ผลงานที่ใช้ในการประเมิน

เรื่อง

การเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์ยีน HER2 ด้วยเทคนิค Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) กับ เทคนิค Dual In Situ Hybridization (DISH)

Comparison of HER2 gene analysis by Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) and Dual In Situ Hybridization (DISH) techniques

โดย

นางสาวนิระชา ศรีวงษ์

นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ

ภารกิจด้านวิชาการและการแพทย์

ตำแหน่งเลขที่ ๔๗๑๖

กลุ่มงานชันสูตรพิเศษ ภารกิจด้านวิชาการและการแพทย์

สถาบันพยาธิวิทยา กรมการแพทย์

บทคัดย่อ

ที่มา: การตรวจหายีน HER2 ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านม ปัจจุบันจัดเป็นวิธีตรวจแบบ molecular targeted therapy วิธีหนึ่ง ซึ่งใช้ในการวางแผนการรักษาตรวจดูการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเต้านม

วิธีการ: เทคนิคที่ใช้ในการตรวจหายีน HER2 ได้แก่เทคนิค Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) และเทคนิค Dual In Situ Hybridization (DISH) งานวิจัยนี้ได้นำตัวอย่างจากสิ่งตรวจทั้งหมด 55 ตัวอย่าง นำมาเปรียบเทียบความแตกต่างของผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HER2 FISH กับ HER2 DISH โดยใช้เกณฑ์การแปลผล-ของ ASCO/CAP 2018 (ในงานวิจัยนี้จะแบ่งกลุ่มดังนี้ Positive หมายถึง ผลที่อยู่ใน Group 1 Equivocal หมายถึง ผลที่อยู่ใน Group 2, 3, และ 4 และ Negative หมายถึง ผลที่อยู่ใน Group 5)

ผลการทดลอง: จากการทดลองพบว่าสิ่งส่งตรวจ 55 ตัวอย่าง ให้ผลการวิเคราะห์ที่เหมือนกันทั้งหมด 48 ตัวอย่าง (คิดเป็น 87.27% ของตัวอย่างทั้งหมด) และให้ผลที่ต่างกัน 5 ตัวอย่าง (คิดเป็น 9.10% ชองตัวอย่างทั้งหมด) และอ่านผลไม่ได้ เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HER2 FISH แต่อ่านผลได้เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HER2 DISH จำนวน 2 ตัวอย่าง (คิดเป็น 3.63% ของตัวอย่างทั้งหมด) และเมื่อนำผลการดลองทั้งหมดมาทำการทดสอบทางสถิติ โดยใช้ Paired-Samples T-Test ได้ค่า *p*-Value = 0.159 (Sig > 0.05 ยอมรับสมมติฐานหลัก)

สรุป: การตรวจยีน HER2 ด้วยเทคนิค FISH และ DISH ให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

Abstract

Background: Determining the HER2 gene status in breast cancer patients is a sole predictive marker for treatment benefits from HER2 targeted therapy and important in the current diagnosis.

Methods: The methods used to determine HER2 gene status were Fluorescence In Situ hybridization (FISH) and Dual In Situ Hybridization (DISH). In the study, 55 specimens were compared between FISH and DISH method and interpret results using ASCO/CAP 2018 interpretive criteria (in this study, they are grouped as follows: Positive refers to results in Group 1, Equivocal refers to results in Group 2 3 4 and Negative refers to results that are in Group 5).

Results: Of the experiments, 55 specimens yielded the concordance results for a total of 48 samples (87.27% of total samples) and 5 discordant results (9.10% of total samples). The two samples uninterpretable by HER2 FISH technique, but we can interpret by the HER2 DISH technique (3.63% of the total samples). The experimental results were analyzed statistically using by Paired-Samples T-Test, the value of *p*-Value = 0.159 (Sig > 0.05 main hypothesis accepted).

Conclusions: It can be concluded that the HER2 gene test by FISH and DISH techniques provides the result is no different statistically significant.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	**ก**
ABSTRACT	**ข**
บทที่ 1 บทนำ	**1**
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	2
1.5 หน่วยงานที่นำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์	2
บทที่ 2 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง	**3**
2.1 การตรวจยีน HER2 ด้วยเทคนิค Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)	4
2.2 การตรวจยีน HER2 ด้วยเทคนิค Dual Stain In Situ Hybridization (DISH)	5
บทที่ 3 วิธีการทดลอง	**8**
3.1 การย้อม HER2 FISH	8
3.2 การย้อม HER2 DISH	13
3.3 การแปลผลสไลด์ ISH (HER2 FISH และ HER2 DISH)	15
บทที่ 4 ผลการทดลอง	**16**
บทที่ 5 สรุป และวิจารณ์	**30**
เอกสารอ้างอิง	**31**
ภาคผนวก	**35**
1. การเตรียมสารเคมี	35
2. ค่าต่างๆ ที่ได้จากการทดลอง	36

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

จากการศึกษาของ Global Cancer 2020 พบว่ามะเร็งเต้านมเป็นมะเร็งที่พบบ่อยที่สุด ทั้งในเพศหญิงและเพศชาย โดยทั่วโลกมีผู้ป่วยมะเร็งเต้านมรายใหม่ ปีละ 2.26 ล้านคน หรือมีผู้ป่วยมะเร็งเต้านมรายใหม่ชั่วโมงละ 258 คน ประเทศไทยพบผู้ป่วยมะเร็งเต้านมเป็นมะเร็งที่พบมากเป็นอันดับ 1 ในเพศหญิง โดยพบมะเร็งเต้านมรายใหม่ 22,158 รายต่อปี หรือชั่วโมงละ 2.5 คน และมีผู้เสียชีวิตจากมะเร็งเต้านม 8,266 รายต่อปี หรือชั่วโมงละ 0.94 คน จึงถือว่ามะเร็งเต้านมเป็นภัยร้ายต่อผู้หญิงทั้งในระดับโลกและในประเทศไทย[1] ผู้ป่วยมะเร็งเต้านม 10-20% จะมีโปรตีน HER2 หรือ ยีนที่ผลิตโปรตีน HER2 นี้มากกว่าปกติ[2-4] การตรวจหาโปรตีน HER2 และยีน HER2 เป็นขั้นตอนสำคัญ เพื่อให้แพทย์สามารถรักษาโดยการใช้ยาได้อย่างตรงเป้า

ปัจจุบันการรักษาโรคมะเร็งด้วยยาชนิดต่างๆ ได้มีวิวัฒนาการไปอย่างมาก เนื่องจากความก้าวหน้าในการศึกษาวิจัยถึงระดับโมเลกุลและกระบวนการทั้งภายใน ภายนอกเซลล์ที่เป็นปัจจัยสำคัญต่อการเกิดและเติบโตของเซลล์มะเร็ง ซึ่งนำไปสู่การพัฒนายาที่ออกฤทธิ์เฉพาะระดับโมเลกุล ยีน หรือกระบวนการทางชีวเคมีต่างๆ โดยสามารถยับยั้งการทำงานของโมเลกุลหรือกระบวนการดังกล่าวได้อย่างมีเป้าหมายจำเพาะและสามารถหยุดการเติบโต (proliferation) หรือการลุกลาม (invasion) และการแพร่กระจาย (metastasis) ของโรคมะเร็งได้อย่างมีประสิทธิภาพ แนวทางดังกล่าวนี้เรียกว่า molecular targeted therapy[5]

การตรวจหายีน HER2 ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมเป็นวิธีหนึ่งที่เรียกได้ว่าเป็นวิธี molecular targeted therapy ซึ่งใช้ในการรักษาหรือตรวจดูการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเต้านม ซึ่งเทคนิคที่ใช้ในการตรวจหายีน HER2 ได้แก่เทคนิค Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) และเทคนิค Dual In Situ Hybridization (DISH)

สถาบันพยาธิวิทยา กรมการแพทย์ให้บริการตรวจวิเคราะห์ ยีน HER2 ด้วยเทคนิคทั้งสองนี้ จึงเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งว่า การตรวจวิเคราะห์ในสิ่งส่งตรวจเดียวกัน ด้วยสองวิธีนี้ให้ผลที่สอดคล้องหรือแตกต่างกันอย่างไร เนื่องจากทั้งสองเทคนิคนี้มีความแตกต่างกันในขั้นตอนการวิเคราะห์ โดยเทคนิค FISH ใช้การวิเคราะห์แบบ manual ซึ่งใช้เวลาในการวิเคราะห์ตรวจหายีน HER2 ประมาณ 36 ชั่วโมง และต้องอ่านผลด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด fluorescence ในขณะที่การตรวจยีน HER2 ด้วยเทคนิค DISH ใช้เครื่องอัตโนมัติ ใช้เวลาในการวิเคราะห์ตรวจยีน HER2 ประมาณ 8 ชั่วโมง และอ่านผลด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาได้ ซึ่งการทำวิจัยนี้นำตัวอย่างจากสิ่งส่งตรวจทั้งหมด 55 ตัวอย่าง โดย 1 ตัวอย่าง จะตัดพาราฟินบล็อกที่ความหนา 3 ไมครอน

ทั้งหมด 3 สไลด์ จากนั้นอบสไลด์ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง โดยนำสไลด์ที่ 1 ย้อม HER2 FISH สไลด์ที่ 2 ย้อม HER2 DISH และสไลด์ที่ 3 ย้อมสี H&E จากนั้นนำสไลด์ที่ทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทั้งสองมาอ่านผล สไลด์ที่ย้อมด้วยเทคนิค FISH จะอ่านผลด้วยกล้องจุลทรรศน์ fluorescence โดยใช้ Filter 4 ชนิด ดูประกอบกัน คือ filter สำหรับดู DAPI, filter สำหรับสีเขียว, filter สำหรับสีส้ม และ filter สำหรับสีเขียว/ส้ม สไลด์ที่ย้อมด้วยเทคนิค DISH จะอ่านผลด้วยกกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง โดยการตรวจหา HER2 และโครโมโซม 17 จะใช้ probe two-color chromogenic in situ hybridization (ISH) โดยใช้เครื่อง BenchMark IHC/ISH instruments จากนั้นแปลผลสไลด์ HER2 FISH และ HER2 DISH โดยใช้เกณฑ์ ASCO/CAP 2018 โดยในงานวิจัยนี้จะแบ่งกลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่เป็น Positive หมายถึง ผลที่อยู่ใน Group 1 กลุ่มที่เป็น Equivocal หมายถึง ผลที่อยู่ใน Group 2, 3 และ 4 และกลุ่มที่เป็น Negative หมายถึง ผลที่อยู่ใน Group 5

