

## مقایسه نتایج دو روش ایمونوهیستوشیمی و Real-Time PCR

## در ارزیابی ژن HER-2 در بافت سرطانی پستان

رضوان اسمعیلی<sup>۱</sup>، احمد کاویانی<sup>۲</sup>، محسن فروغی زاده مقدم<sup>۳</sup>، نسرين عبدلی<sup>۴</sup>، محمد حسین لشگری<sup>۵</sup>، علی اکبر زارع<sup>۶</sup>، \*کیوان مجیدزاده<sup>۷</sup>

تاریخ اعلام وصول: ۹۲/۳/۸

تاریخ اعلام قبولی مقاله: ۹۲/۵/۲۷

## چکیده

**سابقه و هدف:** HER-2/neu یکی از نشانگرهای پیش آگهی مولکولی عمده در سرطان پستان بوده و با توجه به دستورالعمل‌های تصمیم‌گیری درمان، تکثیر این ژن در روند درمان بیماران مبتلا به سرطان پستان بسیار مهم می‌باشد. رایج‌ترین روش استفاده شده برای تشخیص تکثیر ژن HER-2/neu ایمونوهیستوشیمی (IHC) است. نتایج غیرقابل سنجش، عدم تکرارپذیری و زمان طولانی از اشکالات عمده این روش بوده که محققان را بر آن داشته تا در جهت یافتن روش جایگزین مدرن بر اساس تکنیک‌های مولکولی مانند روش Real-Time PCR تلاش کنند. هدف از این مطالعه مقایسه تکثیر ژن HER-2/neu توسط دو روش Real-Time PCR و IHC بود.

**مواد و روش‌ها:** تعداد ۴۱ نمونه بافت پارافینه با نتایج IHC مشخص، با روش Real-Time PCR مورد بررسی قرار گرفته و تعداد کپی ژن HER-2 در آنها اندازه‌گیری شد و با نتایج IHC مقایسه شد. در مواردی که نتیجه IHC دو مثبت گزارش شده بود، نمونه مربوطه با تست FISH ارزیابی گردید. ضریب Phi Cramer's V و آزمون Fisher's Exact برای آنالیزهای آماری مورد استفاده قرار گرفت.

**یافته‌ها:** در مجموع نتایج حاصل از Real-Time PCR نشان داد که ۳۹٪ نمونه‌ها دارای بیان بالا (مثبت) بودند و همچنین ۳۶٪ نمونه‌ها نیز IHC مثبت گزارش شده بودند. انطباق بین دو روش مذکور در نمونه‌های مثبت و منفی به ترتیب ۸۵ و ۸۷ درصد بدست آمد. نمونه‌هایی که دارای نتیجه IHC دو مثبت بودند نیز توسط تکنیک FISH مورد ارزیابی قرار گرفته و تمام آنها منفی گزارش شدند که با نتایج Real-Time PCR مطابقت داشت.

**نتیجه‌گیری:** نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که هم خوانی در حدود ۷۱٪ بین نتایج دو روش Real-Time PCR و IHC وجود دارد. همچنین در مواردی که نتیجه IHC دو مثبت گزارش شده بودند، نتایج Real-Time PCR با FISH هم خوانی داشت. تکنیک Real-Time PCR میزان HER2 در بافتها را با دقت بالایی اندازه‌گیری کرده و با نتایج IHC نیز هم خوانی داشت. بنابراین می‌توان از Real-Time PCR به خاطر دقت بالا و نیز ارزانتر و در دسترس‌تر بودن به جای دو روش دیگر برای ارزیابی این نشانگر استفاده کرد.

**کلمات کلیدی:** سرطان پستان - تعداد کپی ژن - نشانگر HER-2/neu - تکنیک Real-Time PCR

## مقدمه

میلیون مورد جدید در سال در سراسر جهان می‌باشد و هنوز علت

سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در زنان، با وقوع بیش از یک عمده مرگ و میر ناشی از سرطان در زنان با ۴۱۱,۰۰۰ مرگ و میر

۱- پژوهشگر، ایران، تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، پژوهشکده سرطان پستان جهاد دانشگاهی، گروه پژوهشی ژنتیک سرطان

۲- استادیار، ایران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، بخش جراحی

۳- پژوهشگر، ایران، تهران، انستیتو پرتو پزشکی نوین

۴- پژوهشگر، ایران، تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، پژوهشکده سرطان پستان جهاد دانشگاهی، گروه پژوهشی ژنتیک سرطان

۵- استادیار، ایران، تهران، دانشگاه علوم پزشکی آجا، گروه جراحی

۶- پژوهشگر، ایران، تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، پژوهشکده سرطان پستان جهاد دانشگاهی، گروه پژوهشی ژنتیک سرطان

۷- استادیار، ایران، تهران، دانشگاه علوم پزشکی آجا، مرکز تحقیقات و فناوری تشخیص سریع مولکولی

ایران، تهران، گروه پژوهشی ژنتیک سرطان، پژوهشکده سرطان پستان جهاد دانشگاهی (\*نویسنده مسئول)

