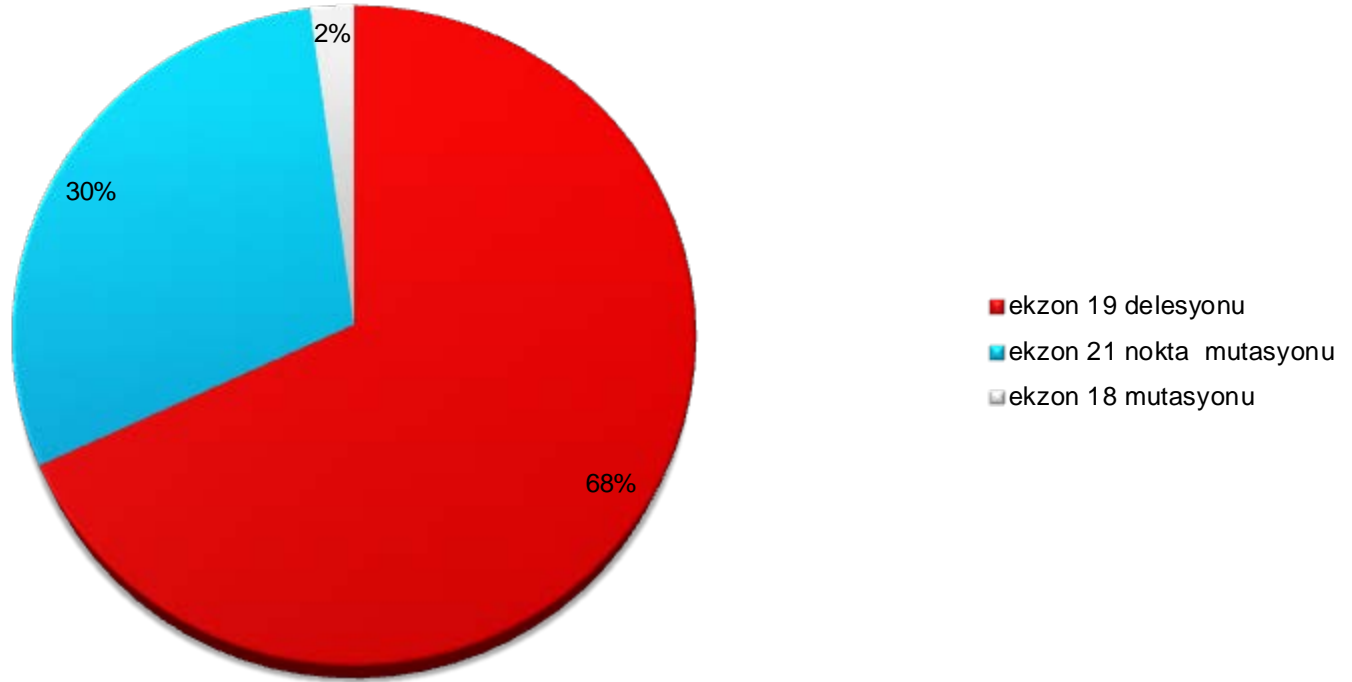
EGFR Mutasyon Spesifik İmmünohistokimya

- Geliştirilen iki Ab
 - Ekzon 21 L858R EGFR nokta mutasyonu (Cell Signaling, 43B2 klonu, 1:100)
 - Ekzon 19 E746-E750 delesyonu (Cell Signaling, 15 bp, 6B6 klonu, 1:100)
- RT-PCR ile EGFR^{mut} saptanmış 47/126 olgu
- Metod : Streptavidin-peroksidaz yöntemi



EGFR Mutasyon Spesifik İmmünohistokimya

İHK yapılan olguların mutasyon durumları





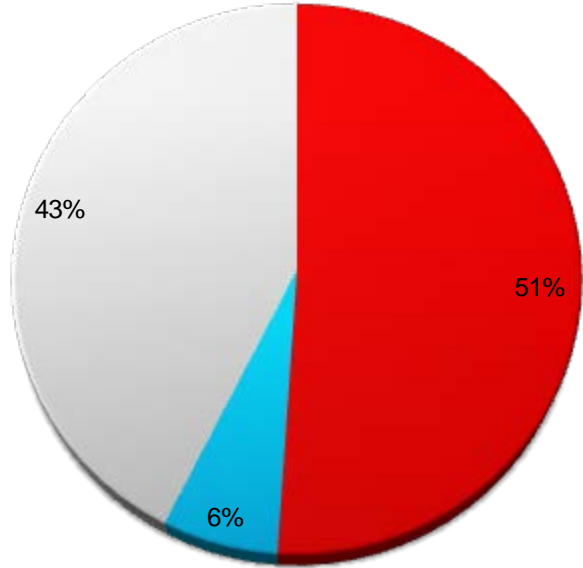
EGFR Mutasyon Spesifik İmmünohistokimya

- İmmünohistokimyasal çalışma yapılan örneklerin
 - 37 tanesi (%79) akciğer
 - 32 tru-cut biyopsi,
 - 3 sitolojik örnek (hasta başı yeterlilik sırasında hazırlanan hücre bloğu),
 - 12 rezeksiyon (lobektomi ya da pnömonektomi) materyali
 - 10 tanesi (%21) ise akciğer dışı alanlar
 - 3 karaciğer iğne biyopsi,
 - 2 plevral biyopsi,
 - 1 beyin eksizyon materyali
 - 2 lenf nodu eksizyon materyali
 - 2 yumuşak doku iğne biyopsi materyali