นอกจากผู้ทำการวิจัยต้องการนำเสนอผลที่ได้จากการตรวจหายีน HER2 ทั้งสองเทคนิคว่าแตกต่างกันหรือไม่แล้วยังนำเสนอเป็นแนวทางให้โรงพยาบาลรัฐ โรงพยาบาลเอกชน รวมถึงสถาบันต่างๆ ที่มีความสนใจที่จะเปิดให้บริการตรวจยีน HER2 ได้เลือกเทคนิคที่เหมาะสม เพื่อใช้ในการตรวจรักษาคนไข้ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อเปรียบเทียบผลการตรวจยีน HER2 ด้วยเทคนิค HER2 FISH กับ HER2 DISH

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาเปรียบเทียบผลการตรวจยีน HER2 ด้วยเทคนิค HER2 FISH กับ HER2 DISH

1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ข้อมูลที่เป็นแนวทางในการตัดสินใจเลือกใช้วิธีการตรวจยีน HER2 เพื่อประโยชน์ในการนำไปใช้ตรวจรักษาคนไข้ต่อไป

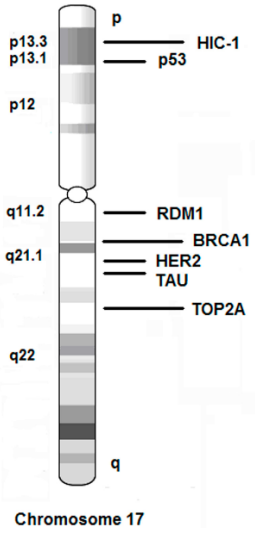
1.5 หน่วยงานที่นำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. สถาบันพยาธิวิทยา กรมการแพทย์
2. หน่วยงานของภาครัฐหรือเอกชนที่เกี่ยวข้องและสนใจข้อมูลที่ได้ศึกษาในงานวิจัยนี้

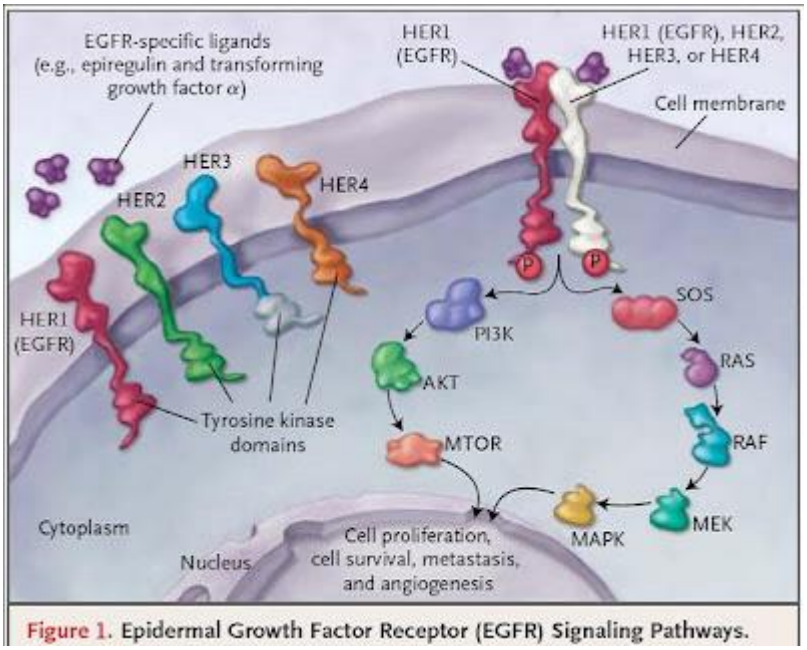
บทที่ 2

ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

ยีน HER2 คือ Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 อาจเรียกว่า ErbB2 หรือ Neu อยู่บน chromosome 17q21 ถอดรหัสโปรตีนเป็น transmembrane tyrosine kinase receptor มีขนาด 185 kDa HER2 หรือ ErbB2 จัดอยู่ในกลุ่ม epidermal growth factor receptor (EGFR) หรือ HER family ซึ่งมีอยู่ 4 ชนิด คือ EGFR/HER1, HER2, HER3 และ HER4 โดยทุกชนิดจะมีส่วนโครงสร้างที่คล้ายกันคือ extracellular ligand-binding domain, Short hydrophobic transmembrane region (lipophilic transmembrane domain) และ cytoplasmic tyrosine kinase domain (intracellular tyrosine kinase domain) เมื่อมีการกระตุ้น receptor kinase จะนำไปสู่การเกิด phosphorylation ของ tyrosine residues อื่นๆ phosphorylated tyrosine residues ที่อยู่ภายใน receptors จะเป็นสื่อในการกระตุ้น signaling pathways ทำให้เซลล์มีการเจริญเติบโต เปลี่ยนรูปร่างและมีชีวิตรอด[6]



รูปที่ 1 ภาพโครโมโซม 17[7]



รูปที่ 2 Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) signaling pathways[8]

การเพิ่มจำนวนของยีน HER2 ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านม ถูกรายงานครั้งแรกในปี 1987[9] และต่อจากนั้นได้รับการยืนยันว่า ร้อยละ 15-20 ของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม มีการแสดงออกหรือเพิ่มจำนวนของยีน HER2 (HER2 amplification)[2-4]

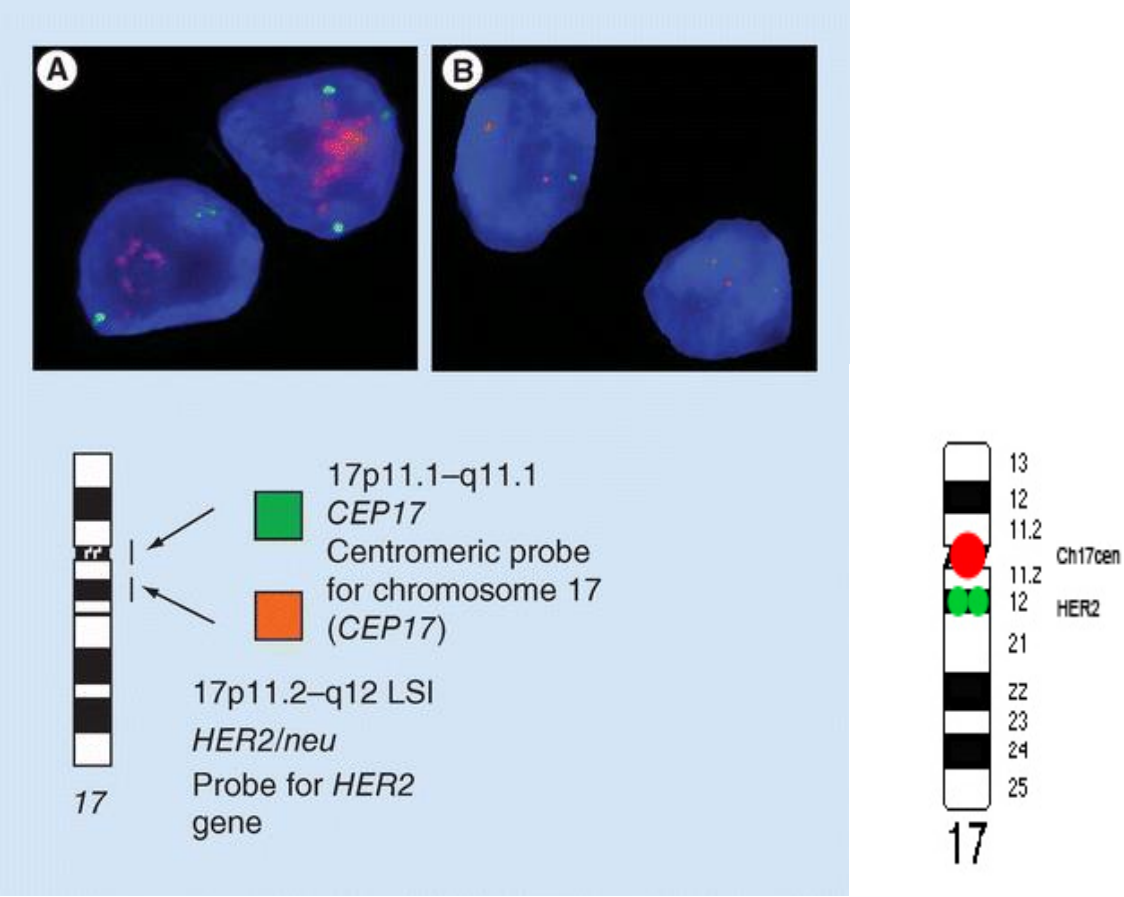
ดังนั้นการตรวจหายีน HER2 จึงมีความสำคัญ ทั้งการตรวจเพื่อเป็นแนวทางในการรักษาหรือเพื่อดูการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเต้านม[10-18] ซึ่งการตรวจนั้นจะใช้ทั้งการตรวจด้วยเทคนิค IHC (immunohistochemistry) และ FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) เพื่อตรวจ HER2 และเลือกการรักษา[19]

ซึ่งที่ผ่านมา การตรวจด้วยเทคนิค FISH ถือว่าเป็น gold standard สำหรับการตรวจยีน HER2 ในขณะที่ปัจจุบันการตรวจด้วยเทคนิค DISH ที่ใช้ prob ตรวจโครโมโซม HER2 และโครโมโซม 17 เช่นกัน โดยทั้งสองเทคนิคนี้ใช้ตรวจจากตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งเต้านมที่ fix formalin และ embedded ด้วยพาราฟิน ซึ่งข้อดีของเทคนิค DISH คือ สามารถดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ light microscope ได้ และสามารถเก็บสไลด์ที่ตรวจไว้ได้เป็นเวลานาน[2]

2.1 การตรวจ HER2 ด้วยเทคนิค Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)

เป็นเทคนิคที่นำชิ้นเนื้อจาก Paraffin block มาตัดให้มีความหนา 3 ไมครอน แล้ววางบนสไลด์ จากนั้นย้อมด้วยสารเรืองแสงที่จำเพาะต่อยีน HER2 โดยใช้ probe ที่เรืองแสง fluorescence ได้ ไปจับกับยีน HER2 ซึ่งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 17 โดยการวิเคราะห์ผลจะดูจากอัตราส่วนระหว่างยีน HER2 ต่อโครโมโซม

