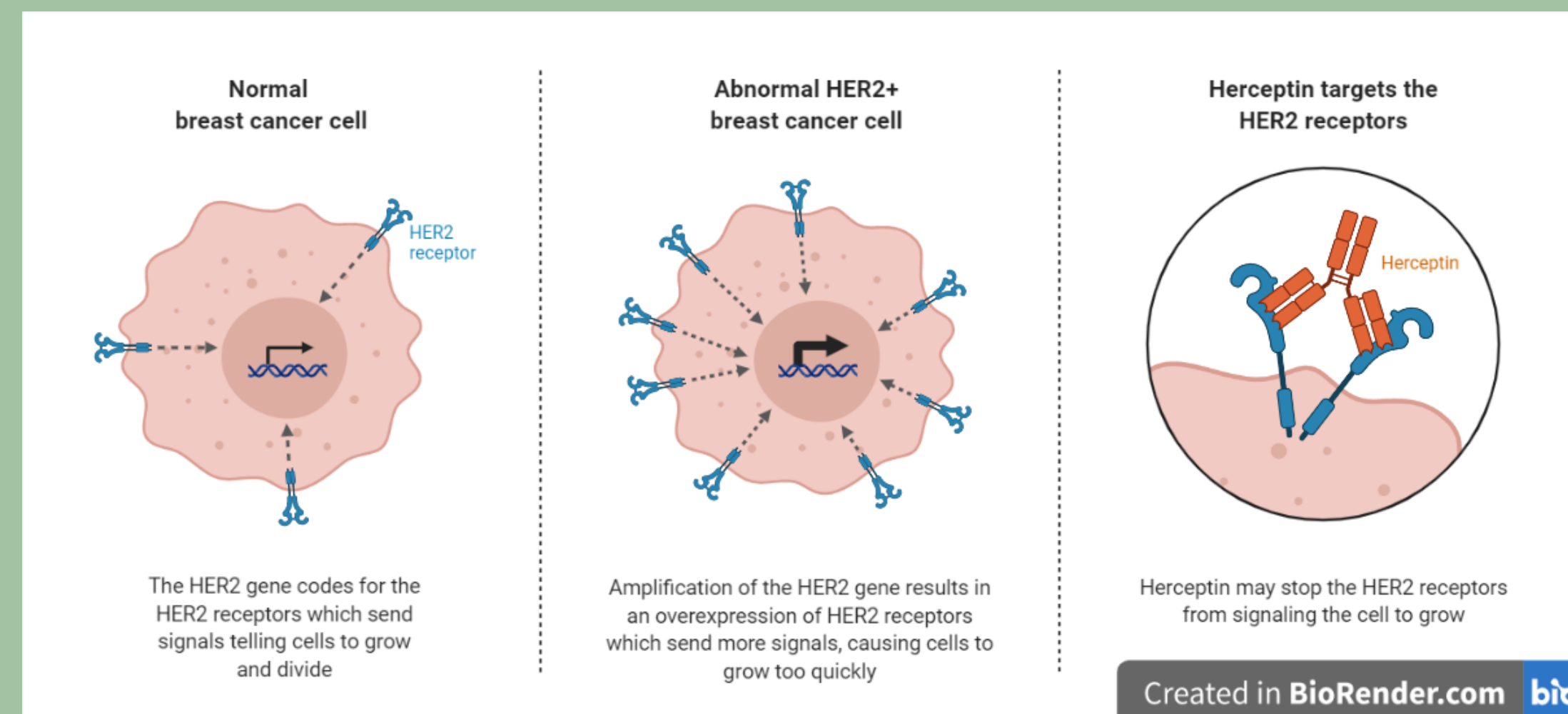


Introductie

Moleculaire diagnostiek is heel belangrijk geworden bij zowel de diagnose als de prognose van mammacarcinomen (borstkanker). De detectie van de amplificatie of overexpressie van het Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) is het voorbeeld. Dit is een proto-oncogen dat zich bevindt op de lange arm q van chromosoom 7. Het gen codeert voor het HER2 proteïne dat een transmembraanreceptor tyrosine kinase is. In normale omstandigheden zijn er twee kopieën van het HER2-gen aanwezig in een diploïde cel, maar bij 10-25% van de mammacarcinomen is er een amplificatie van het gen aanwezig. Dit resulteert in de overexpressie van het proteïne aan het celoppervlak. Een HER2 bepaling toont ook de gevoeligheid aan voor een behandeling met Trastuzumab (Herceptin®). Dit is een recombinant gehumaniseerd monoklonaal antilichaam gericht tegen het HER2-eiwit. De overexpressie van het HER2-gen kan aangetoond worden met een immunohistochemische kleuring (IHC) of een fluorescentie in situ hybridisatie (FISH). Een FISH analyse zou in cytologie metastasen kunnen aantonen. Het doel is om de FISH analyse op cytologies te valideren op het Dako Omnis toestel van Agilent.

