مقاله
پژوهشی

فراوانی جهشهای مضاعف شدگی (duplication) ژن HER2/neu در بیماران مبتلا به سرطان پستان با استفاده از روش MLPA

بهرام پورسیدی[1]، محمد رضا بذرافشانی[2]، سمیه راستین نیا[3]*، فاطمه السادات حسینی[4]

[1]دانشیار و فوق تخصص جراحی لاپاراسکوپی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران
[2]استادیارو دکترای ژنتیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران
[3]رزیدنت جراحی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران
[4]کارشناس ارشد بیوتکنولوژی، آزمایشگاه ژنتیک پزشکی دکتر محمد رضا بذرافشانی، کرمان، ایران
*نویسنده مسئول: دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران
پست الکترونیک: dr.rastinnia@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: *وجود تکثیر ژن HER2 جهت پیش بینی وضعیت و انتخاب درمان، در بیماران مبتلا به سرطان پستان، تعیین کننده است. آنالیز تکثیر ژن Her-2 با استفاده از روش MLPA که روش جدید در بررسی های بالینی می باشد ، انجام گردید.*

مواد و روش کار: *در این مطالعه توصیفی، تعداد ۶۰ بیمار مبتلا به سرطان سینه را که در بیمارستان افضلی پور کرمان، جراحی شدند، از نظر مضاعف شدگی HER2 به روش MLPA مورد مطالعه قرار گرفتند. داده ها توسط نرم افزار SPSS21 و آزمون کای دو آنالیز شد. در این مطالعه، P value < ۰/۰۵ معنی دار تلقی گردید.*

یافته ها: *از ۶۰ نمونه مورد مطالعه، در (۳۶/۷٪) ۲۲ نمونه مضاعف شدگی HER2 مشاهده شد. در این مطالعه ارتباط معنا داری بین مثبت شدن مضاعف شدگی HER2 و درگیری غدد لنفاوی دیده شد (P value<۰/۰۰۱). اندازه تومور با مضاعف شدگی HER2 ارتباط معنادارنشان داد (P value=۰/۰۳۶). همچنین تمامی بیماران دارای مضاعف شدگی ژن HER2 در مرحله ۳ بیماری قرار داشتند (P <۰/۰۰۱ value).*

نتیجه گیری: *با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه، می توان به این نتیجه رسید که استفاده از روش MLPA برای تعیین مضاعف شدگی ژن HER2/neu در بیماران مبتلا به سرطان پستان می تواند به تشخیص سریع و به موقع بیماران، در نتیجه شروع درمان مناسب کمک کند.*

واژه های کلیدی: *سرطان پستان، مضاعف شدگی ژن HER2/neu ،MLPA*

مجله دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی سال ۹۴؛ دوره ۷ (۳): ۵۱۹-۵۲۶
Journal of North Khorasan University 2015;7(3):519-526

وصول: ۹۴/۱/۱۶
اصلاح: ۹۴/۵/۲۵
پذیرش: ۹۴/۸/۲۶

مقدمه

سرطان پستان شایع ترین سرطان زنان و شایعترین علت مرگ و میر ناشی از سرطان در زنان۲۰ تا ۵۹ ساله می باشد. این سرطان ۲۹٪ از تمامی سرطانهای تازه تشخیص داده شده در زنان را شامل می شود و مسئول ۱۴٪ مرگ و میر مرتبط با سرطان در زنان می باشد [۱].

فاکتور های پیش آگهی سرطان پستان شامل اندازه تومور، تعداد غده های لنفاوی درگیر و درجه بدخیمی تومور می باشد. شناسایی وضعیت گیرنده های استروژن، پروژسترون و HER2 جهت پیش بینی وضعیت بیمار و درمان مناسب کاربرد دارد. یکی از مهمترین تغییرات مولکولی درسرطان پستان مضاعف شدگی HER2 می باشد که در۲۰ تا ۳۰ درصد موارد رخ می دهد و فاکتور مهمی در پیش آگهی افراد با غدد لنفاوی مثبت و منفی می باشد. همچنین تشخیص آن در تعیین پاسخ به درمان هورمونی و یا بعضی انواع شیمی درمانی اهمیت دارد [۲].