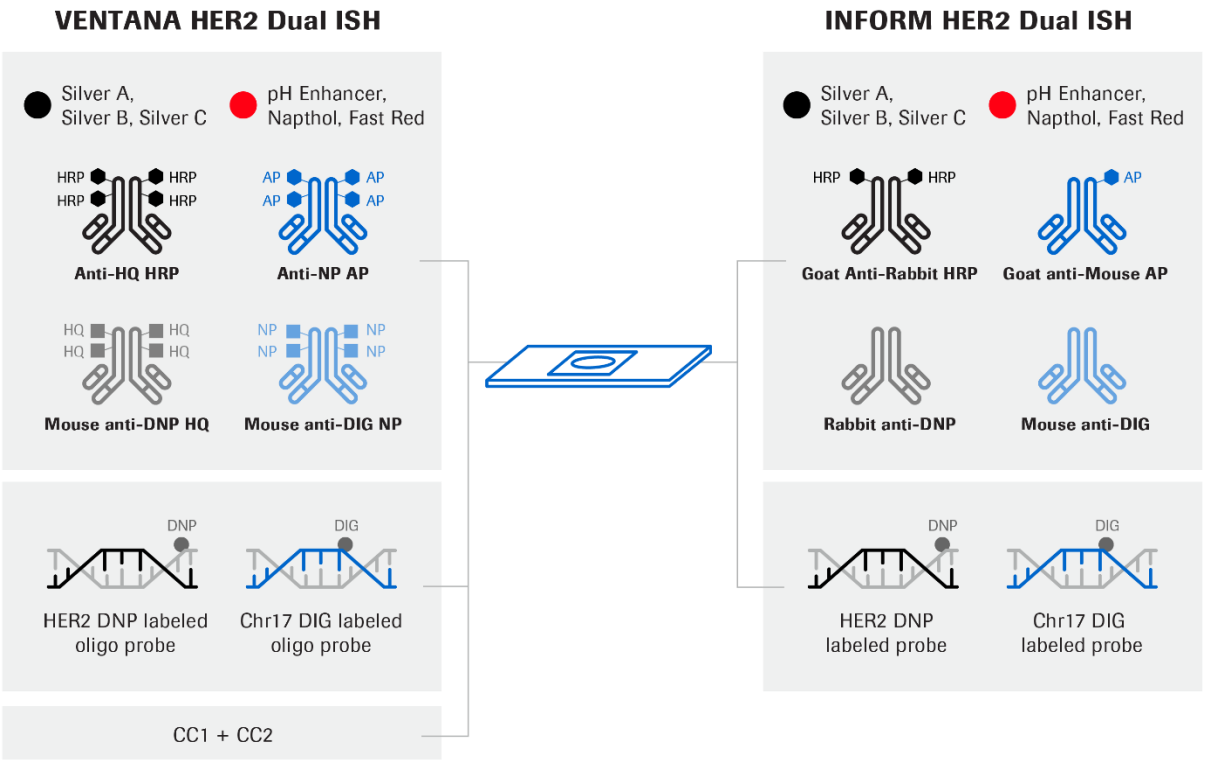
แท่งที่ 17 โดยยีน HER2 มีสัญญานแสงสีแดง ส่วนโครโมโซมแท่งที่ 17 มีสัญญาณแสงสีเขียว แล้ววิเคราะห์ด้วยกล้อง fluorescence[21]



รูปที่ 3 การย้อมด้วยเทคนิค HER2 FISH[22]

2.2 การตรวจยีน HER2 ด้วยเทคนิค Dual Stain In Situ Hybridization (DISH)

การย้อมด้วยเทคนิค DISH เป็นเทคนิคที่ใช้ VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาสถานะของ ยีน HER2 จากอัตราส่วนของยีน HER2 ต่อโครโมโซม 17 ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง โดยการตรวจหา HER2 และโครโมโซม 17 จะใช้ probe two-color chromogenic in situ hybridization (ISH) ตรวจใน Formalin-Fixed & Paraffin-Embedded (FFPE) ในชิ้นเนื้อมะเร็งเต้านม โดยใช้เครื่อง BenchMark IHC/ISH instruments[23-24]



รูปที่ 4 ภาพการย้อม HER2 DISH[25]

ตารางเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ HER2 ยีน ด้วยเทคนิค FISH กับเทคนิค DISH

FISH	DISH
1. อนุมัติให้ใช้จาก International guideline (ASCO 2018)[26]	1. อนุมัติให้ใช้จาก International guideline (ASCO 2018)[26]
2. FDA approved	2. FDA approved
3. อ่านสไลด์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ fluorescence[27]	3. อ่านสไลด์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา[27]
4. อ่านผลด้วยกล้องที่กำลังขยาย 100[27]	4. อ่านผลด้วยกล้องที่กำลังขยาย 60[27]
5. อาจจะยากในการวินิจฉัย invasive cancer cell โดยเฉพาะในเคส extensive intraductal component[27]	5. ง่ายต่อการวินิจฉัย invasive cancer cell[27]
6. HER2/CEN17 ratio provide[27]	6. HER2/CEN17 ratio provide[27]
7. ไม่สามารถเก็บสไลด์ได้อย่างถาวร (เนื่องจาก fluorescence จะเสื่อมสภาพแล้วหายไป)[27,28]	7. สามารถเก็บสไลด์ได้แบบถาวรเพื่อนำกลับมาอ่านใหม่ได้[27,28]
8. ราคา 10,000 บาท/สไลด์	8. ราคา 10,000 บาท/สไลด์
9. ไม่ได้ใช้เครื่องอัตโนมัติ[27]	9. ใช้เครื่องอัตโนมัติ[27]
10. ระยะเวลาย้อมสไลด์ 36 ชั่วโมง[29,30]	10. ระยะเวลาย้อมสไลด์ 8 ชั่วโมง[29-30]

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

นำตัวอย่างจากสิ่งสิ่งตรวจชิ้นเนื้อมะเร็งเต้านมที่ fix formalin และ embedded ด้วยพาราฟิน ทั้งหมด 55 ตัวอย่าง โดย 1 ตัวอย่างจะตัดพาราฟินบล็อกที่ความหนา 3 ไมครอน แล้ววางบนสไลด์ ทั้งหมด 3 สไลด์ต่อ 1 ตัวอย่าง จากนั้นนำสไลด์อบที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง โดยสไลด์แผ่นที่ 1 ย้อม HER2 FISH สไลด์แผ่นที่ 2 ย้อม HER2 DISH และสไลด์แผ่นที่ 3 ย้อมสไลด์ H&E

3.1 การย้อม HER2 FISH[31]

3.1.1 หลักการ

เป็นการตรวจหายีน HER2 โดยอาศัยเทคนิค Fluorescence In Situ Hybridization จากสิ่งส่งตรวจ Formalin fixed - paraffin embedded tissue

3.1.2 ผู้รับผิดชอบ

1. นักวิทยาศาสตร์การแพทย์
2. เจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการ

3.1.3 เครื่องมือ/อุปกรณ์

1. เครื่องควบคุมอุณหภูมิ Hybridizer
2. ถุงมือยาง ผ้าปิดจมูก
3. ถุงขยะดำ และถุงขยะติดเชื้อ
4. พลาสติกกันเปื้อนและ/หรือเสื้อกาวน์
5. ปากกาเคมี ดินสอ ปากกาเขียนแก้ว (ปากกา Permanent)
6. Micropipette tip ขนาด 20 µl
7. Micropipette tip ขนาด 200 µl
8. Micropipette tip ขนาด 1,000 µl
9. Micropipette ขนาด 10 - 20 µl
10. Micropipette ขนาด 20 - 200 µl
11. Micropipette ขนาด 100 – 1,000 µl
12. Vortex mixer
13. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

14. Coplin Jar แก้ว
15. Coplin Jar พลาสติก
16. Forceps
17. Thermometer
18. Coated glass slide & cover glass
19. Fluorescence Microscope

3.1.4 สารเคมี

1. PATH Vysion HER-2 DNA Probe kit (20 assays, Abbott)
2. Pepsin, (Lyophilized powder, USB Corporation)
3. Xylene (Commercial grade)
4. Absolute ethanol (Commercial grade)
5. Pretreatment Solution
6. Protease Buffer
7. Post Hybridization Solution

3.1.5 การวิเคราะห์ตัวอย่าง

วันที่ 1: Pretreatment and Hybridization

1. ละลายสาร Pepsin ปริมาณ 200 มิลลิกรัม ในสารละลาย Protease buffer ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เทลงในcoplin jar นำไปใส่ใน water bath (เครื่องเล็ก) เปิดให้ water bath ทำงานที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ควรละลาย Pepsin ทิ้งไว้ก่อนประมาณ 30 – 60 นาที ก่อนเริ่มใช้งาน
2. เทสารละลาย Pretreatment ประมาณ 50 มิลลิลิตร ลงใน coplin jar นำไปใส่ใน water bath (เครื่องใหญ่) เปิดให้ water bath ทำงานที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ควรเปิด water bath ทิ้งไว้ก่อนเริ่มลงมือปฏิบัติงานอย่างน้อย 1 ชั่วโมง
3. เปิดเครื่อง Hybridizer และเริ่มทำการ Deparaffinization และ Rehydration สไลด์ เริ่มจาก

    - Xylene 5 นาที / 3 Jar
    - Absolute alcohol 1 นาที / 2 Jar

    ปล่อยสไลด์ให้แห้งในอากาศหรือวางสไลด์ในเครื่อง Hybridizer จะช่วยให้สไลด์แห้งเร็วขึ้น จากนั้นใช้ปากกาเพชรขีดหลังสไลด์รอบขอบเขตของชิ้นเนื้อ

4. แช่สไลด์ในสารละลาย Pretreatment Solution ที่อยู่ใน water bath 80 องศาเซลเซียส ปล่อยทิ้งไว้นาน 15 นาที เมื่อครบเวลาแล้วนำสไลด์มาแช่ในน้ำกลั่น นาน 3 นาที
5. ซับน้ำส่วนเกินออกจากสไลด์ จากนั้นแช่สไลด์ในสารละลาย Pepsin solution ที่อยู่ใน water bath 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที สังเกตุได้จากความโปร่งใสของชิ้นเนื้อสามารถมองทะลุได้
6. ล้างสไลด์ในน้ำกลั่นนาน 3 นาที จากนั้นซับน้ำส่วนเกินออกจากสไลด์ แล้วปล่อยให้สไลด์แห้งในอากาศ หรือวางสไลด์ในเครื่อง Hybridizer เพื่อให้สไลด์แห้งเร็วขึ้น (ใช้อุณหภูมิได้ถึง 45 – 50 องศาเซลเซียส)
7. Dehydration สไลด์ ในสารละลาย alcohol ความเข้มข้น 70%, สารละลาย alcohol ความเข้มข้น 85% และ absolute alcohol อย่างละ 1 นาที ตามลำดับ สามารถแช่สไลด์ไว้ใน absolute alcohol ได้จนกว่าจะพร้อมที่จะเริ่มทำขั้นต่อไป
8. นำสไลด์ออกจากสารละลาย absolute alcohol ซับแอลกอฮอล์ส่วนเกินออก แล้วปล่อยสไลด์ให้แห้งสนิท เพื่อให้ alcohol ระเหยออกไปให้หมด หรืออาจวางสไลด์ในเครื่อง Hybridizer เพื่อให้สไลด์แห้งเร็วขึ้น
9. หยด Probe ลงบนกลาง cover slip นำสไลด์ชิ้นเนื้อคว่ำลงบน cover slip ที่มี Probe อยู่ นำสไลด์ไปใส่ในเครื่อง Hybridizer เลือกโปรแกรมที่ 2 เพื่อทำ Denaturation และ Hybridization ของเทคนิค FISH กดปุ่ม start ให้เครื่องเริ่มทำงาน (ปริมาณ Probe และขนาดของ cover slip ที่ใช้ขึ้นอยู่กับขนาดของชิ้นเนื้อ)