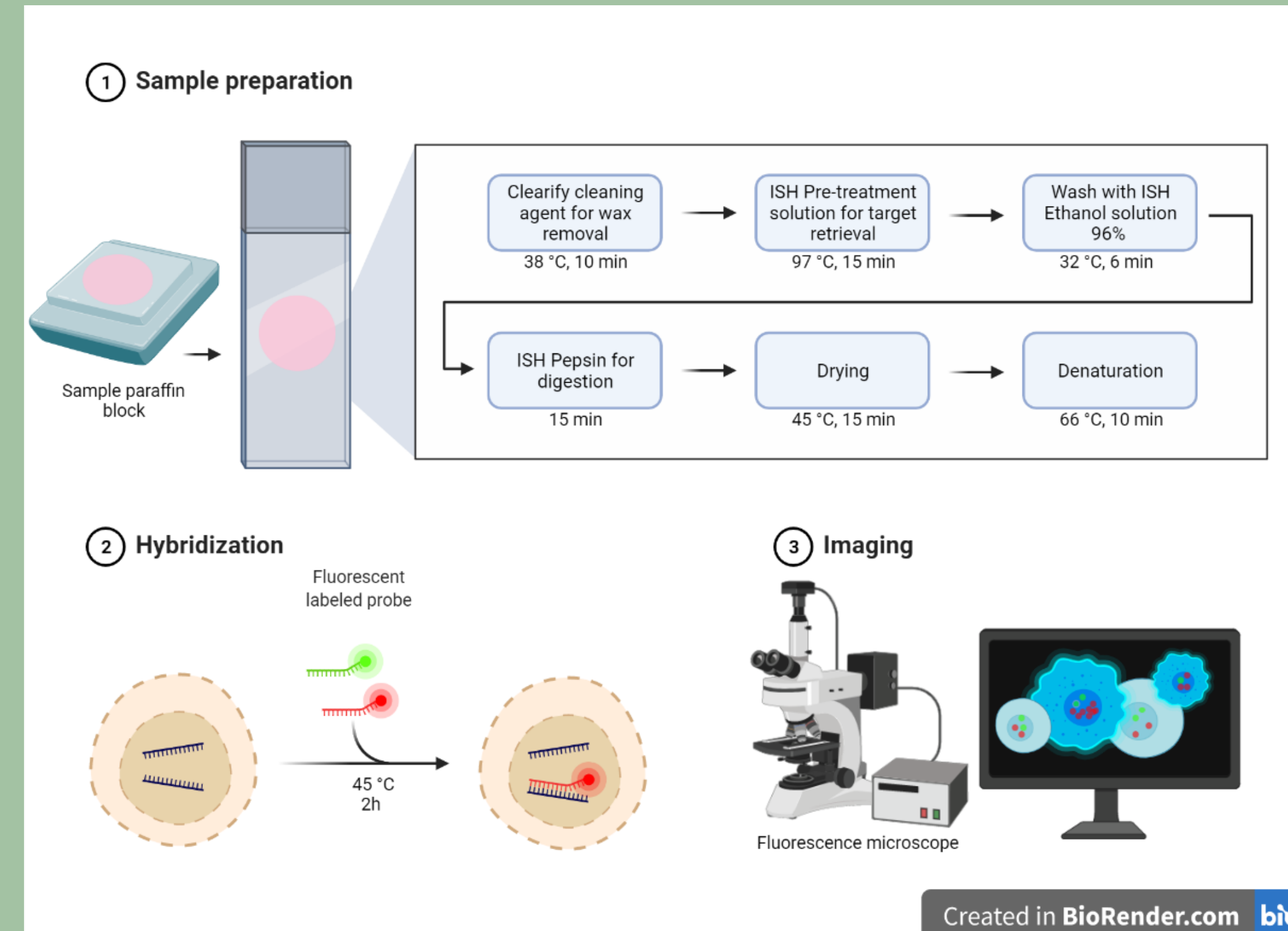


Figuur 1: Werking van de HER2 receptor

Materialen en methoden

De gebruikte staalsoorten zijn drie pleuravochten en één trans-bronchiale naald aspiratie. Deze cytologies werden verwerkt tot een celblok door ze eerst te centrifugeren en daarna Histogel™ toe te voegen aan de gevormde celpellet dat ervoor gaat zorgen dat de celsuspensie stolt. Deze celblok werd gefixeerd met 4% neutraal gebufferde formaldehyde en ingebed met paraffine in de doorvoerverprocessor van Leica. Hierna werd de celblok uitgebied met paraffine ter vorming van een paraffineblok waarvan coupes gesneden kunnen worden.

Voor de FISH analyse werd een coupe gesneden met de microtoom van 4µm. Hierna werden de coupes in de oven gezet om de paraffine te smelten voor 30 minuten op 60°C. Daarna konden de coupes op het Dako Omnis toestel van Agilent geladen worden voor de FISH analyse. Het verloop van de analyse werd toegelicht in Figuur 2. De gebruikte probe mix bestaat uit een mengeling van Texas-rood gelabelde probes die zullen hybridiseren op het HER2-gen en dus rood kleuren en fluorescine gelabelde probes die zullen hybridiseren op het centromeer van chromosoom 17 (CEN-17) en groen zullen kleuren.

