Određivanje HER2 statusa karcinoma želuca i metastatskih limfnih čvorova upotrebom tkivne mikropostrojbe

Gašljević, Gorana

Doctoral thesis / Disertacija

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:672915

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Gorana Gašljević

ODREĐIVANJE HER2 STATUSA KARCINOMA ŽELUCA I METASTATSKIH LIMFNIH ČVOROVA UPOTREBOM TKIVNE MIKROPOSTROJBE

DISERTACIJA

Zagreb, 2016.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Gorana Gašljević

ODREĐIVANJE HER2 STATUSA KARCINOMA ŽELUCA I METASTATSKIH LIMFNIH ČVOROVA UPOTREBOM TKIVNE MIKROPOSTROJBE

DISERTACIJA

Zagreb, 2016.

Disertacija je izrađena na Odjelu za patologiju (Oddelek za patologijo) Onkološkog inštituta u Ljubljani. Pri dobivanju dijela rezultata je sudjelovao i referentni laboratorij za HER2 testiranje Targos iz Kassla u Njemačkoj.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Slavko Gašparov, dr. med.

Zahvaljujem profesoru Slavku Gašparovu i profesorici Jasminki Jakić-Razumović na pomoći i savjetima prilikom izrade ove disertacije.

Zahvaljujem suradnicima dr.sc. Juanu Antoniu Contrerasu Bandrerasu, dr.sc. Mateji Blas, dr.sc. Vesni Zadnik, dr. med. i dr.sc. Janezu Lamovcu, dr. med. koji su sudjelovali u projektu na kojem se temelji ova disertacija.

SADRŽAJ

POPIS OZNAKA I KRATICA

1. UVOD....1
1.1 Karcinom želuca 1
1.1.1 Karcinom gastroezofagealne spojnice 1
1.1.2 Karcinom »distalnog« želuca 2
1.2 Onkogen HER2 6
1.3 Tkivne mikropostrojbe 9
1.4 Interlaboratorijska korelacija HER2 12
2. HIPOTEZA 13
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA 14
3.1 Opći 14
3.2 Specifični 14
4. ISPITANICI I METODE 16
4.1 Ispitanici 16
4.2 Pregled primarnih karcinoma želuca te metastatskih limfnih čvorova i priprema tkivnih mikropostrojbi 16
4.3 Imunohistokemija 18
4.4 Fluorescentna in situ hibridizacija (FISH) 22
4.5 Statističke metode 23
5. REZULTATI 24
5.1 Imunohistokemija 24
5.1.1 Usporedba HER2 ekspresije na standardnim rezovima primarnog tumora s kliničko-patološkim čimbenicima i ukupnim preživljenjem 24
5.1.2 Podudarnost imunohistokemijsko dokazane prekomjerne ekspresije HER2 na tkivnim mikropostrojbama i odgovarajućim standardnim rezovima primarnog tumora 34
5.1.3 Podudarnost ekspresije HER2 na tkivnim mikropostrojbama metastatskog tkiva iz limfnih čvorova i standardnim rezovima iz primarnog tumora 37
5.2 Fluorescentna in situ hibridizacija (FISH) 40
5.2.1 Podudarnost imunohistokemijskih rezultata prekomjerne ekspresije HER2 i amplifikacije HER2 dokazane s metodom FISH na tkivnim mikropostrojbama primarnog tumora 40
5.2.2 Usporedba rezultata FISH-a na parovima tkivnih cilindara primarnog tumora 41

5.2.3 Rezultati FISH-a na standardnim rezovima primarnog tumora 42
5.2.4 Podudarnost imunohistokemijskih rezultata prekomjerne ekspresije HER2 i amplifikacije dokazane metodom FISH na tkivnim cilindrima metastatskog tumorskog tkiva 42
5.2.5 Usporedba rezultata FISH-a na parovima tkivnih cilindara metastatskog tkiva 43
5.2.6 Usporedba rezultata FISH-a na tkivnim cilindrima primarnog tumora i cilindrima metastatskog tkiva iz limfnih čvorova 43
5.2.7 Usporedba statusa amplifikacije u cilindrima metastatskog tumora s onim slučajevima primarnog tumora kod kojih je FISH bio napravljen na standardnim rezovima 45
5.2.8 Usporedba HER2 amplifikacije s kliničko-patološkim čimbenicima i ukupnim preživljenjem 45
5.3 Rezultati usporedbe imunohistokemijskog određivanja HER2 na primarnim tumorima želuca u dva laboratorija 52
5.3.1 Podudarnost imunohistokemijskih rezultata na standardnim rezovima 52
5.3.2 Podudarnost imunohistokemijskih rezultata na cilindrima tkiva u tkivnim mikropostrojbama 53
6. RASPRAVA 54
7. ZAKLJUČCI 69
8. SAŽETAK 70
9. SUMMARY 71
10. LITERATURA 72
11. ŽIVOTOPIS 83

POPIS OZNAKA I KRATICA:

AEG	engl. adenocarcinoma of esophagogastric junction
ANS	amplifikacija niskog stupnja
AVS	amplifikacija visokog stupnja
CI	statistički pokazatelj, engl. confidence interval
CISH	kromogena in situ hibridizacija
DAB	diaminobenzidin
DAPI	4,6-diaminido-2-fenilindol
DNA	engl. deoksiribonukleinska kiselina
EGFR	engl. epidermal growth factor receptor
FAP	engl. familial adenomatous polyposis syndrome
FDA	naziv ustanove, engl. Food and drug administration
FISH	fluorescentna in situ hibridizacija
GERB	gastroezofagealna refluksna bolest
GES	gastroezofagealna spojnica
GTSP-1	engl. glutathione S-transferase P1 gen
HDGC	engl. hereditary diffuse gastric cancer
HER2	engl. human epidermal growth factor receptor 2
HGA	engl. high grade amplification
HNPCC	engl. hereditary nonpolyposis colon cancer syndrome
IHK	imunohistokemija
LGA	engl. low grade amplification
MTA	engl. manual tissue microarrayer
N, n	broj ispitanika
NPV	statistički pokazatelj, negativna prediktivna vrijednost
p	statistička značajnost

PPV	statistički pokazatelj, pozitivna prediktivna vrijednost
SISH	srebrna in situ hibridizacija
SPSS	naziv statističkog alata, engl. Statistical package for the social sciences
ToGA	naziv studije, engl. Transtuzumab for Gastric Cancer
TMP	tkivna mikropostrojba
WHO	naziv organizacije, engl. World health organization

1. UVOD

1.1 Karcinom želuca

Karcinom želuca predstavlja jednu od najčešćih malignih bolesti u čovjeka s gotovo milijun novodijagnosticiranih slučajeva u svijetu godišnje (1, 2). Između svih malignih bolesti zauzima četvrto mjesto po učestalosti (1, 2) s izrazito velikim razlikama u pojavnosti u različitim dijelovima svijeta (1- 4). Incidencija karcinoma želuca u svim populacijama pokazuje trend rasta vezano uz dob i spol pacijenta. Učestalost karcinoma želuca se izrazito povećava nakon pedesete godine života i tada je dva puta češći u muškaraca nego u žena. U mlađoj životnoj dobi je taj odnos 1:1. Bez obzira na incidenciju, stopa mortaliteta je visoka. Petogodišnje preživljenje se kreće u granicama do oko 20% (5, 3) osim u Japanu gdje su masovni »screening« programi, terapija ranih promjena sluznice želuca i praćenje pacijenata povećali 5-godišnje preživljenje na 60% (4). Mnogobrojne studije su se bavile istraživanjem i optimizacijom terapije uznapredovalog karcinoma želuca. Dio studija pokazao je nešto bolje preživljenje, no još uvijek ne postoje standardizirani i opće prihvaćeni kemoterapijski protokoli za liječenje ovog tumora (6).

S obzirom na lokalizaciju (kardija, korpus i antrum), etiopatogenezu i klinički tijek, razlikujemo dva tipa karcinoma želuca: karcinome kardije, koje zajedno s karcinomima vezanima uz Barettov jednjak ubrajamo u skupinu takozvanih karcinoma gastroezofagealne spojnice i karcinome »distalnog« dijela želuca (»ne-kardijalni« karcinomi).

1.1.1 Karcinom gastroezofagealne spojnice

Prema Siewerthovoj klasifikaciji (7) karcinome gastroezofagealne spojnice (AEG, engl. adenocarcinoma of esophagogastric junction) dijelimo u tri grupe. Podjela se bazira na odnosu karcinoma prema proksimalnom rubu gastrične spojnice i na temelju toga postoje tri tipa: AEG I karcinomi distalnog ezofagusa, AEG II pravi kardijalni karcinomi, AEG III karcinomi subkardije. S terapeutskog stajališta se

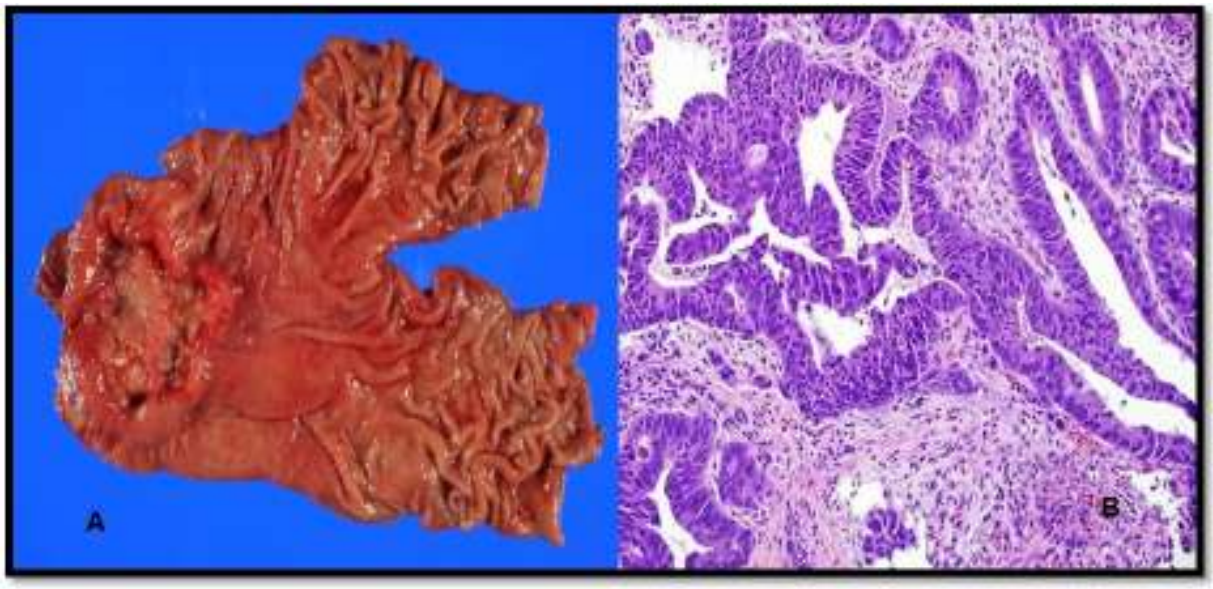
karcinomi AEG II i AEG III smatraju istom bolešću, dok sa stajališta etiopatogeneze epidemiologije i molekularnih karakteristika u istu skupinu spadaju karcinomi grupe AEG I i AEG II.

Etiopatogenetski su karcinomi grupa AEG I i AEG II povezani s postojanjem gastroezofagealne refluksne bolesti (GERB) i Barettovog jednjaka. Incidencija karcinoma gastroezofagealne spojnice (GES) je narasla u razvijenim zemljama svijeta, u pojedinim regijama čak i do 350% u odnosu na incidencije prije 1970. godine. Porast incidencije ovog karcinoma je usko vezana uz spol (muškarci), geografske i etničke faktore (8, 9). Od te vrste karcinoma u pravilu obolijevaju pretili muškarci srednjih godina, bijelci s refluksnim ezofagitisom i bez Helicobacter pylori gastritisa. Za razliku od zemalja zapadnog svijeta (10, 11), incidencija karcinoma GES je u Japanu ostala relativno stabilna i prije svega niska (12). Predisponirajući faktori za nastanak karcinoma GES su, dakle, gastroezofagealni refluks i njegov opseg (13), duljina trajanja refluksne bolesti, prisutnost i veličina hiatalne hernije (13), pretilost (14, 15), pušenje i konzumacija alkohola (14, 16) te porođajna težina (17). Lijekovi koji pospješuju GERB relaksacijom gastroezofagealnog sfinktera (npr. antikolinergici) također mogu utjecati na povećanje učestalosti ovog tumora (18), dok lijekovi koji inhibiraju sintezu prostaglandina mogu djelovati zaštitno (19). Genetski faktori također igraju ulogu u smislu genetske predispozicije, a osim toga poznati su i obiteljski oblici te vrste karcinoma za koje je dokazano da se naslijeđuju autosomno dominantno (20, 21). Genetski polimorfizam igra ulogu u nastanku karcinoma, tako su, na primjer polimorfizam u glutation S-transferazi i GTSP-1 dokazano povezani s nastankom karcinoma želuca (22).

1.1.2 Karcinom »distalnog« želuca

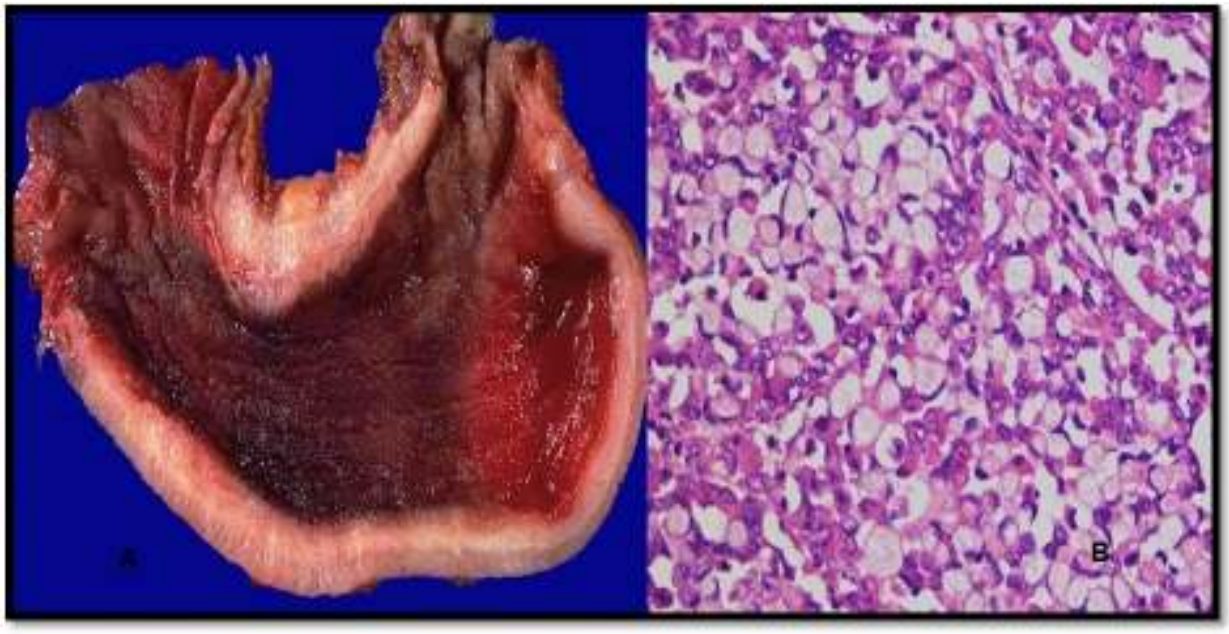
Učestalost karcinoma »distalnog« dijela želuca je u posljednjih 50-tak godina izrazito smanjena prije svega u zapadnom, razvijenom svijetu (2, 8, 9) zahvaljujući poboljšanju sanitarnih uvjeta koji su doveli do smanjenja prevalencije infekcije s Helicobacterom pylori i njegovoj eradikacijskoj terapiji, zahvaljujući povećanju potrošnje odnosno upotrebe svježeg voća i povrća i smanjenju upotrebe soljene, dimljene i konzervirane hrane. Učestalost ovog tipa karcinoma je svejedno ostala

izrazito visoka u zemljama u razvoju, kao i u prvoj generaciji doseljenika iz regija s najvećom učestalošću u »manje ugrožene« regije što ukazuje na važnost negativnih utjecaja faktora okoliša u djetinjstvu (23). Područja s najnižom učestalošću su npr. Sjeverna Amerika i Engleska gdje se učestalost kreće od oko 1,7 do 3,4 novootkrivena slučaja na 100 000 stanovnika na godinu, za razliku od najugroženijih područja Azije u kojima je učestalost i do 145 novootkrivenih slučajeva na 100 000 stanovnika godišnje (1, 2). Najveći rizik za razvoj karcinoma želuca je prisutan u ljudi niskog socijalnog standarda koji žive u slabim sanitarnim uvjetima i u kojih se infekcija s Helicobacter Pylori pojavljuje već u ranom djetinjstvu (24, 25). Karcinom »distalnog« dijela želuca nije jedinstvena bolest već se razlikuje s obzirom na pojavnost u različitim dijelovima želuca i s obzirom na histološku sliku. Jedna od prvih histoloških klasifikacija karcinoma želuca je klasifikacija po Laurenu (26) koji je uočio razlike izmedju dva osnovna tipa karcinoma želuca, tzv. intestinalnog i difuznog tipa. Intestinalni tip (Slika 1 A i B) je izgrađen od žlijezda sličnih onima u crijevu za razliku od difuznog tipa karcinoma (Slika 2 A i B) kojeg karakteriziraju skupine diskohezivnih stanica koje rastu u dezmoplastičnoj stromi. Za intestinalni tip karcinoma je vjerojatnije da će se širiti vaskularnom invazijom i da će dovesti do nastanka jetrenih metastaza, za razliku od difuznog tipa koji općenito ima lošiju prognozu i pokazuje tendenciju transperitonealnog širenja. Tipične karakteristike su ukratko prikazane u Tablici 1. Korisnost te jednostavne podjele pokazala se u mnogim epidemiološkim studijama i očuvala se sve do danas.



Slika 1. A: Makroskopski izgled intestinalnog tipa karcinoma želuca;

B: Histološka slika intestinalnog tipa karcinoma želuca, H&E 10x



Slika 2. A: Makroskopski izgled difuznog tipa karcinoma želuca;

B: Histološka slika difuznog tipa karcinoma želuca, H&E 20x

Tablica 1. Karakteristike intestinalnog i difuznog karcinoma želuca.

	INTESTINALNI	**DIFUZNI**
Epidemiologija	»epidemijski« tip	»endemični« tip
	Prevladava u visokorizičnim populacijama	Incidencija je slična gotovo u svim zemljama
Karakteristična lokacija	Antrum	Korpus
Makroskopska slika	Polipoidni	Linitis plastica
Histologija	Kohezivne stanice koje formiraju žlijezde	Diskohezivne stanice izgleda prstena pečatnjaka
Širenje bolesti	Jetrene metastaze	Difuzno, transperitonealno širenje
Prekursorske lezije	Multifokalni atrofični gastritis	Superficijalni gastritis
Dob, spol	Muškarci > 60 godina	Žene, mlađi muškarci
Prognoza	Bolja prognoza	Slaba prognoza

Genetski faktori i faktori okoliša uveliko utječu na tip karcinoma želuca.

Predisponirajući faktori za karcinom »distalnog« dijela želuca su:

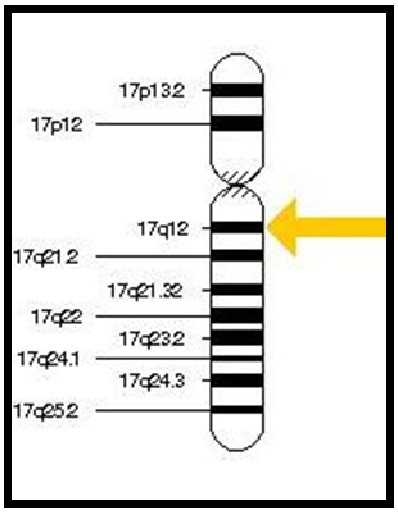
- Genetski faktori:
  a) »germline« mutacije koje se pojavljuju u definiranim familijarnim karcinomskim sindromima (27-29) (npr. HNPCC= »hereditary nonpolyposis colon cancer syndrome« – autosomno dominantna »germline« mutacija gena za popravak DNA; FAP = familial adenomatous polyposis; HDGC = hereditary diffuse gastric cancer nastaje zbog »germline« mutacije E-cadherin/CDH1 gena).
  b) Polimorfizam gena koji kontroliraju stanični ciklus ili enzima koji kataliziraju detoksifikaciju karcinogena (30-33).

- Faktori okoliša:

    1. Provokativni:
        a) Infekcija s Helicobacter pylori (34, 35)
        b) Pušenje (36)
        c) Konzumacija nitrita/nitrata i soli (37, 38)
        d) Ionizirajuće zračenje (39)
        e) Prethodne parcijalne resekcije želuca sa stvaranjem gastroenteroanastomoze (40-42).
    2. Zaštitni:
        a) konzumacija svježeg voća i povrća (43).

1.2 Onkogen HER2

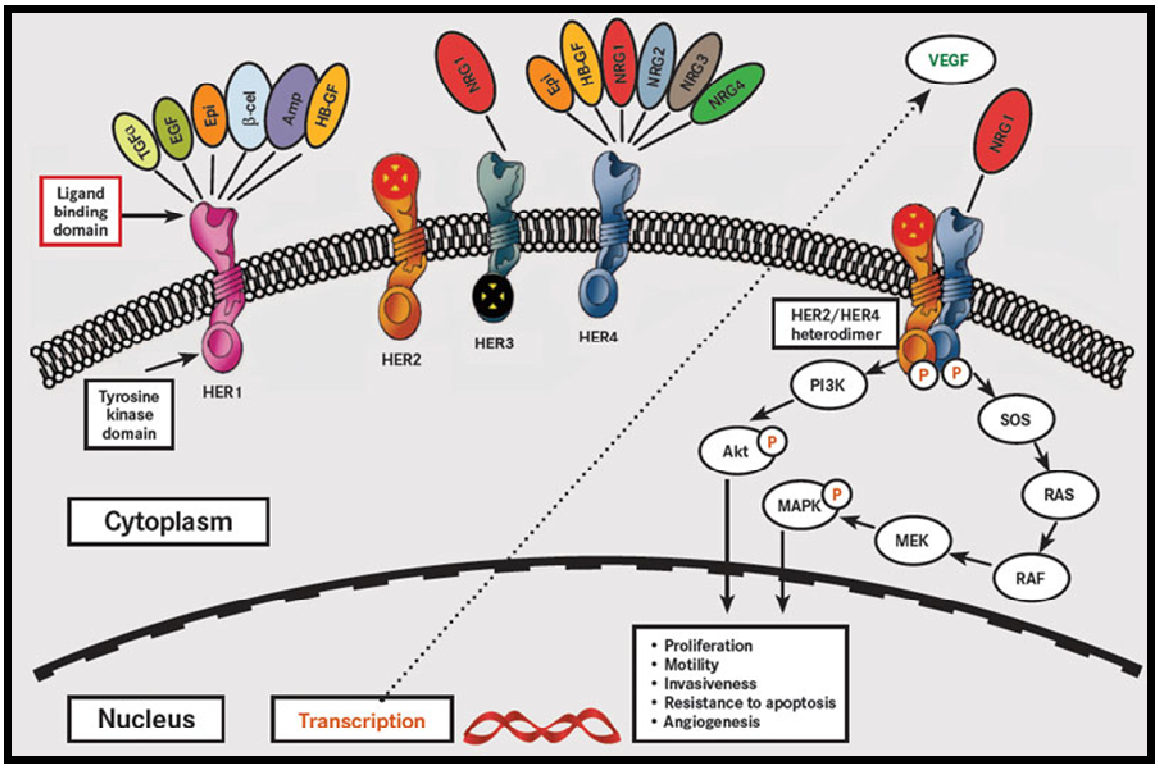
Bolje razumijevanje molekularnih principa karcinogeneze je omogućilo razvoj molekularno ciljane terapije. Jedna od takvih ciljnih molekula je HER2 receptor, 185-kd transmembranski tirozin-kinazni receptor kojega enkodira HER2 gen lociran na kromosomu 17 (17q12-q21) (Slika 3). U karcinomima HER2 djeluje kao onkogen i najnovije studije ukazuju na njegovu ulogu u razvoju mnogih vrsta ljudskih karcinoma kao što su karcinomi jajnika, endometrija, karcinom žlijezda slinovnica, pluća, jednjaka i želuca (44, 45). Uloga i klinično značenje HER2 je do danas najbolje istraženo u karcinomu dojke.



Slika 3. Prikaz lokacije HER2 gena na 17-om kromosomu.

Izvor: http://ghr.nlm.nih.gov/gene/ERBB2

HER2/neu (human epidermal growth factor receptor), poznat i pod imenom C-erbB-2, je protoonkogen čija je uloga u karcinogenezi karcinoma želuca prvi puta opisana 1986. godine (46). Po prvi puta je neovisno i gotovo istovremeno identificiran i imenovan u humanoj populaciji i u štakora u ranim osamdesetim godinama prošlog stoljeća. Vrlo brzo je ustanovljeno da se radi o istom genu (47). Dok se naziv ErbB2 koristi za gen u humanoj populaciji i kod glodavaca, naziv HER2 gen se upotrebljava samo u ljudi. Gen se nalazi na kromosomu 17 na mjestu q12-21.32 i uključen je u proces kontrole rasta i razvoja stanica (48-50). Receptor je sličan receptoru epidermalnoga faktora rasti EGFR (51). Zajedno s EGFR, HER3 i HER4, HER2 (Slika 4) sačinjava četveročlanu skupinu HER proteina koji predstavljaju tip 1 transmembranskih receptora za faktore rasta i koji aktiviraju intracelularne signalne putove kao odgovor na ekstracelularne signale (52-54). Amplifikacija protoonkogena HER2/neu dovodi do prekomjerne ekspresije na membranu vezanog receptorskog proteina.