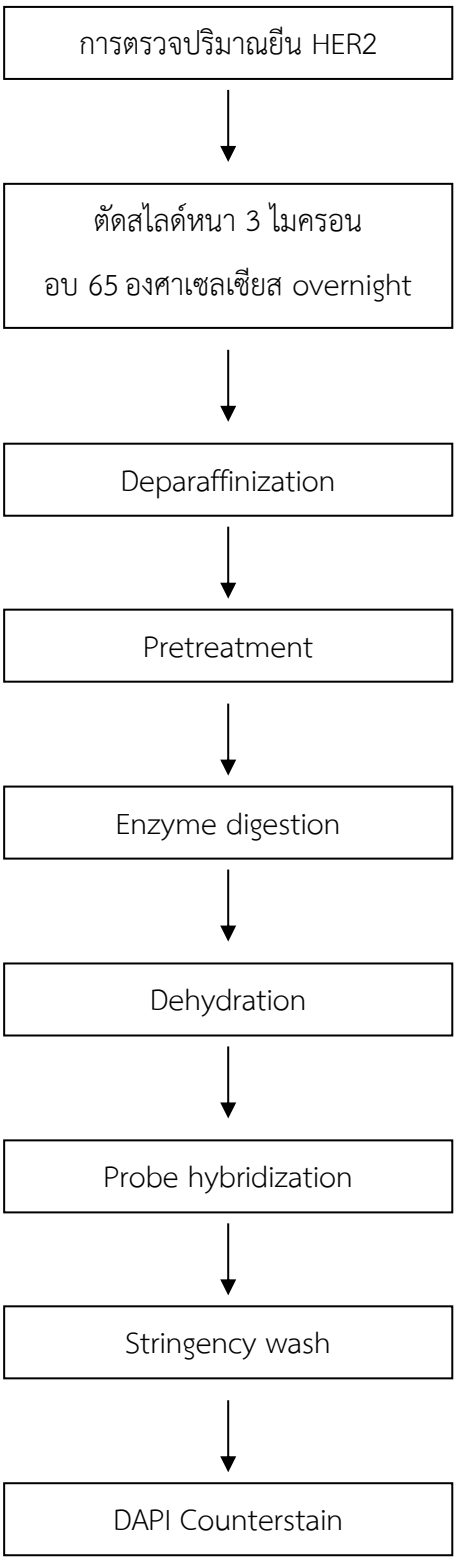
    - Cover slip ขนาด 22x22 mm. ใช้ probe ปริมาตร 7 - 10 µl
    - Cover slip ขนาด 22x30 mm. ใช้ probe ปริมาตร 12 - 15 µl
    - Circular cover slip ขนาดเล็ก ใช้ probe ปริมาตร 4 µl
    - Circular cover slip ขนาดใหญ่ ใช้ Probe ปริมาตร 5 µl

วันที่ 2 : Post Hybridization

1. เทสารละลาย Post hybridization solution ลงใน coplin jar 3 โถ โถที่ 1 และ 2 วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง ส่วนโถที่ 3 นำไปวางไว้ใน water bath (เครื่องใหญ่) เปิดให้ water bath ทำงานที่อุณหภูมิ 73 องศาเซลเซียส ควรเปิด water bath ทิ้งไว้ก่อนเริ่มปฏิบัติงานอย่างน้อย 1 ชั่วโมง
2. นำสไลด์ออกจากเครื่อง Hybridizer แล้วแช่ลงในสารละลาย Post hybridization solution โถที่ 1 ซึ่งวางอยู่ที่อุณหภูมิห้อง เขย่าสไลด์เบาๆ เพื่อให้ cover slip หลุดออกหรืออาจใช้ forceps ค่อยๆ คีบออกก็ได้
3. นำสไลด์แช่ลงในสารละลาย Post-hybridization solution ที่วางอยู่ใน Water bath 73 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที ในระหว่างนี้ให้ยกสไลด์ขึ้น-ลงด้วย

4. นำสไลด์แช่ลงในสารละลาย Post-hybridization solution โถสุดท้ายที่วางอยู่ที่อุณหภูมิห้อง ยกสไลด์ขึ้นลง
5. นำสไลด์ออกจากโถ ปล่อยให้สไลด์แห้งในที่มืด หรืออาจวางสไลด์ไว้ในเครื่อง Hybridizer ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 45–50 องศาเซลเซียส ก็ได้ เมื่อสไลด์แห้งแล้วจึงหยด DAPI ประมาณ 5 – 10 µl ทับลงบนชิ้นเนื้อ ปิดด้วย Cover slip และ seal รอบ cover slip ด้วยน้ำยาทาเล็บ
6. เก็บสไลด์ไว้ในที่มืดและเย็น (ช่องน้ำแข็งของตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส) ประมาณ 10 นาที เพื่อกระตุ้นให้สาร anti-fade ทำงาน นำไปนับจำนวนของ signal และหลังจากที่ดูสไลด์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Fluorescence เสร็จแล้ว ให้เก็บสไลด์ไว้ในที่มืดและเย็น (ช่องน้ำแข็งของตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส) เช่นเดียวกัน

วิธีปฏิบัติ (ต่อ)


การตรวจปริมาณยีน HER2
ตัดสไลด์หนา 3 ไมครอน
อบ 65 องศาเซลเซียส overnight
Deparaffinization
Pretreatment
Enzyme digestion
Dehydration
Probe hybridization
Stringency wash
DAPI Counterstain

3.1.6 การอ่านผล

1. นำสไลด์ที่ย้อมเสร็จเรียบร้อยแล้วไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ fluorescence โดยใช้ Filter 4 ชนิด ดูประกอบกันคือ filter สำหรับดู DAPI, filter สำหรับสีเขียว, filter สำหรับสีส้ม และ filter สำหรับสีเขียว/ส้ม
2. ใช้ filter สำหรับ DAPI เพื่อหาบริเวณที่มีเซลล์มะเร็งอยู่และใช้ดูขอบเขตของนิวเคลียส จากนั้นใช้ filter ที่เหลืออีกสามอันนับจำนวนสัญญาณสีส้มและสีเขียว โดยเลือกนับเฉพาะสัญญาณจากเซลล์มะเร็งที่แยกกันอยู่เดี่ยวๆ และมีทั้งสัญญาณสีเขียวและสีส้มตั้งแต่ 1 อันขึ้นไป ส่วนเซลล์ที่ซ้อนทับกันและมีสัญญาณเพียงสีใดสีหนึ่งจะไม่นับ
3. นับรวมกันให้ได้ 20 เซลล์ภายใน 5 field และบันทึกผลการนับลงในแบบฟอร์มการตรวจนับ จากนั้นจึงทำการ screen ทั้งสไลด์อีกครั้งหนึ่งเพื่อตรวจดูว่าไม่มีสิ่งใดผิดปกติ

3.2 การย้อม HER2 DISH [32,33]

นำสไลด์ตัวอย่างที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง ทำการย้อม DISH ด้วยน้ำยา VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail โดยใช้เครื่องระบบย้อมสไลด์อัตโนมัติรุ่น BenchMark Ultra

3.2.1 หลักการ

VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาสถานะของ ยีน HER2 จากอัตราส่วนของยีน HER2 ต่อโครโมโซม 17 ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง โดยการตรวจหา HER2 และโครโมโซม 17 จะใช้ probe two-color chromogenic in situ hybridization (ISH) ตรวจใน FFPE ในชิ้นเนื้อมะเร็งเต้านม โดยใช้เครื่อง BenchMark IHC/ISH instruments

3.2.2 การปฏิบัติงาน

1. นำสไลด์ในส่วนของการย้อม HER2 DISH ออกจากตู้อบ แล้วนำเข้าเครื่องย้อมโดยมาวางในถาดวางสไลด์ ให้ด้านที่มีฉลากบาร์โค้ดเข้าหาตัวเครื่อง
2. ย้อมสไลด์ด้วยเครื่องย้อมสไลด์อัตโนมัติ โดยเครื่อง BenchMark IHC/ISH instruments
3. นำสไลด์ที่ย้อมเสร็จแล้ว ไป dehydrate มีขั้นตอนดังนี้
   3.1 จุ่มล้างสไลด์ในน้ำผสมน้ำยาล้างจาน เพื่อล้างน้ำมัน (Ultra LCS)
   3.2 จุ่มล้างสไลด์ในน้ำประปา เพื่อล้างฟองน้ำยาล้างจาน
   3.3 จุ่มสไลด์ในน้ำกลั่น เพื่อล้างน้ำประปา
   3.4 ผึ่งสไลด์ให้แห้ง ประมาณ 5 นาที
   3.5 นำสไลด์ไปอบในตู้อบ 60 องศาเซลเซียส ประมาณ 15 นาที