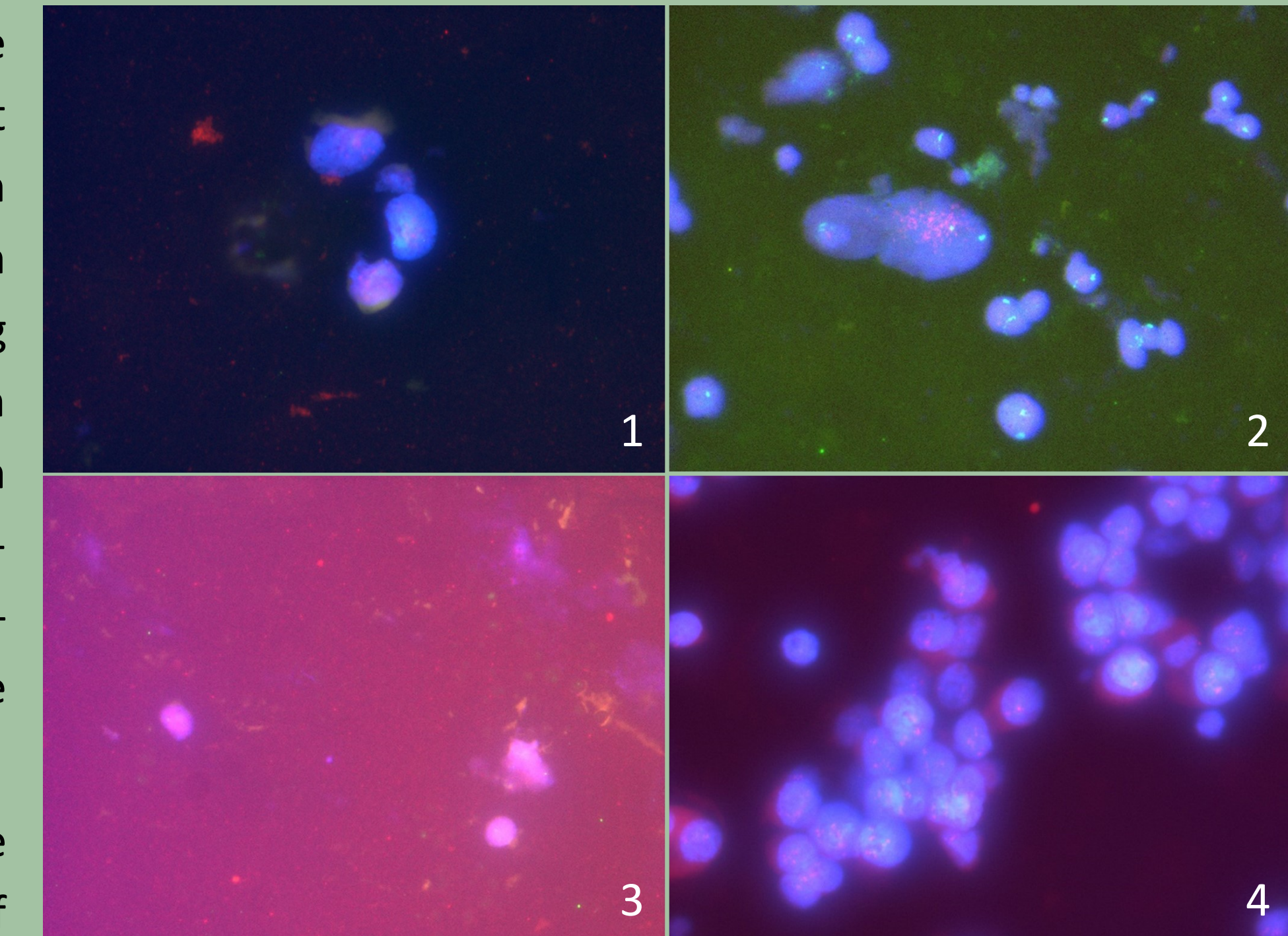


Figuur 2: Overzicht staalverloop

Resultaten

Er werden vier stalen gekleurd: 18C47, 19C1311, 20C6 en 18C1467. Deze stalen werden gekozen door op zoek te gaan naar borstcarcinomen met een positieve of negatieve FISH op het weefsel. Zo werden er twee stalen geselecteerd die negatief moeten zijn en twee stalen die positief moeten zijn. De signalen van de HER2 en de CEN-17 probe werden geteld in twintig tumorcellen. Daarna werd het gemiddelde van de signalen en de ratio van de rode tegenover de groene signalen berekend. De berekende resultaten zijn terug te vinden in de tabel. Met de Leica Application Suite (LAS) konden er foto's genomen worden van het staal. Er werd per filter een foto genomen waarna het programma LAS een overlay maakt van de verschillende foto's. Deze foto's zijn te zien in Figuur 3.

Aan de hand van de ratio van de HER2 probe tegenover de CEN-17 probe en een beslissingsboom kan afgeleid worden of de FISH analyse positief of negatief is. Een positieve analyse wijst in deze gevallen op metastasen ter hoogte van de longen.



Figuur 3: Foto's per staal via Leica Application Suite waarbij 1) 19C1311, 2) 18C1467, 3) 20C6, 4) 18C47

Tabel: Berekende resultaten per staal na telling van de signalen in 20 kernen

	18C47	19C1311	20C6	18C1467
Gemiddelde groene signalen	1,75	1,70	1,80	1,85
Gemiddelde rode signalen	12,65	2,20	2,30	11,30