Slika 4. Prikaz skupine HER receptora na površini stanice i njihove uloge u staničnoj signalizaciji

Izvor: Crutcher A: Human Epidermal Growthh Factor 2 (HER2), 2011; http://chemistry.berea.edu/~biochemistry/2011/ac/

Budući da se receptor nalazi na površini stanice, cilj mnogobrojnih studija je bio razvoj neutralizirajućeg monoklonskog protutijela koje bi se vezalo na receptor i blokiralo signalnu funkciju tirozin kinaze. Danas su dostupna humana rekombinantna monoklonska protutijela koja se već dulje vrijeme koriste u kombinaciji s kemoterapijom u liječenju metastatskog karcinoma dojke s dokazanom prekomjernom ekspresijom, odnosno amplifikacijom HER2 u tumoru.

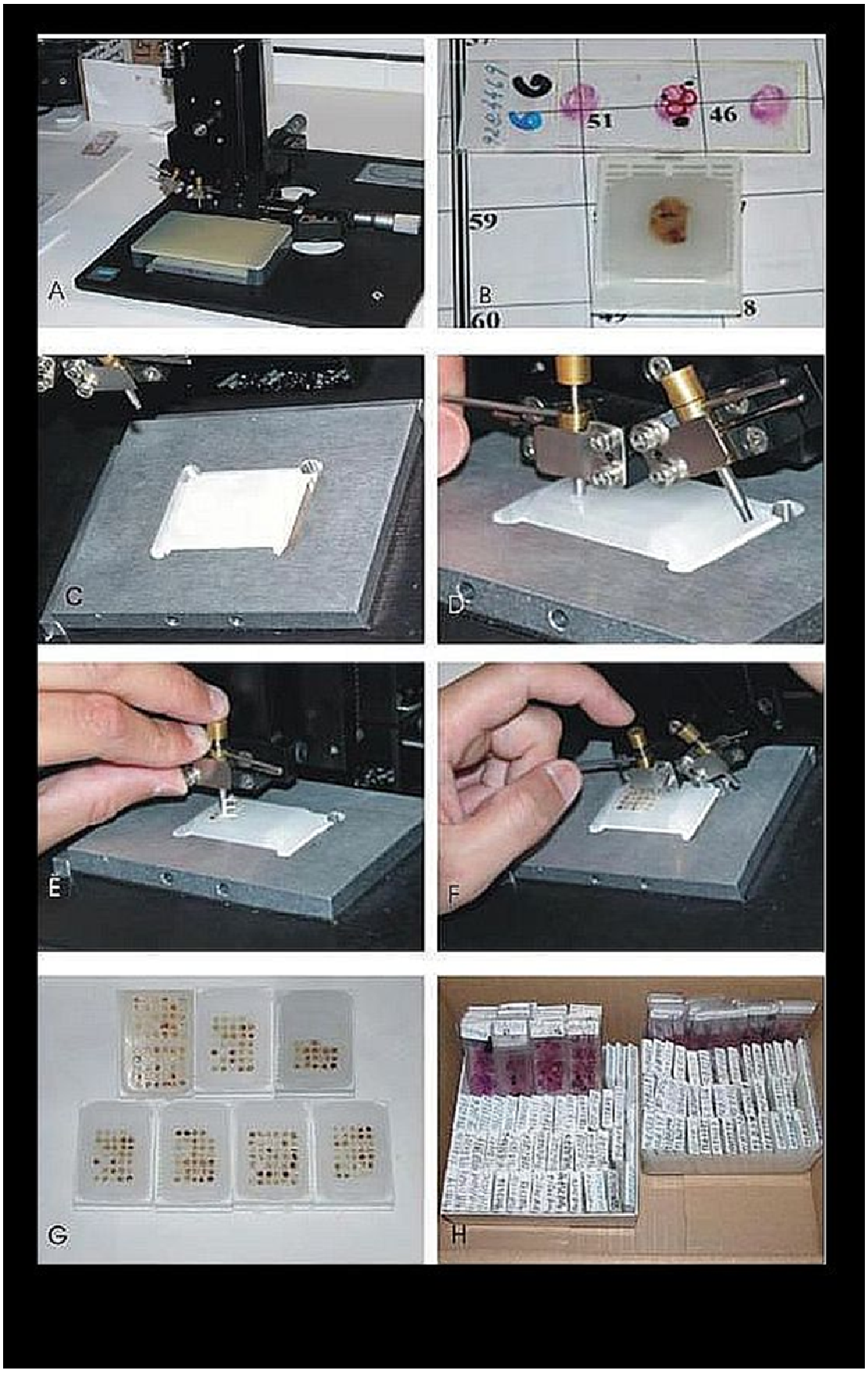
Prekomjerna ekspresija HER2 proteina u karcinomu želuca je dokazana u mnogobrojnim studijama (55, 56) iako s vrlo velikim razlikama u učestalosti HER2 ekspresije koja se kreće od 8.1% do čak 91% (55-58). Razlozi za tako velike razlike u

rezultatima su složeni i uključuju različite demografske i socio-ekonomske faktore iako se kao najvažniji faktor ipak mora istaknuti nestandardizirano rukovanje s materijalom u preanalitičkoj fazi, upotreba različitih, nestandardiziranih imunohistokemijskih protokola, upotreba različitih kriterija za ocjenjivanje pozitiviteta i subjektivnost patologa pri ocjenjivanju pozitiviteta. Novije studije su pokazale da je HER2 prekomjerno izražen u približno 15-25% karcinoma želuca (57, 59-62). Nadalje, pojedine studije su pokazale da je HER2 pozitivitet u karcinomu želuca povezan s agresivnijom bolešću i slabijom prognozom (60, 63) te da je u karcinomima želuca u puno većoj mjeri izražena heterogena ekspresija HER2 nego što je to prisutno npr. u karcinomima dojke (64-66). Prije 5 godina (2010) su objavljeni rezultati multicentrične studije ToGA u kojoj je postignuto 3-mjesečno produženje preživljenja u pacijenata s uznapredovalim karcinomom želuca koji su bili liječeni kombinacijom kemoterapije i transtuzumaba (monoklonalnog protutijela za HER2) u odnosu na pacijente koji su bili liječeni samo kemoterapijom (67).

1.3Tkivne mikropostrojbe

Upotreba tkivnih mikropostrojbi (TMP; engl. Tissue microarray, TMA) pokazala se kao odličan način za istovremenu analizu desetina ili stotina tumorskih uzoraka u imunohistokemijskim i molekularnim analizama u retrospektivnim studijama (68).
Bazični koncept upotrebe tkivnih mikropostrojbi temelji se na simultanoj analizi različitih uzoraka pod istim laboratorijskim uvjetima uz istovremenu izrazito smanjenje troškova u usporedbi sa standardnim patološkim studijama.
Koristeći poseban instrument koji je opremljen s čeličnom iglom tankih stijenki iz pažljivo odabranog/ih morfološki reprezentativnog/ih područja originalnog, davateljskog parafinskog bloka, uzimaju se cilindri tkiva koji se zatim implantiraju odnosno aranžiraju u novi primateljski parafinski blok (Slika 5 A-H). Precizno pozicioniranje i razmak između tkivnih cilindara u primateljskom bloku omogućuje digitalni mjerač koji je sastavni dio aparata za izradu tkivnih mikropostrojbi (engl. tissue arrayer). Za razliku od tradicionalnih, standardnih tehnika u patologiji koje zahtjevaju obradu i bojanje desetina ili stotina stakalaca, tehnologija tkivnih mikropostrojbi omogućuje studije cijelih kohorti slučajeva uz upotrebu samo jednog ili manjeg broja preparata. Na taj način tehnologija tkivnih mikropostrojbi omogućuje

upotrebu imunohistokemijskih i molekularnih metoda na velikom broju uzoraka pod istovjetnim i uniformnim laboratorijskim uvjetima.



Slika 5 A-H . Priprema tkivne mikropostrojbe

1.4 Interlaboratorijska korelacija HER2 statusa

HER2 testiranje je danas dio rutinskog panela u dijagnostici karcinoma dojke, a postalo je i obavezan dio dijagnostike karcinoma želuca. Njime se postavlja indikacija za liječenje s blokatorima HER2 receptora. Budući da je oko 15-20% karcinoma dojke HER2 pozitivnih i da je HER2 pozitivnih oko 15% karcinoma želuca, radi se o vrlo važnom testu čiji će rezultati određivati terapiju koja je učinkovita, ali istovremeno može imati ozbiljne, čak i smrtne posljedice i koja je s druge strane izrazito skupa. Upravo zbog toga se pojavila potreba za standardizacijom testova i laboratorijskih postupaka za određivanje statusa HER2. 2007 godine su objavljene smjernice za određivanje statusa HER2 u karcinomu dojke (69). U njima su detaljno određeni i opisani svi ključni postupci u određivanju statusa HER2, uključujući rukovanje materijalom, pravilnu fiksaciju, optimalno vrijeme za fiksaciju itd. Između ostalih ključnih parametara, jedan od osnovnih uvjeta je akreditacija laboratorija i sudjelovanje u međunarodnim programima kontrole kvalitete. Uključivanje i sudjelovanje u programima vanjske kontrole kvalitete je od ključnog značaja jer se bilo kakve poteškoće i problemi matičnog laboratorija mogu riješiti i poboljšati u sudjelovanju s referentnim laboratorijima koji imaju s tom vrstom problematike najviše iskustva (70-72). Budući da u novijoj literaturi praktički nema podataka o interlaboratorijskoj korelaciji za imunohistokemijsko određivanje statusa HER2 na karcinomima želuca, učinjena je interlaboratorijska korelacija naših imunohistokemijskih rezultata s rezultatima referalnog centra za određivanje HER2 u Kasslu u Njemačkoj.

2. HIPOTEZA

Bez obzira na postojanje HER2 heterogenosti u karcinomima želuca tehnologija tkivnih mikropostrojbi se može pouzdano koristiti za određivanje statusa HER2 kako u primarnom karcinomu želuca tako i u metastatskom karcinomu u regionalnim limfnim čvorovima. Ako se hipoteza potvrdi točnom, u tom slučaju se upravo problem heterogenosti može riješiti simultanim testiranjem većega broja tkivnih cilindara uzetih iz primarnog tumora odnosno istovremenim testiranjem uzoraka iz većeg broja tkivnih blokova.

3. CILJEVI RADA

3.1 Opći

U bolesnika s karcinomom želuca odrediti prekomjernu ekspresiju proteina HER2 na standardnim tumorskim rezovima i na tkivnim mikropostrojbama, a na tkivnim mikropostrojbama primarnog tumora i metastatskih regionalnih limfnih čvorova njegovu amplifikaciju, kao i stupanj amplifikacije.

3.2 Specifični

1. Imunohistokemijski odrediti ekspresiju HER2 na standardnom rezu karcinoma želuca.

2. Imunohistokemijski odrediti ekspresiju HER2 u tkivnim mikropostrojbama primarnog tumora i metastaza u regionalnim limfnim čvorovima.

3. Usporediti rezultate imunohistokemijske ekspresije HER2 na standardnim rezovima i tkivnim mikropostrojbama.

4. Metodom FISH odrediti amplifikaciju gena HER2 u tkivnim mikropostrojbama na primarnim tumorima i metastazama u regionalnim limfnim čvorovima.

5. Usporediti rezultate FISH analize s rezultatima imunohistokemije na tkivnim mikropostrojbama.

6. Metodom FISH odrediti amplifikaciju gena HER2 u cijelom rezu tumora u nejasnim slučajevima.

7. Usporediti povećanu ekspresiju proteina HER2 i amplifikaciju gena HER2, kao i stupanj amplifikacije sa slijedećim parametrima:
   - spol i dob pacijenta,

- veličina tumora,
- smještaj tumora,
- morfološki tip karcinoma po Laurenu i WHO klasifikaciji,
- dubina tumorske invazije (pT kategorija),
- status limfnih čvorova (pN kategorija),
- prisutnost limfovaskularne i perineuralne invazije.

8. Usporediti ekspresiju HER2 i amplifikaciju HER2 gena s ukupnim preživljenjem pacijenata.
9. Usporediti dobivene rezultate imunohistokemijskog testiranja na primarnim tumorima s rezultatima referalnog centra za određivanje statusa HER2 Targos u Kasslu, Njemačka.

4. ISPITANICI I METODE

4.1 Ispitanici

U bazi podataka Odjela za patologiju na Onkološkom Inštitutu u Ljubljani smo identificirali 302 pacijenta s ranim i uznapredovalim karcinomom želuca; pacijenti su bili operirani od 2000-2008 godine na Onkološkom inštitutu ili u drugim ustanovama u Sloveniji, uglavnom u Univerzitetnom kliničnom centru (UKC) u Ljubljani. Patohistološka obrada je u cijelosti izvršena na Odjelu za patologiju Onkološkog Inštituta. Biopsije su izabrane slučajnim izborom; jedini kriterij za uključivanje u studiju je bio dovoljan broj dostupnih parafinskih blokova tumora po biopsiji koji bi omogućio rezanje standardnih rezova i pripremu tkivnih mikropostrojbi. U studiji su upotrijebljeni rutinsko fiksirani (preko noći u 10% puferiranom formalinu) uzorci uklopljeni u parafin. Za svakog pacijenta su postojala barem 2 reprezentativna tumorska bloka. Iz arhiva su uzeti i pregledani H&E preparati i odgovarajući parafinski blokovi.

Prikupljeni su kliničko-patološki podaci o veličini tumora, morfološkom tipu po Laurenu i WHO klasifikaciji, dubini tumorske invazije (pT kategorija), statusu limfnih čvorova (pN kategorija), prisutnosti vaskularne invazije, karcinomske limfangioze i perineuralne invazije te, za 159 pacijenata, podaci o prisutnosti metastatske bolesti.

Klinički podaci su dobiveni iz dokumentacije pacijenata na Onkološkom inštitutu i iz Registra za rak Republike Slovenije .
Studija je vođena prema pravilima državnog etičnog komiteta i Helsinške Deklaracije.

4.2 Pregled primarnih karcinoma želuca te metastatskih limfnih čvorova i priprema tkivnih mikropostrojbi

Svi su histološki preparati ponovni pregledani, a tumori su klasificirani prema klasifikaciji po Laurenu i klasifikaciji karcinoma želuca po Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (WHO klasifikacija). Od svakog tumora izabrana su 2 reprezentativna preparata tumora bojena H&E te odgovarajući parafinski blokovi. Na izabranim

reprezentativnim H&E preparatima su označena 2 područja invazivnog karcinoma s velikom gustoćom tumorskih stanica. Iz odgovarajućeg tumorskog bloka je narezano 5 standardnih rezova debljine 3-4 μm. Za 103 tumora (u projektu obilježene s brojem 200 do 302), su narezana još 4 dodatna reza za testiranje u referentnom HER2 laboratoriju Targos u Kasslu u Njemačkoj. Nakon rezanja standardnih rezova, pristupilo se izradi tkivnih mikropostrojbi. Za izradu je korišten ručni MTA-1 aparat za pripremu tkivnih mikropostrojbi (Beecher Instruments Inc, Silver Spring, WI). Na svakom parafinskom bloku se pomoću markacija na stakalcima identificiralo obilježeno područje. Iz svakog parafinskog bloka uzeti su cilindri invazivnog tumorskog tkiva promjera 2mm. Za difuzni, intestinalni i miješani tip karcinoma želuca sa miješanom intestinalnom i difuznom komponentom, uzeta su po 2 cilindra iz davateljskog parafinskog bloka, a za miješane karcinome s razdvojenim tumorskim komponentama uzeta su po 2 cilindra iz svake tumorske komponente. Od davateljskih cilindara tkiva napravljeni su primateljski parafinski blokovi s ukupno 40 cilindara. Ukupno je napravljenih 18 primateljskih blokova odnosno 18 tkivnih mikropostrojbi. U svaku tkivnu mikropostrojbu smo uključili 2 kontrolna tkivna cilindra (jetra kao negativnu kontrolu za HER2 i invazivni karcinom dojke s dokazanom prekomjernom ekspresijom i amplifikacijom HER2 kao pozitivnu kontrolu). Uz 102 standardna tumorska reza u referentni centar za HER2 u Njemačkoj poslani su i rezovi svih tumorskih mikropostrojbi.

Osim toga, za sve pacijente koji su imali pozitivne limfne čvorove napraviljene su tkivne mikropostrojbe iz metastatskih čvorova. Takvih je pacijenata bilo 223 (pN1+pN2+pN3). Ponovno su pregledani svi histološki preparati zahvaćenih limfnih čvorova. Za izradu tkivnih mikropostrojbi su izabrani reprezentativni čvorovi zahvaćeni tumorskim tkivom. Na izabranim reprezentativnim preparatima bojenim H&E su označena 2 područja metastatskog karcinoma s velikom gustoćom tumorskih stanica. Na svakom parafinskom bloku se pomoću markacija na stakalcima identificiralo obilježeno područje. Za 200 pacijenata koji su imali metastaze prisutne u 2 ili više limfnih čvorova su iz jednog većeg metastatskog limfnog čvora uzeta 2 cilindra metastatskog tumorskog tkiva. Za pacijente koji su imali relativno male metastaze (23 slučaja) i kod kojih nije bilo moguće uzeti dva cilindra tkiva, uzet je jedan tkivni cilindar. Od davateljskih cilindara tkiva napravljeni su primateljski parafinski blokovi s ukupno 40 cilindara. Ukupno je uzetih 423 cilindra metastatskih

tumora koji su raspoređeni u 11 tkivnih mikropostrojbi. U svaku tkivnu mikropostrojbu su uključena 2 kontrolna tkivna cilindra (jetra kao negativna kontrola za HER2 i invazivni karcinom dojke s dokazanom prekomjernom ekspresijom i amplifikacijom HER2 kao pozitivna kontrola).

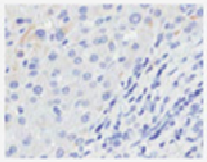
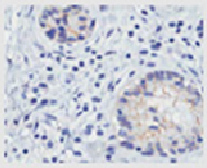
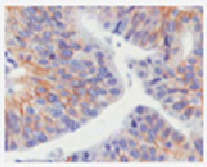
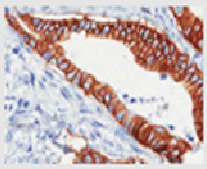
4.3 Imunohistokemija

Imunohistokemijsko bojanje na Onkološkom institutu u Ljubljani učinjeno je na standardnim rezovima tumora i tkivnim mikropostrojbama debljine 3-4 μ koristeći Hercept test (DAKO Corp, CA) prema uputama proizvođača. Osim pozitivne i negativne kontrole u tkivnim mikropostrojbama, prilikom imunohistokemijskog protokola, korištene su i vanjske kontrole (DAKO stanične linije). Ukratko, 3-4 μ debele parafinski rezovi su zagrijavani 2 sata na 57°C. Otkrivanje epitopa je postignuto uranjanjem stakalaca u vruću (95-99°C) otopinu za demarkaciju epitopa u trajanju od 40 min. Stakalca su zatim ohlađena na sobnu temperaturu i bojena u TechMate (Dako) aparatu za bojanje i to u sljedećim koracima postupka bojenja: 1) inkubacija s antiHER2 protutijelom 25 min, 2) blokiranje endogene peroksidaze u reagentu za blokiranje peroksidaze 3 x2,5 min, 3) inkubacija u vizulizacijskom reagensu 30 min, 4) vizualizacija sa supstratnom kromogenom otopinom (DAB, diaminobenzidin) i 5) kontrastno bojenje s hematoksilinom.

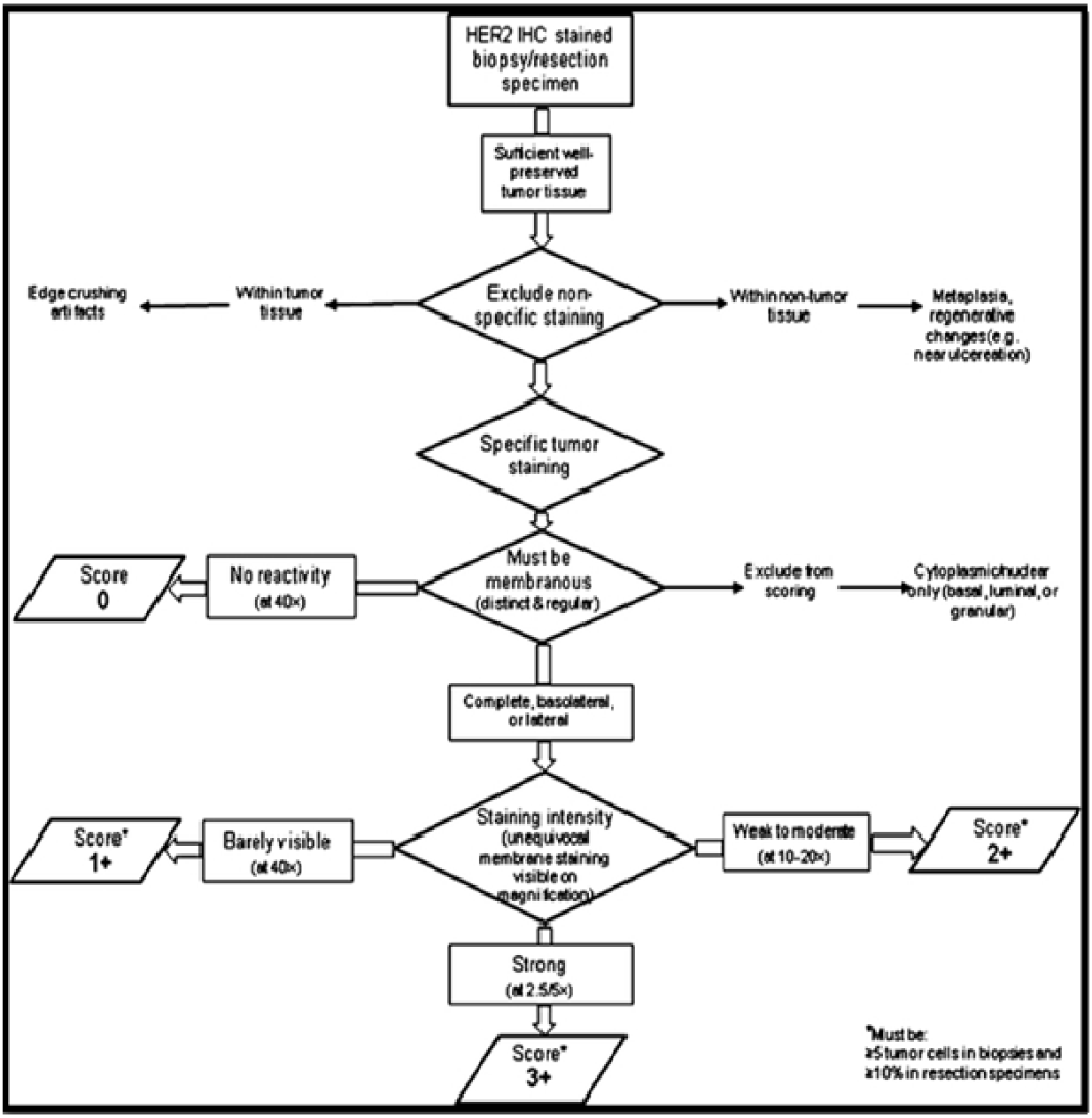
Imunohistokemijska bojanja u laboratoriju u Kasslu su napravljena na standardnim rezovima tumora tkivnih mikropostrojbi debljine 3-4 μ koristeći Hercept test (DAKO Corp, CA) u stroju Ventana BenchMark XT (Roche).

Za interpretaciju rezultata imunohistokemije koristila se 4-stupanjska ljestvica (0, 1+, 2+ and 3+) preporučena od strane „Consensus Panel recommendations on HER2 scoring for gastric carcinoma“ (Slika 6) (57). Osim toga koristili su se i dodatni Rüschoff-ovi kriteriji (Slika 7) (62). Interpretacija rezultata je učinjena na slijedeći način: 0, bez reaktivnosti ili slaba membranska reakcija u <10% tumorskih stanica; 1+, slaba/jedva zamjetna membranska reakcija u ≥10 % tumorskih stanica; 2+, slaba do srednje intenzivna kompletna, bazolateralna ili laterolateralna membranska reakcija u ≥ 10 % tumorskih stanica; 3+, jaka membranska kompletna, bazolateralna ili laterolateralna reakcija u ≥10 % tumorskih stanica (Slika 6). Za standardne rezove

korištena je razdiobna vrijednost (*engl*. cut-off point) 10% pozitiviteta. Budući da su rezultati na tkivnim mikropostrojbama očitavani kao ekvivalent endoskopskoj biopsiji, 10% razdiobna vrijednost nije korištena za konačnu ocijenu već su korištene smjernice kojima se kao pozitivna reakcija smatra skupina od barem 5 kohezivnih tumorskih stanica s prisutnom membranskom reakcijom (62). Slučajeve s HER2 2+ i HER2 3+ smo smatrali pozitivnima u smislu prekomjerne ekspresije. Heterogenim su se smatrali slučajevi kod kojih je HER2 3+ reakcija bila pozitivna fokalno u <10% tumora (57). HER2 status na standardnim rezovima smo usporedili sa statusom HER2 na tkivnim mikropostrojbama. Za slučajeve miješanih karcinoma želuca kod kojih su intestinalna i difuzna komponenta bile odvojene kao konačan rezultat uzeta je veća vrijednost HER2 bojenja.