EGFR Mutasyon Spesifik İmmünohistokimya

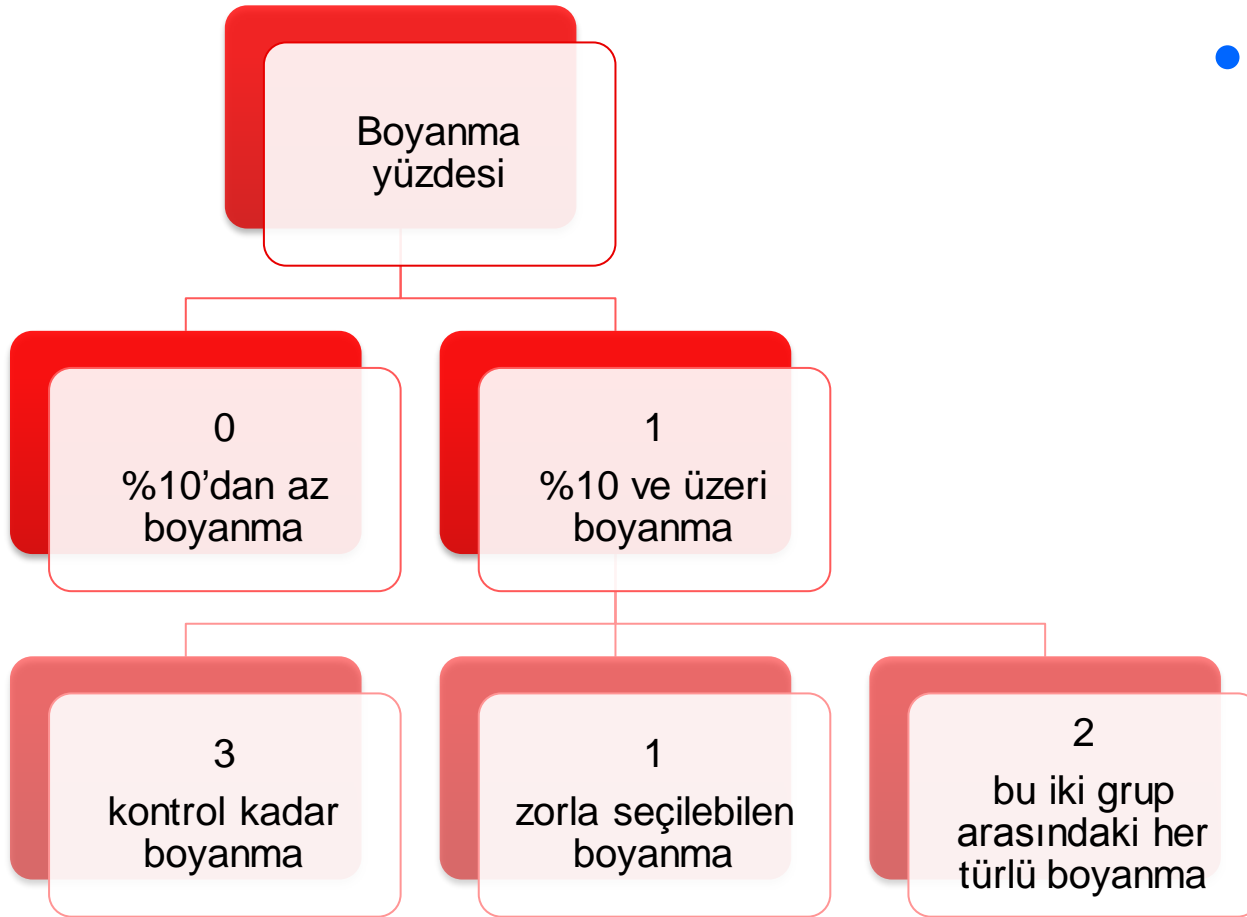
Örneklerin tespit ve takip işlemlerinin yapıldığı
merkezlere göre dağılımı



- Bölümümüzde tespit ve takip işlemi yapılmış biyopsiler
- Hasta başı yeterliliğe gidilerek hazırlanmış olan hücre blokları
- Dış merkezden konsültasyon



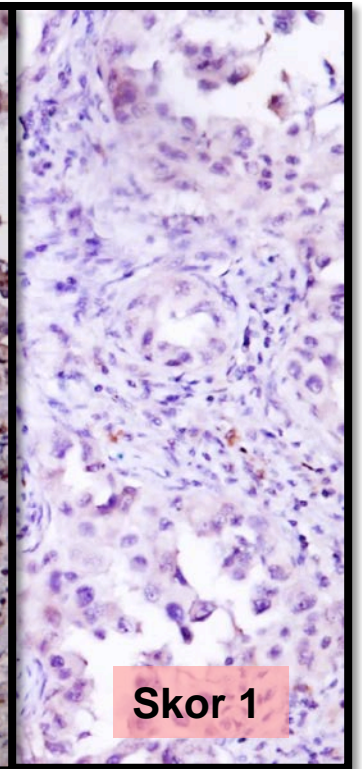
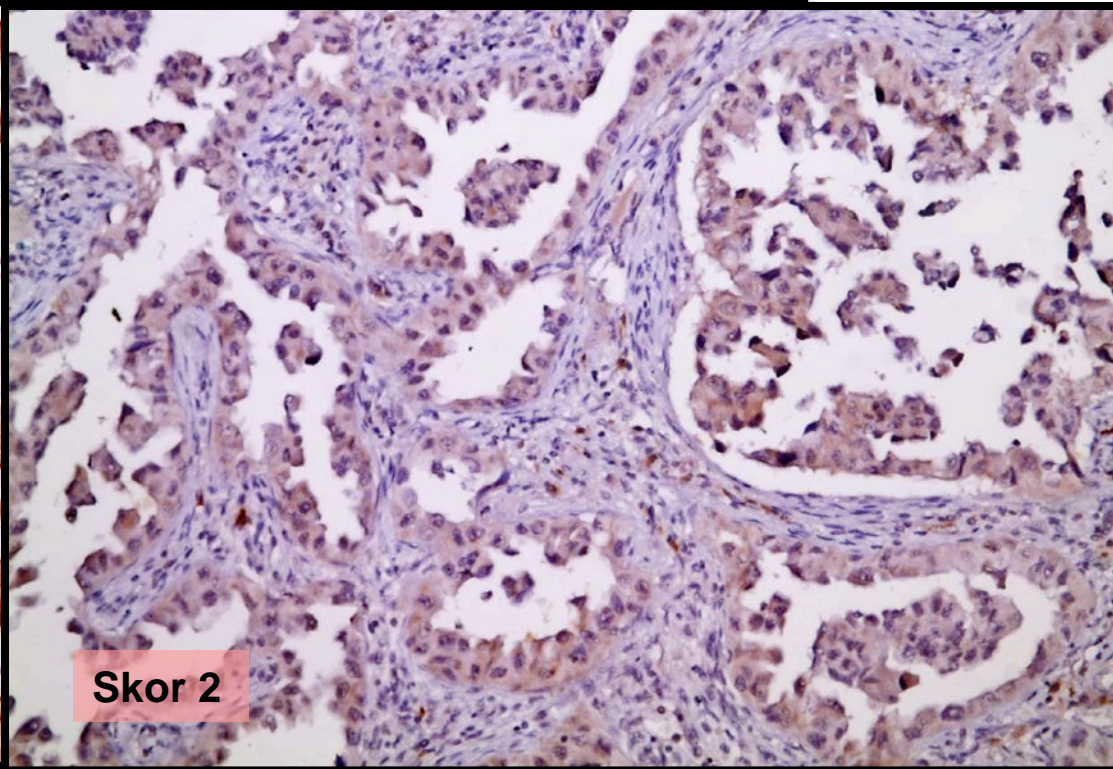
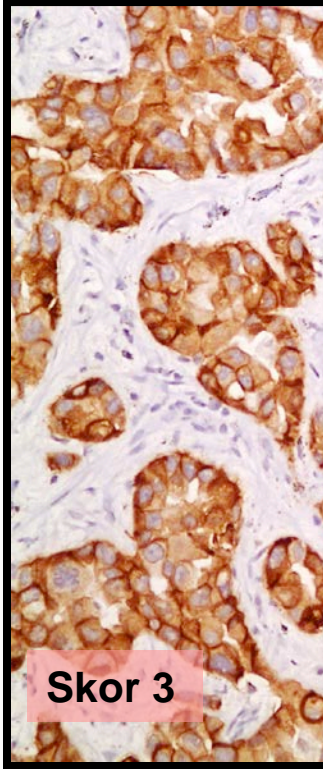
EGFR Mutasyon Spesifik İmmünohistokimya