HER2 یکی از ۴ عضو خانواده تیروزین کیناز غشایی HER است [۳] و تنها عضو این خانواده است که برای آن لیگاند مشخصی وجود ندارد. همچنین به عنوان کمک گیرنده برای تشکیل دایمر به همراه HER3، EGFR و HER4 عمل می نماید [۴]. HER2 پروتوانکوژنی است که روی کروموزوم ۱۷q۲۱ قرار گرفته است. این ژن کد کننده پروتئین ۱۸۵ کیلو دالتونی درون غشایی است که در انتقال سیگنال نقش دارد [۵،۶].

HER2 به خانواده ای از گیرنده های فاکتور رشد (growth factor receptors) تعلق دارد و جزئی از مسیر انتقال پیام (signal transduction pathway) که در رشد سلول نقش دارند می باشد و پروتئین (HER2) نقش کلیدی در تغییر به سمت بدخیمی (malignant transformation) دارد [۲].

تکثیر HER2 و بیش بیانی آن با پیش آگهی ضعیف بیماری و مقاومت به ادجوانت های مرسوم شیمی درمانی در ارتباط است [۶،۷] اما اختلاف در بیان HER2 بین بافت های طبیعی و تومورها منجر به معرفی HER2 به عنوان یک هدف درمانی ایده ال شده است.

آنتی بادی مونوکلونال ضد HER2 یعنی Trazumab، به عنوان یک عامل درمانی مورد استفاده قرار گرفته است و در کارآزمایی های بالینی اولیه نقش آن در درمان موارد عود سرطان پستان که از نظر HER2 مثبت بودند، تایید گردیده است. همچنین در مطالعات تصادفی شده چند مرکزی، نقش Trazumab در همراهی با شیمی درمانی در بیماران سرطان پستان متاستاتیک و HER2 مثبت به عنوان خط اول درمان اثبات گردیده است [۲]. اثر ضد توموری Trazumab به همراهی شیمی درمانی به میزان HER2 expression توسط سلولهای توموری بستگی دارد. بنابراین شناخت HER2 expression توسط سلولهای تومورال فاکتور پروگنوستیک ارزشمند و مهمی جهت پیش بینی پاسخ به درمان با Trazumab می باشد و با توجه به این موضوع روشهای مختلفی جهت بررسی و اندازه گیری وضعیت HER2 ابداع گردیده و مورد استفاده قرار گرفته است.

مطالعات جدید نشان داده اند که سلولهای بدخیم که از نظر HER2/neu مثبت هستند، نسبت به رادیوتراپی حساس ترند. چنانکه در بررسی ۴۶۶ بیمار که دارای این ژن بودند، پاسخ درمانی به رادیوتراپی خارجی و استفاده همزمان از Trazumab به صورت کامل مشاهده شد [۸،۹].

داروی Trazumab دارویی گران و همچنین دارای عوارض متعدد می باشد. از جمله عوارض آن می توان سردرد، آرترالژی، درد در اندامهای انتهایی و پارستزی را نام برد [۱۰]. به دلیل وجود این عوارض، در صورت عدم وجود مضاعف شدگی HER2 در سرطان پستان، این دارو برای درمان به کار برده نمی شود.

روشهای مختلفی جهت اندازه گیری HER2 در مرحله پروتئین RNA, DNA وجود دارد که شامل اندازه گیری ایمنو هیستو شیمیایی (IHC) گیرنده HER2، استفاده از یافتن مضاعف شدگی ژنها با استفاده از روشهای FISH یا PCR می باشد. روش MLPA نوعی PCR می باشد که با کارایی بالا برای مشخص کردن تعداد نسخه های ۴۰ تا ۵۰ توالی DNA ژنومی در یک واکنش که بر مبنای PCR چند تایی می باشد، توسعه یافته است. قطعه های تکثیری حاصل از MLPA بین ۱۰۰ تا ۵۰۰ نوکلوتید طول دارند که قابل جداسازی و کمی سازی به وسیله الکتروفورز مویین هستند [۱۱].