	Score	Surgical specimen-staining pattern	Biopsy specimen-staining pattern	HER2 overexpression assessment
	0	No reactivity or no membranous reactivity in <10% of tumour cells	No reactivity or no membranous reactivity in any tumour cell	Negative
	1+	Faint/barely perceptible membranous reactivity in ≥10% of tumour cells; cells are reactive only in part of their membrane	Tumour cell cluster with a faint/barely perceptible membranous reactivity irrespective of percentage of tumour cells stained	Negative
	2+	Weak-to-moderate complete, basolateral or lateral membranous reactivity in ≥10% of tumour cells	Tumour cell cluster with a weak-to-moderate complete, basolateral or lateral membranous reactivity irrespective of percentage of tumour cells stained	Equivocal
	3+	Strong complete, basolateral or lateral membranous reactivity in ≥10% of tumour cells	Tumour cell cluster with a strong complete, basolateral or lateral membranous reactivity irrespective of percentage of tumour cells stained	Positive

Slika 6. Ocjenjivanje HER2 imunohistokemijske reakcije u karcinomu želuca
Izvor: http://www.her2testing.ru/other/hcp-approval.html



Slika 7. Pomoćni kriteriji za ocjenjivanje pozitivnosti HER2 reakcije u karcinomu želuca

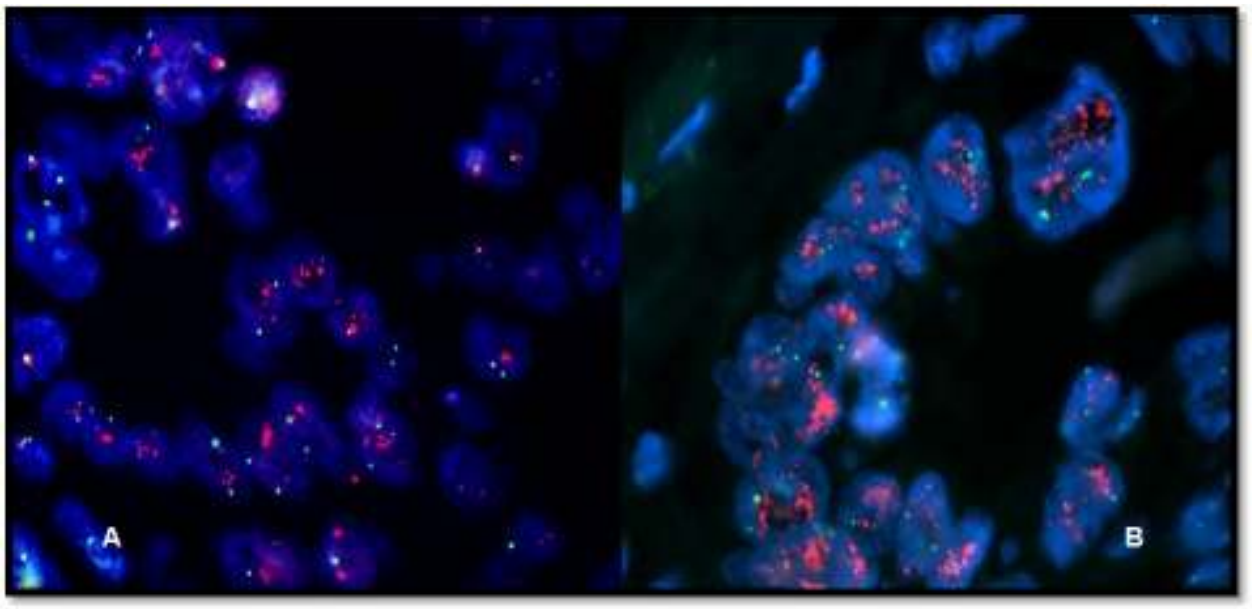
Izvor: Rüschoff J, Dietel M, Baretton G i sur. HER2 diagnostics in gastric cancer – guideline validation and development of standardized immunohistochemical testing. Virchows Arch 2010; 457(3): 299-307.

Za potrebe interlaboratorijske usporedbe su rezultati u oba laboratorija očitani posve neovisno, bez poznavanja rezultata drugog laboratorija ili bilo kakvih drugih informacija glede pacijenata i klinično-patoloških karakteristika tumora. Rezultati su potom uspoređeni.

4.4 Fluorescentna in situ hibridizacija (FISH)

HER2 amplifikaciju smo određivali s dvobojnom FISH metodom koristeći FDA-odobren Path-Vision HER2 DNA kit i pretretmanski kit za parafin (oboje Abbott-Vysis, Inc, Downers Grove, IL) na tkivnim mikropostrojbama i na standardnim rezovima na 7 primjera karcinoma s heterogenom imunohistokemijskom reakcijom za HER2. Ukratko, 3-4 μ debeli rezovi parafinskih blokova su postavljeni na pozitivno nabijena stakalca i osušeni preko noći na 56°C. Uslijedila je deparafinizacija u ksilenu, dehidracija u alkoholima i sušenje na zraku. Rezovi su potom tretirani s 0,2 M HCl kroz 20 min i u vrućem (80°C) NaSCN slijedećih 30 min. Enzimska digestija je učinjena s uranjanjem u toplu (37°C) otopinu proteaze na 25 min. Uzorci su ponovno fiksirani u 10% neutralnom formalinu 10 min, isprani, dehidrirani u alkoholu i osušeni na zraku. Na stakalca je bila aplicirana odgovarajuća količina sonde. Sonda je sadržavala direktno označeno LSI Her2/neu SpectrumOrange i CEP17 SpectrumGreen probu. Uzorci su tada denaturirani zagrijavanjem na 73°C kroz 3 min i preko noći hibridizirani (najmanje 16 sati) na 37°C u HYBrite hibridizacijskoj komori. Nehibridizirane probe smo isprali s vrućom 2xSSC s 0,3% NP40 u trajanju 3 min. Jezgre smo kontrastirali s 4,6-diamidino-2-fenilindolom (DAPI). Stakalca smo potom pokrili pokrovnicom koju smo pričvrstili medijem. Hibridizirane probe smo detektirali fluorescentnim mikroskopom koristeći Olympus BX51 mikroskop opremljen s kamerom Sensys (Photometrics Ltd, UT) i setom ekscitirajućih filtera Ludl filter wheel (Ludl Electronic Products Ltd, NY). Kao upravljački sistem smo upotrebljavali Quips sistem (Applied Imaging Inc, UK). Odgovarajuća pozitivna i negativna kontrola su bile prisutne u samim tkivnim mikropostrojbama. Signali gena HER2 kao i centromere 17-og kromosoma su analizirani na površini cijelog tkivnog cilindra, a omjer je određen u najmanje dvadeset jezgara. Ako je omjer HER2/CEP 17 bio ≥2, smatrali smo da postoji amplifikacija gena HER2. U slučaju omjera između 2-3 radilo se o amplifikaciji

niskog stupnja (Slika 8 A), a ako je omjer iznosio >3 amplifikaciju smo smatrali amplifikacijom visokog stupnja (Slika 8 B).



Slika 8. A: amplifikacija niskog stupnja u karcinomu želuca;

B: amplifikacija visokog stupnja u karcinomu želuca

4.5 Statističke metode

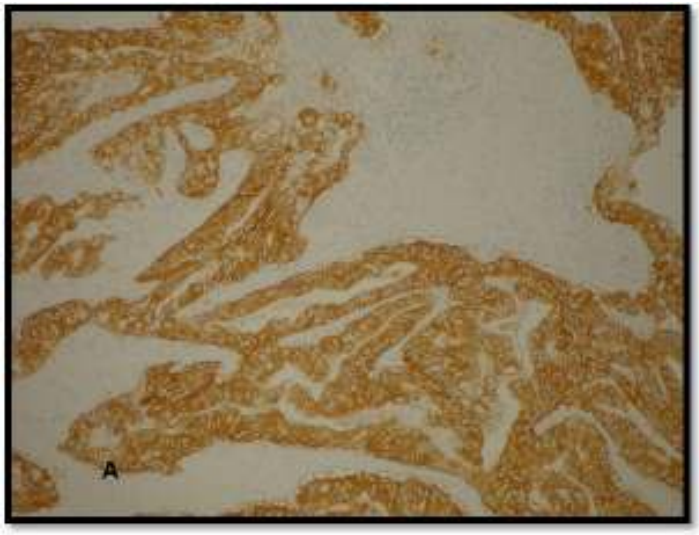
Razlike između HER2 pozitivnih i HER2 negativnih grupa smo testirali koristeći Hi^2 test ili, tamo gdje je to bilo potrebno, Fischerov test. Krivulje preživljenja smo izračunali Kaplar-Meierovom metodom i usporedili ih koristeći log-rank test. Cohen-ov kappa koeficijent smo koristili za mjerenje podudarnosti rezultata između standardnih rezova i tkivnih mreža. Izračunali smo također senzitivnost, specifičnost i ukupnu sukladnost. Za sve analize su bili upotrijebljeni statistični paketi R 2.11.1 and PASW 18.

5. REZULTATI

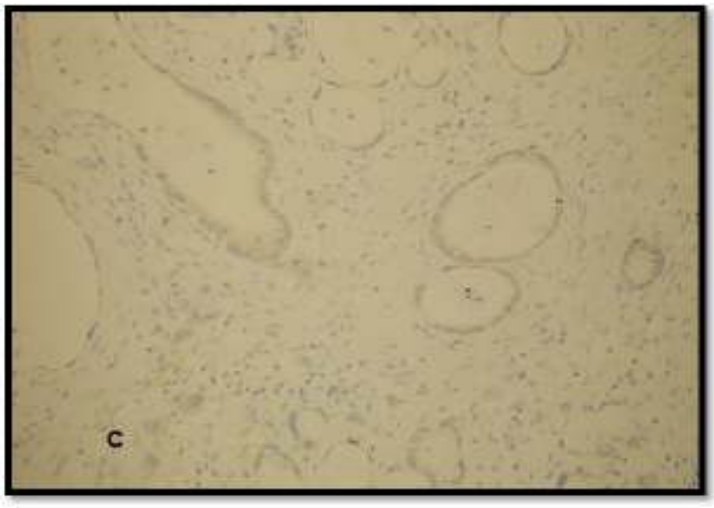
5.1 IMUNOHISTOKEMIJA

5.1.1 Usporedba HER2 ekspresije na standardnim rezovima s kliničko-patološkim čimbenicima i ukupnim preživljenjem

Imunohistokemijsko testiranje je bilo uspješno na svim standardnim rezovima. Ukupno je 20 standardnih rezova bilo ocijenjeno s 3+ (6.6%), 57 kao 2+ (18.7%), 38 kao 1+ (12.5%) (Slika 9), dok je 190 tumora bilo negativno i označeno kao 0 (62.2%). Od slučajeva koji su bili ocijenjeni s 3+, 14 (70.0%) je odgovaralo dobro do srednje diferenciranom tubulopapilarnom karcinomu, 3(15%) dobro do srednje diferenciranom tubularnom karcinomu, 2(10%) su odgovarala slabo diferenciranom tubularnom karcinomu, a u jednom slučaju (5%) se radilo o intestinalnoj komponenti miješanog karcinoma kod kojega su intestinalna i difuzna komponenta bile odvojene. U svim navedenim slučajevima je imunohistokemijski pozitivitet za HER2 bio prisutan na cijeloj površini testiranog dijela tumora. U mnogim slučajevima opažena je neravnomjerna pozitivna imunohistokemijska reakcija s prisutnim područjima 1+ i 2+ reakcije, katkada i manjih 3+ fokusa koji nisu bili prisutni samo u područjima sa sličnom odnosno različitom tumorskom morfologijom, nego i unutar same tumorske žlijezde (Slika 10).







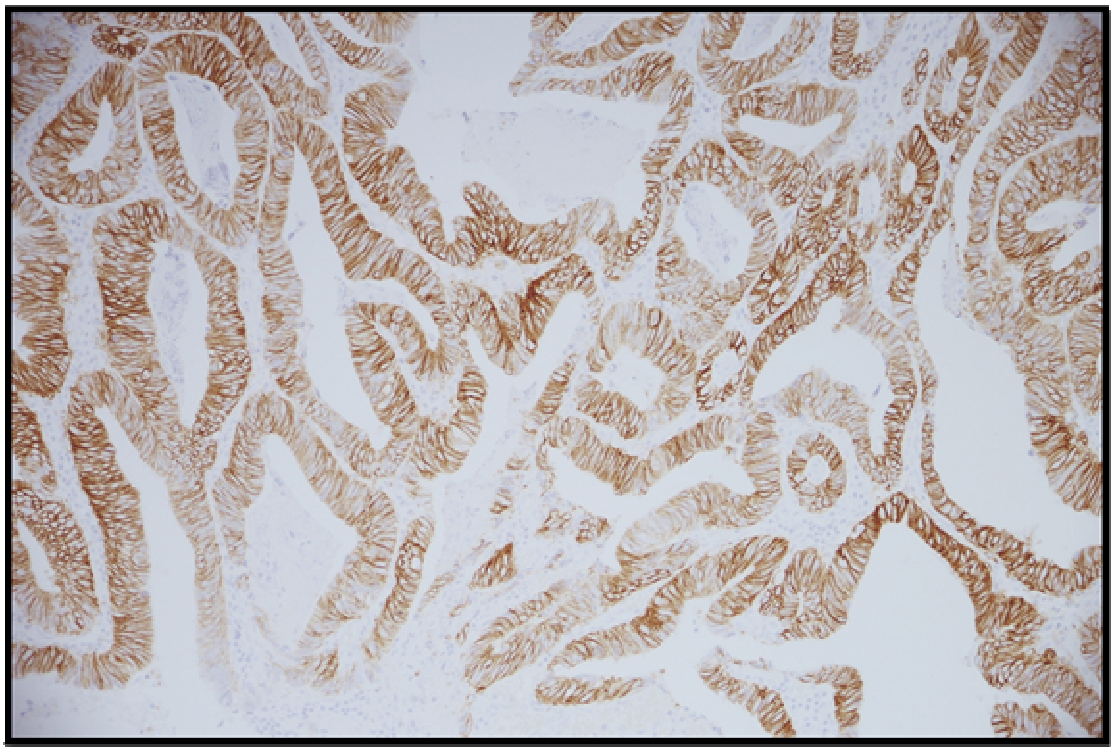
Slika 9: HER2 na standardnim

rezovima:

A: 3+ reakcija, 10x;

B: 2+ reakcija, 10x;

C: 1+ reakcija, 20x



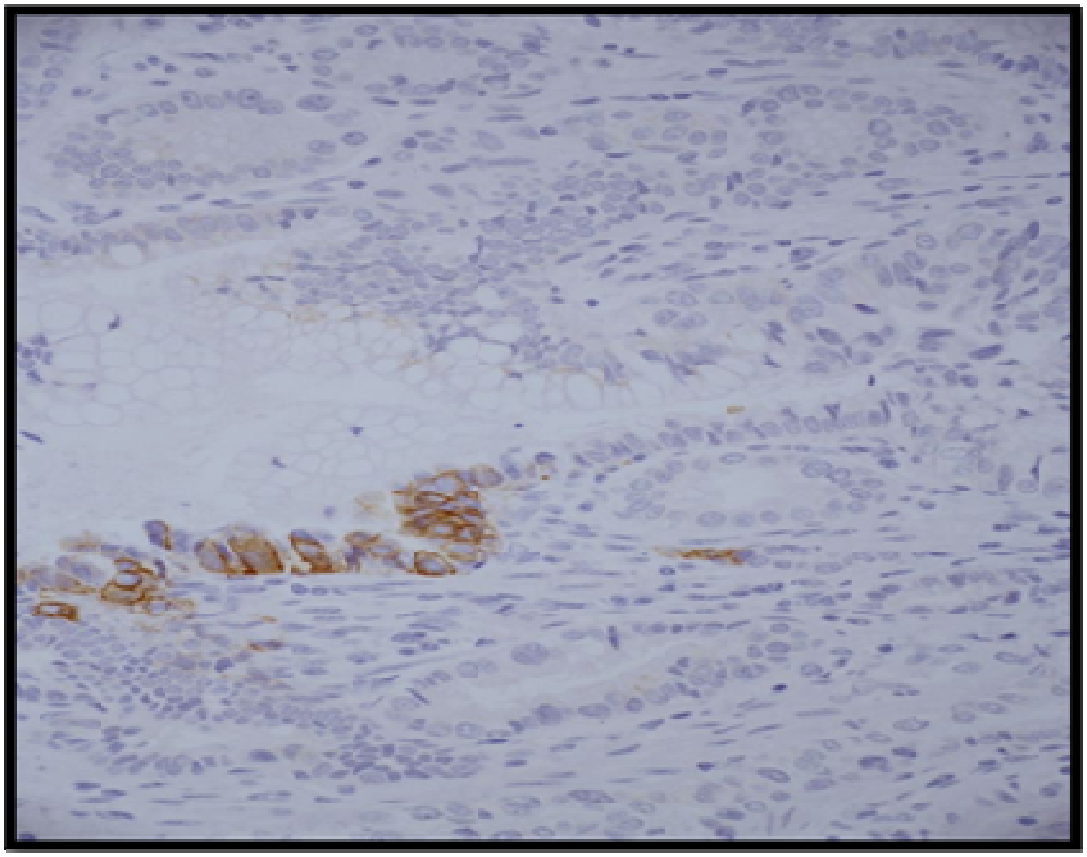
Slika 10. Nejednakomjerna imunohistokemijska HER2 reakcija unutar tumora, IHK HER2, 20x

U sedam slučajeva (2.98%) je tumor ocijenjen kao negativan, ali su se u njemu nalazili fokusi HER2 3+ intenziteta u manje od 10% tumorskih stanica (heterogeni tumori) (Slika 11).

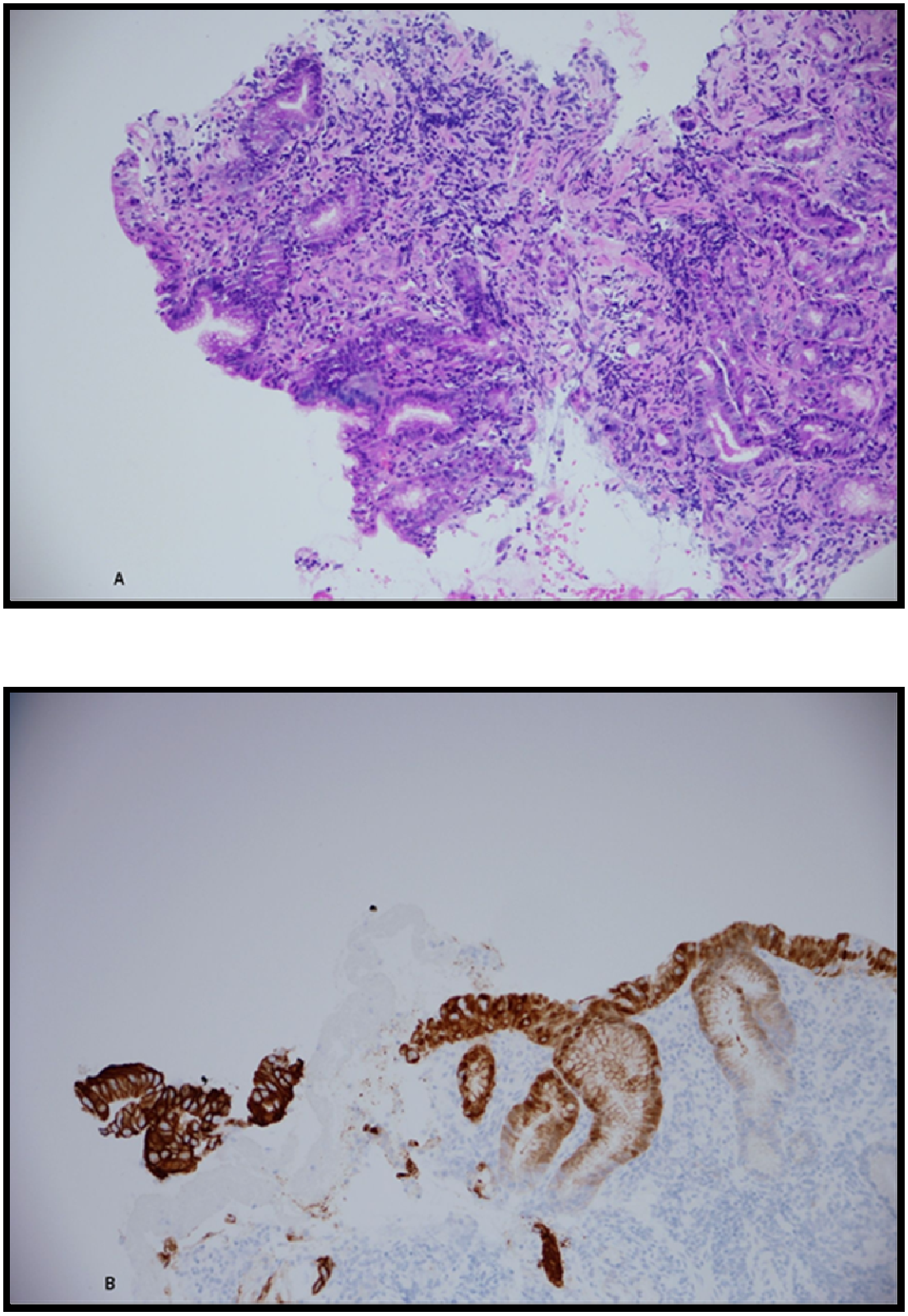


Slika 11. Imunohistokemijska reakcija 3+ u <10% površine tumora

U 10 slučajeva (3.2%) su na površini sluznice želuca pronađeni manji fokusi HER2 3+ stanica u područjima epiteline displazije (Slika 12), dok je u jednom slučaju izvan tumora bio prisutan jasno displastični epitel s displazijom visokog stupnja i jakom HER2 3+ reakcijom (Slika 13 A i B).



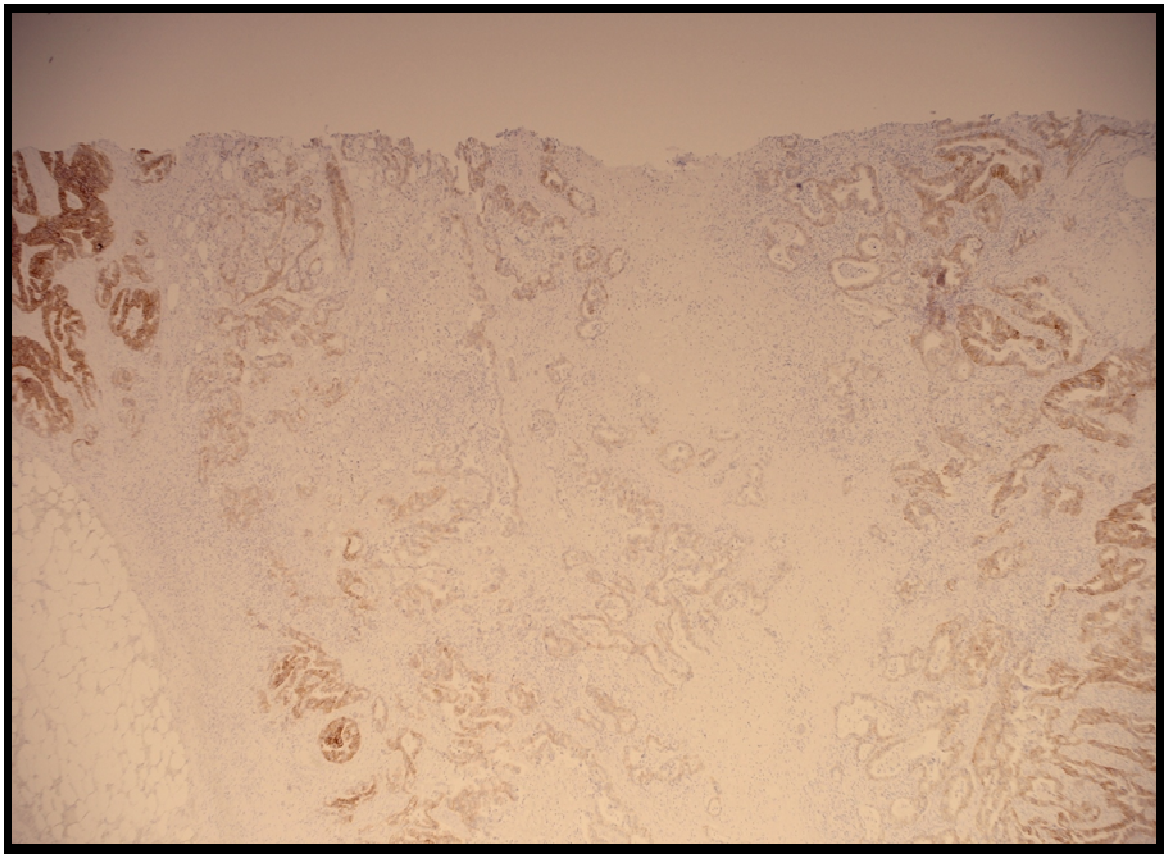
Slika 12. Manji klon HER2 3+ stanica na površini sluznice želuca



Slika 13. **A** : Displazija epitela želučane sluznice, H&E, 10x;

B: IHK HER2 3+ reakcija u displastičnom epitelu (na slici lijevo) i nespecifična reakcija (na slici desno).

U pet slučajeva (1.7%) je bio prisutan gradijent pozitivnog imunohistokemijskog bojanja s izrazitim 3+ pozitivitetom na luminalnom dijelu tumora, dok je reakcija prema središnjim dijelovima tumora postajala slabija s prelazima u 2+/1+ pozitivitet do praktično negativnog (0) bojanja u samom centralnom dijelu tumora (Slika 14).