- Her vakaya ait boyanma yoğunluğu (intensite) ve boyanma yüzdesi kaydedilmiştir

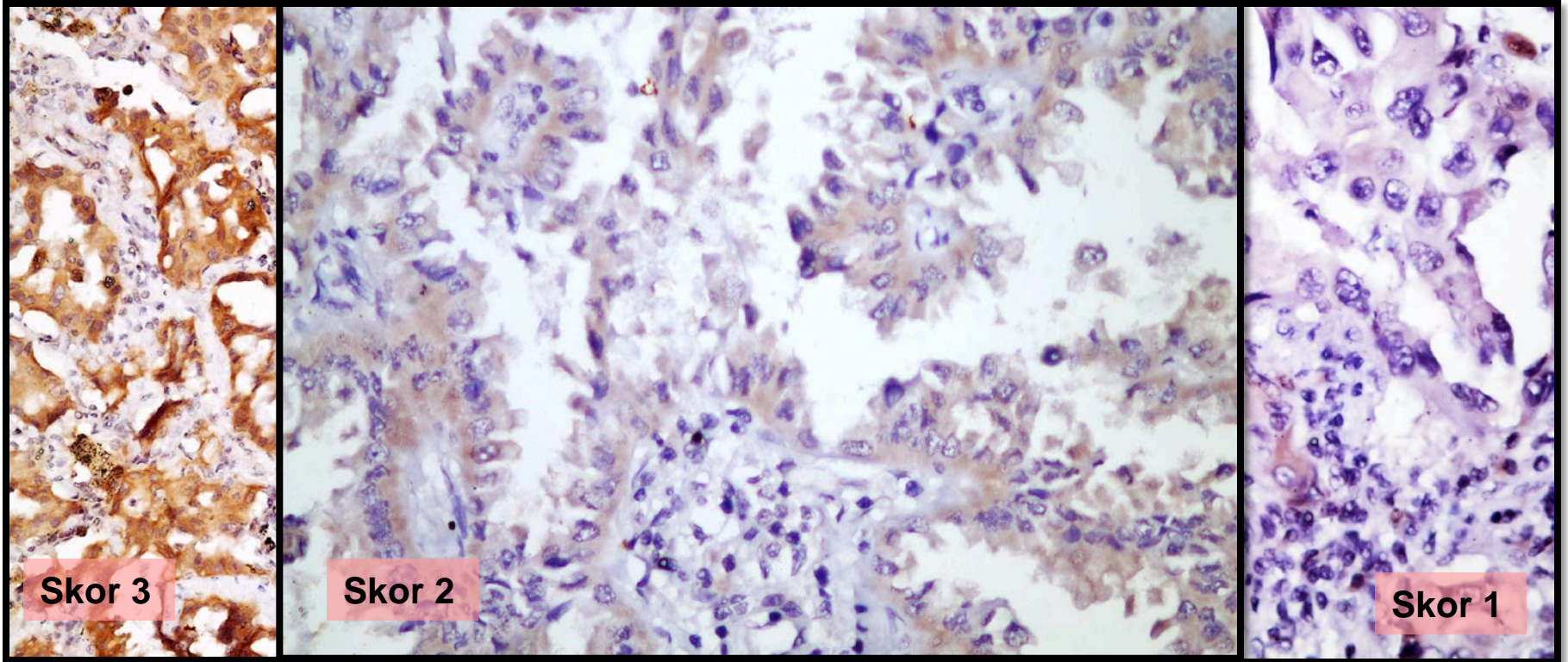
EGFR Mutasyon Spesifik İmmünohistokimya

- Ekzon 21 mutasyon spesifik immünohistokimya



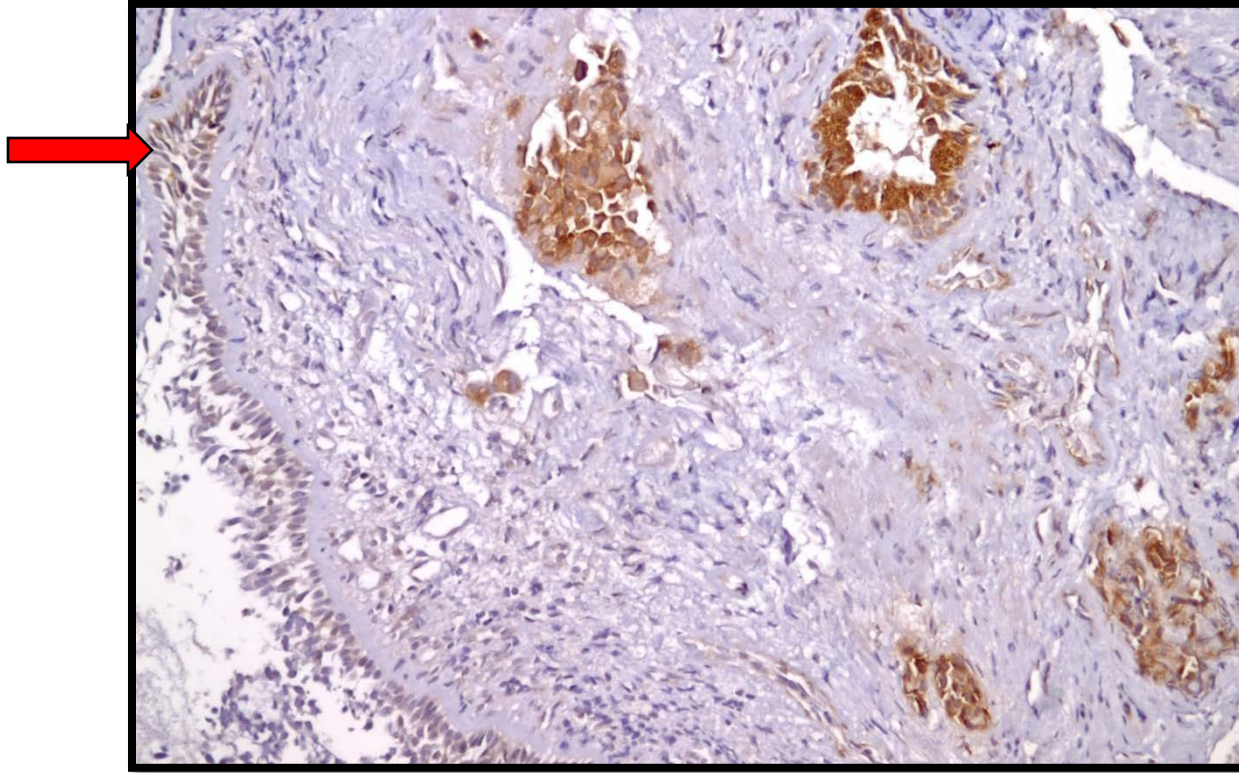
EGFR Mutasyon Spesifik İmmünohistokimya

- Ekzon 19 mutasyon spesifik immünohistokimya



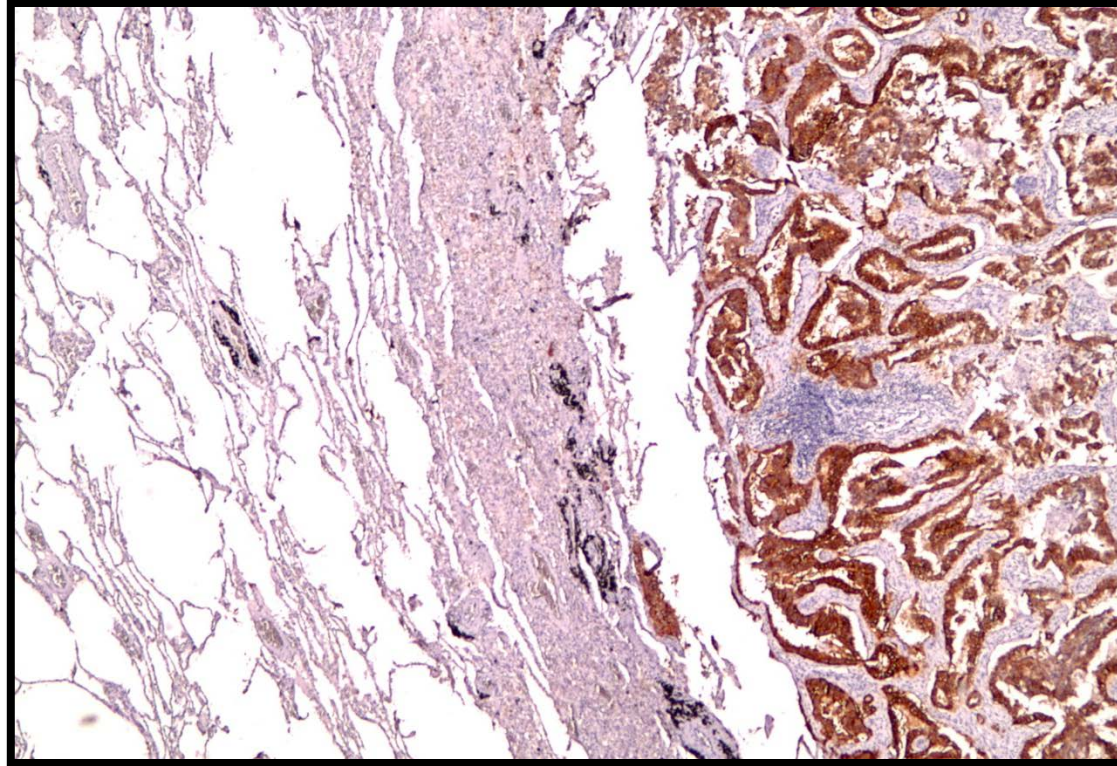
EGFR Mutasyon Spesifik İmmünohistokimya

- Non-neoplastik bronş epitel hücrelerinde zayıf (skor 1) boyanma



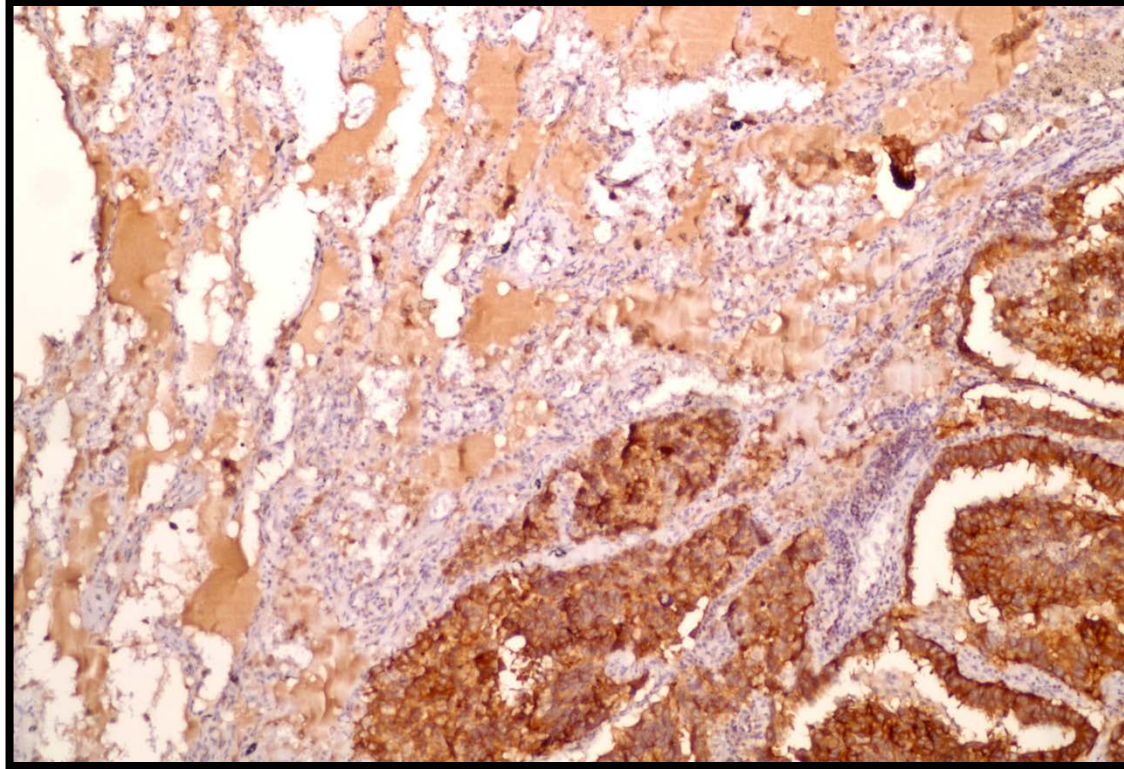
EGFR Mutasyon Spesifik İmmünohistokimya

- Pnömositlerde boyanma izlenmemesi

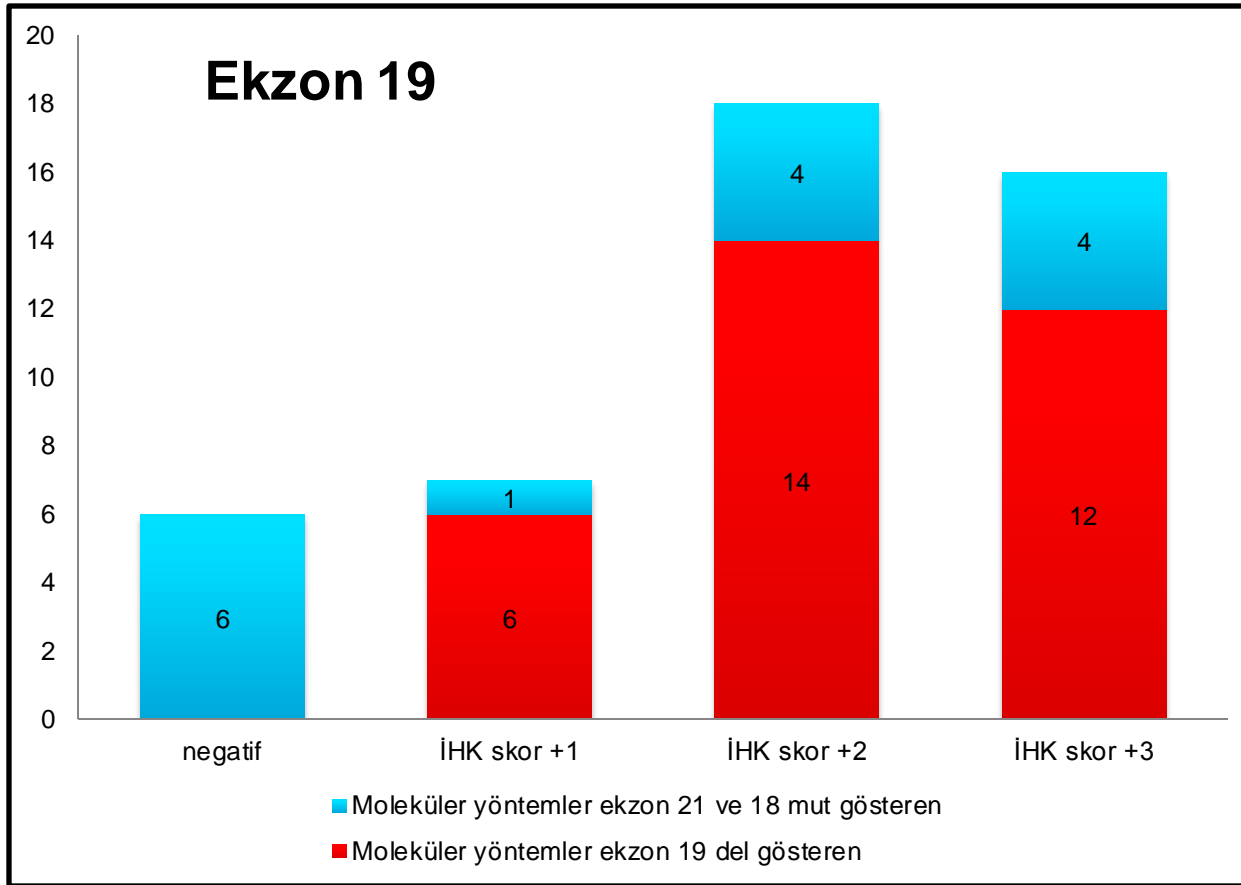


EGFR Mutasyon Spesifik İmmünohistokimya

- İnflamatuar hücreler ve alveolar boşluklarda yabancı boyanma



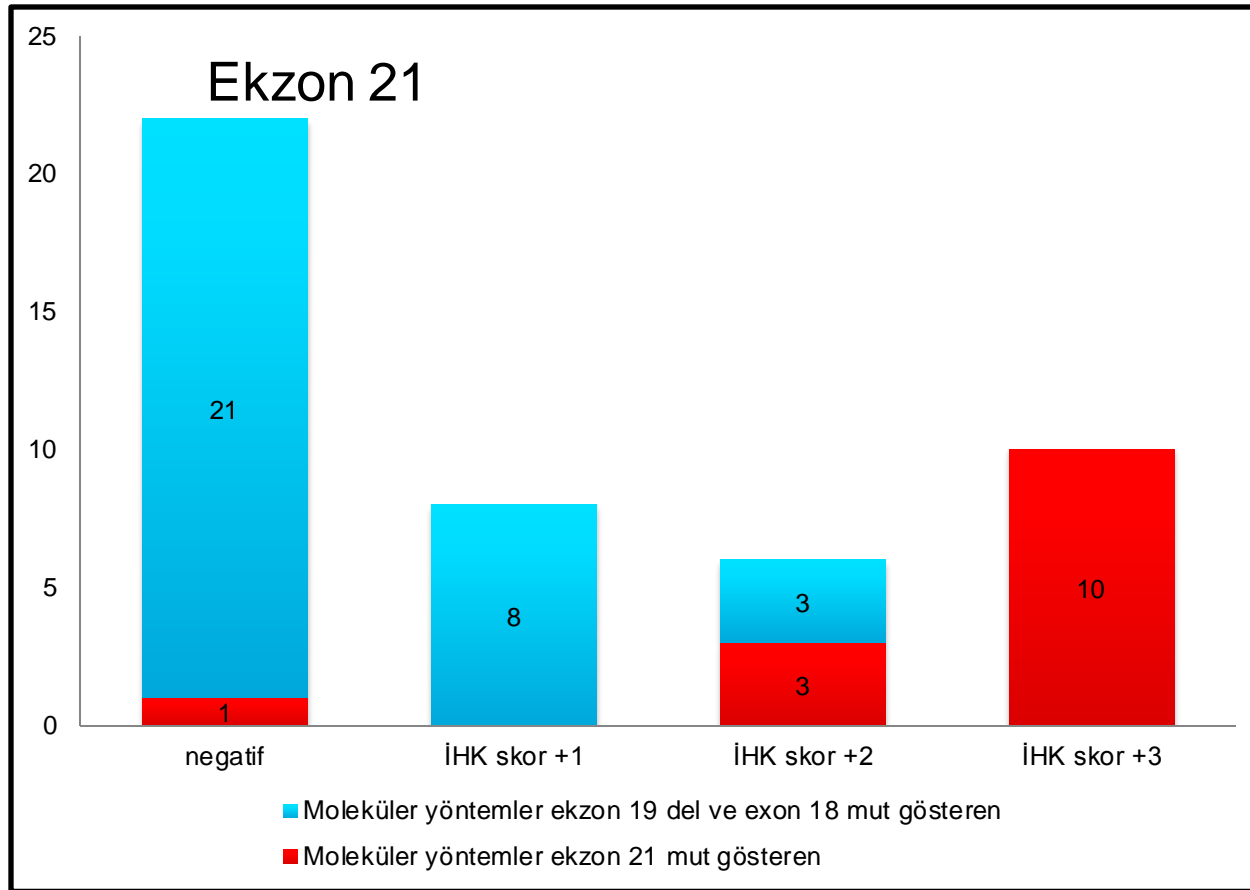
EGFR Mutasyon Spesifik İmmünohistokimya



- Ekzon 19 mutasyon spesifik antikorla yapılan immünohistokimyasal çalışmada boyanma yoğunluklarına göre olguların dağılımı