از مهمترین مزایای MLPA سادگی نسبی، هزینه کم، سرعت انجام، سهولت برای انجام چند تایی به منظور دستیابی به نتایج مطمئن تر، دقت بالا در تخمین تعداد نسخه ها و توانایی روش برای ترکیب آنالیز تعداد نسخه ها با دیگر روش ها می باشد. در مقایسه با PCR چند تایی استاندارد تنها یک جفت پرایمر PCR در MLPA PCR استفاده می شود که آن را به یک سیستم قوی تری تبدیل می کند. این روش حساس بوده و تنها به ۲۰ ng/ML ژنومی نیاز دارد [۱۱،۱۲].

روش کار

در این مطالعه توصیفی مقطعی (Cross-sectional)، تعداد ۶۰ بیمار مبتلا به سرطان سینه را که در مرکز درمانی- آموزشی فضلی پور کرمان تحت عمل جراحی قرار گرفته اند، از نظر جهشهای حذف و اضافه در ژن HER2/neu مورد مطالعه قرار گرفته اند. برای تعیین حجم نمونه، از مقادیر زیر استفاده شد.

$N = ۲۴ ، Z = ۱/۹۶ ، P = ۰/۲۴ ، d = ۲$

در آغاز مطالعه، اطلاعات پاتولوژی مانند نوع بافت شناسی، مرحله بیماری و درگیری غدد لنفی، از پرونده بیماران و فایل های پاتولوژی موجود در بیمارستان فوق الذکر استخراج گردید. پس از آن بلوک محتوی جزء تومورال را از روی لامهای مربوطه شناسایی کرده و توسط پاتولوژیست از آن بلوک، برش تهیه گردید. سپس مقداری از بافت موجود در بلوک پارافینه محتوی تومور، در ابعاد ۳×۳×۳ سانتیمتر، جهت تعیین موتاسیون ژن HER2/neu به آزمایشگاه ژنتیک مولکولی فرستاده شد. به وسیله میکروتوم، نمونه ها به صورت ورقه های یک میلیمتری برش زده شد. نمونه ها سه بار با زایلوتن شستشو و پس از پارافین زدایی و لیز کردن بافت ها، DNA ژنومی با استفاده از کیت سیناژن باز یافت گردید.

برای تعیین موتاسیون های مضاعف شدگی در ژن HER2/neu از تکنیک MLPA استفاده گردید. بدین منظور پس از دناتوره کردن DNA نمونه ها در ۹۵ درجه سانتی گراد، عمل هیبریداسیون با استفاده از پروب های فلوروسنت انجام و در نهایت جهت تکثیر قطعات DNA هدف، نمونه ها در ترموسایکلر قرار گرفتند. به منظور انجام MLPA از کیت SALSA MLPA probemix P004-C ERBB2، محصول شرکت MRC کشور هلند، استفاده شد. این کیت دارای چهار پروب برای ژن HER2/neu بر روی کروموزوم ۱۷و ۲۶ پروب برای دیگر ژنهای کروموزوم ۱۷ می باشد. نمونه های DNA فاقد حذف شدگی و مضاعف شدگی در ژن مورد بررسی، به عنوان کنترل منفی استفاده شد. پس از پایان روند تکثیر پروبها، نمونه های تکثیریافته، توسط دستگاه (DNA Sequencer ABI 313) الکتروفورز شدند. در پایان داده های خام با استفاده از نرم افزار Gene Marker مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

در صورت وجود مضاعف شدگی در ناحیه ای از ژن مورد بررسی در هر یک از نمونه ها مقدار محصول تکثیر یافته در آن ناحیه افزایش داشته و با توجه به اینکه مقدار فلورسانس ساطع شده از هر نمونه در دستگاه Sequencer متناسب با مقدار محصول می باشد، افزایش میزان فلورسانس نمونه ای در یک ناحیه مشخص نسبت به میزان مرجع در همان ناحیه، نشان دهنده جهش افزایشی در آن قسمت می باشد. کیت مورد استفاده برای انجام MLPA محصول شرکت MRS کشور هلند می باشد. سپس از نرم افزار SPSS21 و آزمون کای دو جهت تجزیه و تحلیل داده ها استفاده گردید و $P<۰/۰۵$ معنی دار تلقی گردید.