Ratio rode signalen/groene	7,23	1,29	1,28	6,11
Resultaat FISH	Positief	Negatief	Negatief	Positief

Conclusie

De validatie is geslaagd aangezien twee positieve en twee negatieve stalen voldoende zijn om dergelijke validatie te voltooien. De stalen 18C47 en 18C1467 zijn FISH positief en wijzen op metastasen ter hoogte van de longen en stalen 19C1311 en 20C6 zijn FISH negatief en wijzen niet op metastasen ter hoogte van de longen.

Het is mogelijk om een HER2 FISH analyse uit te voeren op een cytologie, maar de interpretatie is moeilijker en duurt langer omdat er in losse cellen gezocht wordt en niet in vast weefsel. Hierdoor is het moeilijker om twintig tumorcelkernen te vinden en te tellen. De eventuele theoretische toevoeging van een extra probe specifiek voor de tumorcelkernen zou het gemakkelijker maken ze te lokaliseren.

Referenties

- Ilse Van Hee. Opsporen van een overexpressie van het HER2-gen. Imelda ziekenhuis Bonheiden; z.j.; PO-ANA-296.
- C.B. Moelans, R.A. de Weger, L.D.C. Hoefnagel, E. van der Wall, P.J. van Diest. Nieuwe ontwikkelingen in HER2-detectie bij het mammacarcinoom. NTVO. 2010; 7(5): 186-197.
- E. E. Doxtader, B. C. Calhoun, C. D. Sturgis, C. N. Booth. HER2 FISH concordance in breast cancer patients with both cytology and surgical pathology specimens. JASC. 2017; 7(1): 31-36.
- Ilse Van Hee. Aandachtspunten uitvoeren FISH. Imelda ziekenhuis Bonheiden; z.j.; PO-INFO-28.