EGFR Mutasyon Spesifik İmmünohistokimya



- Ekzon 21 mutasyon spesifik antikorla yapılan immünohistokimyasal çalışmada boyanma yoğunluklarına göre olguların dağılımı



EGFR Mutasyon Spesifik İmmünohistokimya

- Eşik değeri??

Study	IHC antibody ^a (dilution)	Sample No. (ADCs)	Cutoff criteria (positive)	E746-A750 del		L858R		Comments
				Sensitivity (for 19 del) ^b	Specificity (for 19 del) ^b	Sensitivity	Specificity	
Kato et al. 2010 [28]	6B6 (1:100) 43B2 (1:100)	70 (57)	H-score ^c (Max. 400) ≥20	81.8% (50.0%)	100.0% (100.0%)	75.0%	97.0%	70 patients treated with gefitinib TMAs, Cell conditioning 1 E746-A750 del (n = 11), 19 del (n = 18) L858R (n = 6)
Simonetti et al. 2010 [27]	6B6 (1:100) 43B2 (1:100)	78 (69)	≥IHC 1+ ^f	100.0% (63.0%)	100% (100.0%)	100%	100%	52 patients treated with erlotinib Whole sections, EDTA (pH 9.0) E746-A750 del (n = 16), 19 del (n = 29) L858R (n = 25)
Kitamura et al. 2010 [1]	6B6 (1:100) 43B2 (1:100)	238 (181)	≥IHC 1+ ^f	Unknown (40.0%)	Unknown (99.0%)	36.0%	97.0%	TMAs, EDTA (pH 9.0)