یافته ها

در مطالعه انجام شده میانگین سنی بیماران ۴۹/۳۷ سال با حد اقل سنی ۲۸ و حد اکثر ۸۸ بود. از بین نمونه ها، تعداد ۲۲ نمونه از نظر مضاعف شدگی ژن HER2 مثبت بودند (۳۶/۷٪) و ارتباط بین مثبت شدن مضاعف شدن ژن HER2 و اندازه تومور، درگیری غدد لنفاوی و مرحله بیماری بررسی گردید.

نمونه ها بر اساس سیستم TNM از نظر اندازه به ۴ گروه T۱ تا T۴، از نظر درگیری غدد لنفاوی به ۴ گروه N۰ تا N۳ و از نظر مرحله بندی به مرحله ۱ تا ۳ تقسیم بندی شدند. نتایج بررسی نمونه ها بر اساس جدول ۲ می باشد.

بیماران دارای مضاعف شدگی HER2 نیز در گروه بندی مشابه به کمک سیستم TMN قرار گرفتند. نتایج حاصله از بررسی این بیماران در جدول ۲ آورده شده است. بین مضاعف شدن ژن HER2 و اندازه سرطان پستان در

جدول ۱: نتایج به دست آمده بر اساس سیستم تقسیم بندی TNM

		Total (Percentage of Total)	HER2 Positive (Percentage of HER2 Positive)
Size	T ۱	۱۰ (٪۱۶/۷)	۱ (٪۴/۵)
	T ۲	۱۷ (٪۲۸/۳)	۴ (٪۱۸/۲)
	T ۳	۲۹ (٪۴۳/۳)	۱۶ (٪۷۲/۷)
	T ۴	۳ (٪۵)	۱ (٪۴/۵)
Lymph Node	N ۰	۱۴ (٪۲۳/۳)	۰
	N ۱	۱۱ (٪۱۸/۳)	۱ (٪۴/۵)
	N ۲	۲۴ (٪۴۰)	۱۳ (٪۵۹/۱)
	N ۳	۱۰ (٪۱۶/۷)	۸ (٪۳۶/۴)
Stage	I	۸ (٪۱۳/۳)	۰
	II	۱۲ (٪۲۰)	۰
	III	۳۹ (٪۶۵)	۲۲ (٪۱۰۰)
Missing Case			۱ (٪۱/۷)
Total		۳۷ (٪۶۱/۷)	۲۲ (٪۳۶/۷)

جدول ۲: شاخص کارایی یافتن مضاعف شدگی HER2 به کمک روش MLPA در مقایسه با روشهای ISH

Performance Index	Rate (%)
Sensitivity	۹۲
Specificity	۱۰۰
PPV	۱۰۰
NPV	۹۸/۹
Accuracy	۹۹

ISH= indicates in situ hybridization (FISH, CISH)
PPV(Positive Predective Value), NPV(Negative Predective Value)

بیماران ارتباط معنی دار با P = ۰/۰۳۶ مشاهده گردید (جدول ۲). ارتباط معنی داری بین مثبت شدن مضاعف شدن ژن HER2 و درگیری غدد لنفاوی به دست آمد (P value<۰/۰۰۱) (جدول ۲).

از نظر مرحله بندی، تمامی نمونه های مثبت مضاعف شدن ژن HER2 در مرحله ۳ بیماری بودند که با P value<۰/۰۰۱، ارتباط معنی داری بین مثبت شدن مضاعف شدن ژن HER2 و مرحله بیماری به دست آمد.