تلفن: ۰۲۱-۶۶۴۸۸۹۸۰ آدرس الکترونیک: kmajidzadeh@razi.tums.ac.ir

افزایش تکثیر سلولهای سرطانی می‌شود. در اغلب موارد HER-2 به صورت مونومر دیده می‌شود و دایمر شدن این مولکول باعث راه افتادن آبشار آنزیمی شده و در نهایت منجر به تکثیر سلولها می‌شود. لیگاند اختصاصی برای HER-2 شناخته نشده است، بلکه تشکیل هتروداایمرهای HER-2 با دیگر مولکولهای خانواده HER باعث تقویت پاسخ به فاکتورهای رشد می‌شود و این در حالی است که حذف HER-2 از سطح سلول یا سرکوب فعالیت آنزیمی داخل غشایی آن، باعث کاهش خاصیت آنکوژنیک آن می‌شود. HER-2 به همراه دیگر اعضای خانواده HER از طریق شبکه سیگنالی پیچیده‌ای باعث تنظیم رشد، تمایز و بقای سلول می‌شود (۱۰).

چهار عضو خانواده گیرنده HER (HER1, 2, 3, 4) شامل فاکتور رشد اپیدرمی EGFR (epidermal growth factor receptor) می‌باشند که همگی در غشای سلول قرار داشته و دارای ساختار مشابهی می‌باشند. این ساختار شامل یک دومین خارج سلولی متصل شونده به لیگاند غنی از سیستئین، قطعه گذرنده از غشا و دومین تیروزین کینازی داخل سلولی به همراه قطعه تنظیم کننده از ناحیه کربوکسیل است. بر خلاف دیگر اعضای خانواده HER، HER3 فاقد چند اسید آمینه ناحیه کاتالیتیک بوده و در نتیجه خاصیت کینازی ضعیفی دارد. فعال شدن گیرنده‌های HER از طریق ایجاد دایمر، با فعالیت تیروزین کینازی منجر به انتقال سیگنال به هسته و در نهایت فعال شدن ژن‌های مربوطه و تقسیم سلول می‌شود (۱۰، ۱۱).

فعال شدن HER به وجود لیگاندها و دیگر گیرنده‌های خانواده HER بستگی دارد. در نتیجه اتصال لیگاند، چهار نوع مختلف HER می‌توانند ۱۰ نوع دایمر گوناگون به صورت همودایمر مثل HER1-HER1 یا هتروداایمر HER1-HER2 تشکیل دهند که اشکال هتروداایمر بسیار پایدارتر از فرم همودایمر می‌باشند.

اتصال خانواده HER در پستانداران به این صورت است که HER1 به طیف وسیعی از لیگاندها از جمله EGF (Epidermal growth factor)، TGF (tumor growth factor)، AR (Amphiregulin)، EGF (Epidermal growth factor)، HB-EGF (Heparin-binding EGF-like growth factor) و Epregrulin متصل می‌شود. HER2 لیگاند شناخته شده‌ای ندارد ولی HER3، HER4 به طیف وسیعی از Neuregulinها یا فاکتورهای تمایز مانند Factor Differentiation Neu (NDF) متصل می‌شود. سلول سرطانی در مقایسه با سلول سالم دارای میزان بیان گیرنده

سالانه می‌باشد که عدد معادل ۱۴٪ از مرگ و میر ناشی از سرطان در زنان بوده و روی هم رفته رتبه دوم مرگ و میر در دو جنس مرد و زن در سطح جهان را به خود اختصاص داده است. (۱، ۲). این سرطان در صورت تشخیص در مراحل اولیه از شانس بالایی برای درمان برخوردار است. در حال حاضر با استفاده از برنامه‌های غربالگری مناسب تعداد زیادی از بیماران مبتلا به سرطان پستان در مراحل اولیه تشخیص داده می‌شوند. درمان‌های انتخابی برای سرطان پستان در مراحل اولیه سرطان پستان شامل شیمی درمانی و هورمون درمانی می‌باشد (۳-۵). سلولهای سرطانی پستان دارای گیرنده‌های متنوعی بر روی سطح خود و در سیتوپلاسم و یا هسته هستند. پیام رسان‌های شیمیایی مانند هورمون‌ها و داروها با اتصال به این گیرنده‌ها باعث تغییراتی در سلول می‌شوند. یکی از گیرنده‌ها فاکتور رشد اپیدرمال انسانی HER2/ErbB2 می‌باشد که سلولهای دارای این گیرنده پیش آگهی بدتری دارند (۶). سلول‌های سرطانی که از نظر HER2 مثبت می‌باشند به داروهایی مانند آنتی بادی تک دودمانی هرسپتین (Trastuzumab) در ترکیب با شیمی درمانی مرسوم پاسخ داده و پیش آگهی به طور قابل ملاحظه‌ای بالا می‌رود (۷). تاثیر هرسپتین در ترکیب با شیمی درمانی در درمان هر دو نوع اولیه و متاستاتیک سرطان پستان که از نظر نشانگر HER2 مثبت هستند به اثبات رسیده است (۸). لذا افراد مبتلا به سرطان پستان که از نظر نشانگر زیستی HER2 مثبت می‌باشند، جهت درمان با این آنتی بادی انتخاب می‌شوند (۹). لازم به ذکر است که این پروتئین نوترکیب از جمله گران‌ترین داروهای موجود بوده و هزینه‌های زیادی را به بیماران و سیستم بهداشتی کشور تحمیل می‌نماید، لذا شناسایی دقیق آن در نزد بیماران از اهمیت بسزایی برخوردار می‌باشد.