Brevet et al. 2010 [10]	6B6 (1:100) 43B2 (1:100)	194 (194)	≥IHC 1+ ^f	100% (74.2%)	98.8% (98.8%)	76.0%	100.0%	TMAs, EDTA (pH 9.0) 15bp del (n = 20), 19 del (n = 31) L858R (n = 21)
Wu et al. 2011 [29]	6B6 (1:150) 43B2 (1:150)	143 (143)	H-score ^c (Max. 300) ≥ROC value	93.5% (73.2%)	94.6% (95.1%)	88%	77%	Whole sections, AR-10 solution E746-A750 del (n = 31), 19 del (n = 41) L858R (n = 43)
Kozu et al. 2011 [37]	6B6 (1:100) 43B2 (1:200)	577 (577)	H-score ^c (Max. 300) ≥10	Unknown (42.0%)	Unknown (99.0%)	76%	98%	TMAs E746-A750 (n = 135) L858R (n = 172)
Kawahara et al. 2011 [18]	6B6 (1:200) 43B2 (1:200)	24 (22)	Not described	100.0%	90.0%	100%	100%	16 cases obtained by surgical resection and cytology Papanicolaou specimens, EDTA (pH 9.0) Primary NSCLC: E746-A750 del (n = 4), L858R (n = 9) Recurrent NSCLC: E746-A750 del (n = 5), L858R (n = 7)
Hofman et al. 2012 [38]	6B6 (1:100) 43B2 (1:100)	154 (154)	≥IHC 1+ ^f	55.0%	97.0%	24%	98%	Whole sections, EDTA (pH 9.0) E746-A750 del (n = 22), 19 del (n = 36) L858R (n = 17)