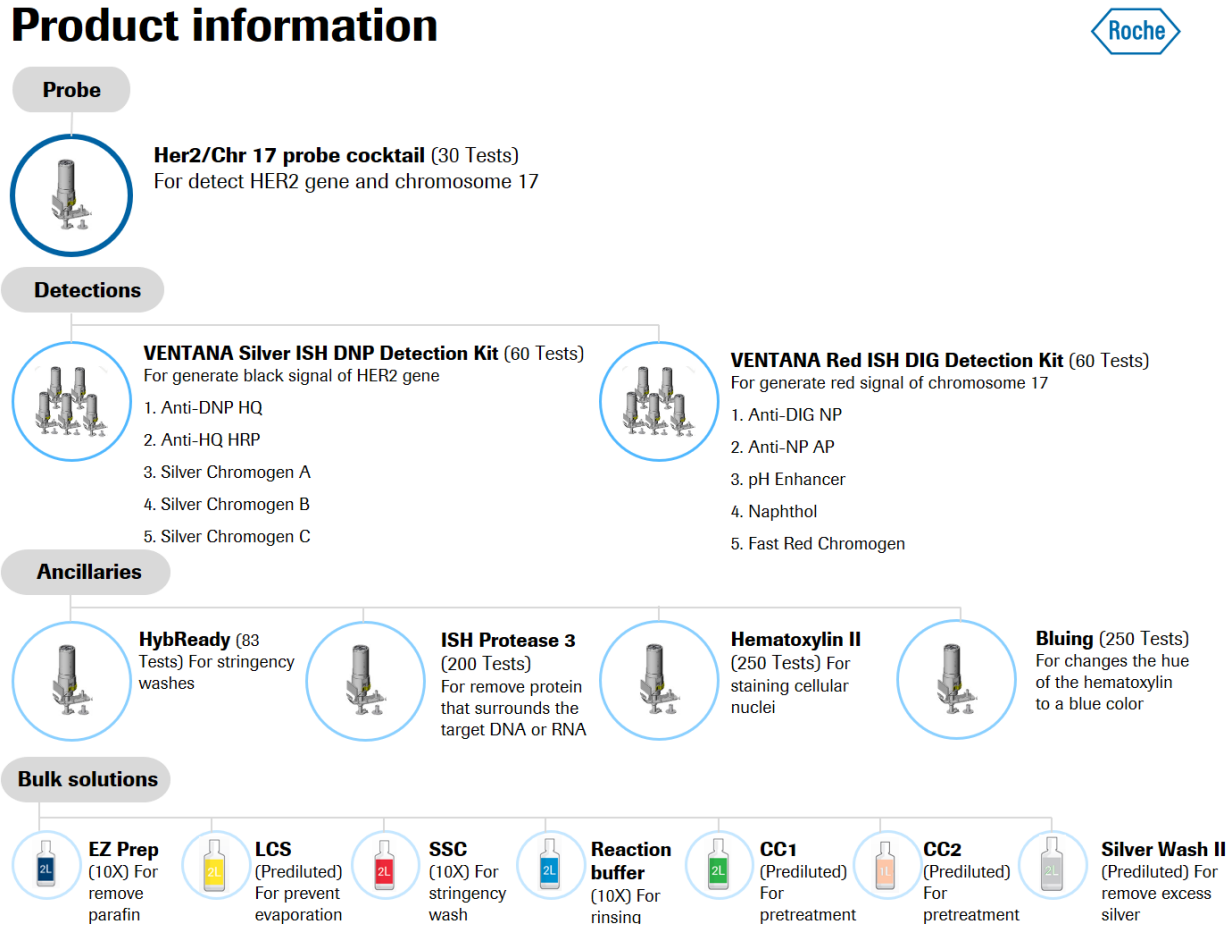
3.6 จุ่มสไลด์ใน xylene

3.7 หยด mounting media ลงบนสไลด์ จากนั้นปิดทับด้วย coverslip

3.8 ผึ่งสไลด์ให้แห้ง ประมาณ 5 นาที

3.9 เช็คคุณภาพของสไลด์ โดยดูการติดสีของ positive control ก่อนส่งให้พยาธิแพทย์ (2-3)

3.2.3 น้ำยาที่ใช้



3.3 การแปลผลสไลด์ ISH (HER2 FISH และ HER2 DISH) ตามเกณฑ์ ASCO/CAP 2018

พยาธิแพทย์ควรสแกนสไลด์ ISH ทั้งหมดก่อนที่จะนับจำนวน HER2 และโครโมโซม 17 อย่างน้อย 20 invasive carcinoma cell หรือใช้ IHC เพื่อกำหนดพื้นที่ของ HER2 amplification ที่อาจเกิดขึ้น โดยใช้เกณฑ์ INTERPRETATION GUIDELINE (ASCO 2018)

INTERPRETATION GUIDELINE (ASCO 2018)[33]

Group 1 = HER2/CEP17 ratio ≥2 with an average HER2 copy number ≥4.0 HER2 signals/cell

Group 2 = HER2/CEP17 ratio ≥2.0 with an average HER2 copy number <4.0 HER2 signals/cell

Group 3 = HER2/CEP17 ratio <2.0 with an average HER2 copy number ≥6.0 HER2 signals/cell

Group 4 = HER2/CEP17 ratio <2.0 with an average HER2 copy number ≥4.0 and <6.0 HER2 signals/cell

Group 5 = HER2/CEP17 ratio <2.0 with an average HER2 copy number <4.0 HER2 signals/cell

Reporting Results of HER2 Testing by In Situ Hybridization (dual-probe assay)

Result	**Criteria (dual-probe assay)**
Negative	● Group 5
Negative* (see comment)	● Group 2 and concurrent IHC 0-1+ or 2+ ● Group 3 and concurrent IHC 0-1+ ● Group 4 and concurrent IHC 0-1+ or 2+
Positive*	● Group 2 and concurrent IHC 3+ ● Group 3 and concurrent IHC 2+ or 3+ ● Group 4 and concurrent IHC 3+
Positive	● Group 1

หมายเหตุ: ในงานวิจัยนี้จะแบ่งกลุ่มดังนี้

Positive หมายถึง ผลที่อยู่ใน Group 1

Equivocal หมายถึง ผลที่อยู่ใน Group 2, 3 และ 4

Negative หมายถึง ผลที่อยู่ใน Group 5

บทที่ 4

ผลการทดลอง

จากการนำตัวอย่างจากสิ่งสิ่งตรวจทั้งหมด 55 ตัวอย่าง โดยมีกลุ่ม Positive กลุ่ม Negative และกลุ่ม Equivocal เมื่อนำมาเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HER2 FISH กับ HER2 DISH พบว่าให้ผลการวิเคราะห์ที่เหมือนกันทั้งหมด 48 ตัวอย่าง (คิดเป็น 87.27% ของตัวอย่างทั้งหมด) และให้ผลที่ต่างกัน 5 ตัวอย่าง (คิดเป็น 9.10% ชองตัวอย่างทั้งหมด) และอ่านผลไม่ได้ เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HER2 FISH แต่อ่านผลได้เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HER2 DISH จำนวน 2 ตัวอย่าง (คิดเป็น 3.63% ของตัวอย่างทั้งหมด) โดยมีรายละเอียดดังนี้

ตัวอย่างที่ให้ผลจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HER2 FISH และ HER2 DISH เป็น Positive เหมือนกัน จำนวน 32 ตัวอย่าง (ตารางที่ 4.1)

ตัวอย่างที่ให้ผลจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HER2 FISH และ HER2 DISH เป็น Negative เหมือนกัน จำนวน 10 ตัวอย่าง (ตารางที่ 4.2)

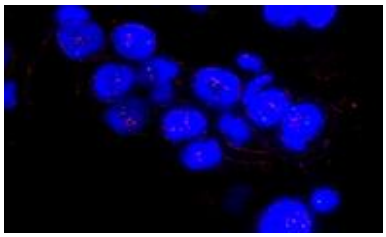
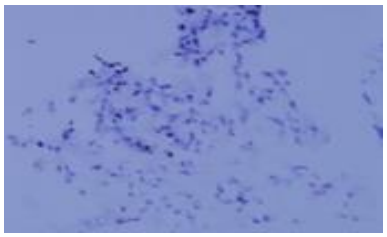
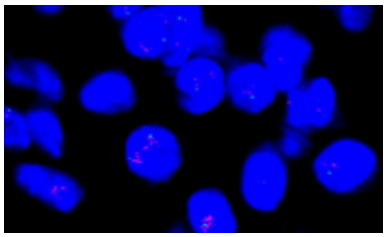
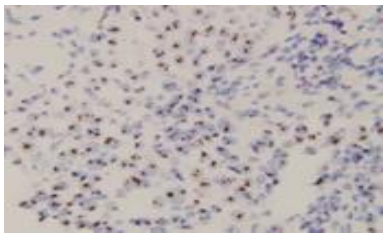
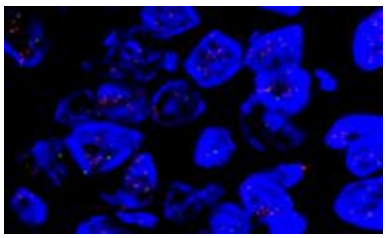
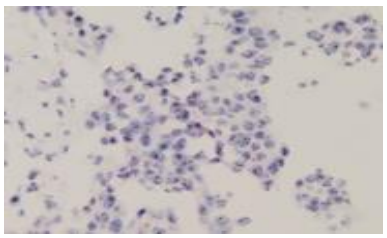
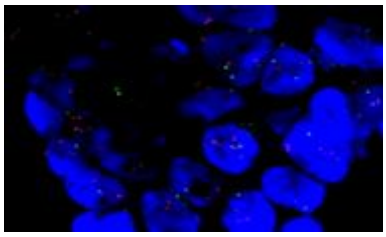
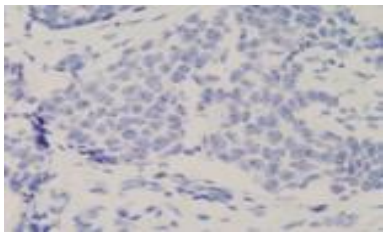
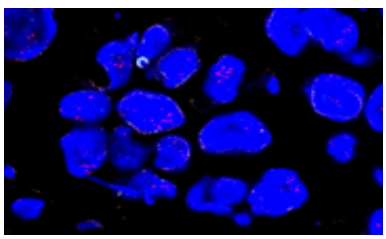
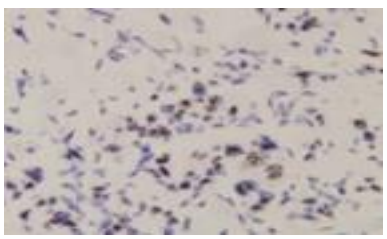
ตัวอย่างที่ให้ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HER2 FISH และ HER2 DISH เป็น Equivocal หมือนกันทั้งหมด 6 ตัวอย่าง (ตารางที่ 4.3)

ตัวอย่างที่ให้ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HER2 FISH และ HER2 DISH ต่างกัน จำนวน 5 ตัวอย่าง (ตารางที่ 4.4)