گیرنده HER2 به خانواده‌ای از چهار گیرنده گذرنده از غشا (Trans membrane) تعلق دارد که رشد و تمایز سلولی را از طریق مسیر انتقال سیگنال کنترل می‌کنند. بیان زیاد و یا افزایش تعداد نسخه‌های HER2 با بدخیمی و پیش آگهی بد سرطان پستان ارتباط دارد. HER2 به عنوان یک گیرنده واسطه در شبکه پیام رسانی عمل کرده و باعث

اختصارات:

HER: Human Epidermal Growth Factor Receptor

EGFR: Epidermal growth factor receptor

IHC: Immunohistochemistry

BCRC-BB: Breast Cancer Research Center - Bio Bank

برای استفاده متداول نشده و در دستورالعمل‌های معتبر تشخیصی و درمانی وارد نشده است. لذا با عنایت به ویژگی‌های ممتاز این روش انجام مطالعات متعدد در جهت تأیید هر چه بیشتر کارایی و صحت آن ضروری به نظر می‌رسد.

## مواد و روش‌ها

### نمونه‌های بافتی

۴۱ نمونه بافت پارافینه بر اساس داده‌های پرونده بالینی بیماران و نتایج آزمایشات IHC به شرح ذیل از بانک زیستی پژوهشگاه سرطان پستان (BCRC-BB) انتخاب گردید. تعداد نمونه‌ها بر اساس نتیجه IHC جهت نشانگر HER-۲ در جدول شماره ۱ آمده است.

جدول ۱- تعداد نمونه‌های مورد استفاده جهت آزمایش بر اساس نتایج ایمنو هیستوشیمی

| نتیجه تست      | IHC  |    |    |    | جمع |
|----------------|------|----|----|----|-----|
|                | منفی | ۱+ | ۲+ | ۳+ |     |
| تعداد نمونه‌ها | ۲۱   | ۲  | ۵  | ۱۳ | ۴۱  |

\* نمونه‌های IHC دو مثبت توسط تکنیک FISH مورد ارزیابی قرار گرفتند.

### استخراج DNA

استخراج DNA توسط کیت TakaRa DEXPAT™ و از بافت پارافینه به شرح زیر انجام شد. بافت‌ها در تیوب ریخته شده و ۵/۵ ml از محلول DEXPAT™ اضافه شد. تیوب به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری ۱۰۰°C قرار گرفته و سپس سریعاً در دمای ۴°C با دور ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. لایه میانی که حاوی DNA می‌باشد جدا شده و سپس غلظت آن توسط دستگاه اسپکتروفتومتر سنجیده شد.

### انجام Real-Time PCR بر روی نمونه‌ها

پس از استخراج DNA واکنش Real-Time PCR بر روی تمام ۴۱ نمونه بافت پارافینه که بر اساس داده‌های پرونده بالینی بیماران انتخاب شده بودند، صورت گرفت. این واکنش برای هر دو ژن HER-۲ و نیز Gastrin (به عنوان ژن کنترل تک کپی) به صورت تکرار سه تایی (triplicate) انجام شد.

پرایمر و پروب‌های طراحی شده برای هر ژن از نظر ترمودینامیکی کنترل شده و سپس در پایگاه اطلاعاتی BLAST جهت تأیید عدم

HER-۲ بسیار بالا و حتی تا ۱۰۰ برابر می‌باشد. دلیل این امر اغلب به علت افزایش تعداد کپی‌های ژن HER-۲ است و این افزایش منجر به افزایش سنتز mRNA و تولید پروتئین می‌شود. در سرطان پستان نیز اکثر موارد افزایش بیان HER-۲ به علت افزایش در تعداد کپی‌های ژن است. امروزه روش معمول اندازه‌گیری این پروتئین، IHC است که نتایج آن به صورت منفی (-)، یک مثبت (+۱)، دو مثبت (+۲)، و سه مثبت (+۳) گزارش می‌شود. پاسخ سه مثبت اندیکاسیون استفاده از داروی هرسپتین را داشته و پاسخ یک مثبت و یا منفی اندیکاسیون استفاده از این دارو را نخواهد داشت. نتیجه دو مثبت نیز به عنوان نتیجه مشکوک تلقی شده و برای رفع ابهام در این موارد، آزمایش FISH انجام می‌شود که البته انجام این آزمایش در کشور ما بسیار گران بوده و تنها در مراکز محدودی انجام می‌گیرد. در نتیجه تصمیم در مورد درمان با هرسپتین در این موارد بویژه با عنایت به قیمت بسیار بالای این آنتی بادی بسیار مشکل می‌باشد. از سوی دیگر اعتبار نتایج آزمایش IHC به دلایل متعددی شدیداً وابسته به آزمایشگاه و تجربه فرد انجام دهنده آن بوده و لذا می‌تواند از آزمایشگاهی به آزمایشگاه دیگر و یا از فردی به فردی دیگر کاملاً متفاوت باشد. علاوه بر این، متعدد بودن مراحل آماده سازی نمونه، طبیعت پروسه تثبیت (Fixation)، زمان تثبیت و نوع آن، انواع مختلف آنتی بادی، همگی از عواملی هستند که از ثبات نتایج این تست می‌کاهند. همچنین، نتایج این آزمایش به صورت کمی نبوده و صرفاً به صورت نیمه کمی ارائه می‌شود. (۱۲).