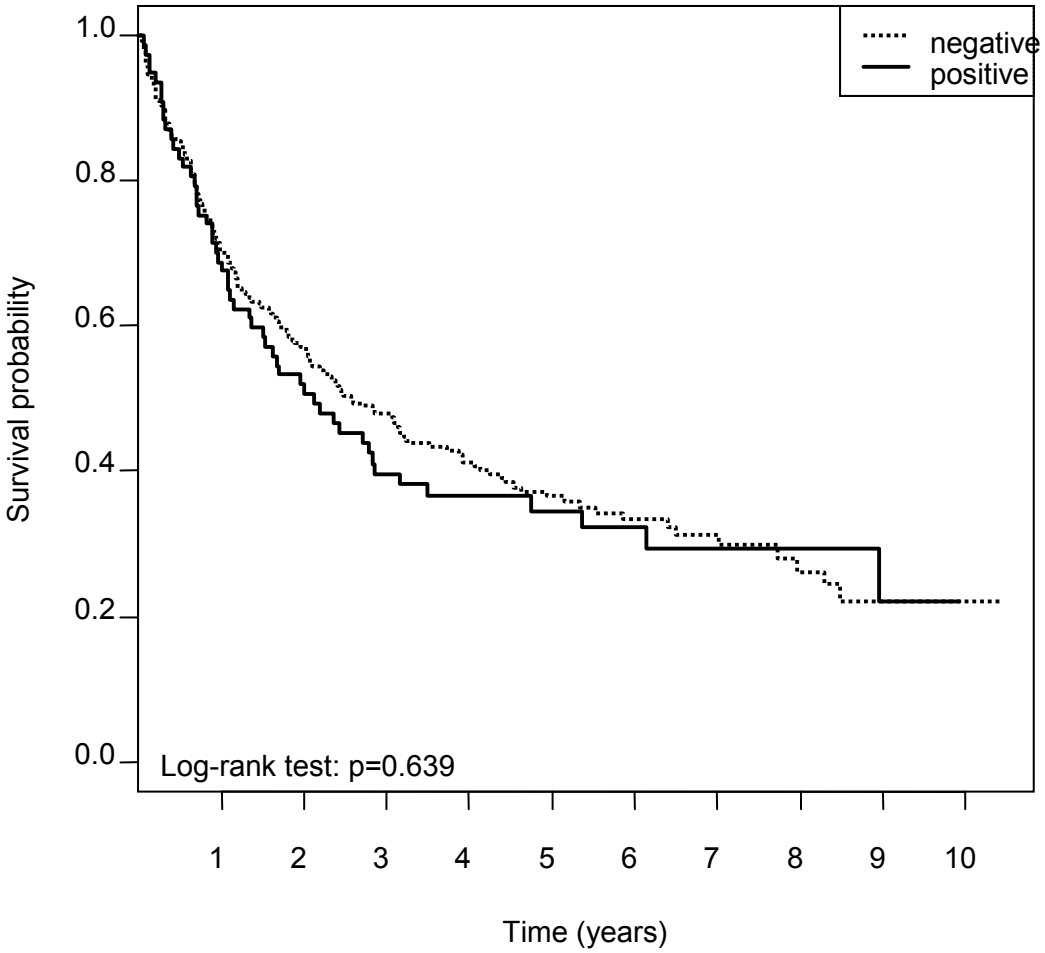


Slika 14. Adenokarcinom želuca, IHK HER2, 4x; gradijent intenziteta reakcije – desno je luminalna strana stijene želuca, lijevo serozna

Prekomjerna HER2 ekspresija je bila značajno povezana sa smještajem tumora, histološkim tipom tumora (Lauren i WHO klasifikacija) i stupnjem diferencijacije. Rezultati i njihov odnos prema kliničko-patološkim čimbenicima su prikazani u Tablici 2. Srednje preživljenje je za tumore bez prekomjerne ekspresije bilo nešto duže (Slika 15) (31 mjesec vs. 25.3 mjeseca; CI od 24.6–44.6 i CI od 16.5–41.8), ali ta razlika nije bila statistički značajna (p=0.639).

Tablica 2. Prikaz i usporedba kliničko-patoloških karakteristika karcinoma želuca u odnosu na prekomjernu ekspresiju HER2 proteina

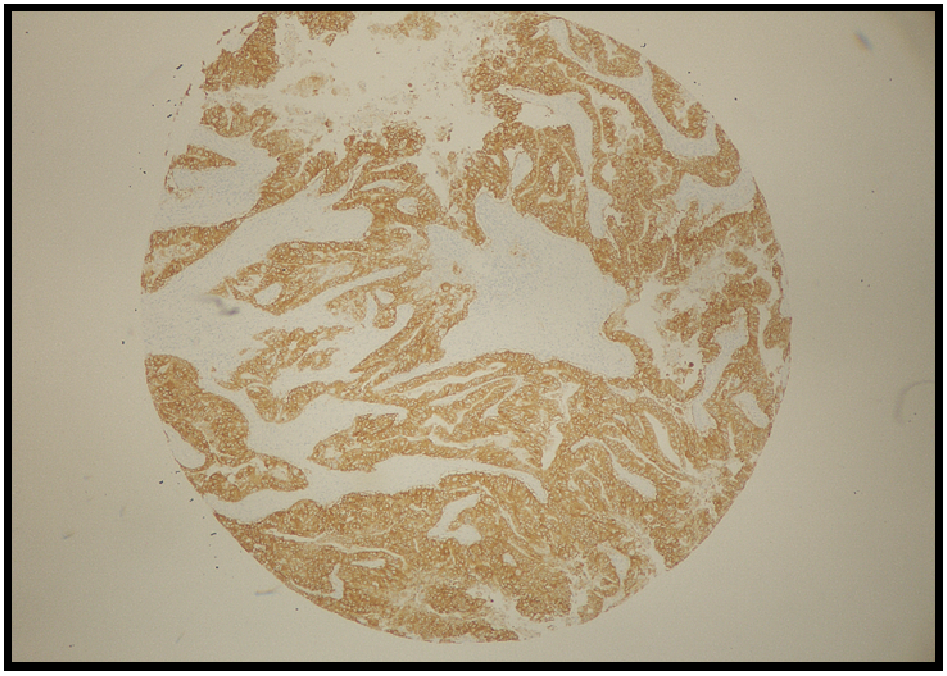
		HER2 prekomjerna ekspresija		
	Ukupno n, (%)	Negativni (0, 1+)	Pozitivni (2+, 3+)	P vrijednost
	n = 302	225	77	
Smještaj				
distalni želudac	244 (81)	188 (77)	56 (23)	
GES	58 (19)	37 (64)	21 (36)	**0.037**
Spol				
Muški	199 (66)	150 (75)	49 (25)	
Ženski	103 (34)	75 (73)	28 (27)	0.628
Laurenova klasifikacija				
Intestinalni	184 (61)	122 (66)	62 (34)	
Difuzni	52 (17)	50 (96)	2 (4)	
miješani i drugi	66 (22)	53 (80)	13 (20)	**<0.0001**
WHO klasifikacija				
Tubularni	154 (51)	114 (74)	40 (26)	
papilarni, tubulopapilarni	27 (9)	7 (26)	20 (74)	
Mucinozni	16 (5)	12 (75)	4 (25)	
stanice prstena pečatnjaka	100 (33)	87 (87)	13 (13)	
Drugi	5 (2)	5 (100)	0 (0)	**<0.0001**
Stupanj diferencijacije				
G1/G2	94 (31)	49 (52)	45 (48)	
G3	93 (31)	76 (82)	17 (18)	
G4	115 (38)	100 (87)	15 (13)	**<0.0001**
Veličina tumora				
<5 cm	125 (41)	92 (74)	33 (26)	
>5 cm	177 (59)	133 (75)	44 (25)	0.762
Dubina infiltracije				
pT1	31 (10)	21 (68)	10 (32)	
pT2	133 (44)	93 (70)	40 (30)	
pT3	130 (43)	104 (80)	26 (20)	
pT4	8 (3)	7 (88)	1 (12)	0.166
Status limfnih čvorova				
pN0	79 (26)	56 (71)	23 (29)	
pN1	95 (32)	75 (79)	20 (21)	
pN2	79 (26)	60 (76)	19 (24)	
pN3	49 (16)	34 (69)	15 (31)	0.514
Vaskularna invazija				
Pozitivna	57 (19)	42 (74)	15 (26)	
Negativna	183 (61)	137 (75)	46 (25)	
Nepoznato	62 (20)	46 (74)	16 (26)	0.982
Karcinomska limfangioza				
Pozitivna	127 (42)	97 (76)	30 (24)	
Negativna	6 (2)	6 (100)	0 (0)	
Nepoznato	169 (56)	122 (72)	47 (28)	0.227
Perineuralna invazija				
Pozitivna	175 (58)	86 (80)	22 (20)	
Negativna	108 (36)	126 (72)	49 (28)	
Nepoznato	19 (6)	13 (68)	6 (32)	0.295
Metastatska bolest				
Pozitivno	78 (26)	60 (77)	18 (23)	
Negativno	82 (27)	63 (77)	19 (23)	
Nepoznato	142 (47)	102 (72)	40 (28)	0.604



Slika 15. Kaplan-Meierova krivulja preživljenja pacijenata s karcinomom želuca u odnosu na prekomjernu ekspresiju HER2 u karcinomu

5.1.2 Podudarnost imunohistokemijski dokazane prekomjerne ekspresije HER2 na tkivnim mikropostrojbama i odgovarajućim standardnim rezovima primarnog tumora

Od 668 cilindara tumorskog tkiva 36 (5.4 %) uzoraka se nije moglo ocijeniti bilo zbog tehničkih problema s imunohistokemijskom procedurom (npr. izrazita nespecifična reakcija, otpali cilindri itd) ili stoga što tumorsko tkivo nije nađeno u cilindru. Slika 16 pokazuje primjer prekomjerne ekspresije 3+ u tkivnom cilindru.



Slika 16. HER2 3+ ekspresija na cilindru tumorskog tkiva

Za prvi od ukupno dva uzeta cilindra iz svakog parafinskog bloka (rezultati su prikazani u Tablici 3), ukupni stupanj podudarnosti je bio 84.8 % (κ=0.62, 95 % CI: 0.51–0.72). Osjetljivost bojenja je 69.5 % (58.4–79.2 %) a specifičnost 91.0 % (95 % CI: 86.2–94.6 %). Negativna prediktivna vrijednost (NPV) negativnog rezultata imunohistokemije u cilindru je bila 88.0 %; pozitivna prediktivna vrijednost (PPV) pozitivnog imunohistokemijskog rezultata u cilindru je 76.0 %.

Tablica 3. Podudarnost IHK HER2 rezultata između prvog tumorskog cilindra i standardnog reza*.

	Cijeli rezovi *n*, (%)				
Cilindar 1 *n*, (%)	IHK HER2 negativni (0, 1)	IHK HER2 pozitivni (2, 3)	Ukupno *n*, (%)	NPV (%)	PPV (%)
IHK HER2 negativni (0, 1)	183 (65)	25 (9)	208 (74)	88.0	
IHK HER2 pozitivni (2, 3)	18 (6)	57 (20)	75 (26)		76.0
Ukupno	201 (71)	82 (29)	283		

* Cilindri nisu bili informativni za 19 cijelih rezova.

Za drugi od ukupno dva uzeta cilindra (rezultati su prikazani u Tablici 4) je ukupan stupanj podudarnost 86.3 % (κ=0.67, 0.58–0.76), osjetljivost 67.4 % (57.0–76.6) a specifičnost 95.8 % (91.9–98.1). Negativna prediktivna vrijednost (NPV) negativnog imunohistokemijskog rezultata u cilindru je 85.4 %, dok je pozitivna prediktivna vrijednost (PPV) pozitivnog imunohistokemijskog rezultata u cilindru 88.9 %.

Tablica 4. Podudarnost HER2 IHK rezultata između drugog tumorskog cilindra i standardnog reza*.

	Cijeli rezovi *n*, (%)				
Cilindar 2 *n*, (%)	IHK HER2 negativni (0, 1)	IHK HER2 pozitivni (2, 3)	Ukupno *n*, (%)	NPV (%)	PPV (%)
IHK HER2 negativni (0, 1)	182 (64)	31 (11)	213 (75)	85.4	
IHK HER2 pozitivni (2, 3)	8 (3)	64 (22)	72 (25)		88.9
Ukupno	190 (67)	95 (33)	285		

* Cilindri nisu bili informativni za 17 cijelih rezova

Kada usporedimo imunohistokemijske rezultate standardnih rezova s rezultatom onoga cilindra koji je imao veću ocijenjenu vrijednost HER2 rezultata, dobivamo slijedeće rezultate: ukupan stupanj podudarnosti je 83.5 % (κ=0.63, 0.53–0.72), osjetljivost 80.1 % (74.2–85.1 %) i specifičnost 93.4 % (85.3–97.8 %). Negativna prediktivna vrijednost (NPV) negativnog imunohistokemijskog rezultata u cilindru je 97.3 %, dok je pozitivna prediktivna vrijednost (PPV) pozitivnog imunohistokemijskog rezultata u cilindru 61.7 %. Rezultati su prikazani u Tablici 5.

Tablica 5. Podudarnost rezultata HER2 IHK izmedju cilindra s većim HER2 rezultatom i standardnim rezom*.

	Cijeli rezovi *n*, (%)				
Cilindar s najvećim HER2 rezultatom *n*, (%)	IHK HER2 negativni (0, 1)	IHK HER2 pozitivni (2, 3)	Ukupno *n*, (%)	NPV (%)	PPV (%)
IHK HER2 negativni (0, 1)	177 (59)	5 (2)	182 (61)	97.3	
IHK HER2 pozitivni (2, 3)	44 (15)	71 (24)	115 (39)		61.7
Ukupno	221 (74)	76 (26)	297		

* Oba cilindra nisu bila informativna za 5 cijelih rezova.

5.1.3 Podudarnost ekspresije HER2 na tkivnim mikropostrojbama metastatskog tkiva iz limfnih čvorova i standardnim rezovima iz primarnog tumora

Od 423 cilindra metastatskog tumorskog tkiva 51 cilindar (12%) nije bilo moguće ocijeniti zbog tehničkih problema s imunohistokemijskim bojanjem (npr. izrazita nespecifična reakcija, otpali cilindri itd). Za prvi od ukupno dva uzeta cilindra (rezultati su prikazani u Tablici 6), ukupan stupanj podudarnosti je 82.6 % (κ=0.54, 95 % CI: 0.43–0.64), osjetljivost je 64.0 % (54.4–75.2 %) a specifičnost 89.0 % (95 % CI: 84.2–92.6 %). Negativna prediktivna vrijednost (NPV) negativnog rezultata imunohistokemije u cilindru je 87.6 %; pozitivna prediktivna vrijednost (PPV) pozitivnog imunohistokemijskog rezultata u cilindru je 66.6 **%.**

Tablica 6. Podudarnost rezultata HER2 IHK između prvog cilindra metastatskog tkiva i standardnog reza iz primarnog tumora*.

	Cijeli rezovi *n*, (%)				
Cilindar 1 *n*, (%)	IHK HER2 negativni (0, 1)	IHK HER2 pozitivni (2, 3)	Ukupnol *n*, (%)	NPV (%)	PPV (%)
IHK HER2 negativni (0, 1)	129 (66)	18 (9.2)	147 (75.4)	87.6	
IHK HER2 pozitivni (2, 3)	16 (8.2)	32 (16.4)	48 (24.6)		66.6
Ukupno	145 (74.3)	50 (25,6)	195		

* Cilindri nisu bili informativni za 28 cijelih rezova

Za drugi od ukupno dva uzeta cilindra (rezultati su prikazani u Tablici 7). Ukupan stupanj podudarnosti je 82.0 % (κ=0.5, 0.42–0.66), osjetljivost 62.0 % (52.0–70.6) a specifičnost 88.0 % (76.9–93.1). Negativna prediktivna vrijednost (NPV) negativnog imunohistokemijskog rezultata u cilindru je 88.0 %, dok je pozitivna prediktivna vrijednost pozitivnog imunohistokemijskog rezultata u cilindru 62.0 %.

Tablica 7. Podudarnost rezultata HER2 IHK između drugog cilindra metastatskog tkiva i standardnog reza iz primarnog tumora*.

	Cijeli rezovi *n*, (%)				
Cilindar 2 *n*, (%)	IHK HER2 negativni (0, 1)	IHK HER2 pozitivni (2, 3)	Ukupnol *n*, (%)	NPV (%)	PPV (%)
IHK HER2 negativni (0, 1)	125 (66)	17 (9.3)	142 (76.5)	88.0	
IHK HER2 pozitivni (2, 3)	17 (9.7)	28 (15)	45 (24.5)		62.0
Ukupno	142 (77)	45 (23)	187		

*Cilindri nisu bili informativni za 13+ 23 cijela reza (13 otpalih, 23 nije oduzeto zbog prisutnosti manjih metastaza koje su omogućile oduzimanje samo jednog cilindra tkiva)

Kada smo usporedili imunohistokemijske rezultate standardnih rezova s rezultatom onog cilindra metastatskog tumora koji je imao veći imunohistokemijski HER2 rezultat, dobili smo slijedeće rezultate: ukupan stupanj podudarnosti je 76.0 % (κ=0.4, 0.33–0.52), osjetljivost je 57.4 % (47.3–62.8 %) a specifičnost 83.1 % (74.2–85.1 %). Negativna prediktivna vrijednost (NPV) negativnog imunohistokemijskog rezultata u cilindru je 84.3 %, dok je pozitivna prediktivna vrijednost (PPV) pozitivnog imunohistokemijskog rezultata u cilindru 54.7 %. Rezultati su prikazani u Tablici 8.

Tablica 8. Podudarnost rezultata HER2 IHK između cilindra metastatskog tkiva s većim HER 2 rezultatom i standardnim rezom*.

	Cijeli rezovi *n*, (%)				
Cilindar s najvećim HER2 rezultatom *n*, (%)	IHK HER2 negativni (0, 1)	IHK HER2 pozitivni (2, 3)	Ukupno *n*, (%)	NPV (%)	PPV (%)
IHK HER2 negativni (0, 1)	125 (61.4)	23 (11.7)	148 (72.2)	84.3	
IHK HER2 pozitivni (2, 3)	26 (12.7)	31 (15.2)	57 (27.8)		54.7
Ukupno	151 (73.6)	54 (26.4)	205		

* Cilindri nisu bili informativni za 18 cijelih rezova

5.2 Fluorescentna in situ hibridizacija (FISH)

5.2.1 Podudarnost imunohistokemijskih rezultata prekomjerne ekspresije HER2 i amplifikacije HER2 dokazane s metodom FISH na tkivnim mikropostrojbama primarnog tumora

HER2 status je određen s FISH metodom na 505 tkivnih cilindara (75.6 %); u preostalim cilindrima (163; 24.4 %) to nije bilo moguće zbog neadekvatne kvalitete reakcije koja se manifestirala preslabim signalima ili njihovom odsutnošću, jakom autofluorescencijom tkiva ili otpalim cilindrima. Nadalje, u 6 cilindara kod kojih je FISH uspješno analiziran, rezultati nisu mogli biti uspoređeni s rezultatima imunohistokemije jer imunohistokemijski rezultati nisu bili dostupni za analizu. Tako su prekomjerna ekspresija HER2 i amplifikacija uspoređene na 499 (74.7 %) cilindara. Amplifikaciju HER2 gena smo dokazali u 69 cilindara (13.8 %). U skupini cilindara s HER2 amplificiranim tumorom (Tablica 9), svi cilindri s imunohistokemijskom reakcijom HER2 3+ (41/41) su bili amplificirani, što je bio također slučaj u 11.5 % cilindara s IHK HER2 2+ (14/122), 9.7 % onih ocijenjenih kao IHK HER2 1+ (10/103) i u 1.7 % onih ocijenjenih kao IHK HER2 0 (4/233). Ukupna podudarnost između imunohistokemijskih rezultata i rezultata FISH-a je bila 75.5 %. U HER2 amplificiranim cilindrima je stupanj amplifikacije korelirao s imunohistokemijskim rezultatom. U svim cilindrima s imunohistokemijskim rezultatom 0 ili 1+ (14/14) i u većini njih s imunohistokemijskim rezultatom 2+ (11/14) pronađena je amplifikacija niskog stupnja (ANS). Udio cilindara s amplifikacijom niskog stupnja je među cilindrima s imunohistokemijskom reakcijom ocijenjenom kao 3+ bio izrazito nizak i iznosio je 7.3 % (3/41). Tako je u većini cilindara ocijenjenih kao IHK HER2 3+ (92.7 %) pronađena amplifikacija visokog stupnja (AVS). Rezultati su prikazani u Tablici 9.

Tablica 9. Podudarnost između rezultata HER2 IHK i FISH-a na tkivnim cilindrima primarnog tumora

	IHK 0	IHK 1+	IHK 2+	IHK 3+	Ukupno
FISH +					
amplifikacija niskog stupnja	4	10	11	3	28
amplifikacija visokog stupnja	0	0	3	38	41
FISH -	229	93	108	0	430
Ukupno	233	103	122	41	499

5.2.2 Usporedba rezultata FISH-a na parovima tkivnih cilindara primarnog tumora

Ukupno 105 cilindara (31.4 %) od 334 parova cilindara nismo mogli usporediti zbog toga što najmanje jedan tkivni cilindar nije bio informativan. Od 229 uspoređenih parova (68.6 %), amplifikacija nije nađena niti u jednom cilindru u 194 slučaja (84.7 %). U 19 (8.3 %) i 13 (5.7 %) parova cilindara je u oba cilindra pronađena amplifikacija bilo niskog bilo visokog stupnja u području cijele površine cilindra. Razlika u statusu genske amplifikacije je pronađena u svega 3 para cilidara (1.3 %) kod kojih je postojala amplifikacija visokog stupnja u jednom cilindru, dok je drugi cilindar bio negativan (heterogen rezultat FISH-a). Usporedba različitih, molekularno heterogenih slučajeva s rezultatima prekomjerne ekspresije HER2 na standardnim rezovima je pokazala da se radi o tumorima u kojima HER2 3+ područja predstavljaju 10-20% tumorskog tkiva, dok je preostali dio tumora negativan.

5.2.3 Rezultati FISH-a na standardnim rezovima primarnog tumora

Za sedam slučajeva u kojima je IHK HER2 3+ reakcija na cijelim rezovima bila <10 % u inače negativnom tumoru (Slika 11) i u kojih IHK pozitivna žarišta nisu bila zahvaćena u tkivnim mikropostrojbama, učinjen je FISH na standardnim rezovima. U svih sedam slučajeva je s metodom FISH u opisanim žarištima pronađena amplifikacija, uglavnom visokog stupnja.

5.2.4 Podudarnost imunohistokemijskih rezultata prekomjerne ekspresije HER2 i amplifikacije dokazane metodom FISH na tkivnim cilindrima metastatskog tumorskog tkiva

HER2 status je metodom FISH određen na 371 (88 %) od ukupno 423 tkivna cilindra metastatskog tumora; u preostalim cilindrima (52; 12 %) to nije bilo moguće zbog neadekvatne kvalitete reakcije koja se manifestirala preslabim signalima ili njihovom odsutnošću, jakom autofluorescencijom tkiva ili otpalim cilindrima. Nadalje, u 21 cilindru kod kojih je FISH uspješno analiziran, rezultati nisu mogli biti uspoređeni s rezultatima imunohistokemije jer imunohistokemijski rezultati nisu bili dostupni za usporedbu (otpali cilindri). Usporedba je bila moguća za 60 cilindara u kojima je bila dokazana amplifikacija i 290 cilindara bez amplifikacije. U skupini cilindara s dokazanom amplifikacijom HER2 (Tablica 10), svi cilindri ocijenjeni s HER2 3+ (25/25) su bili amplificirani, što je bio također slučaj u 25 % cilindara s IHK HER2 2+ (20/80), 15.4 % onih ocijenjenih kao IHK HER2 1+ (10/65) i u 2,6 % onih ocijenjenih kao IHK HER2 0 (5/180). Ukupna podudarnost između imunohistokemijskih rezultata i rezultata FISH-a je bila 81.4 %. Stupanj amplifikacije nije više tako dobro korelirao s imunohistokemijskim rezultatom kao što je to bio slučaj u tkivu primarnog tumora. Od 15 cilindara s imunohistokemijskim rezultatom 0 ili 1+ u 8 (53,3%) je nađena amplifikacija niskog stupnja, a u 7(46.6%) visokog stupnja. Svi cilindri s imunohistokemijskim rezultatom 2+ (20/20) su imali amplifikaciju niskog stupnja. Udio cilindara s amplifikacijom niskog stupnja među cilindrima s imunohistokemijskom reakcijom ocijenjenom kao 3+ je 8 % (2/25). Drugim riječima, većina cilindara ocijenjenih kao IHK HER2 3+ (92 %) je imala amplifikaciju visokog stupnja. Rezultati su prikazani u Tablici 10.