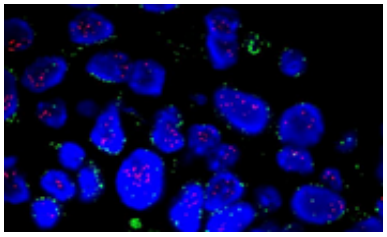
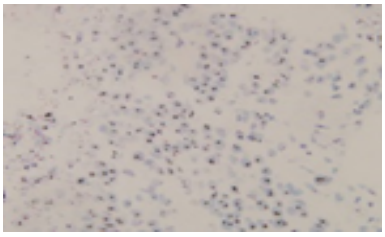
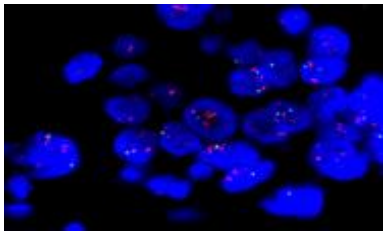
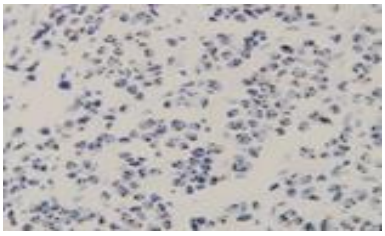
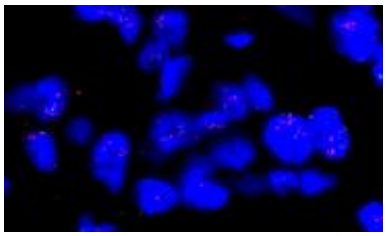
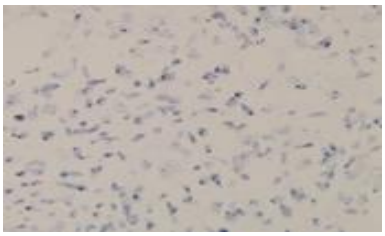
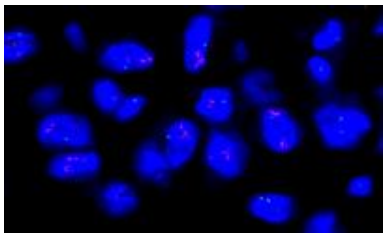
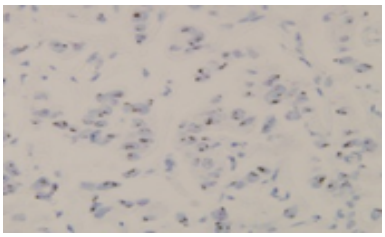
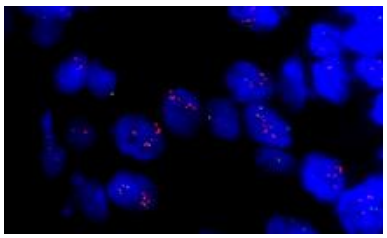
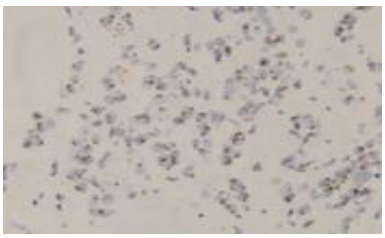
ตัวอย่างที่ไม่สามารถอ่านค่าได้เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HER2 FISH แต่สามารถอ่านค่าและวิเคราะห์ผลได้เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HER2 DISH จำนวน 2 ตัวอย่าง (ตารางที่ 4.5)

และเมื่อนำผลการทดลองที่ได้ไปวิเคราะห์ค่าทางสถิติ โดยใช้ Paired-Samples T-Test ได้ค่า P-Value = 0.159 (Sig > 0.05 ยอมรับสมมติฐานหลัก) พบว่าการตรวจยีน HER-2 ด้วยเทคนิค FISH และ DISH ให้ผลไม่แตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

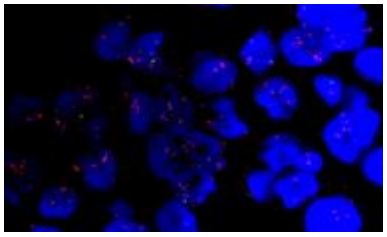
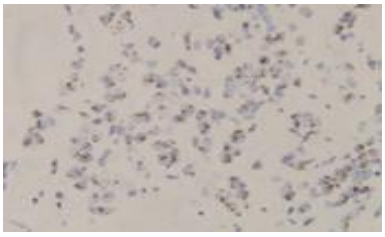
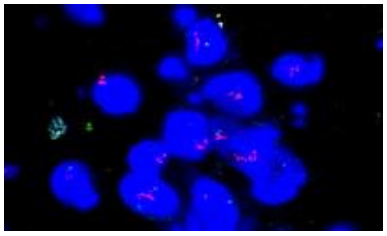
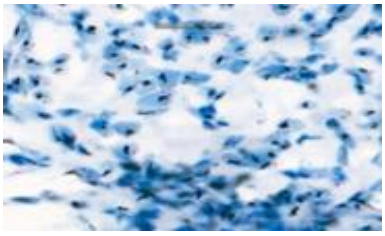
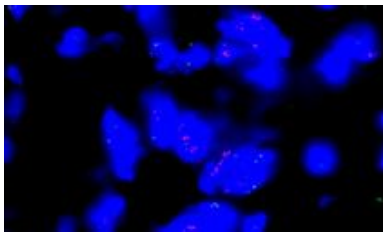
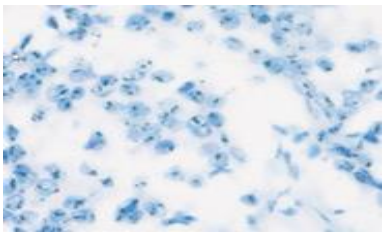
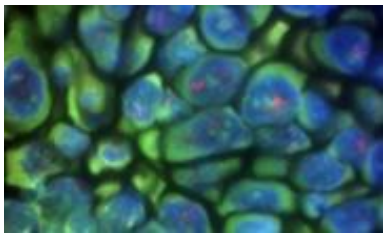
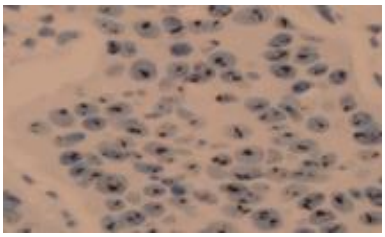
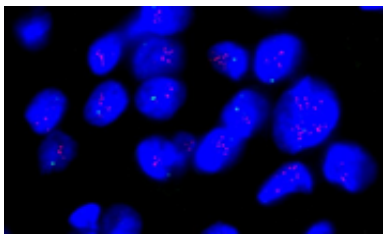
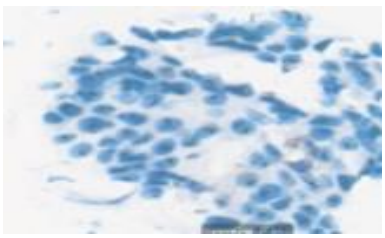
ตารางที่ 4.1 ตารางภาพแสดงผลการวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเทคนิค HER2 FISH กับ HER2 DISH ที่ให้ผล Positive เหมือนกัน 32 ตัวอย่าง

No	FISH	DISH
1		
2		
3		
4		
5		

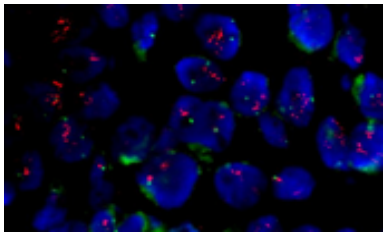
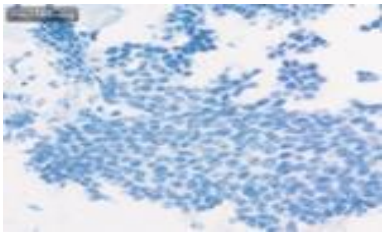
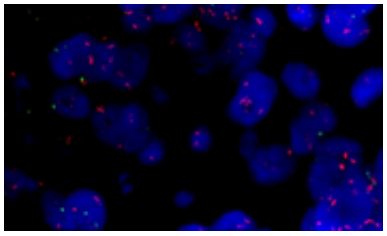
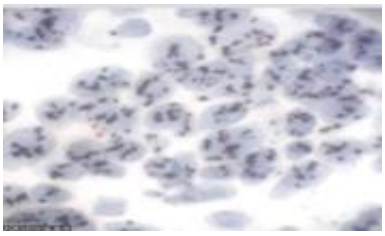
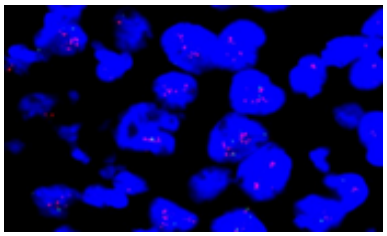
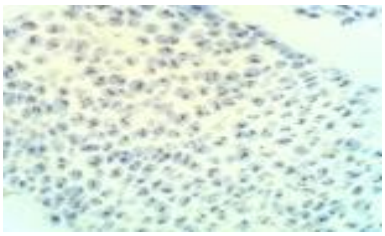
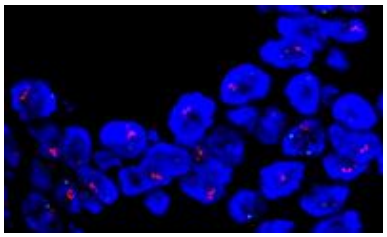
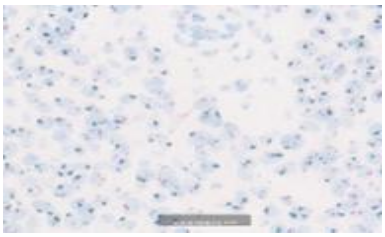
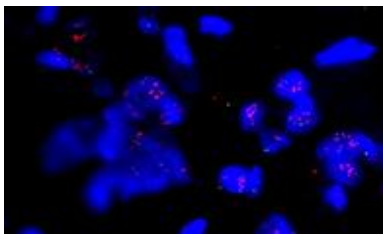
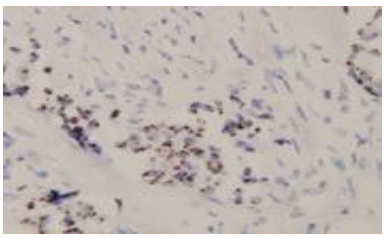
ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