امروزه مطالعات زیادی در جهت یافتن روشهای جایگزین این تکنیک انجام شده و یا در حال انجام است (۹، ۱۳-۲۳). روش دیگر اندازه‌گیری نشانگر HER-۲ تکنیکی به نام Real-Time PCR می‌باشد که روشی آسان و بسیار سریع بوده و از دقت بالایی برخوردار است. در این روش تکثیر و کمی سازی بر اساس تکنیک PCR صورت گرفته و هیچیک از محدودیت‌های روش IHC از جمله "نیاز به تیمارهای نسبتاً طولانی" و "تفاوت اعتبار نتایج از آزمایشگاهی به آزمایشگاه دیگر و یا از فردی به فرد دیگر" را نداشته و از طرفی در مقایسه با روش FISH آسان‌تر و کم هزینه‌تر می‌باشد (۲۴). نتایج این روش بصورت کمی گزارش شده و حساسیت بسیار بالای این روش، تکثیر مقادیر بسیار کم اسید نوکلئیک را امکان پذیر ساخته و می‌تواند میزان تکثیر ژن را به طور دقیق بیان کند. این روش هنوز

جدول ۲- توالی پرایمرها و پروبها

| بازده | توالی                          | ژن      |
|-------|--------------------------------|---------|
|       | F GAAGCCTTCCCCCTGAAATC         |         |
| ۹۹/۳  | R GACAGGGAGAAGCCTGACTG         | HER-۲   |
|       | P ACCCCTCCGCCCATGTCCCTTGC      |         |
|       | F CTCCTGGATCCCCTTCAAG          |         |
| ۹۶/۳  | R CATATTGAACAGTGCAGATGAAGA     | Gastrin |
|       | P ACCAGTGCCATCCAAAAGAACGTCTATG |         |

پروبها با استفاده از FAM 3' TAMRA 5' نشاندار شده‌اند

اتصال غیر اختصاصی به نواحی دیگر ژنوم بررسی شد. توالی پرایمر و پروبها به شرح جدول ۲ می‌باشند.

واکنش Real-Time PCR با استفاده از Master Mix ۲x از شرکت Primer Design در واکنشهای ۲۰ میکرولیتری انجام شد. غلظت نهایی پرایمر و پروبها به ترتیب ۰/۵ میکرومولار و ۰/۳ میکرومولار بود. اندازه گیری میزان فلورسانس توسط دستگاه ۷۵۰۰ Biosystems Applied و آنالیز داده‌ها توسط نرم افزار ۲.۰ ver. ۷۵۰۰ software system انجام شد. پس از اتمام، چرخه‌های آستانه هر نمونه از نرم افزار استخراج شده و سپس تعداد کپی HER-۲ با استفاده از فرمول  $2^{-\Delta\Delta CT}$  محاسبه شد که در آن  $e$  بازده هر واکنش و  $\Delta\Delta CT$  تفاوت سیکل آستانه نمونه کنترل نسبت به نمونه توموری می‌باشد. از یک نمونه DNA بافت پارانیه فرد سالم نیز به عنوان نمونه کنترل استفاده شد.

### آنالیز آماری

برای بررسی میزان انطباق تکنیک Real-Time PCR با IHC با استفاده از نرم افزار SPSS ver. ۱۶، از آزمون Fisher's Exact Test و ضریب Phi Cramer's V استفاده شد. برای روش Real-Time PCR میزان cut off برابر عدد ۲ (بیشتر از ۲ مثبت و کمتر از ۲ منفی) در نظر گرفته شد. نتایج IHC نیز بصورت مثبت (سه مثبت) و منفی (یک مثبت و صفر) در نظر گرفته شده و موارد دو مثبت جداگانه با FISH بررسی شده و با نتایج حاصل از Real-Time PCR مقایسه شد.

### نتایج

میانگین سنی اهداء کنندگان نمونه‌های زیستی حدود (۸۲-۳۱)

جدول ۳- میزان تطابق دو روش Real-Time PCR و IHC

| Real-Time PCR             | IHC منفی | IHC مثبت * | جمع |
|---------------------------|----------|------------|-----|
| تکثیر ژن HER-۲ بیشتر از ۲ | ۳        | ۱۱         | ۱۴  |
| تکثیر ژن HER-۲ کمتر از ۲  | ۲۰       | ۲          | ۲۲  |
| جمع                       | ۲۳       | ۱۳         | ۳۶  |

\* نتایج IHC از ۰ تا ۳ گزارش می‌شوند.