بحث

سرطان پستان شایع ترین سرطان در زنان می باشد که پیش آگهی و انتخاب نوع درمان به عوامل متعددی از جمله اندازه تومور و درگیری غدد لنفاوی و گیرنده های استروژن و پروژسترون بستگی دارد. در سالهای اخیر برای سلولهای بدخیم، مارکرهای مولکولی مختلف شناسایی شده که به نظر می رسد می تواند هم به عنوان یک فاکتور پیش آگهی و هم به عنوان یک عامل غربالگری از آنها استفاده نمود. از جمله این مارکرها می توان به CCND1 ,ADAM9 ,TOP2A ,PRDM14 ,MYC و HER2 اشاره کرد.

یکی از مهمترین تغییرات مولکولی در سرطان پستان مضاعف شدگی HER2 می باشد که در ۲۰ تا ۳۰ درصد موارد رخ می دهد. این مارکر به صورت گسترده مورد مطالعه قرار گرفته است و نتیجه حاصل از این مطالعات نشان داده اند که HER2 فاکتور پروگنوستیک مهمی در افراد با غدد لنفاوی مثبت و منفی می باشد. همچنین تشخیص آن در تعیین پاسخ به درمان هورمونی و یا بعضی انواع شیمی درمانی اهمیت دارد.

در مطالعه ای ترایناً[1] و همکارانش ثابت کردند که HER2 مثبت و تومورهای با مرحله ۳ بافت شناسی، به شدت با طول عمر بیماران ارتباط دارند [۱۳]. همچنین در مطالعه آیادای[2] و همکارانش، HER2 مثبت در تومور های درجه یک و دو ۱۴/۸٪ و در تومورهای درجه سه، ۲۷/۵ درصد بود و ارتباط بین HER2 و درجه بافت شناسی تومور معنی دار بود [۱۴]. با توجه به نتایج این مطالعه بین HER2 مثبت و در گیری غدد لنفاوی و مرحله بیماری رابطه معنی داری مشاهده گردید. با توجه به مطالعات انجام شده در زمینه آنتی بادی ضد Trazumab، نیاز به تشخیص HER2 در مراحل اولیه بیماری و با روش دقیق ضروری به نظر می رسد.

اکنون مطالعات فراوانی برای یافتن مضاعف شدگی ژن HER2/neu به روش MLPA انجام شده است. فرشید[3] و همکاران در سال ۲۰۱۱، تعداد ۲۰۸ نمونه سرطان سینه تهاجمی را با روش دو رگه سازی درجا (CISH ,FISH) و MLPA بررسی نمودند و اثبات کردند روش MLPA در مقایسه با آزمون مرجع ISH دارای ۹۲ درصد حساسیت، ۱۰۰درصد ارزش پیشگویی مثبت، ۹۸/۹ درصد ارزش پیشگویی منفی و دقت ۹۹ درصد می باشد. (جدول ۲)، [۱۵]. محققان دانشگاه Einthoven نیز در بررسی های خود به نتیجه مشابه رسیدند [۱۶]. دانشمندان دانشگاه Utrecht در بررسی های در سال ۲۰۰۸، نشان دادند که MLPA جایگزین مناسبی برایIHC می باشد [۱۷].

نتیجه گیری

تطابق بالای FISH و CISH، MLPA و MLPA همچنین IHC و CISH تایید کرد که MLPA روش سریع و دقیق برای شناسایی تکثیر ژن HER2 می باشد و به همین دلیل می تواند یک جایگزین قابل اطمینان برای FISH و CISH باشد [۱۷]. این تکنیک می تواند محدوده وسیعی از تغییرات ژنومیک اعم از انواع جهش های نقطه ای منفرد تا حذف و اضافه های بزرگ کروموزومی را تشخیص دهد. منظور از جهش در ژنتیک منحصر به تغییر یک نوکلئوتید (جایگزینی یک نوکلئوتید با یک نوکلئوتید دیگر) نیست بلکه شامل انواع حذف شدگی و مضاعف شدگی نیز می باشد که این مقدمه ضرورت اجرای بررسی کل ژن را در انواع بیماریها من جمله سرطان تاکید می نماید. به همین دلیل علیرغم مطالعات بسیار زیاد ژنتیکی در مورد ارتباط موتاسیونهای ژنهای مختلف با بیماریهای مختلف، اکنون تحقیقات ژنتیک پزشکی در جهان به سمت بررسی مجدد ژنهای مرتبط با بیماری از طریق توالی یابی با تکنیک های جدید من جمله MLPA است [۱۸].