Hasanovic et al. 2012 [39]	Unknown	94 (94)	≥IHC 2+ ^g	82.0%	100.0%	78%	100%	Only small biopsy or cytological samples E746-A750 del (n = 34), 19 del (n = 47) L858R (n = 35)
Xiong et al. 2013 [9]	6B6 (1:100) 43B2 (1:100)	50 (50)	≥IHC 2+ ^f	71.4% (59.0)	100.0% (100.0%)	82.0%	97.0%	Sensitivity: Thin prep > cell blocks samples ^e Whole sections, EDTA (pH 8.0) E746-A750 del (n = 14), 19 del (n = 17) L858R (n = 16)
Fan et al. 2013 [20]	6B6 (1:100) 43B2 (1:200)	169 (169)	≥IHC 1+ ^f	Unknown (73.9%)	Unknown (99.3%)	93.0%	100.0%	Whole sections, EDTA (pH 9.0) E746-A750 del (n = 23) L858R (n = 43)
Jiang et al. 2013 [40]	6B6 (1:400) 43B2 (1:400)	399 (341)	≥IHC2+ ^f	80.2%	85.3%	75.7%	91.8%	Sensitivity for E746-A750 del: resection > biopsy specimen ^d Whole sections, EDTA (pH 9.0) E746-A750 del (n = 86), 19 del (n = 90) L858R (n = 70)
Sensitivity: resection > biopsy > cytological specimen ^d								