$SD = ۱۴/۵۲ + ۴۹/۶۲$  سال بوده و بیشترین مرحله بیماری (stage) ۲ و ۳ و نیز بیشترین رتبه II (grade) بود. تکثیر ژن HER-۲ بر اساس تعداد کپی در روش Real-Time PCR و نتایج IHC در جدول شماره ۳ آمده است. تعداد ۱۱ نمونه از نمونه‌هایی که نتایج IHC مثبت داشتند با روش Real-Time PCR نیز دارای تعداد کپی بالای ۲ بودند و تنها در ۵ نمونه نتایج این دو تکنیک با هم مطابقت نداشته است.

با استفاده از آزمون Fisher's Exact Test و ضریب Phi Cramer's V میزان انطباق دو روش مذکور ۷۱ درصد بدست آمد ( $p\text{-value}=۰/۰۰$ ). نمونه‌هایی که دارای نتیجه IHC دو مثبت بودند توسط تکنیک FISH مورد ارزیابی قرار گرفته و تمام آنها منفی گزارش شدند که با نتایج بدست آمده توسط روش Real-Time PCR هم خوانی داشتند. جدول شماره ۴ تعداد و نتیجه ارزیابی این نمونه‌ها را با FISH و Real-Time PCR نشان می‌دهد.

جدول ۴- تعداد و نتیجه ارزیابی FISH و Real-Time PCR بر روی نمونه‌هایی که از لحاظ IHC دو مثبت بودند.

| Real-Time PCR          | FISH مثبت | FISH منفی | جمع |
|------------------------|-----------|-----------|-----|
| تکثیر HER-۲ بیشتر از ۲ | ۰         | ۰         | ۰   |
| تکثیر HER-۲ کمتر از ۲  | ۰         | ۵         | ۵   |
| IHC ۲+                 | ۰         | ۵         | ۵   |
| جمع                    | ۰         | ۱۰        | ۱۰  |

### بحث و نتیجه گیری

از روشهای ارزیابی HER-۲ می‌توان به Real-Time PCR، IHC و تکنیک FISH اشاره کرد. با توجه به مشکلات ذکر شده در انجام IHC و همچنین طولانی بودن مراحل و قیمت نسبتاً بالای FISH مطالعات زیادی برای روشهای جایگزین از جمله Real-Time PCR انجام شده

نظر گرفته می‌شوند.

میزان انطباق دو روش Real-Time PCR با IHC در این مطالعه در حدود ۷۱ درصد بدست آمد. در مجموع ۳۹٪ نمونه‌ها که توسط Real-Time PCR مورد بررسی قرار گرفتند دارای بیان بالا (مثبت) و ۶۱٪ دارای بیان پایین (منفی) بودند. همچنین ۳۶٪ نمونه‌ها IHC مثبت و ۶۴٪ نمونه‌ها نیز IHC منفی بودند. از ۱۳ نمونه‌ای که دارای نتیجه IHC مثبت بودند، در ۱۱ نمونه نتیجه Real-Time PCR نشان دهنده تعداد کمی بالای ۲ بوده (مثبت) و تنها در ۲ نمونه با وجود تکرار آزمایش Real-Time PCR، تطابقی بین دو روش دیده نشد. در این مورد هم برای تایید یا عدم تایید جواب، تست FISH انجام شد که در نهایت نتیجه تکنیک FISH نتیجه حاصل از IHC را تایید کرده و با نتیجه Real-Time PCR مطابقت نداشت. یعنی در مجموع در نمونه‌های مثبت Real-Time PCR انطباق ۸۵ درصدی با IHC داشته است.

از ۲۳ نمونه‌ای که دارای نتیجه IHC منفی بودند نیز در ۲۰ نمونه نتیجه Real-Time PCR نشان دهنده تعداد کمی کمتر از ۲ (منفی) بوده و تنها ۳ نمونه نتیجه مثبت را نشان دادند. در نمونه‌های منفی نیز در مجموع Real-Time PCR انطباق ۸۷ درصدی با IHC داشته است.

همچنین یکی از نمونه‌ها که IHC یک مثبت داشت نیز با توجه به نتیجه Real-Time PCR که ۲،۱ بود، تکرار شده و نتیجه جدید ۲+ گزارش شد که این خود عدم تکرار پذیری نتایج IHC و در عین حال دقت روش دوم را نشان می‌دهد. در مطالعه حاضر نمونه‌های IHC ۲+ با استفاده از تکنیک FISH مورد ارزیابی قرار گرفتند که نتایج آنها منفی بود. نتیجه انجام Real-Time PCR بر روی همین نمونه‌ها نیز منفی به دست آمد که نشان دهنده تطابق نتایج Real-Time PCR با FISH در این نمونه‌ها است و این نتیجه، برتری این روش را در تمایز این دسته از گزارشات IHC به خوبی نشان می‌دهد.