1-Traina
2 -Ayadi
3 -Farshid

بنابراین در ایران نیز مانند سایر انستیتوهای جهانی تحقیق در زمینه سرطان، بررسی ژنتیکی کل ژنهای دخیل در ایجاد و مبارزه با سرطان کاملا ضرورت دارد. لذا هدف از این مطالعه پیدا کردن فراوانی موتاسیون های از نوع مضاعف شدگی ژن HER2/neu با استفاده از تکنیک MLPA در بیماران مبتلا به سرطان پستان در کرمان، جهت پیش اگهی سریع و به موقع این بیماران می باشد که با توجه به نتایج به دست آمده به نظر می رسد که استفاده از این روش جهت تعیین پیش آگهی و درمان بیماران مناسب می باشد.

تشکر و قدردانی

این طرح با شماره ۳۱۱/۹۳ در کمیته پژوهشی بیمارستان افضلی پور کرمان به تصویب رسیده است. لازم می دانیم از همکاری صمیمانه استاد بخش جراحی دانشگاه علوم پزشکی کرمان، جناب آقای دکتر لشکری زاده، سرکار خانم رجایی در کمیته پژوهش بیمارستان افضلی پور و همچنین آزمایشگاه ژنتیک پزشکی دکترمحمدرضا بذرافشانی، تشکر و قدردانی نماییم.