EGFR Mutasyon Spesifik İmmünohistokimya

- EGFR ekzon 19 ve ekzon 21 için mutasyon spesifik antikorlarla yapılan çalışmada eşik değeri değiştirildiğinde duyarlılık, özgüllük, negatif ve pozitif öngörü değerlerin karşılaştırılması

Mutasyon spesifik antikor	İHK eşik değeri (pozitif)	Duyarlılık	Özgüllük	Negatif öngörü değeri	Pozitif öngörü değeri
EGFR ekzon 19 E746-A750 delesyonu	≥ skor 1	100	40	100	78
	≥ skor 2	81	47	54	76
	Sadece skor 3	38	73	35	75
EGFR ekzon 21 L858R nokta mutasyonu	≥ skor 1	93	64	95	52
	≥ skor 2	93	91	97	82
	Sadece skor 3	71	100	89	100



EGFR Mutasyon Spesifik İmmünohistokimya

- Literatür
 - Özgüllük
 - ekzon 21 %80-100
 - ekzon 19 %90-100
 - Duyarlılık
 - ekzon 21 %80-100
 - ekzon 19 %63 -100
 - ancak literatürde bazı yayınlarda
 - ekzon 19 için %47
 - ekzon 19'un 15 bp dışı delesyonları ???



Deletion size	AA mutation	AA sequence	COSMIC (n = 1531)
	No mutation	IKELREATSPKANKEIL	
Del-9	L747_E749del	IK...EATSPKANKEIL	6.4%
	K745_L747del	I...REATSPKANKEIL	0.2%
Del-12	E746_E749del	IK... .ATSPKANKEIL	0.2%
Del-15	E746_A750del*	IK... .TSPKANKEIL	68.1%
	L747_T751del	IKE... .SPKANKEIL	6.4%
	K745_E749del	I... .ATSPKANKEIL	0.9%
	A750_K754del	IKELRE... .ANKEIL	0.12%
Del-18	E746_T751del	IK... ...SPKANKEIL	0.7%
	L747_S752del	IKE... ...PKANKEIL	2.4%
	E746_S752>X†	IK... ...XPKANKEIL	3.8%
	L747_P753del	IKE... ...KANKEIL	0.4%
	L747_P753>Q	IKE... ...QKANKEIL	1.1%
	L747_P753>S	IKE... ...SKANKEIL	6.7%
Del-24	E746_P753del	IK... ...KANKEIL	0.4%
	L747_K754del	IKE... ...ANKEIL	0.12%
	A750_K757del	IKELRE... ...EIL	0.12%
	T751_E758del	IKELREA... ...IL	0.06%
	S752_I759del	IKELREAT... ...L	0.7%

EGFR mutasyon spesifik immunhistokimya

J Mol Diagn. Mar 2010; 12(2): 169-176.
doi: [10.2353/jmoldx.2010.090140](https://doi.org/10.2353/jmoldx.2010.090140)

PMCID: PMC2871723

Assessment of EGFR Mutation Status in Lung Adenocarcinoma by Immunohistochemistry Using Antibodies Specific to the Two Major Forms of Mutant EGFR

Marie Brevet,^{*} Maria Arcila,^{*} and Marc Ladanyi^{1†}



Ekzon 19 Mutasyon Spesifik İmmünohistokimya

- ROC değerinin en anlamlı : eşik değeri skor 1
 - duyarlılık %100,
 - özgüllük %40,
 - pozitif öngörü değeri %78

Literatür

Duyarlılık %63 -100

Özgüllük %90-100



Ekzon 19 Mutasyon Spesifik İmmünohistokimya

- Literatürden farklı olarak özgüllüğümüz düşük
 - negatif kontrol olarak ekzon 21 ve ekzon 18 mutant vakaları kullanmamız
 - mevcut olan mutant proteinler ekzon 19 mutasyon spesifik antikor ile çapraz reaksiyon
 - tespit ve fiksasyonun immünohistokimyasal protein ekspresyonuna etkisi
 - ekzon 21 mutasyonu saptanan 8/14 tanesi (%57) ekzon 19 mutasyon spesifik antikorla pozitif olarak değerlendirilmiştir (eşik değer skor 1)
 - olguların 4/8'i (%50) dış merkezden konsülte