Tablica 10. Podudarnost između rezultata HER2 IHK i FISH-a na tkivnim cilindrima metastatskog tkiva

	IHK 0	IHK 1+	IHK 2+	IHK 3+	Ukupno
FISH +					
amplifikacija niskog stupnja	3	5	20	2	30
amplifikacija visokog stupnja	2	5	0	23	30
FISH -	175	55	60	0	290
Ukupno	180	65	80	25	350

5.2.5 Usporedba rezultata FISH-a na parovima tkivnih cilindara metastatskog tkiva

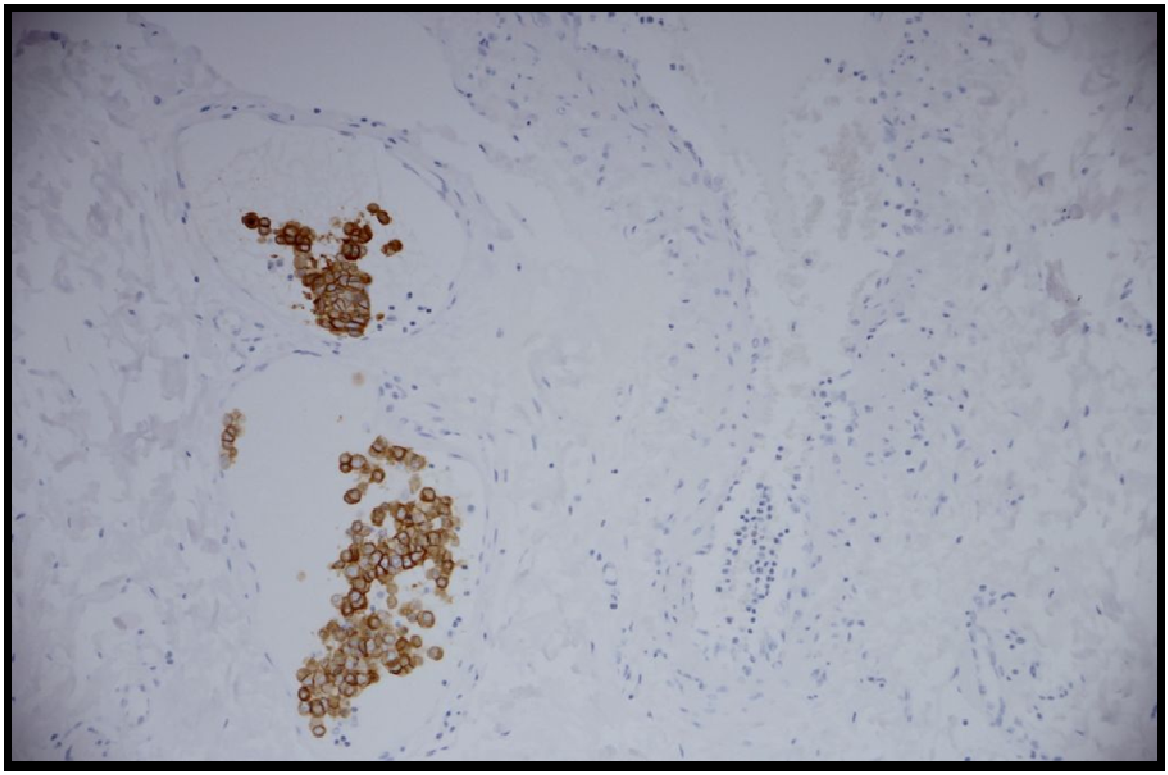
Ukupno 38 (19 %) od 200 parova cilindara metastatskog tkiva nije uspoređeno zbog toga što rezultati u najmanje jedanom tkivnom cilindru nisu uspješno analizirani (tehnički problemi ili otpali cilindri). Od 162 uspoređena para (81%), oba cilindra nisu pokazala amplifikacije u 131 slučaju (80.1 %). U 31 (19.9 %) paru cilindara su oba cilindra pokazala amplifikaciju bilo niskog bilo visokog stupnja u području cijele površine cilindra. Nije bilo razlike u statusu genske amplifikacije u cilindrima metastatskog tumora.

5.2.6 Usporedba rezultata FISH-a na tkivnim cilindrima primarnog tumora i cilindrima metastatskog tkiva iz limfnih čvorova

Usporedba rezultata FISH-a na tkivnim cilindrima primarnog tumora i metastatskog tumorskog tkiva je prikazana u Tablici 11. U analizu su uključeni svi cilindri primarnog tumora i svi cilindri metastatskog tumorskog tkiva iz limfnog čvora u kojima je FISH uspješno analiziran. Od ukupno 423 cilidra iz metastatskog tkiva i 505 evaluiranih cilindara iz primarnog tumora, je usporedba bila moguća za 302 cilindra (iz analize su isključeni svi pN0 slučajevi,a dio slučajeva se nije mogao usporediti zbog tehničkih

problema bilo u skupini jednih bilo u skupini drugih cilindara, a koji su se očitovali kao neadekvatna kvaliteta reakcije s preslabim signalima ili njihovom odsutnošću, jakom autofluorescencijom tkiva ili otpalim cilindrima). Ukupno suglasnih je bilo 99,4% cilindara, od toga 79,5% s negativnim rezultatom odnosno bez amplifikacije, 19,9% s prisutnom amplifikacijom (niskog ili visokog stupnja). Razlika je pronađena u 0,6% cilindara, od toga se u dva cilindra našla »pozitivna konverzija« (negativni primarni tumor dok je u metastazi pronađena amplifikacija), u oba cilindra se radilo o amplifikaciji niskog stupnja. »Negativne konverzije« (amplificiran tumor s neamplificiranim metastazama) nije bilo, dok je u dva cilindra bila prisutna promjena statusa amplifikacije (iz AVS u primarnom tumoru u ANS u metastazama).

Usporedba statusa amplifikacije u metastazama u tri slučaja kod kojih je postojala razlika u rezultatima na dva cilindra primarnog tumora (prisutna u jednom i odsutna u drugom cilindru) i čija je revizija na cijelim rezovima pokazala da se radi s tumorima u kojima je 10-20% tumora HER2 3+, je pokazala da se u sva tri slučaja radi o metastazama s prisutnom amplifikacijom. U slučaju u kojemu su bili prisutni HER2 3+/amplificirani tumorski trombi u limfnim žilama (Slika 17), u metastatskom tkivu nije bilo amplifikacije.



Slika 17. HER2 3+ tumorski trombi u limfnim žilama; primarni tumor je u istom parafinskom bloku bio HER2 negativan.

Tablica 11. Podudarnost između rezultata HER2 FISH-a na tkivnim cilindrima primarnog tumora i metastatskog tkiva

	FISH metastaze		
FISH primarni tumor	Neg n, %	Poz n, %	ukupno
Neg n, %	240 (79,5)	2 (0,6)	242
Poz n, %	0 (0)	60 (19.9)	60
Ukupno	240	62	302

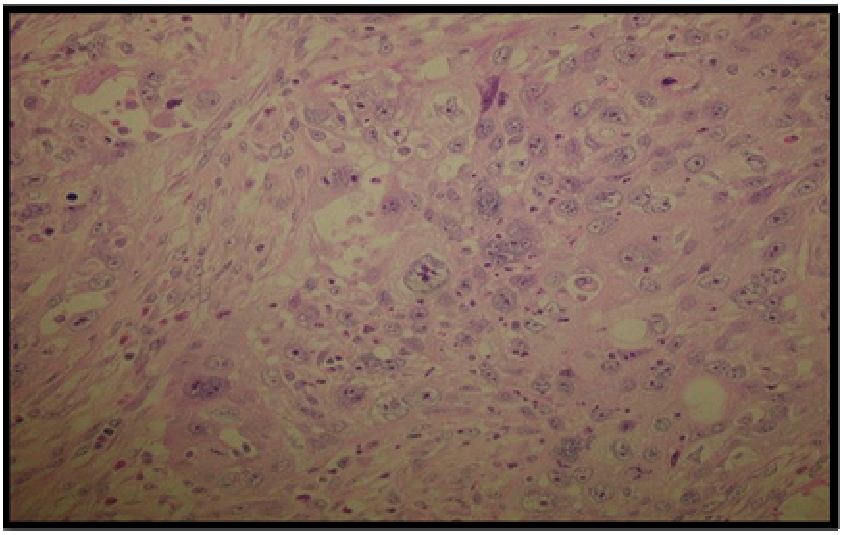
5.2.7 Usporedba statusa amplifikacije u cilindrima metastatskog tumora s primarnim tumorom kod kojih je FISH bio napravljen na standardnim rezovima

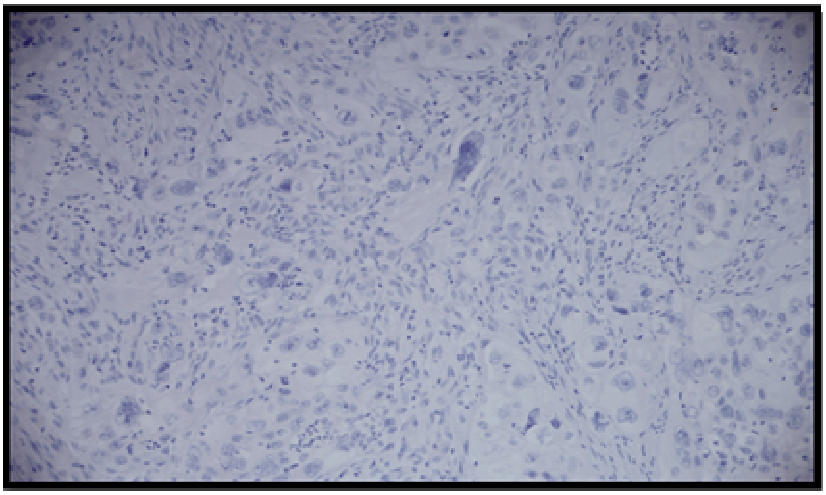
Usporedba je pokazala da niti u jednom od tih slučajeva nije došlo do »pozitivne konverzije«. U svim onim tumorima u kojima je žarište amplifikacije bilo malo i prema gruboj procjeni nije predstavljalo više od 1-2% cijele površine tumora, u metastazama u limfnim čvorovima nije utvrđena amplifikacija.

5.2.8 Usporedba HER2 amplifikacije s klinično-patološkim čimbenicima i ukupnim preživljenjem

Usporedba kliničko-patoloških karakteristika u odnosu na HER2 amplifikaciju i razlike u odnosu na amplifikaciju niskog ili visokog stupnja su prikazane u Tablicama 12 i 13. HER2 amplifikacija je bila značajno povezana s histološkim tipom tumora (po Lauren-u i po WHO klasifikaciji) i sa stupnjem diferencijacije. Što se tiče stupnja amplifikacije, našli smo značajne razlike u odnosu na histološki tip tumora po WHO klasifikaciji i u odnosu na stupanj diferencijacije tumora (amplifikacija niskog stupnja je bila češće prisutna u slabije diferenciranim tumorima (Slika 18) i tumorima difuznog tipa, dok su bolje diferencirani karcinomi intestinalnog tipa češće imali amplifikaciju visokog stupnja (Slika 19)). Ukupno preživljenje (Slika 20) je bilo kraće za slučajeve s

prisutnom amplifikacijom (13.1 mjeseci vs. 37.1 mjeseci;CI od 8.6–26.4 i od 33.4–48.6) i ta razlika je bila statistički značajna (p=0.005). Usporedba slučajeva kod kojih je bila prisutna amplifikacija niskog stupnja, odnosno amplifikacija visokog stupnja (Slika 21) je isto tako pokazala razliku u ukupnom preživljenju (ANS:AVS=10.6:14.8; CI od 8.57–6.00 i NA-33.4), ali ta razlika nije bila statistički značajna.





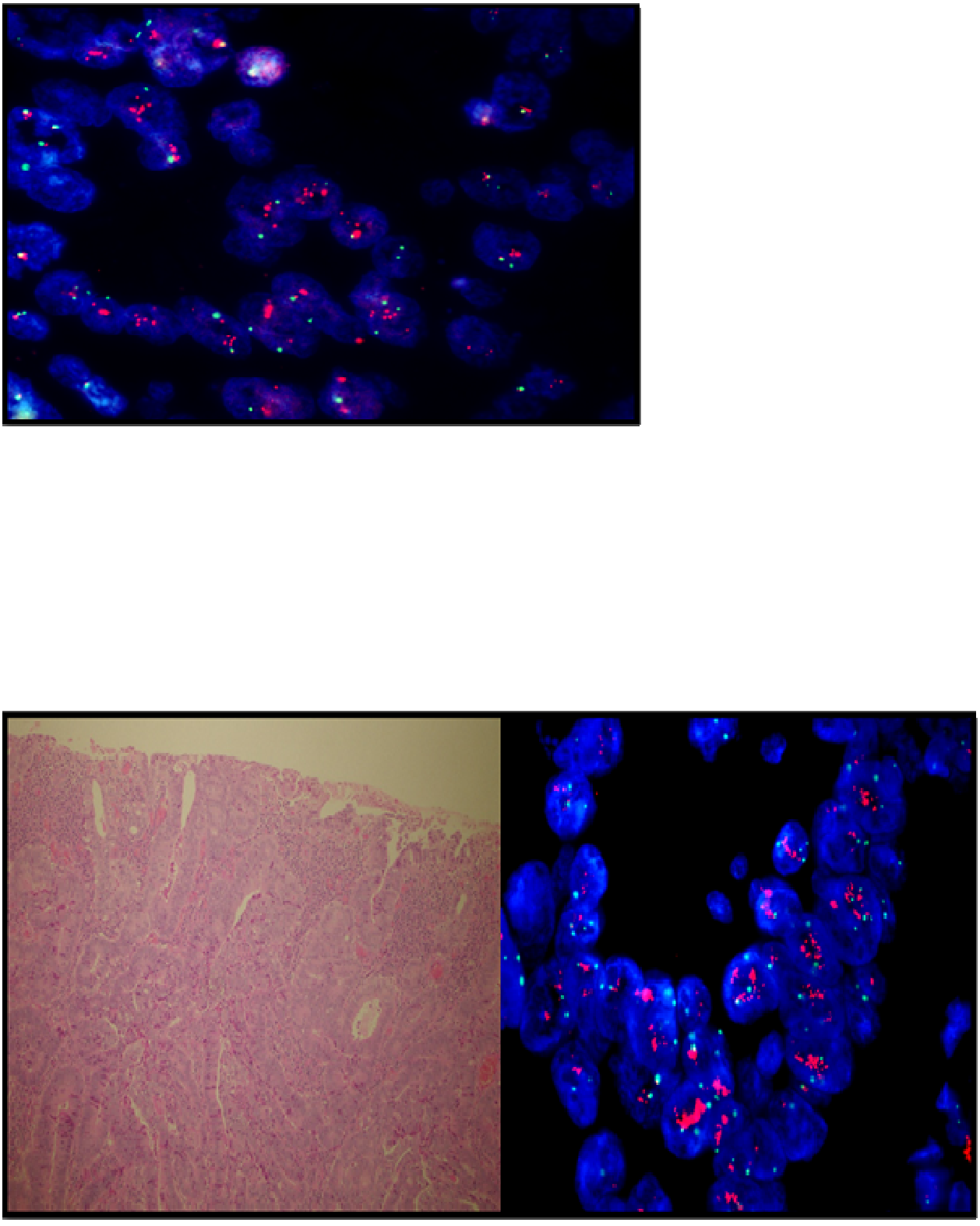
Slika 18: anaplastični karcinom želuca

A: H&E, 20x

B: IHK HER2 0, 20x

C: HER2 FISH,

ANS



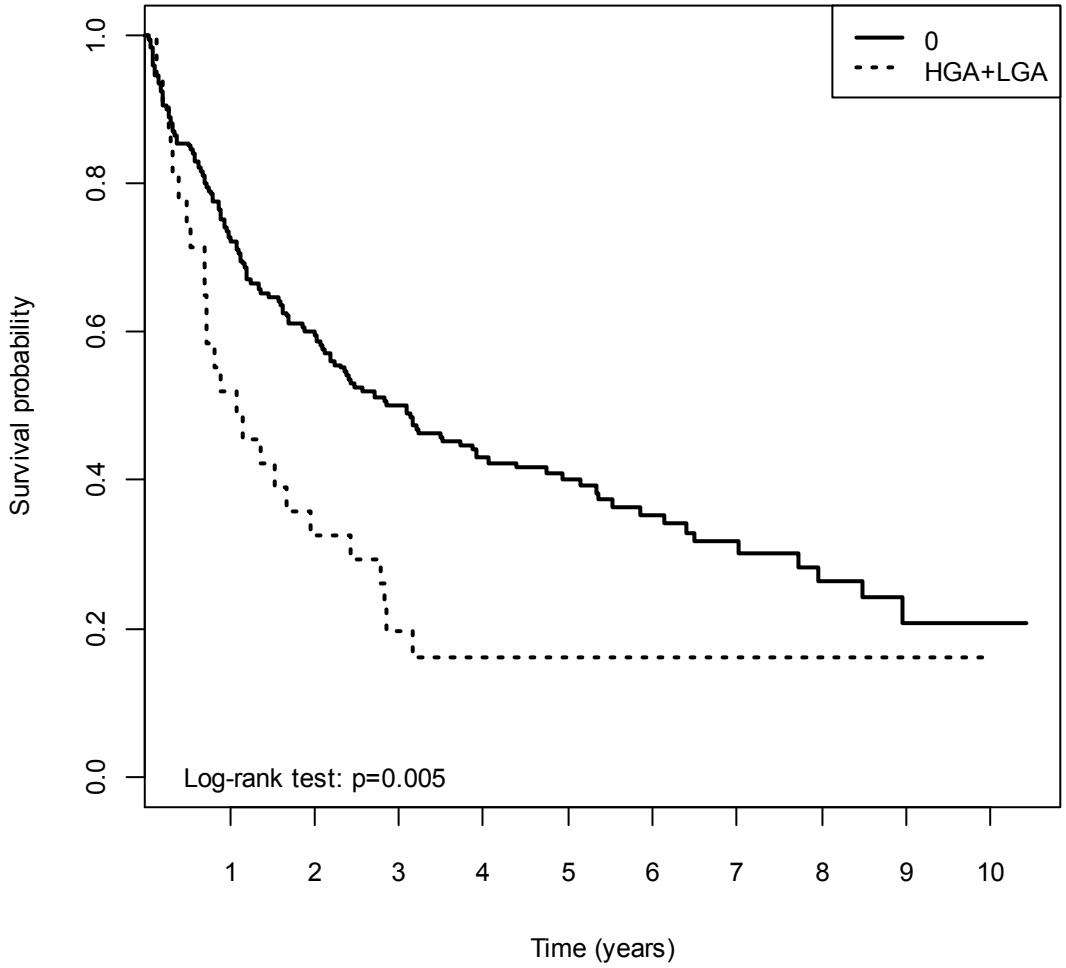
Slika 19. Primjer srednje dobro diferenciranog adenokarcinoma želuca s amplifikacijom visokog stupnja

Tablica 12.Usporedba kliničko-patoloških čimbenika u odnosu na HER2 amplifikaciju.

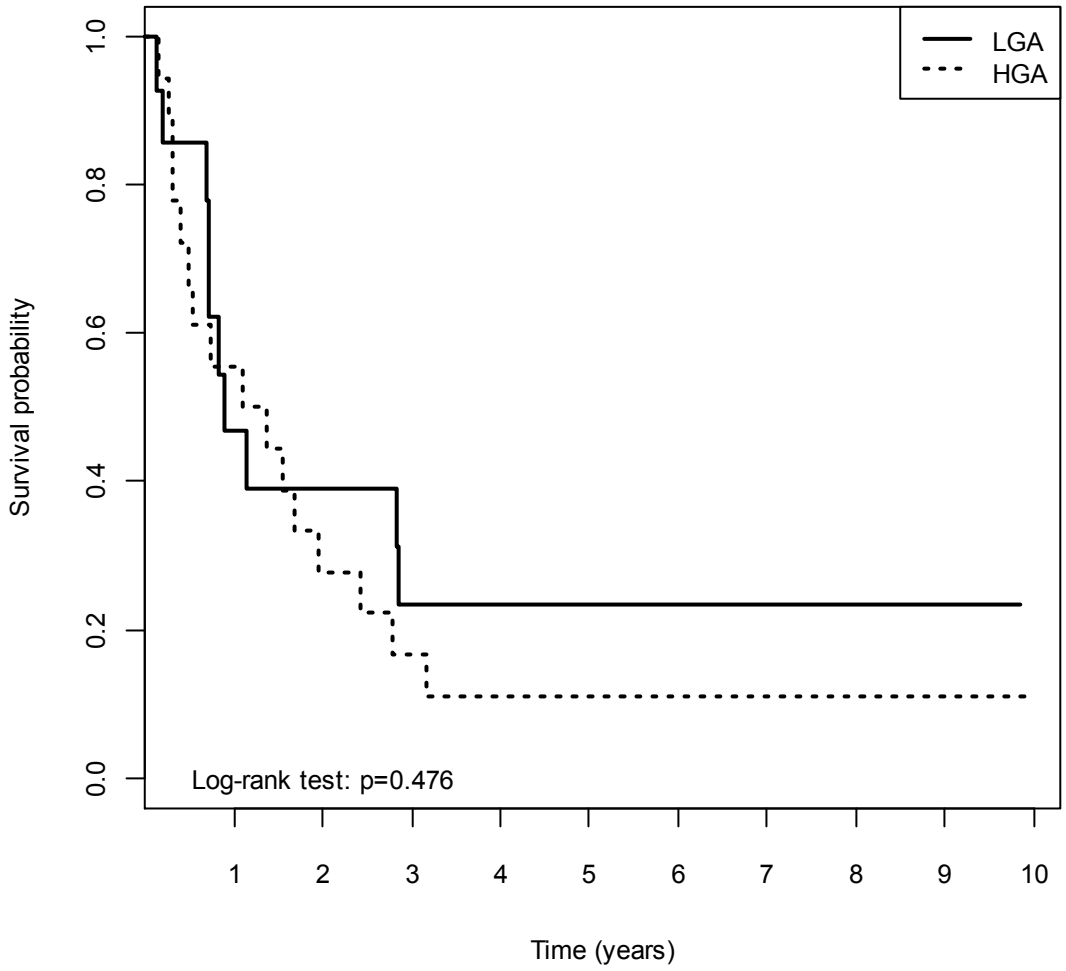
	HER2 amplifikacija		
	Negativna	Pozitivna	P vrijednost
N = 237	201 (85)	36 (15)	
Smještaj			
distalni želudac	163 (85)	28 (15)	
GES	38 (83)	8 (17)	0.643
Spol			
Muški	133 (86)	21 (14)	
Ženska	68 (82)	15 (18)	0.364
Lauren klasifikacija			
Intestinalni	114 (79)	31 (21)	
Difuzni	37 (97)	1 (3)	
miješani i ostali	50 (93)	4 (7)	**0.003**
WHO klasifikacija			
Tubularni	103 (88)	14 (12)	
papilarni, tubulopapilarni	8 (32)	17 (68)	
Mucinozni	13 (100)	0 (0)	
stanica prstena pečatnjaka	74 (95)	4 (5)	
Drugi	3 (75)	1 (25)	**<0.0001**
Stupanj diferencijacije			
G1/G2	52 (68)	25 (32)	
G3	65 (92)	6 (8)	
G4	84 (94)	5 (6)	**<0.0001**
Veličina tumora			
<5 cm	83 (87)	12 (13)	
>5 cm	118 (83)	24 (17)	0.369
Dubina infiltracije			
pT1	18 (82)	4 (18)	
pT2	89 (84)	17 (16)	
pT3	50 (85)	15 (15)	
pT4	6 (100)	0 (0)	0.755
Status limfnih čvorova			
pN0	59 (92)	5 (8)	
pN1	64 (84)	12 (16)	
pN2	88 (85)	9 (15)	
pN3	28 (74)	10 (26)	0.095
Vaskularna invazija			
Pozitivna	41 (87)	6 (13)	
Negativna	117 (83)	24 (17)	
Nepoznato	43 (88)	6 (12)	0.634
Karcinomska limfangioza			
Pozitivna	89 (86)	14 (14)	
Negativna	3 (100)	0 (0)	
Nepoznato	109 (83)	22 (17)	0.653
Perineuralna invazija			
Pozitivna	116 (84)	23 (16)	
Negativna	74 (87)	11 (13)	
Nepoznato	11 (85)	2 (15)	0.766
Metastatska bolest			
Pozitivna	50 (82)	11 (18)	
Negativna	62 (91)	6 (9)	
Nepoznato	89 (82)	19 (18)	0.230

Tablica 13. Usporedba kliničko-patoloških čimbenika između karcinoma želuca s HER2 amplifikacijom niskog stupnja (ANS) i amplifikacijom visokog stupnja (AVS)

	HER2 amplifikacija		
	AVS (omjer>3)	ANS (omjer 2-3)	P vrijednost
N = 36	20 (56)	16 (44)	
Smještaj			
distalni želudac	15 (54)	13 (46)	
GES	5 (63)	3 (37)	0.709
Spol			
Muški	13 (62)	8 (38)	
Ženska	7 (47)	8 (53)	0.500
Lauren klasifikacija			
Intestinalni	19 (61)	12 (39)	
Difuzni	0 (0)	1 (100)	
miješani i drugi	1 (25)	3 (75)	0.190
WHO klasifikacija			
Tubularni	5 (36)	9 (64)	
papilarni, tubulopapilarni	14 (82)	3 (18)	
Mucinozni	0 (0)	0 (0)	
stanice prstena pečatnjaka	1 (25)	3 (75)	
Drugi	0 (0)	1 (100)	**0.008**
Stupanj diferencijacije			
G1/G2	18 (72)	7 (28)	
G3	1 (17)	5 (83)	
G4	1 (20)	4 (80)	**0.011**
Dubina invazije			
pT1	2 (50)	2 (50)	
pT2	9 (53)	8 (47)	
pT3	9 (60)	6 (40)	
pT4	0 (0)	0 (0)	0.897
Status limfnih čvorova			
pN0	4 (80)	1 (20)	
pN1	6 (50)	6 (50)	
pN2	4 (44)	5 (56)	
pN3	6 (60)	4 (40)	0.577
Vaskularna invazija			
Pozitivna	4 (67)	2 (33)	
Negativna	12 (50)	12 (50)	
Nepoznato	4 (67)	2 (33)	0.688
Karcinomska limfangioza			
Pozitivna	8 (57)	6 (43)	
Negativna	0 (0)	0 (0)	
Nepoznato	12 (55)	10 (45)	0.577
Perineuralna invazija			
Pozitivna	7 (64)	4 (36)	
Negativa	12 (52)	11 (48)	
Nepoznato	1 (50)	1 (50)	0.855
Metastatska bolest			
Pozitivna	6 (55)	5 (45)	
Negativna	3 (50)	3 (50)	
Nepoznato	11 (58)	8 (42)	0.941



Slika 20. Kaplan-Meierova krivulja preživljenja karcinoma želuca u odnosu na HER2 amplifikaciju.