همه موارد ذکر شده توانایی Real-Time PCR را در مقایسه با IHC و در برخی موارد عدم تکرار پذیر بودن نتایج IHC را نشان می‌دهد و اینکه می‌توان از روش اول به عنوان جایگزین مناسبی برای روش دوم بهره جست.

با توجه به هم خوانی نتایج Real-Time PCR با نتایج IHC و FISH و نیز با عنایت به این نکته که روش اولی دقیق‌تر و حساس‌تر از روش دوم می‌باشد می‌توان از Real-Time PCR به عنوان جایگزین

است (۱۷، ۲۳، ۲۵). Real-Time PCR به عنوان یک روش با کارایی بالا و نیز ارزان قیمت بسیار مورد توجه قرار گرفته و امروزه در بسیاری از مراکز تحقیقاتی و تشخیصی نیز در دسترس می‌باشد. در سال ۲۰۰۸ Capizzi و همکارانش همخوانی بین دو روش Real-Time RT PCR و FISH بر روی ۸۳ نمونه را حدود ۹۸٪ گزارش کردند. همچنین حساسیت Real-Time PCR حدود ۹۶٪ و ویژگی آن ۱۰۰٪ گزارش شده است (۲۵). در مطالعه Barberis و همکاران نیز تطابق ۸۷ درصدی بین نتایج Real-Time PCR و IHC مشاهده شده است (۲۶).

نتایج مقایسه ارتباط Real-Time PCR با IHC و FISH در مطالعه Gjerdrum و همکاران نیز بدین صورت بوده است (۱۷). تعداد ۸ نمونه دارای نتیجه IHC ۳+ بودند که نتیجه انجام Real-Time PCR بر روی هر ۸ نمونه تکثیر بالای ۲۰ مورد نظر را نشان داد. از ۸ نمونه دیگری که دارای نتیجه IHC ۲+ بودند ۵ نمونه تکثیر (یا تعداد کمی بالا) و ۳ نمونه دیگر عدم تکثیر با استفاده از Real-Time PCR را نشان دادند. همچنین از ۱۴ نمونه‌ای که IHC منفی بودند ۱۳ نمونه عدم تکثیر بالا و تنها ۱ نمونه تکثیر بالا با استفاده از Real-Time PCR را نشان دادند.

از طرفی ۹ نمونه که FISH مثبت بودند در روش Real-Time PCR نیز تعداد کمی بالا را نشان دادند و از ۲۱ نمونه که FISH منفی گزارش شده بودند تنها ۵ نمونه تعداد کمی بالا و بقیه موارد تعداد کمی کمتر را نشان دادند.

در سال ۲۰۰۴ schlemmer و همکاران با مطالعه بر روی ۱۱۲ نمونه هم خوانی بین روش Real-Time PCR و FISH را ۹۲٪ و با IHC را ۹۱٪ ذکر کرده اند (۲۷). همچنین نتایج گزارش شده در یک مطالعه دیگر توسط Sue و همکاران که در سال ۲۰۰۴ بر روی ۸۷ نفر صورت گرفته نشان داد که در ۷۲ نمونه، نتیجه Real-Time PCR با نتایج FISH منفی مطابقت داشته و تنها در یک نمونه عدم تطابق نتایج دیده شد. همچنین ۱۲ نمونه که دارای نتیجه FISH مثبت بودند نیز دارای تعداد کمی بالا با استفاده از تکنیک Real-Time PCR شدند و در ۲ مورد عدم تطابق این دو روش مشاهده شد (۲۸).

در این مطالعه چون از یک ژن تک کمی کنترل برای مقایسه استفاده می‌شد در نظر گرفتن عدد ۲ به عنوان cut off (همانند کیت Roche) منطقی به نظر می‌رسد که بر این اساس اعداد بیشتر از ۲ مثبت در

روشهای اندازه گیری تعداد کپی، بهتر است میزان cut off بر مبنای نتایج همان آزمایشگاه تعیین شود، پیشنهاد می شود که آزمایش بر روی تعداد بیشتری نمونه (هم برای تعیین میزان cut off و هم افزایش اعتبار تست) انجام شود.

مناسبتی برای روشهای نیمه کمی مثل IHC استفاده کرد. همچنین با توجه به هم خوانی نتایج Real-Time PCR با FISH می توان از آن به جای آزمایشات تشخیصی که هزینه بالایی را به بیمار و سیستم وارد می کنند استفاده کرد. همچنین از آنجائیکه در بهینه سازی