Ekzon 21 Mutasyon Spesifik İmmünohistokimya

- ROC değerinin en anlamlı (p değeri 0.0001): eşik değeri skor 2
 - duyarlılık %92
 - özgüllük %91
 - pozitif öngörü değeri %91

Literatür

Duyarlılık %80-100

Özgüllük %80-100



Ekzon 21 Mutasyon Spesifik İmmünohistokimya

- RT-PCR yöntemi ile ekzon 21 nokta mutasyonu saptanmış ancak immünohistokimyasal olarak negatif bulunmuş sadece bir olgu
 - nükleer pozitivite
 - olgunun takip ve tespiti dış merkezde
 - nükleer boyanmanın nedeni tespit ve takipe ikincil



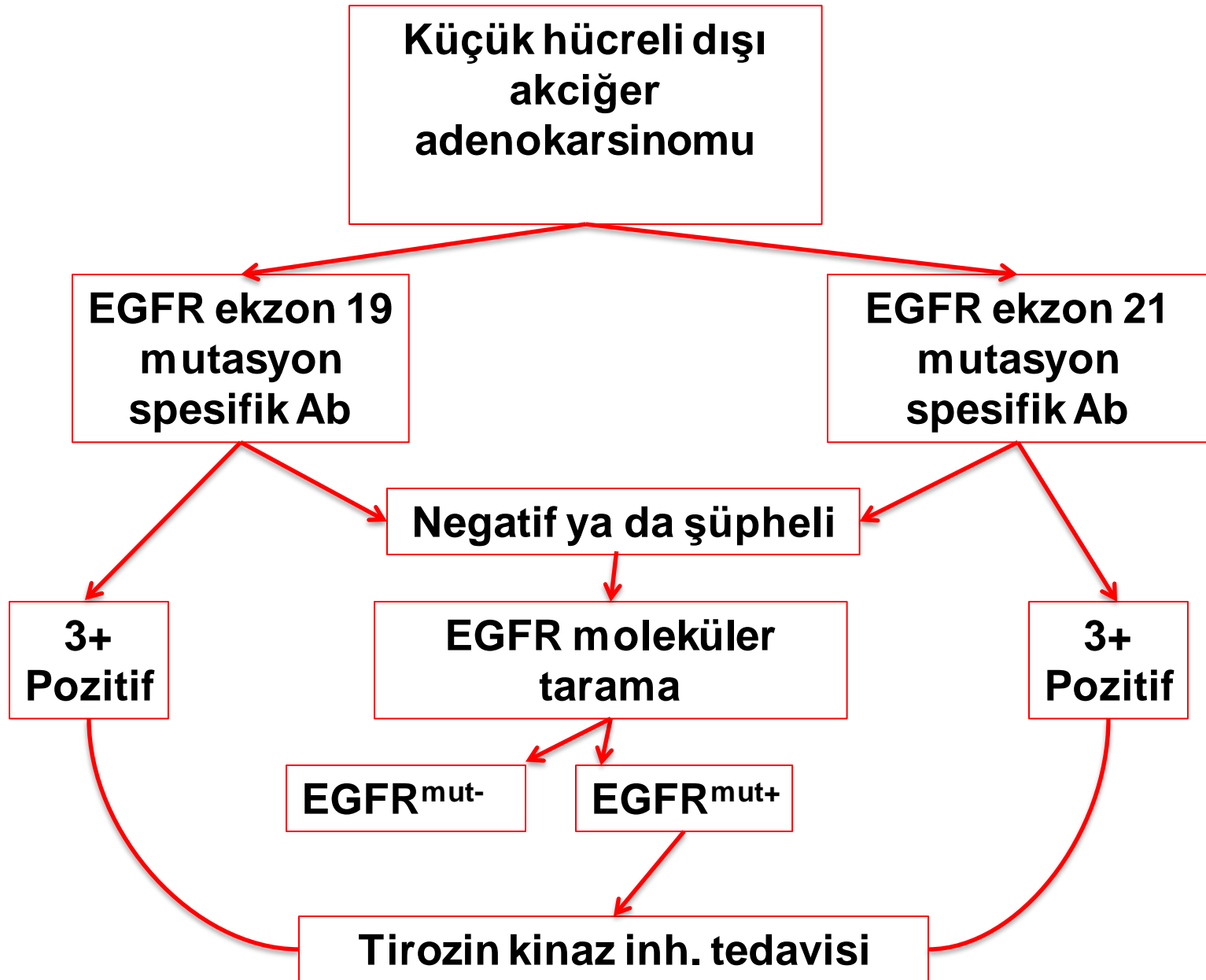
EGFR Mutasyon Spesifik İmmünohistokimya

- Laboratuvarlar arası standardizasyon farklılıkları
- Tespit ve takip süreçleri immünohistokimyasal boyanmaları direkt etkileyen faktörlerden
- Manuel / otomatize immün boyama cihazı
 - İki yöntem arasında özellikle boyanma yoğunlukları açısından farklılıklar
 - Manuel boyamalar dış ortamın koşullarından ve bireysel farklılıklardan oldukça etkilenmekte
- CAP'in son rehberinde klinik kullanımda sadece en sık görülen iki mutasyonun taranması da kabul edilmemekte



EGFR Mutasyon Spesifik İmmünohistokimya

- Bütün laboratuvarlarda uygulanabilecek basit bir yöntem
- Küçük doku materyallerinde iyi sonuç
- Düşük maliyet
- Daha hızlı sonuç
- Daha kolay değerlendirme, patologlar deneyimli
- Akciğer adenokarsinomların %15'inde EGFR mutasyonu
 - EGFR mutasyonlarının da %85'i ekzon 19 ve ekzon 21
 - Mutasyon spesifik antikorla bütün olguların yaklaşık **%10-15'inde moleküler testlere gereksinim olmaksızın** hızlı, standart bir şekilde mutasyon varlığı



A histological section of testis tissue stained with hematoxylin and eosin (H&E). The image shows several seminiferous tubules, which are the structures where sperm are produced. The tubules are filled with germ cells at various stages of development. The nuclei of these cells are stained a deep blue-purple, while the surrounding cytoplasm and connective tissue are stained a light pink. The overall appearance is that of a highly organized, cellular tissue.

Teşekkürler