Slika 21. Kaplan-Meierova krivulja preživljenja karcinoma želuca u odnosu na stupnju HER2 amplifikacije (amplifikacija niskog stupnja engl. Low grade amplification, LGA; amplifikacija visokog stupnja engl. High grade amplification, HGA).

5.3 REZULTATI USPOREDBE IMUNOHISTOKEMIJSKOG ODREĐIVANJA HER2 NA PRIMARNIM TUMORIMA U DVA LABORATORIJA

5.3.1 Podudarnost imunohistokemijskih rezultata na standardnim rezovima

U referentnom i našem laboratoriju je evaluirano ukupno 206 standardnih rezova (po 103 u svakom od laboratorija) te su rezultati imunohistokemijskog HER2 bojenja uspoređeni. Podudarnost rezultata je pronađena u 93 (90.3%) standardna reza, dok je razlika nađena u 10 (9.7%) slučajeva. Ponovna analiza tih slučajeva je pokazala da nije bilo razlika u interpretaciji slučajeva koji su bili ocijenjeni s HER2 0/1+ ili HER2 3+. U svih 10 slučajeva s različitim rezultatima, su u jednom laboratoriju rezultati bili ocijenjeni kao HER2 2+, u drugom HER2 0/1+ (po 5 takvih slučajeva u oba laboratorija). Koeficijent κ je iznosio 0.7 što znači prilično dobru suglasnost (*engl*. »substantial agreement«). Rezultati su prikazani u Tablici 14.

Tablica14. Podudarnost rezultata HER2 IHK na cijelim rezovima

Targos , Kassel	Onkološki institut Ljubljana		
	IHK HER2 negativni (0,1) n, (%)	IHK HER2 pozitivni (2,3) n, (%)	Ukupno *n*, (%)
IHK HER2 negativni (0,1) n, (%)	76 (74)	5 (5)	81 (79)
IHK HER2 pozitivni (2,3) n, (%)	5 (5)	17 (16)	22 (21)
Ukupno	81 (79)	22 (21)	103 (100)

5.3.2 Podudarnost imunohistokemijskih rezultata na cilindima tkiva u tkivnim mikropostrojbama

Ukupno 1336 tkivnih cilindara iz primarnih tumora (raspoređenih u 18 tkivnih mikropostrojbi) je bilo uključeno u HER2 IHK analizu u oba laboratorija i potom uspoređeno. Kod onih slučajeva koji su u tkivnim mikropostrojbama bili zastupljeni s više od jednim tkivnim cilindrom, se je kao konačan rezultat uzeo cilindar s najvećim HER2 rezultatom. Od 305 konačnih rezultata 12 (3.9%) nije bilo moguće usporediti zbog toga što tumorskog tkiva nije bilo u cilindru ili zbog toga što je cilindar otpao sa stakalca. Kao što je prikazano u Tablici 15, podudarnost je bila prisutna u 248 od 293 analiziranih tkivnih cilindara (84.6 %). Razlika je bila prisutna u 45 (15.4%) tkivnih cilindara. Kao i u primjeru standardnih rezova, nije bilo razlika u rezultatima u skupinama HER2 3+. Svi različiti slučajevi su uključivali HER2 2+ rezultat u jednom od laboratorija. Od 45 cilindara s različitim IHK rezultatima 12 je ocijenjeno kao 2+ u laboratoriju Ljubljani i kao negativni (0/1+) u laboratoriju u Kasslu. Većina tih cilindara ocijenjenih s 2+ je bila opisno ocijenjena kao slabo pozitivni (8/12; 67%). Od 33 cilindra koji su bili ocijenjeni kao HER2 2+ u laboratoriju u Kasslu i negativni (0/1+) u laboratoriju u Ljubljani, 24 od njih (24/33; 73%) je opisno ocijenjeno kao heterogeno 2+. Koeficijent κ je iznosio 0.7 što znači prilično dobru suglasnost (*engl*. substantial agreement).

Tablica 15. Podudarnost rezultata HER2 IHK na tkivnim cilindrima*

Targos, Kassel	Onkološki inštitut, Ljubljana		
	IHK HER2 negativni (0,1)	IHK HER2 pozitivni (2,3)	Ukupno *n*, (%)
IHK HER2 negativni (0, 1)	145 (50)	12 (4)	157 (54)
IHK HER2 pozitivni (2, 3)	33 (11)	103 (35)	136 (46)
Ukupno	178 (61)	115 (39)	293 (100)

*12 cilindara neinformativno

6. RASPRAVA

Karcinom želuca je po učestalosti četvrti karcinom u ljudskoj populaciji i u svijetu i predstavlja drugi najčešći uzrok smrtnosti u skupini malignih bolesti (1, 2). U većini pacijenata se bolest manifestira u uznapredovalom, neoperabilnom ili metastatskom stadiju kada je moguća samo palijativna terapija. Rana detekcija karcinoma želuca je do sada postala učestalija samo u nekim dijeovima Azije u kojima je njegova incidencija izrazito visoka (4). U UK MAGIC studiji (5) je s upotrebom perioperativne kemoterapije postignuto 5-godišnje preživljenje od 36% iako je u pravilu kod lokalno uznapredovale ili metastaske bolesti preživljenje svega 5 do najviše 20% s ukupnim preživljenjem od svega godinu dana (1, 5). Meta-analize faze 2 i 3 randomiziranih studija na pacijentima s karcinomom želuca su pokazale da su kombinacije kemoterapeutika učinkovitije od monokemoterapije. Obično se u protokolima za liječenje uznapredovalog karcinoma želuca upotrebljavaju fluoropirimidini ili kemoterapeutici na osnovi platine koji se kombiniraju s drugim kemoterapeuticima (73), ali standardizirani protokoli ne postoje. Zbog toga je potrebno pronaći i uvesti nove terapijske mogućnosti koje bi dovele do produženja preživljenja pacijenata s lokalno uznapredovalim ili metastatskim karcinomom želuca. Kao jedan od mogućih terapijskih ciljeva se pokazao HER2 receptor, član familije receptora vezanih za proces stanične proliferacije, apoptoze, adhezije, migracije i diferencijacije (55, 74). Formacija heterodimera i njihova aktivacija na površini stanice su, u normalnim okolnostima, limitiran i kontroliran proces. Disregulacija toga procesa dovodi do aktivacije i prekomjerne ekspresije HER2 i time omogućuje odnosno potiče staničnu proliferaciju, a isto tako ima i poticajnu ulogu pri metastaziranju. Njegova uloga u karcinogenezi ljudskih karcinoma i kliničko značenje je do danas najbolje istraženo u karcinomu dojke (75).

Prekomjerna ekspresija HER2 u karcinomu želuca je prvi puta opisana 1986. godine (46). Od tada do prije 4-5 godina su objavljene mnoge studije u kojima je nađena prekomjerna ekspresija HER2 u karcinomu želuca od 8% do 91% (55-61). Razlozi tako velike razlike u ekspresiji su kompleksne, a velikim dijelom se mogu pripisati činjenici da proces imunohistokemijskog bojanja HER2, upotreba i vrsta protutijela i način očitavanja rezultata nisu bili standardizirani. Osim toga su u interpretaciji rezultata bili primjenjivani kriteriji koje koristimo pri imunohistokemijskom testiranju

HER2 na karcinomu dojke. Kao važan faktor koji može doprinjeti tako velikoj razlici treba uzeti u obzir i subjektivnost patologa u interpretaciji rezultata. Najveći napredak u procesu standardizacije dokazivanja HER2 pozitiviteta je napravljen u području testiranja HER2 u karcinomu dojke. Već 2007. godine publicirane su prve smjernice (69) u kojima su detaljno opisani svi stupnjevi laboratorijske obrade tkiva, kao i standardizacija procedure te način prikazivanja rezultata bojenja, dakle koraci u postupku određivanja HER2 statusa na koje se može utjecati, a koji su važni za dobivanje točnog rezultata statusa HER2 u karcinomu dojke. Najnovije prihvaćene smjernice su objavljene u listopadu 2013. godine (76). Kod testiranja karcinoma želuca sistematizacija prikazivanja rezultata bojenja započela tek 2008. godine. Objavljen je prilagođeni sistem očitavanja ekspresije HER2 u karcinomu želuca koji se dijelom temelji na onome što se koristi kod karcinoma dojke, ali se od njega ponešto i razlikuje (57). Osnovna razlika je u kvantiteti membranske reakcije koja je potrebna za interpretaciju rezultata. Dok se u karcinomu dojke za reakciju 2+ ili 3+ zahtijeva membranski pozitivitet čitave cirkumferencije stanične membrane, u karcinomu želuca, zbog fiziologije stanica želučanog epitela, je obojanost cijele cirkumferencije rijetka, najčešće nalazimo takozvani »U« uzorak pozitiviteta (bazolateralne membrane) ili »I I« uzorak pozitiviteta (lateralne membrane). Kao druga važna razlika je očitavanje pozitiviteta na endoskopskim biopsijama, na kojima su autori predlagali da se 10% razdiobna vrijednost (*engl*. cut off point) koja se upotrebljava na standardnim rezovima tumorskog tkiva, zanemari i da se kao pozitivan rezultat interpretira postojanje pozitivne reakcije na kohezivnoj grupi stanica bez obzira na njenu veličinu. Razlog za takvu odluku je mala količina tkiva dobivena endoskopskom biopsijom. Posve isti su ostali zahtjevi u smislu faktora koji odlučuju o tretmanu s monoklonskim protutijelima, a to je da se pozitivnim karcinomima smatraju oni koji imaju imunohistokemijsku reakciju 3+ ili oni s imunohistokemijskom reakcijom 2+ i amplifikacijom dokazanom nekom od hibridizacijskih metoda. Heterogenim su bili definirani oni karcinomi kod kojih je IHK 3+ reakcija bila prisutna u <10% tumora; takvih je u istoj seriji bilo 4,8%. Već 2010. godine su objavljeni rezultati prve velike, internacionalne randomizirane studije (faza 3), u kojoj autori pokazuju rezultate tumorske regresije, produljenje preživljenja i produljenje vremena do relapsa u skupini pacijenata s HER2 pozitivnim karcinomom želuca koji su bili tretirani kombinacijom kemoterapeutika i monoklonskog protutijela za HER2, u odnosu na one koji su dobivali samo kemoterapiju (67). U istoj studiji autori su utvrdili

bolji uspjeh liječenja u onih pacijenata u kojih je imunohistokemijski pozitivitet izrazit (IHK 3+/ 2+) uz postojanje ISH pozitiviteta, dok su rezultati u odgovoru na terapiju bili lošiji u pacijenata s FISH pozitivnim, ali imunohistokemijski negativnim tumorima (IHK 0/1+).

Standardizacija i sistematizacija u području određivanja HER2 statusa karcinoma želuca nastavljena je uvođenjem pomoćnih smjernica za očitavanje rezultata koje su objavljene 2010. godine (62). U smjernicama je preporučeno da se, u cilju smanjenja subjektivnosti u interpretaciji rezultata, u obzir uzme veličina objektiva koja se upotrebljava pri interpretaciji rezultata i da se na endoskopskom materijalu kao minimum potreban za interpretaciju rezultata uzme kohezivna nakupina od barem 5 pozitivnih tumorskih stanica. Preporučena je upotreba protutijela odobrenih od strane FDA (Herceptest i 4B5) te sudjelovanje u programima vanjske kontrole kvalitete (engl. external quality assurance) u sudjelovanju s referentnim laboratorijima. Ista skupina autora (77) je 2012. godine objavila publikaciju u kojoj obrađuje važne korake u procesu određivanja HER2 statusa u karcinomu želuca, rezimira smjernice za očitavanje imunohistokemijskih rezultata i rezultata dobivenih hibridizacijskim metodama i istovremeno obrađuje probleme rukovanja s materijalom, pravovremene fiksacije, obrade tkiva, laboratorijskih i analitičkih parametara koji mogu utjecati na rezultat bojanja, odnosno interpretaciju rezultata. U publikaciji se dotiču problema heterogenosti HER2 reakcije odnosno pozitiviteta u karcinomu želuca, definirajući je kao postojanje <30% tumorskih stanica koje su IHK HER2 pozitivne (3+) ili samo fokalno postojanje istih. Takva heterogenost je navodno prisutna u čak 30% karcinoma želuca (77). Kao inicijalna metoda testiranja se preporučuje imunohistokemija, za 2+ slučajeve revalidacija s nekom od in situ hibridizacijskih metoda, po mogućnosti srebrnom in situ hibridizacijom (SISH) ili kromogenom in situ hibridizacijom (CISH). Ipak, neki problemi ostaju otvoreni. Unatoč poznatoj i čestoj HER2 heterogenosti u karcinomu želuca, je preporučeno testiranje na samo jednom tumorskom bloku, a ako se radi o bioptičnom materijalu, na najmanje 6-8 fragmenata tumorskog tkiva, dok istovremeno ne preporučuju upotrebu tkivnih mikropostrojbi za potrebe kliničkog odlučivanja o terapiji zbog heterogene prirode HER2 ekspresije i amplifikacije u karcinomu želuca. U smjernicama je ponuđen vrlo veliki raspon definicije HER2 heterogene bolesti (fokalno pa sve do 30%) pri čemu istovremeno još uvijek ne raspolažemo s pouzdanim informacijama o tome kakve rezultate ima

terapija s monoklonskim protutijelima u karcinomu želuca s homogenom prekomjernom ekspresijom HER2, a kakve u onih s heterogenom prekomjernom ekspresijom HER2 (78). Dakle, budući da je karcinom želuca morfološko heterogena bolest, da je heterogenost HER2 pozitiviteta utvrđena u mnogim radovima, a da je, unatoč tome, za određivanje HER2 pozitiviteta u karcinomu želuca predviđeno testiranje na samo jednom tumorskom bloku odnosno na endoskopskom materijalu, provedena je studija kojoj je osnovna zadaća bila usporedba prekomjerne ekspresije HER2 na tumorskim cilindrima i odgovarajućim standardnim rezovima uz dodatnu FISH studiju na tkivnim mikropostrojbama sastavljenim iz serije karcinoma želuca i njihovih metastaza u regionalnim limfnim čvorovima. Cilj je ponuditi upotrebu tumorskih mikropostrojbi kao adekvatniji način određivanja HER2 statusa u reseciranim karcinomima želuca upravo zbog morfološke heterogenosti i heterogenosti za HER2 pozitivitet. Tumorske mikropostrojbe bi omogućile pregled većega broja različitih areala karcinoma želuca koji su najčešće uznapredovali i veliki tumori i postavlja se pitanje da li je analiza statusa HER2 na jednom tkivnom bloku tumorskog tkiva odnosno endoskopskom materijalu, kao što je preporučeno u smjernicama, dovoljno.

U našoj je studiji prekomjerna ekpresija HER2 proteina (definirana kao zbroj slučajeva s IHK HER2 3+ i IHK HER2+ reakcijom) dokazana na ukupno 25,3% (77/305) svih cijelih rezova uključenih u studiju. Ukupno je 20 cijelih rezova bilo ocijenjeno s 3+ (6.6 %), 57 kao 2+ (18.7 %), 38 kao 1+ (12.5 %), i 190 kao 0 (62.2 %). Imunohistokemijski pozitivitet intenziteta 3+ je najčešće prisutan u dobro do srednje diferenciranom tubulopapilarnom karcinomu (14; 70.0 %), 3 (15 %) su bila dobro do srednje diferencirana tubularna karcinoma, 2 (10 %) su odgovarala slabo diferenciranom tubularnom karcinomu, a u jednom slučaju (5 %) se radilo o intestinalnoj komponenti miješanog karcinoma kod kojega su intestinalna i difuzna komponenta bile odvojene. U svim navedenim slučajevima je imunohistokemijski pozitivitet za HER2 bio relativno izrazit i više-manje jednakomjeran odnosno prisutan praktično na cijeloj površini testiranog tumora (za objašnjenje gledaj nastavak diskusije!). U sedam slučajeva (2.98 %) je tumor ocijenjen kao negativan, ali su se u njemu nalazili fokusi HER2 3+ intenziteta u manje od 10% tumorskih stanica. Nismo našli korelacije između prekomjerne ekspresije HER2 i starosti pacijenta, spola, veličine tumora, dubine infiltracije odnosno stadija (pT status), postojanja metastaza

u limfnim čvorovima (pN status) te prisutnosti limfovaskularne odnosno perineuralne invazije. Prisutna je statistički značajna korelacija između HER2 ekspresije i lokacije tumora (79) te intestinalnog tipa tumora (61, 63, 67, 79). Isto tako, statistički značajnom se pokazala prekomjerna ekspresija HER2 proteina kod tumora s tubularnom odnosno tubulopapilarnom morfologijom (61, 63, 67, 79) i u dobro do srednje diferenciranih tumora (80, 81). Distribucija prekomjerne ekspresije HER2 s obzirom na tipove tumora po Laurenu je bila slična onoj objavljenoj u studiji ToGA (intestinalni:difuzni:miješani = 34% : 4%: 20%) (61, 67, 79). Isto je tako stupanj heterogenosti definiran kao fokalni IHK pozitivitet prisutan u <10% tumora (preuzeto iz publikacije Hofmann i sur. iz 2008. koji su pripremali smjernice za očitavanje reakcije u želucu) u granicama već opisanih (57). U IHK negativnim tumorima je preživljenje bilo nešto duže (31 vs 25 mjeseci) iako ta razlika nije statistički značajna.

Potrebno je ponovno se osvrnuti na pojam odnosno definiciju heterogenosti imunohistokemijske reakcije za HER2. Naime, u području imunohistokemijskog dokazivanja prekomjerne ekspresije HER2 u karcinomu dojke se kao razdiobna vrijednost (*engl*. cutt-off point) za pozitivitet uzima vrijednost 10% (jedno vrijeme je bila pomaknuta na 30%, a najnovije smjernice je vraćaju u područje 10%). Heterogenost je u karcinomu dojke relativno rijedak fenomen i kreće se u okvirima od 1-1.5% (64-66). U karcinomu želuca je, prema prvim smjernicama objavljenima od strane Hoffmanna i njegove grupe (57), heterogenost definirana na isti način kao u karcinomu dojke dakle u 10% okviru, nekoliko godina nakon toga u publikaciji Ruschov i sur. (77) pod pojmom heterogenosti se podrazumijevaju tumori u kojima je imunohistokemijska reakcija intenziteta 3+ prisutna u do 30% tumorskih stanica odnosno fokalno pozitivna u inače negativnom tumoru. Tom definicijom raspon heterogenosti postaje širok i postavlja se pitanje smisla upotrebe 10% razdiobne vrijednosti u očitavanju pozitiviteta IHK reakcije. Istovremeno se tumor može smatrati pozitivnim ako se u njemu nađe bilo kakav fokus amplifikacije koji mjeri najmanje 20 amplificiranih stanica. U takvim situacijama se postavlja i pitanje usporedbe HER2 pozitiviteta odnosno heterogenosti u različitim studijama. Dok se u nekim studijama kao npr. Hoffmannovoj i Kunz-inoj (57, 82) pojam heterogenosti odnosi na posebne IHK 2+/3+ pozitivne klonove koji predstavljaju <10% areala tumora i njena učestalost se kreće u okvirima od oko 5%, u nekim drugim studijama kao što je npr. studija Lee-ja i suradnika (83) u kojima je kvantificiran omjer IHK in ISH pozitivnih žlijezda je

ocijenjena heterogenost iznosila čak 50%. U našoj smo seriji u mnogim slučajevima opazili nejednakomjerno pozitivnu imunohistokemijsku reakciju s prisutnim područjima 1+ i 2+ reakcije, katkada i manjih 3+ fokusa koji nisu bili prisutni samo u područjima sa sličnom odnosno različitom tumorskom morfologijom, nego i unutar same tumorske žlijezde. Područja nejednakomjerno prisutnog pozitiviteta su bila prisutna u svim dijelovima tumora. Prilikom analize standardnih rezova su, osim toga, u dosta slučajeva bili prisutni mali fokusi 2+/3+ pozitivnih klonova stanica in situ karcinoma/visokodisplastičnog epitela koji su se nalazili na samoj površini sluznice želuca.

Različitih autori (78, 80, 82-84) su već opisali svoja slična opažanja. Nedavno je publicirano nekoliko članaka u kojima su autori sami postavljali kriterije za definiciju heterogenosti i povukli paralele s kliničkopatološkim karakteristikama tumora (78, 85). Kao i u našoj seriji, homogena i jaka ekspresija HER2 proteina je nađena u manjem dijelu tumora s prisutnom prekomjernom ekspresijom (cca 20-25%) dok su u većini primjera 1+ i 2+ pozitiviteta opisivali takozvani pozitivitet u obliku leopardovih pjega (86, 87) bez obzira na lokaciju unutar samog tumorskog tkiva (površinski dijelovi tumora u odnosu na duboke dijelove tumora). Osim toga su Lee i sur. (83) po prvi puta upozorili na postojanje HER2 ekspresije/amplifikacije u displastičnom epitelu. Opisali su slučajeve u kojima su i displastični epitel i invazivni karcinom bili HER2 pozitivni, ali isto tako su upozorili na slučajeve HER2 pozitivnosti u displastičnom epitelu dok su područja prisutnog invazivnog karcinoma bila HER2 negativna te na teškoće u razlikovanju područja teške displazije od invazivnog karcinoma u endoskopskim biopsijama zbog male veličine uzorka i mehaničkih oštećenja tkiva koja su neizbježna pri endoskopskom uzimanju uzoraka. Time se, naravno, otvara pitanje adekvatnosti očitavanja HER2 pozitivnosti u endoskopskim biopsijama odnosno velike mogućnosti za postojanje lažno pozitivnih slučajeva (skoro 40% karcinoma je pokazivalo područja displazije visokog stupnja, 4% tih displazija su bile IHK/SISH HER2 pozitivne!). Zaključak svih navedenih studija je bio takav da je, u studijama s velikim brojem uzoraka na kojima bi se pokazala biološka važnost odnosno utjecaj heterogenosti na ponašanje i odgovor na terapiju s blokatorima HER2 receptora, potrebno reevaluirati definiciju HER2 pozitivnosti u karcinomu želuca te da, ako se radi o određivanje statusa HER2 na materijalu endoskopskih biopsija, je potrebno testirati čim veći broj uzoraka. Baš tako je, s

obzirom na prisutnost heterogene reakcije za HER2 u većini uzoraka karcinoma želuca, po mišljenju mnogih autora, potrebno reevaluirati smjernice u smislu broja tumorskih blokova koje je potrebno testirati jer se praktično svi slažu da testiranje statusa samo na jednom bloku dosta puta nije dovoljno. Najslikovitiji prikaz toga problema je publikacija Asioli i sur. u kojoj je utvrđeno da u seriji tumora prosječne veličine 5.5 cm testiranje na jednom tumorskom bloku otkrije 14% HER2+ karcinoma dok testiranje svakog slijedećeg bloka podigne taj postotak na 20%. Slični su rezultati objavljeni u publikaciji Wang i sur. (za dodatne komentare gledaj nastavak diskusije!) kao i Lee i sur. (78). U njihovoj studiji su pacijenti s homogenom amplifikacijom HER2 (bilo niskog, bilo visokog stupnja) u pravilu imali kraće vrijeme do relapsa bolesti od pacijenata s heterogenom amplifikacijom.

Drugi problem koji se pojavljuje u domeni rezultata HER2 bojanja i interpretaciji imunohistokemijske reakcije za HER2 je utjecaj preanalitičkih faktora na krajnji rezultat imunohistokemijske reakcije. Neki autori (78, 88-91) su upozorili na taj problem, iako se o njemu do sada nije podrobnije pisalo. Prema našim iskustvima je to problem kojem treba posvetiti posebnu pažnju. Naime, u najmanje 5 slučajeva je u našoj studiji bio prisutan fenomen izrazite 2+/3+ pozitivne reakcije koja je bila prisutna na luminalnoj i seroznoj strani tumora, a koja se je prema centralnim dijelovima tumora gubila, postajala sve slabija, da bi u centralnim dijelovima postala posve negativna. Najlogičnije objašnjenje tog fenomena je da se radi o artefaktima koji su posljedica neadekvatne fiksacije tkiva. Naime, fiksaciju kirurških resektata je vrlo teško standardizirati i uz činjenicu da formalin samo u prvom satu fiksacije u tkivo penetrira brzinom od tri mm/sat, a kasnije se ta brzina smanji na 1 odnosno 0,5 mm/h, čak i u uvjetima idealno brze postoperativne fiksacije ostaje upitna adekvatna fiksacija centralnih dijelova tumora, još pogotovo i zbog toga što najčešće ne znamo koliko je vremena trajala hladna ishemija prije nego je kirurški uzorak bio dostavljen na odjel za patologiju.