No	FISH	DISH
6		
7		
8		
9		
10		

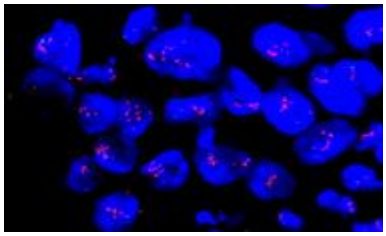
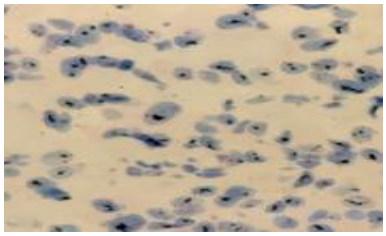
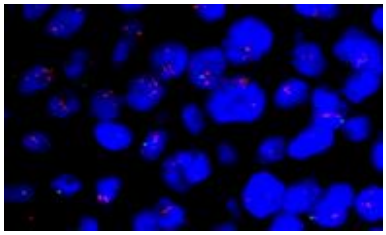
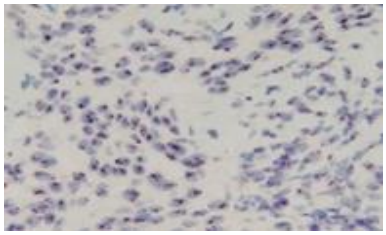
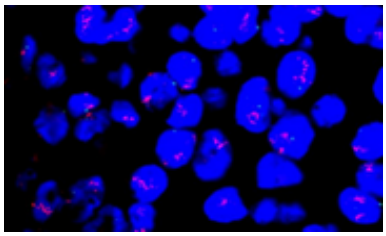
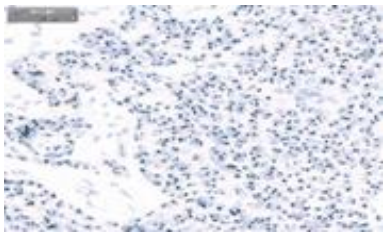
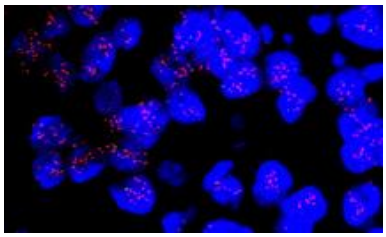
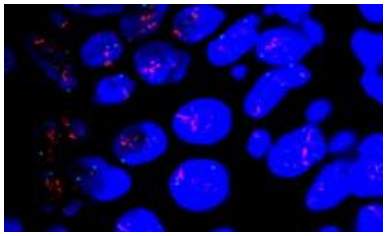
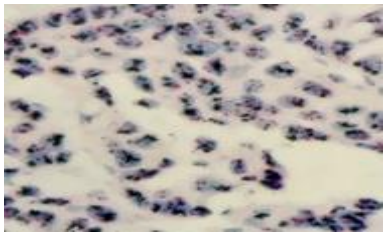
ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

No	FISH	DISH
11		
12		
13		
14		
15		

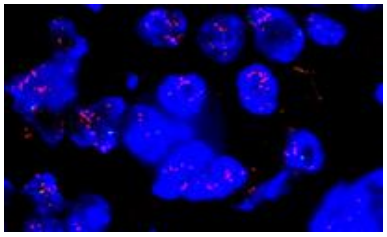
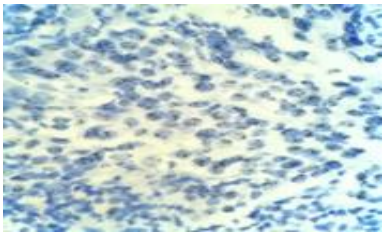
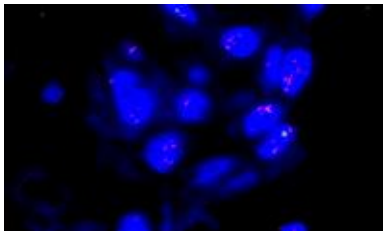
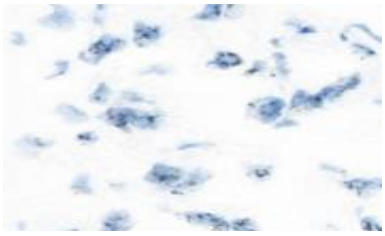
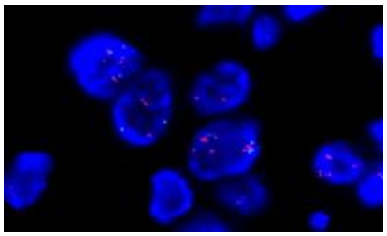
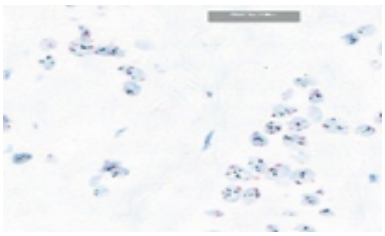
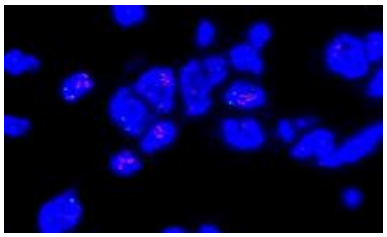
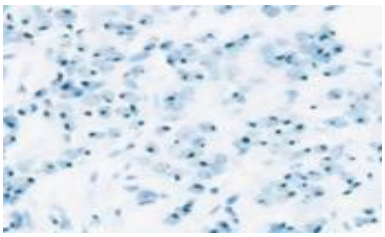
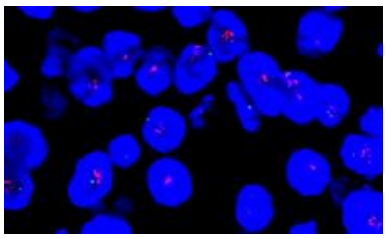
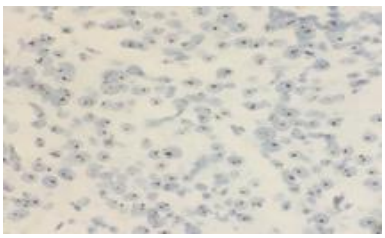
ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

No	FISH	DISH
16		
17		
18		
19		
20		

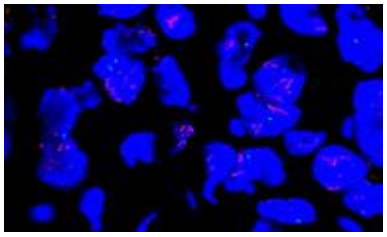
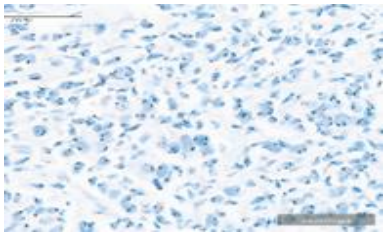
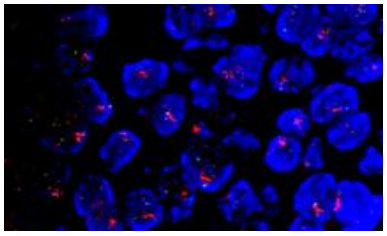
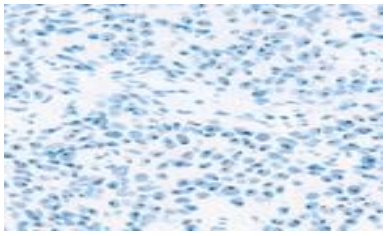
ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

No	FISH	DISH
21		
22		
23		
24		
25		

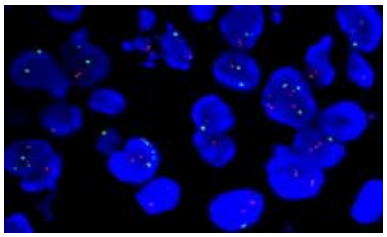
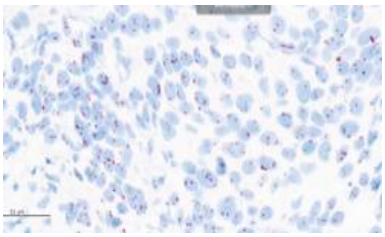
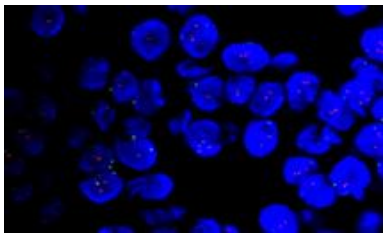
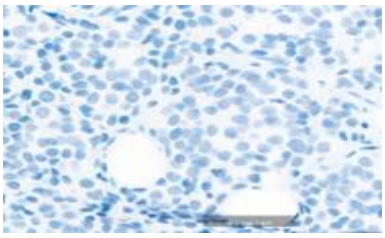
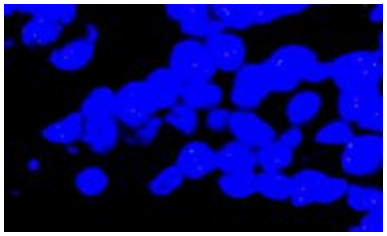
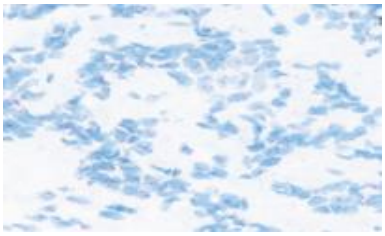
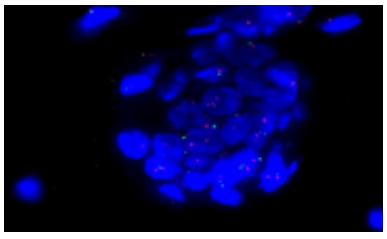
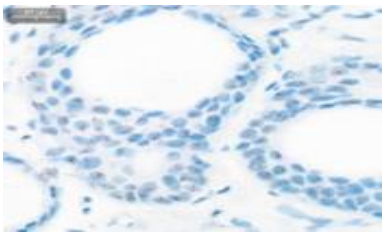
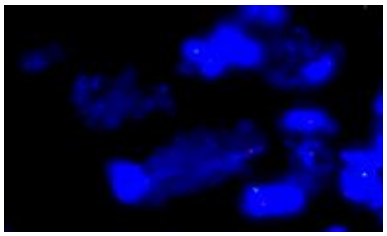
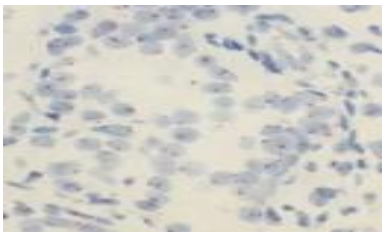
ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