References

1. Kelly K, Hunt, John Fr. R. Robertson, Kirby I. Bland, The Breast. F, Charls Brunicardi, Dana K. Andersen, Timothy R. Billiar, David L. Dunn,Schwartz's Principles of Surgery, 10th Edition, USA. MCGraw-Hill, 2014.498
2. Schaller G., Evers K., Papadopoulos S., Ebert A., Bühler H., Current use of HER2 tests, Annals of oncology, 2001; 12: 97-100.
3. Gutierrez M, Schiff R, HER 2: Biology, Detection and Clinical Implications, Arch Pathol Lab Med., 2011; 135(1), 55–62.1
4. Shitara K, Yatabe Y, Matsuo K, Sugano M, Kondo C, Takahari D, "et al", Prognosis of patients with advanced gastric cancer by HER2 status and trastuzumab treatment, Gastric Cancer 2013; 14: 261-267.
5. Moelans CB, de Weger RA, Ezendam C, van Diest PJ, HER-2/neu amplification testing in breast cancer by Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification: influence of manual- and laser microdissection, BMC Cancer 2009; 9(4): doi:10.1186/1471-2407-9-4.
6. Moelans C, van Diest P, N. A.Milne A, Johan A, Offerhaus A, HER-2/neu testing and therapy in gastroesophageal adenocarcinoma. Pathology Research International 2011; doi:10.4061/2011/674182.
7. Campbell N, Villaflor V, Neoadjuvant treatment of esophageal cancer, World J Gastroenterol, 2010;16(30): 3793-3803.
8. Brollo J, Kneubil MC, Botteri E, Rotmensz N, Duso BA, Fumagalli L, "et al", Locoregional recurrence in patients with HER2 positive breast cancer, Breast 2013; doi:10.1016/j.breast.2013.03.010.
9. Gullo G, Bettio D, Zuradelli M, Masci G, Giordano L, Bareggi C, "et al", Level of HER2/neu amplification in primary tumours and metastases in HER2-positive breast cancer and survival after trastuzumab therapy, Breast J 2013; 22: 190-3.
10. Seidel M.F., Wise B.L., Lane N.E, Nerve growth factor: an update on te science and therapy, Osteoarthritis and Cartilage 2013; 1223-1228.
11. Schouten JP., MC Elgunn Cg., Wuajjer R., Zwiynemburg D., Drepvens F., Pals G, Relative qualification of 40 nucleic acid sequence by Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification., Nucleic acid Res 2002; 30-57.
12. Kozlowsk P., Jasinska Ag., Kwiatkowski Dj., New application and development in the use of Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification, Electrophoresis 2008; 29: 4627-4636.
13. Traina A., Agostara B., Marasa L., Calabro M. JC., Zarcone M., Curraba G., HER2/neu expression in relation to clinicopathologic features of breast cancer patients., Ann Ny Acad Sci 2006; 1089:159-167.
14. Ayadi L., Khabir A., Amouri H., Karray S., Oammak A., Gaermazi M and ,"et al", Correlation of HER2 overexpression with chemicopathologic parameters in Tunisian breast carcinoma, Word J Sar oncol 2006; 6112.
15. Farshid G, Cheetham, Davies R, Validation of the Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) Technique for the Determination of HER2 Gene Amplification in Breast Cancer, Diagnostic Molecular Pathology 2011; 20 (1): 11–17.
16. Moerland E., Rens L. Hezik, Toine C.J.M., Mike W.P.M., Adriaan J.C., Detection of HER2 amplification in breast carcinomas: Comparison of Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) and Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) combined with automated spot counting., Analytical Cellular Pathology, 2006, 28, 151-159.
17. Moelans CB, Weger RA, Ezendam C, Elshof S, Tilanus MG, Diest PJ and ,"et al", HER-2/neu amplification testing in breast cancer by multiplex ligation-dependent probe amplification in comparison with immunohistochemistry and in situ hybridization, Cell Oncol 2009; 31(1): 1-10.
18. Stuppia L, Antonucci I, Palka G, Gatta V, Use of the MLPA assay in the molecular diagnosis of gene copy number alterations in human genetic diseases, Int J Mol Sci 2012; 13: 3245-3276.

Original Article

Evaluation of HER2/neu gene amplification (duplications) frequency in patients with breast cancer using MLPA method

Pourseidi B[1], Bazrafshani MR[2], Rastinnia S[3], HosseiniFS[4]*

[1]Associated Professor and Fellowship in advance laparoscopy, Kerman University of Medical Sciences
, Kerman, Iran
[2]Assistant Professor and Doctor of medical Genetics, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
[3]Resident of Surgery, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
[4]Master's degree in Biotechnology, Medical Genetics Laboratory of Dr. Bazrafshani
, Kerman, Iran
***Corresponding Author:** Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
Email: dr.rastinnia@yahoo.com

Abstract

Background & Objectives: *Her2/neu is a biomarker which is overexpressed in a subset of breast cancer patients who are eligible to receive treatment. Her-2 gene amplification analyzed by MLPA that is a new method to detect Her-2 status in clinical practice.*
Material and Methods: *60 patients, who were operated in Afzalipour Hospital of Kerman, were enrolled in this cross-sectional study. The pathologic specimens were evaluated by MLPA method for detecting HER2 overexpression. The data were analyzed by SPSS21 software and CHI SQUARE test.*
Results: *Correlation between HER2 overexpression and lymph node involvement was remarkable (P value=0.0). HER2 over overexpression and size of tumor had obvious relation (P value=0.036). All the patients with HER2 overexpression were stage3 of malignancy (P value=0.0).*
Conclusion: *According to the results of this study it can be concluded MLPA method is a suitable method for detecting overexpression of HER2 in patients with breast cancer.*
Keywords: *Breast Cancer, HER2/neu Overexpression, MLPA.*

Journal of North Khorasan University 2015;7(3): 519-526

Recivied: 5 Apr 2015
Revised:16 Aug 2015
Accepted:17 Nov 2015