Usporedba prekomjerne ekspresije HER2 proteina na standardnim rezovima i tkivnim cilindrima uzetim iz primarnih tumora je pokazala sukladnost rezultata u 83,5%-86,3% slučajeva s κ vrijednostima koje su se kretale od 0,62 do 0,67 što znači prilično dobru podudarnost (engl. substantial agreement) (vrijednosti su bile očitavane posebno za dva cilindra i potom za cilindar s najvećom HER2 ocjenom). Razlike su uglavnom bile prisutne u onim tumorima koji su na standardnim rezovima

bili ocijenjeni kao negativni, a na tkivnim cilindrima većinom s 2+. Takvi rezultati su u skladu s postojanjem nejednakomjerne, heterogene HER2 reakcije u karcinomu želuca, a s druge strane su dijelom posljedica toga što je u bioptičkom materijalu (a cilindre smo očitavali po smjernicama za endoskopske biopsije) potrebna kohezivna nakupina od samo pet pozitivnih stanica da bi se uzorak očitao kao pozitivan. Ako se rezultati očitavanja na standardnim rezovima usporede s rezultatima dobivenim upotrebom tkivnih mikropostrojbi, onda se vidi da je nešto veći udio uzoraka s 2+ rezultatom u cilindrima u odnosu na standardne rezove (24,4% vs 18,7% na standardnim rezovima). Usporedba s podacima u literaturi je praktično nemoguća. Naime, do sada nisu objavljivane serije poput naše u kojima bi se uspoređivali rezultati iste kohorte pacijenata na standardnim rezovima i na tkivnim mikropostrojbama. U seriji Parka i sur. (92) su našli samo 2,7% odnosno 4,8% uzoraka koje su ocijenili s 2+ iako je potrebno naglasiti da su u njihovoj studiji za očitavanje rezultata upotrebljavali kriterije za očitavanje reakcije na resektatima (10% razdiobna vrijednost; engl. cut-off point), dok smo mi upotrebljavali smjernice za očitavanje na materijalu endoskopskih biopsija (zbog veličine materijala koja je se može usporediti s veličinom bioptičnog uzorka dobivenog endoskopskom procedurom). U seriji koju su objavili Kunz i sur. (82) je IHK HER2 2+ ocijenjenih samo 7% svih uzoraka. Ta razlika u rezultatima se može objasniti činjenicom da je promjer cilindra za konstrukciju tkivnih mikropostrojbi u našoj studiji bio 2 mm, a u njihovoj 1 mm. U studiji Kim KC i sur. (87) su baš kao i mi primijetili veći udio 1+ i 2+ pozitivnih cilindara u odnosu na standardne tkivne rezove iako njihova studija nije bila napravljena na istim tkivnim blokovima već na različitim kohortama pacijenata. Zanimljivi su bili rezultati te iste studije (87) u kojoj su uspoređivali kliničkopatološke karakteristike HER2 pozitivnih tumora na kohorti pacijenata kod kojih je bila napravljena tkivna mikropostrojba s promjerom 2mm i kohorti kod koje je HER2 određen na standardnom rezu. Ukupno je analizirano 1414 slučajeva i pokazalo se da u kohorti pacijenata testiranih s tkivnim mikropostrojbama nema statistički značajne razlike u odnosu na spol i status limfnih čvorova za razliku od kohorte sa standardnim rezovima. Jednaki su bili rezultati za starost pacijenta, stupanj diferenciacije, intestinalnu morfologiju i interval bez relapsa bolesti. Upravo tako nije bilo razlike u sveukupnom preživljenju dviju skupina. Zaključak te studije je da bi se eventualne razlike u rezultatima testiranja između tkivnih postrojbi i standardnih rezova mogle smanjiti oduzimanjem i testiranjem većeg broja tkivnih cilindara.

Što se tiče veličine materijala oduzete pri konstrukciji tkivnih mikropostrojbi, treba naglasiti da smo upravo iz razloga lakše usporedbe s tkivom endoskopskog bioptičnog materijala izabrali cilindre s promjerom 2 mm. Iako se, naravno, ne može povući apsolutna paralela između tkivnih cilindara i endoskopskih biopsija, upravo zbog različitih uvjeta fiksacije i dubine oduzimanja materijala. Naime, smjernice za određivanje statusa HER2 na karcinomu želuca (77), naglašavaju da je bioptički materijal uzet prilikom endoskopije pouzdaniji od resektata upravo zbog standardiziranih uvjeta fiksacije. Pri tomu se preporuča da je za potrebe dobivanja čim relevantnijeg rezultata potrebno testirati barem 6-8 tkivnih fragmenata karcinoma. S obzirom na to da se u pravilu radi o velikim, uznapredovalim tumorima i s obzirom na postojanje HER2 heterogenosti u karcinomskom tkivu, neke su studije pokušale uspoređivati rezultate dobivene na malim biopsijama s rezultatima dobivenim odgovarajućim resektatima (što u grubom smislu riječi predstavlja i naša studija) pokušavajući odrediti stupanj podudarnosti odnosno pouzdanost određivanja statusa HER2 na bioptičkom materijalu. Stupanj sukladnosti se kretala od 80%-96,2% (83, 86, 91, 93) s tim da je sukladnost u pravilu bila manja za IHK rezultate i veća za ISH rezultate (86, 93). Što se tiče razlike u rezultatima imunohistokemijskog testiranja, nešto češće se radilo o takvim slučajevima kod kojih je IHK u endoskopskim biopsijama bila negativna, a u resektatima ocijenjena kao pozitivna nego obratno (npr. 15:6 u studiji Grillo i sur.). Što se tiče rezultata FISH analize, u istoj studiji podudarnost iznosi čak 95% pri čemu se u većini slučajeva negativna reakcija u endoskopskoj biopsiji pokazala pozitivnom u resektatu (većinom amplifikacija niskog stupnja!!!), a samo u jednom slučaju je to bilo obrnuto (5:1). U našoj su seriji rezultati bili nešto drugačiji i diskrepance su bile u većoj mjeri posljedica negativnost na standardnom rezu i pozitivnosti u cilindru, rezultate slične našima opisuju i u studiji Yoshida i sur. koja je bila objavljena nedavno (93). Unatoč tim manjim razlikama zaključujemo da se rezultati sukladnosti u našoj seriji između rezultata standardnih rezova i cilindara mogu usporediti s rezultatima suglasnosti bioptičnog i resekcijskog materijala.

Važnost adekvatne standardizirane i kontrolirane preanalitične faze određivanja HER2 se još posebno dobro vidi u rezultatima dobivenima u cilindrima metastatskog tumorskog tkiva iz limfnih čvorova u odnosu na rezultate na standardnim rezovima primarnog tumora. Usporedba je pokazala značajnije slabije rezultate podudarnosti

imunohistokemijskog testiranja nego što je to bio slučaj s cilindrima iz primarnog tumora sa stupnjem podudarnosti koja se kretala od 76-82% i koeficientom κ 0.4-0.5 što znači dobru sukladnost (engl. fair agreemen). Najvjerojatnije je to posljedica postojanja još uznapredovalijih autolitičkih procesa u tkivu limfnih čvorova u usporedbi s tkivom primarnog tumora. Naime limfni se čvorovi nalaze unutar masnog tkiva i radi se o inkapsuliranim strukturama. Prilikom stavljanja uzorka u formalin, primarni tumor je od samog početka u direktnom kontaktu s fiksativom za razliku od limfnih čvorova kod kojih formalin mora penetrirati kroz mast i kapsulu limfnog čvora. Zbog toga je fiksacija još neadekvatnija. S jedne strane se zna da autoliza doprinosi smanjivanju antigenosti odnosno gubitku pozitiviteta HER2 (77), a s druge strane se zbog autolize tkiva povećava količina nespecifične imunohistokemijske reakcije. Razlike u imunohistokemijskoj analizi između primarnog i metastatskog tumora dobivene su i u drugim serijama (94, 95). Studija Kim i sur. je pokazala razlike IHK rezultata u čak 21,8% testiranih slučajeva, dok je razlika u rezultatima FISH analize bila svega 4%.

Osim već opisanih problema izazvanih s preanalitičnim faktorima koji su uključeni u određivanje statusa HER2, se nameće zaključak da bi se s korekcijom i nadzorom preanalitičnih faktora, upotrebom igle za izradu tkivnih mikropostrojbi većeg promjera i uzimanjem odnosno analizom većega broja cilindara iz primarnog parafinskog tkivnog bloka, mogla očekivati još veća suglasnost IHK HER2 rezultata na standardnim rezovima i tkivnim cilindrima.

Načelno je stupanj podudarnosti između IHK i ISH testova za HER2 visoka (57, 59, 81, 87, 95) što se pokazalo i u našoj seriji. Stupanj podudarnosti između IHK i FISH-a u primarnim tumorima je za IHK 3+ reakciju bila 100%, a za negativnu reakciju ocijenjenu s 0/1+ 95.8%. U skupini cilindara koji su bili ocijenjeni s 2+ je amplifikaciju pokazalo samo 11.5% slučajeva. Gotovo svi slučajevi s IHK 3+ reakcijom su pokazali prisutnost amplifikacije visokog stupnja (AVS), dok su uzorci s IHK 0/1+/2+ reakcijom kod kojih je postojala amplifikacija, pokazivali amplifikaciju niskog stupnja (ANS). Slične rezultate glede intenzivnosti IHK reakcije i stupnje amplifikacije su potvrđene i objavljene i od strane drugih autora (62, 82, 92). S obzirom na relativno veliki postotak tumora u kojih je IHK reakcija negativna, a ISH metode pokažu prisutnost amplifikacije, pojedini su autori naglasili (82) da je ISH snažnija metoda za HER2 testiranje u karcinomu želuca. Rezultati ToGA serije su, s druge strane, pokazali

dobar učinak terapije s trastuzumabom u pacijenata s visokim stupnjem ekspresije proteina, dok oni koji su imali FISH+ ali IHK negativne tumore nisu pokazali takav tijek liječenja. Budući da u toj publikaciji nije decidirano iznijeto koliko je takvih slučajeva dijagnosticitranih na endoskopskim biopsijama, a koliko na resektatima, dakle nije se mogao isključiti utjecaj IHK lažno negativnih nalaza s obzirom na visoku IHK hetrogenost tumora želuca, pojedine su skupine predlagale da se s ISH metodama provjeravaju ne samo IHK2+ tumori već i oni koji su IHK 0 ili 1+, bez obzira da li se radi o endoskopskom bioptičkom materijalu (82) ili o resektatima (86). Naime, većina slučajeva karcinoma želuca koji su IHK2+ baš kao i oni koji su 0/1+, a kod kojih postoji amplifikacija je ona u pravilu niskog stupnja (ANS). Zato se pojavila ideja o tome da se sa stajališta terapije te dvije skupine bolesnika zapravo neće razlikovati. Potrebne su daljnje studije koje bi potvrdile tu ideju. Potrebno je naglasiti i to da se u rijetkim slučajevima IHK 3+ reakcija može pojaviti i bez amplifikacije kao posljedica postojanja polisomije kromosoma 17 (polisomija kromosoma 17 je u karcinomu želuca relativno rijetka i procijenjuje se na oko 4%) (93). Klinički značaj toga još nije poznat.

Najveća nesuglasnost u IHK i FISH rezultatima se zapravo nalazi u skupini tumora kod kojih je IHK HER2 reakcija ocijenjena kao 2+. Zanimljiva je jedna od novijih studija skupine Wang i sur. (91) u kojoj su proučavali podudarnost rezultata na bioptičkom materijalu i resektatima. Heterogenost su definirali kao postojanje IHK HER 2+/3+ u 10-60% volumena tumora. Rezultati su pokazali da unatoč tome da je 26% tumora bilo ocijenjeno kao heterogeno, u samo 5 od njih (4%) su nalazi između endoskopskog materijala i resektata bili nesuglasni. Sugerirali su da je u pacijenata s IHK2+ rezultatima kod kojih su ISH rezultati negativni vjerojatno smisleno testiranje statusa HER2 na dodatnim blokovima tumorskog tkiva.

U našoj je studiji stupanj suglasnosti između IHK i FISH-a u cilindrima metastatskog tumorskog tkiva za IHK 3+ reakciju 100%, a za negativnu reakciju ocijenjenu s 0/1+ 92.6%. U skupini cilindara koji su ocijenjeni s 2+ je amplifikacija utvrđena u 25.0% slučajeva. 92% cilindara s IHK 3+ reakcijom su pokazali prisutnost amplifikacije visokog stupnja (AVS). Za razliku od cilindara primarnih tumora u kojima je većina cilindara s IHK 0/1+ i prisutnom amplifikacijom pokazivala amplifikaciju niskog stupnja (ANS), se je u metastatskom tumorskom tkivu AVS pronašla i u ukupno 7 cilindara s IHK 0/1+ (7/15 cilindara s IHK 0/1+ i prisutnom amplifikacijom). Stupanj

podudarnosti je za rezultate IHK 3+ i 0/1+ ostao visok iako se nešto smanjio i iznosio 94.4% (na račun nešto većeg udjela IHK 0/1+ uzoraka s prisutnom amplifikacijom) u odnosu na cilindre primarnog tumora. U cilindrima iz metastatskog tumora se nije više mogao slijediti trend povezanosti stupnja amplifikacije s intenzitetom imunohistokemijske reakcije što je vjerojatno posljedica već opisanih artefakata nastalih produljenjem vremena do fiksacije uzorka.

Usporedba HER2 amplifikacije u parovima cilindara, kako primarnog tumora tako i metastatskog tkiva, je pokazala homogenu distribuciju među skupinom amplificiranih (19 parova s AVS i 13 parova s ANS), kao i u skupini bez amplifikacije (194 parova). Razlike su bile prisutne samo u tri para cilindara (1.3%) primarnog tumora kod kojih je jedan cilindar bio potpuno neamplificiran, u drugom su se nalazili fokusi AVS (molekularna heterogenost). Ponovni pregled standardnih rezova je pokazao da se radi o IHK heterogenim tumorima u kojima HER2 područja s prekomjernom ekspresijom proteina predstavljaju do 10-20% tumora. Vrlo su slične rezultate iznijeli u studiji Kim i sur. iz 2011 godine (95). U toj su studiji uspoređivali IHK i FISH status primarnog tumora u odnosu na metastaze u limfnim čvorovima i drugim lokacijama. Dizajn studije je bio sličan našem jer su koristili tkivnu mikropostrojbu s promjerom 2 mm i opisali su prisutnost heterogene amplifikacije u 2.5% testiranih cilindara. U drugim su studijama uspoređivali prekomjernu proteinsku ekspresiju s genetskom amplifikacijom i našli relativno homogenu amplifikaciju čak i u onim slučajevima u kojima je ekspresija proteina bila heterogena (82, 89, 90, 96). Ovdje je ipak potrebno naglasiti da upotreba FISH-a nije idealna metoda za analizu amplifikacije HER2 u karcinomu želuca jer ne omogućuje dobar uvid u manje fokuse amplifikacije, pogotovo ako se radi o amplifikaciji niskog stupnja (potrebna je upotreba 100x objektiva uz upotrebu imerzijskog ulja). U tom smislu se u analizi HER2 statusa u karcinomu želuca predost daje drugim ISH metodama kao što su na primjer srebrna (SISH) i kromogena in situ hibridizacija (CISH) (77) koje omogućuju uvid u šire polje ocjenjivanja reakcije. Druga prednost je i to da signali s vremenom ne blijede i mogu se ponovno evaluirati i nakon dužeg vremena odnosno na arhiviranom materijalu.

Usporedba statusa amplifikacije između cilindara tkiva primarnog tumora iz želuca i cilindara tkiva metastaza iz limfnih čvorova je pokazala sukladnost između pozitivnoga ili negativnoga statusa amplifikacije u 99,4% svih uspoređenih cilindara. Fenomen takozvane »pozitivne konverzije« je bio pronađen u dva cilindra (isti slučaj),

kod kojih su cilindri primarnog tumora bili posve negativni, a u metastatskom tumoru je bila prisutna amplifikacija niskog stupnja. Negativnu konverziju u našoj seriji nismo dokazali iako je u jednom paru cilindara primarnog tumora s prisutnom amplifikacijom visokog stupnja, u metastazi nađena amplifikacija niskog stupnja. Dosadašnja literatura nudi relativno malo publikacija o usporedbi statusa HER2 u primarnom tumoru želuca sa statusom u metastazama regionalnih limfnih čvorova i/ili udaljenim metastazama. Nekoliko studija je pokazalo da je podudarnost tog statusa visoka i da se kreće od 95-98% (95, 97, 98). Praktički u svima su u rijetkim slučajevima opisali fenomen pozitivne i negativne konverzije s tim da je pozitivna konverzija bila češća od negativne. Potrebno je naglasiti da se radi o relativno rijetkom fenomenu. Uz pretpostavku da je HER2 pozitivan klon tumora agresivniji, morali bi očekivati viši stupanj pozitivne konverzije, a negativna konverzija zapravo ne bi smjela postojati. Budući da tomu nije tako, nameće se zaključak da HER2 pozitivnost možda ne utječe na agresivniji ponašanje tako jako kao što se misli. U našoj smo seriji imali i sedam tumora u kojima su bili prisutni manji fokusi HER2 pozitiviteta, a sve testirane metastaze su bile HER2 negativne. Naši rezultati upućuju i na mogućnost toga da možda postoji kvantitativna korelacija »količine« HER2 pozitivnosti u primarnom tumoru i metastatskog potencijala (u svih sedam fokalno HER2 pozitivnih tumora, fokusi pozitiviteta nisu prelazili 1-2% cijelog testiranog parafinskog bloka).

Zanimljiva je usporedba kliničkopatoloških karakteristika tumora u odnosu na postojanje amplifikacije i njenog stupnja. Amplifikacija visokog stupnja je češće pronađenau dobro do srednje diferenciranim tumorima s papilarnom i tubulopapilarnom morfologijom, dok se amplifikacija niskog stupnja u pravilu nalazila u slabo diferenciranim tumorima intestinalnog tipa te u slučajevima amplificiranih karcinoma stanica prstena pečatnjaka i jednog anaplastičnog karcinoma. Analiza je pokazala da su pacijenti s dobro diferenciranim tumorima s manje agresivnim histološkim tipovima i prisutnom amplifikacijom visokog stupnja, imali nešto kraće preživljavanje od pacijenata kod kojih je bila unutar tumora prisutna amplifikacija niskog stupnja bez obzira na to što su pacijenti s amplifikacijom niskog stupnja imali histološko agresivniju bolest. Ipak, ta razlika nije bila statistički značajna.

Prognostička vrijednost HER2 statusa u karcinomu želuca je još uvijek neizvjesna odnosno kontradiktorna. Neke su studije pokazale značajnu povezanost HER2 pozitivnih tumora s kraćim preživljenjem (60, 63, 99-101), dok u cijelom nizu drugih studija nije dokazana povezanost HER2 statusa i preživljenja, uključujući veliku meta-analizu publiciranu 2014 godine (102-105). U nekim su studijama nedvosmisleno dokazane razlike u vremenu do relapsa bolesti koje je u HER2 pozitivnih karcinoma bilo kraće nego kod onih koji su bili negativni (87), prije svega unutar skupine dobro do srednje diferenciranih karcinoma, gdje se je HER2 pozitivitet pokazao kao neovisan prognostični faktor za relaps bolesti. S druge strane su rezultati drugih studija pokazale duže vrijeme do relapsa bolesti kod HER2+ tumora u odnosu na HER2 negativne (106).

Prekomjerna ekspresiju HER2 i amplifikacija HER2 je pronađena u tri karcinoma miješanog tipa s različitom distribucijom pozitiviteta. Jedan od karcinoma je imao IHK 3+ i AVS u intestinalnoj komponenti dok je difuzna bila negativna, u preostala dva je IHK 2+ i ANS bila prisutna u obje komponente. Za razliku od rezultata koje su objavili Barros-Silva i sur. (107) o tome da su prekomjerna ekspresija i amplifikacija prisutni u obje komponente miješanih karcinoma i da se radi o događaju koji se pojavljuje rano u tijeku karcinogeneze, naši rezultati pokazuju da HER2 amplifikacija nije nužno prisutna u obje tumorske komponente.

Analiza interlaboratorijske reproducibilnosti je pokazala izvrsnu suglasnost među pozitivnim IHK 3+ slučajevima i negativnim IHK 0/1+ slučajevima, bez obzira na to da li se radilo o očitavanju rezultata na standardnimm rezovima ili na cilindrima tkiva u tkivnim mikropostrojbama. Razlike u rezultatima su u prvom redu bila prisutne u uzorcima ocijenjenim s 2+. Po 5 takvih standardnih rezova je u jednom laboratoriju bilo ocijenjeno kao 2+, u drugom kao 0 i obrnuto. Pri ocijenjivanju cilindara je nešto veći postotak cilindara ocijenjen različito, ali se u pravilu radilo o cilindrima koji su u jednom laboratoriju bili ocijenjeni s 0/1+, u drugom s 2+ i obrnuto. Nekoliko je mogućih razloga kojima bi se dalo objasniti nastalu razliku. Prva od njih su upotreba različitih tehnologija u bojanju HER2 u oba laboratorija. Iako smo u oba laboratorija upotrebljavali Hercept test, u Kasslu je bojanje bilo izvedeno pod standardiziranim uvjetima u aparatu Ventana BenchMark, dok se u Ljubljani upotrebljavalo poluautomatsko bojanje u automatiziranom bojaču (engl.auto-stainer). Nastale razlike se mogu pripisati i subjektivnim razlikama u očitavanju (engl. interobserver

variability). Prilikom očitavanja rezultata na standardnim rezovima je potrebno ocijeniti reakciju koja mora biti prisutna u više od 10% tumora i na konačni rezultat pozitivno odnosno negativno može utjecati subjektivni doživljaj patologa da li pozitivna reakcija predstavlja 10% površine tumorskog tkiva prisutnog u standardnom rezu. U publikaciji Rushoffa i sur. (62) u kojoj se objašnjava značenje očitavanja rezultata u odnosu na veličinu objektiva koja se koristi pri očitavanju se je pokušalo smanjiti utjecaj subjektivnosti očitavanja na krajnji rezultat. Ipak, u svakodnevnoj je praksi teško razlikovati između tzv. jedva zamjetne i slabe (*engl*. faint i weak) reakcije. Podrobnija analiza cilindara koji su bili različito interpretirani u dva centra je pokazala da se u pravilu radi o uzorcima koji su u Kasselskom laboratoriju ocijenjeni kao heterogeni (unutar samog cilindra), u Ljubljani je reakcija bila ocijenjena na 2+ s komentarom o slabom, nejednakomjernom 2+ pozitivitetu. Naravno, ne treba zaboraviti niti mogućnost da se status bojanja na preparatima istog tumora iz istog parafinskog bloka može razlikovati zbog izražene heterogenosti tumora odnosno različitosti prisutne u različitim dubinama parafinskog bloka. Potrebno je naglasiti i to da je kod upotrebe Hercept testa primjećena češća lažna negativnost nego s upotrebom nekih drugih klonova protutijela kao što su recimo 4B5 ili SP3 (108-110).

7. ZAKLJUČCI

1. Karcinom želuca je izrazito heterogena bolest i upravo intratumorska heterogenost ostaje glavni problem u određivanju HER2 statusa u karcinomu želuca.
2. Upotreba tkivnih mikropostrojbi za određivanje statusa HER2 na karcinomu želuca se može smatrati jednom od opcija pod uvjetom korekcije i nadzora preanalitičnih faktora, upotrebe igle za izradu tkivnih mikropostrojbi s većim promjerom i uzimanjem većega broja cilindara iz primarnog bloka.
3. Budući da je poznata činjenica da je HER2 pozitivan uglavnom u intestinalnom tipu karcinoma želuca, pregled svih histoloških preparata oduzetih iz reseciranog tumora bi omogućio izbor većeg broja različitih tumorskih fokusa koji bi se svi mogli pregledati sinhrono unutar jedne odnosno manjeg broja tkivnih mikropostrojbi, što bi, pored veće količine testiranog tkiva, doprinjelo i smanjenju troškova testiranja.
4. Testiranje HER2 na metastatskom tumorskom tkivu regionalnih limfnih čvorova se pokazalo adekvatnim ekvivalentom testiranja na primarnim tumorima te zbog toga u inoperabilnih bolesnika može predstavljati altrenativni izvor informacija o statusu HER2 na primarnom tumoru.

8. SAŽETAK

Karcinom želuca je jedna od najčešćih malignih bolesti u ljudi s gotovo milijun novodijagnosticiranih slučajeva u svijetu godišnje i petogodišnjim preživljenjem od svega 20%. Još uvijek ne postoje standardizirani i opće prihvaćeni kemoterapijski protokoli za njegovo liječenje, a budući se bolest najčešće dijagnosticira u vrlo uznapredovalom stadiju, u najvećem broju slučajeva kemoterapija ima samo palijativnu namjenu. Zbog toga je potrebno pronaći i uvesti nove terapijske mogućnosti koje bi dovele do produženja preživljenja pacijenata s lokalno uznapredovalim ili metastatskim karcinomom želuca. Budući da je oko 15% karcinoma želuca pozitivno za HER2, upravo se ta molekula koja se nalazi na površini stanice ponudila kao eventualna ciljna molekula koju bi se moglo blokirati već postojećim antiHER2 monoklonskim protutijelima. 2010. godine su objavljeni rezultati prve velike, internacionalne randomizirane studije u kojoj je postignuta tumorska regresija, produljenje preživljenja i produljenje vremena do relapsa u skupini pacijenata s HER2 pozitivnim karcinomom želuca koji su bili tretirani kombinacijom kemoterapeutika i monoklonskog protutijela za HER2, u odnosu na one koji su dobivali samo kemoterapiju. Testiranje HER2 na karcinomu želuca ulazi u rutinu, a 2012. godine stvorene su smjernice koje diktiraju način rukovanja materijalom te očitavanje rezultata. Vrlo brzo postaje jasno da primjena tih smjernica dovodi do toga da se dio karcinoma koji su HER2 pozitivni ne prepozna i da se takve pacijente ne liječi adekvatno. Načelno je mišljenje da testiranje HER2 na jednom bloku tumorskog tkiva nije dovoljno kao i da ocjena HER2 statusa na bioptičnom materijalu nije adekvatni ekvivalent testiranja na cijelom tkivnom bloku. Rezultati naše studije pokazuju da bi se problem heterogenosti za HER2 u karcinomu želuca mogao premostiti upotrebom tehnologije tkivnih mikropostrojbi koje bi omogućile testiranje veće količine tumorskog tkiva u kratkom vremenskom roku i s bitno manjim troškovima testiranja nego što bi bili s testiranjem većeg broja standardnih rezova.