## References

- 1- Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer* 2010; 46 (4): 765-81. PubMed PMID: 20116997. Epub 2010/02/02. [eng].
- 2- Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, DM. P. GLOBOCAN 2008 v1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]. 2008.
- 3- van de Vijver MJ. Biological variables and prognosis of DCIS. *Breast* 2005; 14 (6): 509-19. PubMed PMID: 16246564.
- 4- Britta Weigelt JLP, Laura J. van 't Veer. BREAST CANCER METASTASIS: MARKERS AND MODELS. *Nature Review* 2005; 5: 591-602.
- 5- Esteve FJ, Hortobagyi GN. Prognostic molecular markers in early breast cancer. *Breast Cancer Res* 2004; 6 (3): 109-18. PubMed PMID: 15084231.
- 6- Sotiriou C, Pusztai L. Gene-expression signatures in breast cancer. *N Engl J Med* 2009; 360 (8): 790-800. PubMed PMID: 19228622. Epub 2009/02/21. [eng].
- 7- Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE, Jr., Davidson NE, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005; 353 (16): 1673-84. PubMed PMID: 16236738. Epub 2005/10/21. [eng].
- 8- Del Mastro L, Lambertini M, Bighin C, Levaggi A, D'Alonzo A, Giraudi S, et al. Trastuzumab as first-line therapy in HER2-positive metastatic breast cancer patients. *Expert Rev Anticancer Ther* 2012. PubMed PMID: 23072512.
- 9- Ménard S CP, Campiglio M, Pupa SM, Tagliabue E. Role of HER2/neu in tumor progression and therapy. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61 (23): 2965-78.
- 10- Yarden Y. Biology of HER2 and Its Importance in Breast Cancer. *Oncology* 2001; 61: 1-13.
- 11- Jr RR. The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancerstar, open. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2004; 319 (1): 1-11.
- 12- (NCCN) NCCN. Breast Cancer. 2009; 1.
- 13- Millson A, Suli A, Hartung L, Kunitake S, Bennett A, Nordberg MC, et al. Comparison of two quantitative polymerase chain reaction methods for detecting HER2/neu amplification. *J Mol Diagn* 2003; 5 (3): 184-90. PubMed PMID: 12876209. Pubmed Central PMCID: 1907331. Epub 2003/07/24. [eng].
- 14- Schlemmer BO, Sorensen BS, Overgaard J, Olsen KE, Gjerdrum LM, Nexø E. Quantitative PCR--new diagnostic tool for quantifying specific mRNA and DNA molecules: HER2/neu DNA quantification with LightCycler real-time PCR in comparison with immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. *Scand J Clin Lab Invest* 2004; 64 (5): 511-22. PubMed PMID: 15276916. Epub 2004/07/28. [eng].
- 15- Lewis F, Jackson P, Lane S, Coast G, Hanby AM. Testing for HER2 in breast cancer. *Histopathology* 2004; 45 (3): 207-17. PubMed PMID: 15330798. Epub 2004/08/28. [eng].
- 16- Kurt Beyser, Astrid Reiser, Christof Gross, Carmen Möller, Karim Tabiti, Josef Rüschoff. Real-time Quantification of HER2/neu Gene Amplification by LightCycler Polymerase Chain Reaction (PCR) – a New Research Tool. *ROCHE MOLECULAR BIOCHEMICALS* 2001; 2.
- 17- Gjerdrum LM, Sorensen BS, Kjeldsen E, Sorensen FB, Nexø E, Hamilton-Dutoit S. Real-time quantitative PCR of microdissected paraffin-embedded breast carcinoma: an alternative method for HER-2/neu analysis. *J Mol Diagn* 2004; 6 (1): 42-51. PubMed PMID: 14736826. Pubmed Central PMCID: 1867459. Epub 2004/01/23. [eng].
- 18- Maria Ntoulia, Loukas Kaklamanis, Christos Valavanis, Maria Kafousi, Efsthios Stathopoulos, Petroula Arapantoni, et al. HER-2 DNA quantification of paraffin-embedded breast carcinomas with LightCycler real-time PCR in comparison to immunohistochemistry and chromogenic in situ hybridization. *Clinical Biochemistry* 2006; 39: 942-6.
- 19- Massimo Barberis, Caterina Pellegrini, Maria Cannone, Carmelo Arizzi, Guido Coggi, Silvano Bosari. Quantitative PCR and HER2 Testing in Breast Cancer A Technical and Cost-Effectiveness Analysis. *Anatomic Pathology* 2008; 129: 563-70.
- 20- Melanie Ko" nigshoff, Jochen Wilhelm, Rainer M. Bohle, Alfred Pingoud, Meinhard Hahn. HER-2/neu Gene Copy Number Quantified by Real-Time PCR: Comparison of Gene Amplification, Heterozygosity, and Immunohistochemical Status in reast Cancer Tissue. *Molecular Diagnostics and Genetics* 2003; 4 (2): 219-29.
- 21- P de Cremoux, C Tran-Perennou, B L Brockdorff, E Boudou, N Bru"nner, H Magdele"nat, et al. Validation of real-time RT-PCR for analysis of human breast cancer cell lines resistant or sensitive to treatment with antiestrogens. *Endocrine-Related Cancer* 2003; 10: 409-18.