9. SUMMARY

Stomach cancer is one of the most common malignant diseases in human population. There are almost one million of newly diagnosed cases each year. Five year survival is only about 20%. There are still no standardized or generally accepted chemotherapy protocols for its treatment. Since the disease is usually diagnosed at a very advanced stage, treatment is only palliative. Therefore, it is necessary to find and to introduce new therapeutic options which could extend the survival of patients with locally advanced or metastatic gastric cancer. About 15% of stomach carcinomas are positive for HER2. HER2 is a molecule which was found at the cell surface of the different human malignancies including gastric cancer. It represents target molecule that can be blocked by use of monoclonal antiHER2 antibodies. In 2010 the results of the first, international and randomized study about antiHER2 therapy of metastatic gastric carcinoma were published. The study showed regression of the primary tumor, prolongation of survival and prolongation of the relapsing time in the group of patient that had been treated with combination of chemotherapy and antiHER2 antibody in comparison with patients that had been treated with chemotherapy only. The very same year HER2 testing for gastric cancer was introduced into routine. In 2012. first guidelines about proper testing protocol were published. Very soon it became clear that the application of guidelines, in the meaning of HER2 testing at the one section of the resected tumor or at the endoscopic material, results in too many false negative tumors. There is an opinion that endoscopic material cannot be used as an equivalent for HER2 testing at the whole section. Also, testing at the one tumor block is not necessarily enough because of known HER2 heterogeneity of gastric cancer. The results of our study show that the problem of HER2 heterogeneity of gastric cancer could be »bypassed« by the use of tissue microarrays. Technology of tissue microarrays would enable the testing of larger volume of tumor tissue within short period of time and in significantly lower cost in comparison with testing at the whole sections of the tumor tissue.

10. LITERATURA

1.*Kamangar F, Dores GM, Anderson WF*. Patterns of cancer incidence, mortality and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. J Clin Oncol 2006; 24: 2137-50.

2.*Parkin DM, Whelan SL, Ferlay i sur*. Cancer incidence in five continents, Vol III, No 155. Lyon, France: IARC Scientific Publications, 2002, pp 546-8.

3.*Fayçal J, Bessaguet C, Nousbaum JB i sur.* Epidemiology and long term survival of gastric carcinoma in the French district of Finestere between 1984 and 1995. Gastroenterol Clin Biol 2005; 29: 23-32.

4.*Tsubono Y, Hisamichi S.* Screening for gastric cancer in Japan. Gastric Cancer 2000; 3: 9-18.

5.*Cunningham SC, Kamangar F, Kim MP i sur.* Survival after gastric adenocarcinoma resection: Eighteen-year experience at single institution. J Gastrointest Surg 2005; 9: 728-35.

6.*Ohtsu A*. Chemotherapy for metastatic gastric cancer: past, present and future. Gastroenterology 2008; 43: 256-64.

7.*Siewert JR, Holscher AH, Becker K i sur.* Cardia cancer: attempt at a therapeutically relevant classification. Chirurg 1987;58:25-32.

8.*Newnham A, Quinn MJ, Babb P i sur.* Trends in the subsite and morphology of esophageal cancer in England and Wales 1971-1998. Aliment Pharmacol Ther 2003;17:665-76.

9.*Devesa SS, Blot WJ, Fraumeni JF Jr i sur.* Changing patterns in the incidence of esophageal and gastric cancer in England and Wales 1971-1998; Cancer 1998;83:2049-53.

10.*Kubo A, Corley DA*. Marked regional variation in adenocarcinomas of the esophagus and gastric cardia in the United States. Cancer 2002;95:2096-102.

11.*Voutilainen ME, Juhola MT*. The changing epidemiology of esophageal cancer in Finland and the impact of the surveillance of Barrett's esophagus in detecting esophageal carcinoma.Dis esophagus 2005;18:221-5.

12. *Hongo M.* Barrett's esophagus and carcinoma in Japan. Aliment Pharmacol Ther 2004;20:50-4.
13. *Avidan B, Sonnenberg A, Scnell TG i sur.* Hiatal hernia's size, Barrett's lenght and severity of acid reflux are all risk factors for esophageal adenocarcinoma. AmJ Gastroenterol 2002;97:1930-36.
14. *Lindblad M, Rodriguez LAG, Lagergen J*. Body mass, tobacco and alcohcol risk of esophageal, gastric cardia and gastric non-cardia adenocarcinoma among men and women in a nested case-control study. Cancer Causes Control 2005;16:285-94.
15. *Chow WH, Blot WJ, Vaughn TJ i sur*. Body mass index and risk of adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia. J Natl Cancer Inst 1998;90:150-5.
16. *Vaughn TL, Davis S, Kristal A i sur*. Obesity, alcohol and tobacco as risk factors for cancers of esophagus and gastric cardia:adenocarcinoma versus squamous cell carcinoma. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1995; 4:85-92.
17. *Kaijser M, Akre O, Cnattinggius S i sur.* Preterm birth, low birth weight and risk of esophageal adenocarcinoma. Gastroenterology 2005; 28:607-9.
18. *Lagergren L, Bergstrom R, Adami HO i sur.* Assotiations between medications that relax the lower esophageal sphincter and risk of esophageal adenocarcinoma. Ann Int Med 2000; 133:165-75.
19. *Vaughn TL, Dong LM, Blount P i sur.* Non-steroidal antiinflammatory drugs and risk of neoplastic progression in Barrett's oesophagus: a prospective study. Lancet Oncol 2005;6:945-52.
20. *Eng C, Spechler SJ, Ruben R i sur.* Familial Barrett oesophagus and adenocarcinoma of the gastroesophageal junction. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1993;2:397-99.
21. *Jochem VJ, Fuerst PA, Fromkes JJ.* Familial Barrett's esophagus associated with adenocarcinoma. Gastroenterology 1992;102:1400-2.
22. *Van Lieshout EM, Roelofs HM, Dekker S i sur.* Polymorphic expression of the glutathione – S – transferase P1 gene and its susceptibility to Barrett's esophagus and esophageal carcinoma. Cancer Res 1999;59:586-9.
23. *Kolonel LN, Hanken J, Nomura AMY i sur.* Multiethnic studies of diet, nutrition and cancer in Hawaii. In: Hayashi Y, Nagao M, Sugimura T (eds). Diet,

Nutrition and Cancer. Tokyo, Japan: Scientific Societies Press, 1986, pp 29-40.

24. *Stemmermann GN, Fenoglio–Preiser CM.* Gastric carcinoma distal to the cardia: a review of the epidemiological pathology of the precursors to a preventable disease. Pathology 2002; 34:494-503.

25. *Mendall MA, Goggin PM, Molineaux N i sur.* Childhood living conditions and Helicobacter pylori seropositivity in adult live. Lancet 1992; 39:896-7.

26. *Lauren P*. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcimoma. Acta Path Microb Scandm1965;64:31-49.

27. *Guilford P, Hopkins J, Harraway J i sur.* E cadherin germline mutations in familial gastric cancer. Nature 1998; 392-402.

28. *Gayther SA, Gorringe KL, Ramus SJ i sur.* E cadherine germline mutations in gastric cancer family of European origine. Cancer Res 1998; 58: 4086-9.

29. *Keller G, Vogelsang H, Becker I i sur.* Germline mutations of E cadherin (CDH1) and TP53 genes rather than RUNX and HPP1 contribute to genetic predisposition of German gastric cancer patients. J Med Genet 2004; 41:401-10.

30. *Katoh T, Nagata N, Kuroda i sur.* Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) and T1 (GSTMT1) genetic polymorphism and susceptibility of gastric and colorectal cancer. Carcinogenesis 1996;17:1855-9.

31. *Boissey RJ, Watson MA, Umbach DM i sur.* A pilot study investigating the role of NAT-1 and NAT-2 polymorphisms in gastric adenocarcinoma. Int J Cancer 2000;87:507-11.

32. *Carvalho F, Seruca R, David I i sur.* MUC1 polymorphism and gastric cancer – an epidemiological study. Glycoconj J 1997;14:107-11.

33. *Lee SG, Kim B, Choi J i sur.* Genetic polymorphism of XRCC1 and risk of gastric cancer. Cancer Lett 2002;187:53-60.

34. *Goodman KJ, Correa P*. The transmission of Helicobacter pylori: a critical review of the evidence. Int J Epidemiol 1995;24:875-87.

35. *Forman D.* Gastric cancer and Helicobacter pylori:a combined analysis of 12 case-control studies nested in prospective cohorts. Gut 2001;49:347-53.

36. *Tridaniel J, Boffeta P, Butiatti E i sur.* Tobacco smoking and gastric cancer: a review and meta-analysis. Int J Cancer 1997;72:565-70.

37. *Stemmermann GN, Marcus EB, Buist AS i sur*. Impact of diet and smoking on the risk of developing intestinal metaplasia of the stomach. Dig Dis Sci 1990;35:433-8.

38. *Nomura AMY. Stomach cancer*. U: Schoenfeld D, Fraumann J (ured) Cancer, Epidemiology and Prevention,2nd ed. Oxford University Press 1996; pp 707-24.

39. *Kato H, Schull WJ*. studies of mortality of A-bomb survivors. Radiol Res 1982;90:395-432.

40. *Stemmermann GN, Hayashi T*. Hyperplastic polyps of the gastric mucosa adjacent to gastroenterostomy stomas. Am J Clin Pathol 1979;71:341-45.

41. *Mukaisho KI, Miwa K, Kumagai H i sur*. Gastric carcinogenesis by duodenal reflux through gut regenerative cell lineage. Dig Dis Sci 2003;48:2153-8.

42. *Toledano MT, del Olmo JCM, Castano JG i sur*. Gastric pouch carcinoma after gastric bypass for morbid obesity. Obes Surg 2005;15:1215-7.

43. *Butiatti E, Palli D, De Carli A i sur*. A case-control study of gastric cancer in Italy:assotiation with nutrients. Int J Cancer 1990;45:896-901.

44. *Menard S, Casalini P, Campiglio M i sur*. HER2 overexpresion in various tumor types, focusing on its relationship to the development of invasive breast cancer. Ann Oncol 2001; 12: S15-S19.

45. *Scholl S, Beuzeboc P, Pouillart P*. Targeting HER2 in other tumor types. Ann Oncol 2001; 12: S81-S87.

46. *Sakai K, Mori S, Kawamoto T i sur.* Expression of epidermal growth factor receptors on normal human gastric epithelia and gastric carcinomas. J Natl Canc Inst 1986; 77:1047-52.
47. *Slamon DJ, Clark GM, Wong SG i sur.* Human breast cancer: correlation of relaps and survival with amplification of Her-2/neu oncogene. Science 1987;235:177-82.
48. *Mendelsohn J, Baselga J.* The EGF receptor family as targets for cancer therapy. Oncogene 2000; 19:6550-65.
49. *Olayioye MA, Neve RM i sur.* The erb signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer (Review). EMBO J 2000; 19:3159-67.
50. *Barnes CJ, Kumar R*. Biology of epidermal growth factor receptor family. Cancer Tret Res 2004; 119:1-13.
51. *Akiyama T, Sudo C, Ogawara H i sur*. The product of the human c-erbB2-gene: a 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. Science 1986;232:1644-46.
52. *Kraus MH, Issing W, Miki T i sur*. Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86:9193-7.
53. *Plowman GD, Culouscuo JM, Whitney GS i sur*. Ligand specific activation of Her4/p180erbB4, a forth member of the epidermal growth factor receptor family. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90:1746-50.
54. *Manning G, Whyte DB, Martinez R i sur*. The protein kinase complement of the human genome. Science 2002; 298:1912-34.
55. *Gravalos C, Jimeno A*. HER2 in gastric cancer: a new prognostic factor and a novel therapeutic target. Ann Oncol 2008; 19: 1523-9.
56. *Jørgensen JT*. Targeted HER2 treatment in advanced gastric cancer. Oncology 2010; 78: 26-33.

57. *Hofmann M, Stoss O, Shi D i sur.* Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study. Histopathology 2008; 52: 797-805.
58. *Allgayer H, Babic R, Gruetzner KU i sur.* c-erbB-2 is of independent prognostic relevance in gastric cancer and is associated with the expression of tumor-associated protease systems. J Clin Oncol 2000; 18(11): 2201-9.
59. *Yano T, Toshihiko D, Ohtsu A i sur*. Comparison of HER2 gene amplification assessed by fluorescence in situ hybridization and HER2 protein expression assessed by immunohistochemistry in gastric cancer. Oncology Reports 2006; 15: 65-71.
60. *Tanner M, Hollmen M, Junttila TT i sur*. Amplification of HER-2 in gastric carcinoma: association with Topoisomerase IIα gene amplification, intestinal type, poor prognosis and sensitivity to trastuzumab. Ann Oncol 2005; 16: 273-8.
61. *Lordick F, Bang YJ, Kang YK i sur.* HER2-positive advanced gastric cancer: similar HER2 positivity levels to breast cancer. P3541, ECCO 14, Barcelona, Spain, September 2007.
62. *Rüschoff J, Dietel M, Baretton G i sur*. HER2 diagnostics in gastric cancer – guideline validation and development of standardized immunohistochemical testing. Virchows Arch 2010; 457(3): 299-307.
63. *Park DI, Yun JW, Park JH i sur.* HER2/neu amplification is an independent prognostic factor in gastric carcinoma. Dig Dis Sci 2006; 51: 1371-9.
64. *Carlsson J, Nordgren H, Sjöström J i sur*. Her2 expression in breast cancer primary tumors and corresponding metastases. Originale data and literature review. Br J cancer 2004;90:2344-8.
65. *Gancber D, Di Leo A, Cardoso F i sur*. Comparison of Her2 status between primary breast carcinoma and corresponding distant metastatic sites. Ann Oncol 2002;13:1036-43.
66. *Masood S, Bui MM*. Assessment of Her2/neu overexpression in primary breast cancers and their metastatic lesions: an immunohistochemical study. Ann Clin Lab Sci 2000;30:259-65.
67. *Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova i sur.* Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive

advanced gastric or gastroesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. Lancet 2010; 376: 687-97.

68. *Simon R, Mirlacher M, Sauter G.* Tissue microarrays in cancer diagnosis. Expert Rev Mol Diagn 2003; 3: 421-430.

69. *Wolff AC, Hammond EH, Schwartz JN i sur*. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guidline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer.Arch Pathol Lab Med 2007; 131:18-43.

70. *Bartlett JMS, Merdol I, Jasani B i sur*. External Qality Assurance of Her2 FISH and ISH testing. Three Years of the UK National External Quality Assurance Scheme. Am J Clin Pathol 2009; 131:106-11.

71. *Fitzgibbons PL, Murphy DA, Dorfman DM i sur*. Interlaboratory Comparison of Immunohistochemical Testing for Her2. Results of the 2004 and 2005 College of American Pathologists Her2 Immunohistochemistry Tissue Microarray Survey. Arch Pathol Lab Med 2006; 130:1440-4.

72. *Perez EA, Suman V, Davidson N i sur.* Her2 testing by local, central and reference laboratories in specimens from the north central cancer treatment group N9831 intergroup adjuvant trial. J Clin oncol 24:3032-8.

73. *Wagner AD, Grothe W, Haerting J i sur.* Chemotherapy in advanced gastric cancer: a systematic review and meta-analysis based on aggregate data. J Clin Oncol 2006; 24:2903-9.

74. *Moasser MM.* The oncogen HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. Oncogene 2007; 26:6469-87.

75. *Ross JS, Slodkowska A, Symmans F i sur.* The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. Oncologist 2009; 14: 320-68.

76. *Wolff AC, Hammond EMH, Hicks DG i sur*. Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update J Clin Pathol 2013; Published Ahead of Print on October 7, 2013 as 10.1200/JCO.2013.50.9984

77. *Rüschoff J, Wedad H, Bilous M i sur.* HER2 testing in gastric cancer: a practical approach. Mod Pathol 2012; 25:637-50.

78. *Lee HE, Park KU, Yoo SB i sur*. Clinical significance of intratumoral HER2 heterogeneity in gastric cancer. Europ J Cancer 2013;49:1448-57.

79. *Bang YJ, Chung HC, Xu JM i sur.* Pathological features of advanced gastric cancer: relationship to human epidermal growth factor receptor 2 positivity in the global screeening programme of the ToGA trial. J Clin Oncol 2009; 27(Suppl.15s); Abstract 4556.

80. *Grabsch H, Sivakumar S, Gray S, Gabbert HE, Müller W.* HER2 expression in gastric cancer: Rare, heterogeneous and of no prognostic value – conclusions from 924 cases of two independent series. Cellular Oncology 2010; 32: 57-65.

81. *Kim MA, Jung EJ, Lee SH i sur*. Evaluation of HER2 gene status in gastric carcinoma using immunohistochemistry, fluorescence in situ hybridization and real-time quantitative polymerase chain reaction. Human Pathology 2007; 38: 1386-93.

82. *Kunz PL, Mojtahed A, Fisher G i sur.* HER2 expression in gastric and gastroesophageal junction adenocarcinoma in a US population: clinicopathologic analysis with proposed approach to HER2 assessment. Appl Immunohistochem Mol Morphol 2012; 20(1): 13-24.

83. *Lee S, de Boer WB, Fermoyle S i sur.* Human epidermal growth factor receptor 2 testing in gastric carcinoma: issues related to heterogeneity in biopsies and resections. Histopathology 2011; 59: 832-40.

84. *Asioli S, Maletta F, Verdun di Cantogno L i sur.* Approaching heterogeneity of human epidermal growth factor receptor 2 in surgical specimens of gastric cancer. Hum Pathol 2012;43:2070-9.

85. *Yang J, Luo H, Li Y i sur*. Intratumoral heterogeneity determines discordant results of diagnostic tests for human epidermal growth factor receptor (HER) 2 in gastric cancer specimens. Cell Biochem Biophys 2012;62:221-8.

86. *Grillo F, Fassan M, Ceccaroli C i sur*. The reliability of endoscopic biopsies in assesing HER2 status in gastric and gatroesophageal junction cancer: a study comparing biopsies with surgical samples. Transl Oncol 2013;6:10-6.

87. *Kim KC, Koh YW, Chang HM i sur.* Evaluation of HER2 protein expression in gastric carcinomas: comparative analysis of 1414 cases of whole-tissue sections and 595 cases of tissue microarrays. Ann Surg Oncol 2011; 18:2833-40.

88. *Yamashita-Kashima Y, Shu S, Yorozu K i sur*. Importance of formaline fixing conditions for HER2 testing in gastric cancer: immunohistochemical staining in fluorescence in situ hybridization. Gastric Canc 2014;17:638-47.

89. *Marx AH, Tharun L, Muth J i sur.* HER-2 amplification is highly homogenous in gastric cancer. Human Pathology 2009; 40: 769-77.

90. *Moelans CB, Milne AN, Morsink FH i sur.* Low frequency of HER2 amplification and overexpression in early onset gastric cancer. Cell Oncol 2011; 34: 89-95.

91. *Wang T, Hsieh E, Henry P i sur.* Matched biopsy and resection specimens of gastric and gastroesophageal adenocarcinoma show high concordance in HER2 status. Hum Pathol 2014;45:970-75.

92. *Park SY, Hwang HS, Park HJ i sur*. Comprehensive analysis of HER2 expression and gene amplification in gastric cancers using immunohistochemistry and in situ hybridization: which scoring system should we use? Human Pathology 2011; 43(3): 413-22.

93. *Yoshida H, Yamamoto N, Taniguchi H i sur*. Comparison of HER2 status between surgically resected specimens and matched biopsy specimens of gastric intestinal-type adenocarcinoma. Virchows Arch 2014;465:145-54.

94. *Pagni F, Zannella S, Ronchi S i sur.* HER2 status of gastric carcinoma and corresponding lymph node metastases. Pathol Oncol Res 2013;19:103-9.

95. *Kim MA, Lee HJ, Yang HK i sur*. Heterogeneous amplification of ERBB2 in primary lesions is responsible for the discordant ERBB2 status of primary and metastatic lesions in gastric carcinoma. Histopathology 2011;59:822-31.

96. *Yan B, Yau EX, Omar SB i sur*. A study of HER2 gene amplification and protein expression in gastric cancer. J Clin Pathol 2010;63:839-42.

97. *Bozzetti C, Negri FV, Lagrasta CA i sur.* Comparison of HER2 status in primary and paired metastatic sites of gastric carcinoma. Br J Cancer 2011;104:1372-6.

98. *Shibata R, Nimura S, Hashimoto T i sur.* Expression of human epidermal growth factor 2 in primary and paired parenchimal recurrent and/or metastatic sites of gastric cancer. Mol Clin Oncol 2014; 2:751-5.

99. *Kim JW, Im SA, Kim M i sur.* The Prognostic Significance of HER2 Positivity for Advanced Gastric Cancer Patients Undergoing First-line Modified FOLFOX-6 Regimen. Anticancer Res 2012; 32:1547-53.

100. *Dang HZ, Yu Y, Jiao SC.* Prognosis of HER2 over-expressing gastric cancer patients with liver metastasis. WJG 2012; 18: 2402-7.

101. *Jørgensen JT, Hersom M.* HER2 as a Prognostic Marker in Gastric Cancer - A Systematic Analysis of Data from the Literature. J Cancer. 2012;3:137-44.

102. *Gu J, Zheng L, Wang Y i sur.* Prognostic significance of HER2 expression based on transtuzumab for gastric cancer (ToGA) criteria in gastric cancer: an updated meta-analysis. Tumor Biol 2014; 35:5315-21.

103. *Terashima M, Kitada K, Ochiai A i sur*. Impact of expression of human epidermal growth factor receptors EGFR and ERBB2 on survival in stage II/III gastric cancer. Clin Cancer Res 2012;18:5992-6000.

104. *Gómez-Martin C, Garralda E, Echarri MJ i sur.* HER2/neu testing for anti-HER2-based therapies in patients with unresectable and/or metastatic gastric cancer. J Clin Pathol 2012; 65: 751–7.

105. *Janjigian YY, Werner D, Pauligk C i sur*. Prognosis of metastatic gastric and gastroesophageal junction cancer by HER2 status: a European and USA International collaborative analysis. Ann Oncol 2012; 23: 2656-62.

106.*Matsumoto T, Sasako M, Mizusawa J i sur.* HER2 expression in locally advanced gastric cancer with extensive lymph node (bulky N2 or paraaortic) metastasis (JCOG1005-A trial). Gastric Cancer 2014; DOI 10.1007/s10120-014-0398-3.

107.*Barros-Silva JD, Leitão D, Afonso L i sur*. Association of ERBB2 gene status with histopathological parameters and disease specific survival in gastric carcinoma patients. BJC 2009; 100: 487-93.

108.*Dekker TJA, Borg S, Hooijer GKJ i sur*. Determining sensitivity and specificity of HER2 testing in breast cancer using a tissue micro-array approach. Breast Cancer Res 2012; 14:R93.

109.*Sheffield BS, Garratt J, Kalloger SE i sur*. HER2/neu testing in gastric cancer by immunohistochemistry. Assesment of interlaboratory variation. Arch pathol Lab Med 2014; 138:1495-1502.

110.*Boers JE, Meeuwissen H, Methorst N.* HER2 status in gastroesophageal adenocarcinomas assessed by two monoclonal antibodies (SP3 and 4B5) and two in situ hybridization methods (FISH and SISH). Histopathology 2011; 58:383-94.

11. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 03. svibnja 1971. u Zagrebu. Diplomirala sam na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 1996. godine. Pripravnički staž sam obavila u općoj bolnici "Dr Tomislav Bardek" u Koprivnici, nakon čega sam 1998. položila državni ispit. Nekoliko sam godina radila kao liječnica opće medicine u različitim zdravstvenim domovima u Zagrebu, pored toga sam volontirala na Odjelu za patologiju KB Merkur. 2000. godine sam se zaposlila na Medicinskom fakultetu u Zagrebu kao znanstveni novak na projektu "Dijagnostika, terapija i prognoza hemoblastoza" kojega je vodio prof.dr. Branimir Jakšić. 2001 godine sam dobila specijalizaciju iz patološke anatomije za KB Merkur. Krajem 2002. godine sam specijalizaciju prekinula i preselila se u Sloveniju, gdje sam, nakon nostrifikacije diplome, slovenskog državnog ispita i ispita iz znanja jezika, nastavila specijalizirati za potrebe Onkološkog inštituta u Ljubljani. Specijalistični ispit sam položila 2007. godine u Ljubljani, iste sam godine položila ispit European Board of Pathology. U akademskoj godini 2005/06 sam završila Znanstveni poslijediplomski studij Biomedicina i zdravstvo na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Od 2007. godine sam zaposlena kao specijalist patolog na Odjelu za patologiju Onkološkog instituta u Ljubljani. Jedan sam od autora 13 znanstvenih radova objavljenih u časopisima koji su citirani u bazi Current Contents i oko 40 radova koji su bili predstavljeni na domaćim i međunarodnim kongresima.