- 22- Piotr Potemski, Elżbieta Pluciennik, Andrzej K, Bednarek, Renata Kusińska, Grażyna Pasz-Walczak, et al. A comparative assessment of HER2 status in operable breast cancer by real-time RT-PCR and by immunohistochemistry. *Diagnostics and Medical Technology* 2006; 12 (12): MT57-61.
- 23- Zhenhe Suo, Kalhinka U. Daehli, Christian Fr. Lindboe, Elin Borgen, Assia Bassarova, Jahn M. Nesland. Real-Time PCR Quantification of c-erbB-2 Gene is an Alternative for FISH in the Clinical Management of Breast Carcinoma Patients. *International Journal of Surgical Pathology* 2004; 12 (4): 311-8.
- 24- B. O. SCHLEMMER, B. S. SORENSEN, J. OVERGAARD, K. E. OLSEN, L. M. GJERDRUM, E. NEXO. Quantitative PCR – new diagnostic tool for quantifying specific mRNA and DNA molecules: HER2/neu DNA quantification with LightCycler real-time PCR in comparison with immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. *Scand J Clin Lab Invest* 2004; 64: 511 – 22.
- 25- Capizzi E, Gruppioni E, Grigioni AD, Gabusi E, Grassigli A, Grigioni WF, et al. Real time RT-PCR approach for the evaluation of ERBB2 overexpression in breast cancer archival samples: a comparative study with FISH, SISH, and immunohistochemistry. *Diagn Mol Pathol* 2008; 17 (4): 220-6. PubMed PMID: 18382352. Epub 2008/04/03. [eng].
- 26- Barberis M, Pellegrini C, Cannone M, Arizzi C, Coggi G, Bosari S. Quantitative PCR and HER2 testing in breast cancer: a technical and cost-effectiveness analysis. *Am J Clin Pathol* 2008; 129 (4): 563-70. PubMed PMID: 18343783. Epub 2008/03/18. [eng].
- 27- Schelmm B. Quantitative PCR – new diagnostic tool for quantifying specific mRNA and DNA molecules. *Scand J Clin Lab Invest* 2004; 64: 511-22.
- 28- suo z. Real-Time PCR Quantification of c-erbB-2 Gene is an Alternative for FISH in the Clinical. *International Journal of Surgical Pathology* 2004; 12 (4): 311-18.

# Comparison of Real-Time PCR and Immunohistochemistry for HER-2/neu gene amplification assay in breast cancer tissue

Rezvan Esmaeili<sup>1</sup>, Ahmad Kaviani<sup>2</sup>, Mohsen Foroughizadeh Moghaddam<sup>3</sup>, Nasrin Abdoli<sup>4</sup>,  
Mohammad Hossein Lashgari<sup>5</sup>, Ali-Akbar Zare<sup>6</sup>, Keivan Majidzadeh<sup>7</sup>

Received: 29 May 2013

Accepted: 18 Aug 2013

## Abstract

**Background:** HER-2/neu is one of the major molecular prognostic markers in breast cancer and due to treatment decision guidelines, the amplification of this gene is very important in breast cancer patients treatment. The most commonly used method for detecting HER-2/neu gene amplification is immunohistochemistry (IHC). Unquantifiable results, lack of reproducibility and long procedure time are among the drawbacks of this method which have persuaded researchers to seek alternative modern molecular based techniques such as Real-Time PCR. The aim of our study was the comparison of HER-2 gene amplification assessed by Real-Time PCR and IHC method.

**Materials and Methods:** After DNA extraction, 41 formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) breast carcinoma with known IHC results, had been assessed using Real-Time PCR and gene copy number of HER-2 were measured and compared with the results of IHC. Fluorescent in situ hybridization (FISH) for equivocal IHC and unreliable results were performed. The Fisher's Exact Test and Phi Cramer's V Coefficient were used for statistical analysis.

**Results:** According to the results, 39% of samples tested by Real-Time PCR have HER-2/neu gene amplification and 36% of samples was positive by IHC. The correlation of two methods in positive and negative samples were 85% and 87% respectively. Overall correlation between two methods was 71%. Also, IHC2+ results have been assessed by FISH technique and all of them were negative, which was in concordance with the results of the Real-Time PCR.

**Conclusion:** About 71% concordance had been observed between two methods. In the case of IHC2+ results, FISH was performed and proved the Real-Time PCR results. Real-Time PCR could precisely measure the amount of tissue HER2 amplification and also were in agreement with IHC results. Since Real-Time PCR has high precision, also is cheaper and more accessible than other methods, we suggest it to be used to assess this indicator.

**Keywords:** Breast Neoplasms; HER-2/neu; Copy Number Changes, DNA; Polymerase Chain Reaction

1- Researcher, Cancer Genetics Research Group, Breast Cancer Research Center (BCRC), ACECR, Tehran, Iran

2- Associated professor, Department of Surgery, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3- Researcher, Novin medical radiation institute, Tehran, Iran

4- Researcher, Cancer Genetics Research Group, Breast Cancer Research Center (BCRC), ACECR, Tehran, Iran

5- Assistant Professor, Department of Surgery, AJA University of Medical Science, Tehran, Iran

6- Researcher, Cancer Genetics Research Group, Breast Cancer Research Center (BCRC), ACECR, Tehran, Iran

7- (\*Corresponding Author) Associated professor, Faculty of Medicine, AJA University of Medical Science, Tehran, Iran and Associated professor, Cancer Genetics Research Group, Breast Cancer Research Center (BCRC), ACECR, Tehran, Iran.

Tel: +98 21 66488980

E-mail: kmajidzadeh@razi.tums.ac.ir