No	FISH	DISH
26		
27		
28		
29		
30		

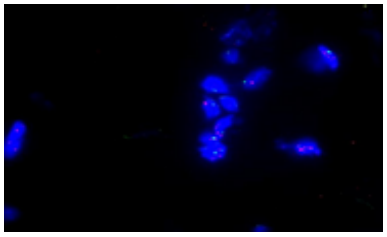
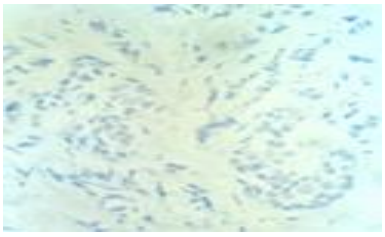
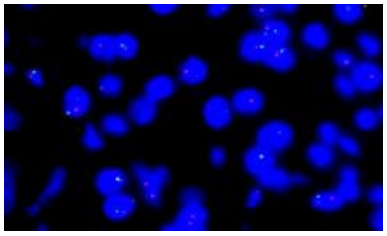
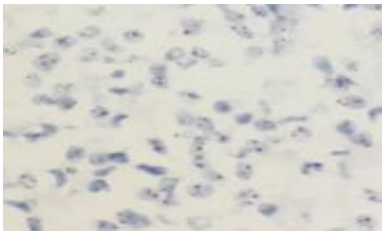
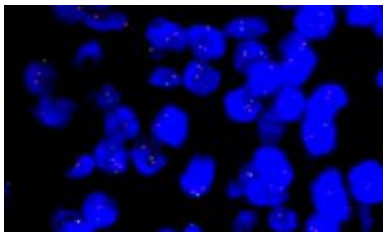
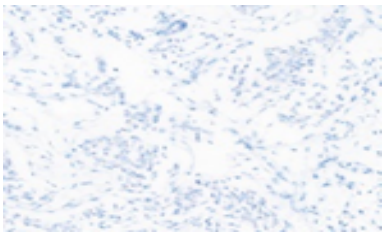
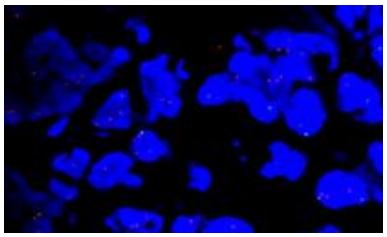
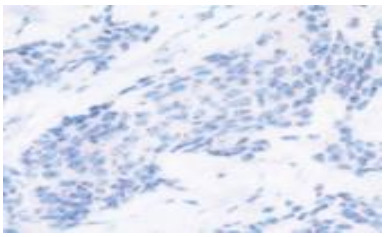
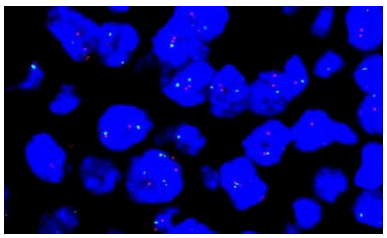
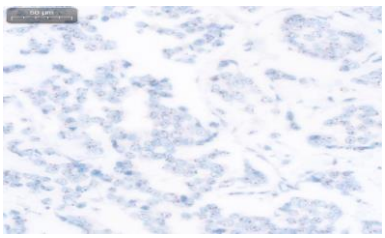
ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

No	FISH	DISH
31		
32		

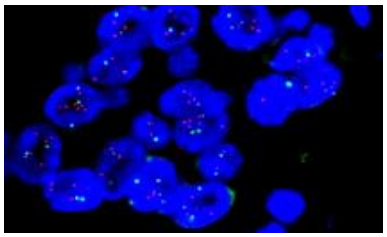
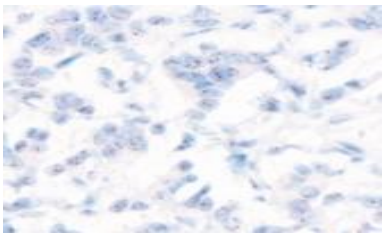
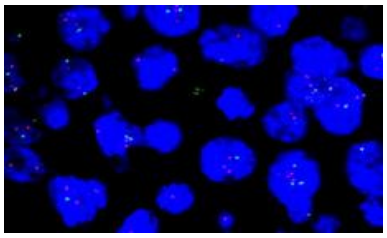
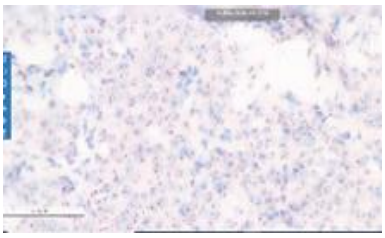
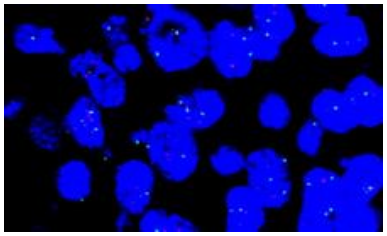
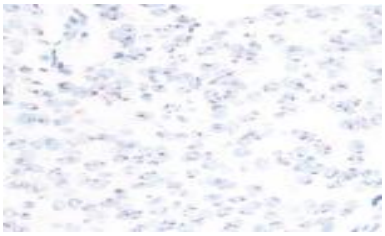
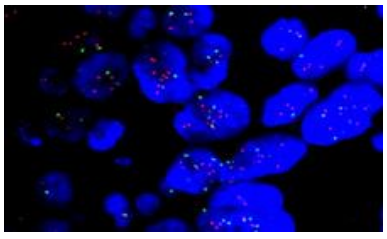
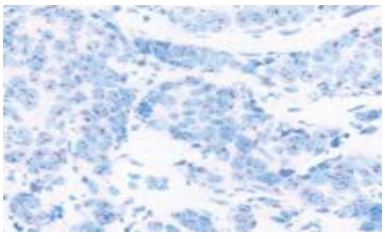
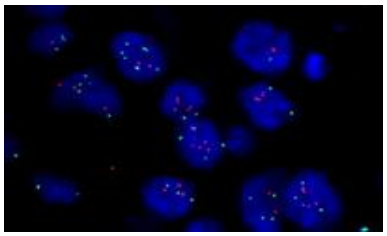
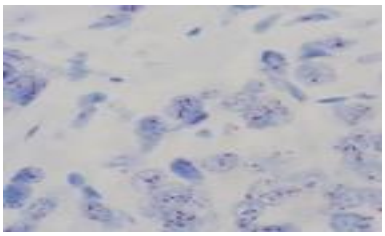
ตารางที่ 4.2 ตารางภาพแสดงผลการวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเทคนิค HER2 FISH กับ HER2 DISH ที่ให้ผล Negative เหมือนกัน 10 ตัวอย่าง

No	FISH	DISH
1		
2		
3		
4		
5		

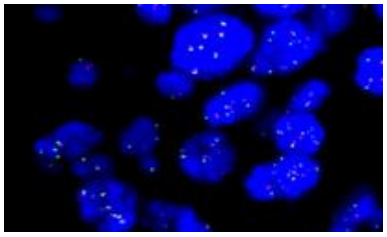
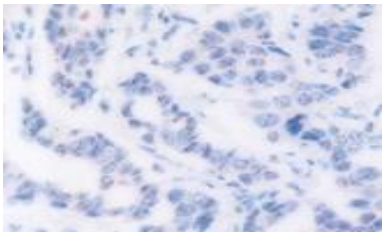
ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

No	FISH	DISH
6		
7		
8		
9		
10		

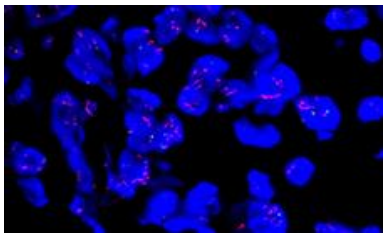
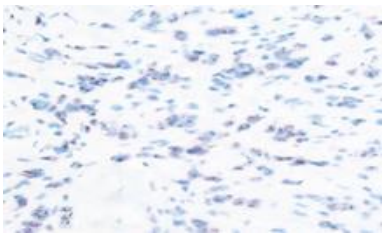
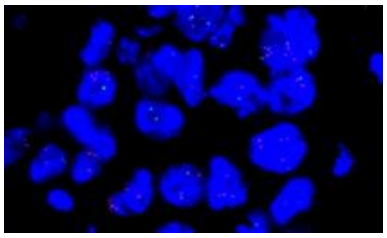
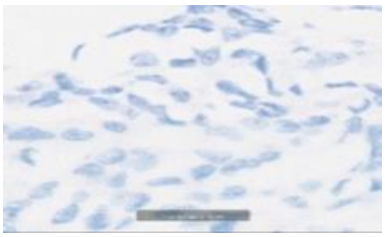
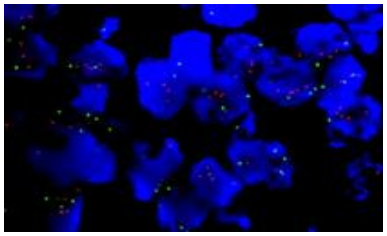
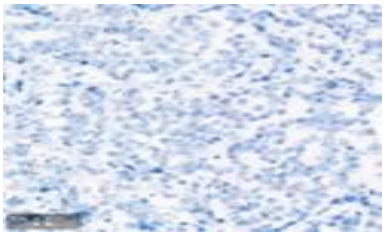
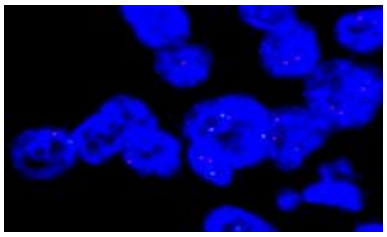
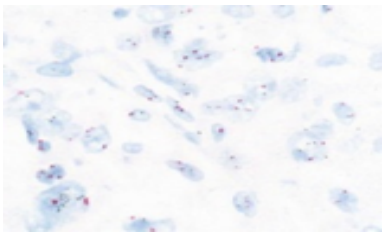
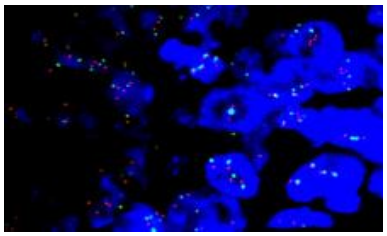
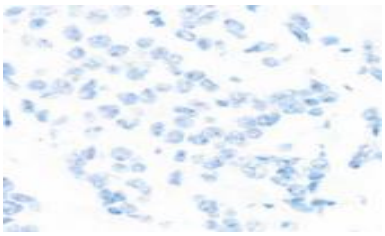
ตารางที่ 4.3 ตารางแสดงผลเปรียบเทียบภาพที่วิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเทคนิค HER2 FISH กับ HER2 DISH ที่ให้ผล Equivocal เหมือนกัน 6 ตัวอย่าง

No	FISH	DISH
1		
2		
3		
4		
5		

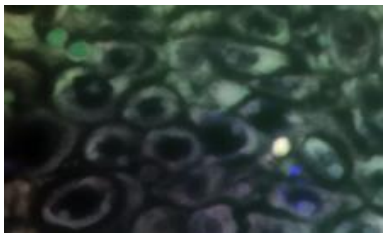
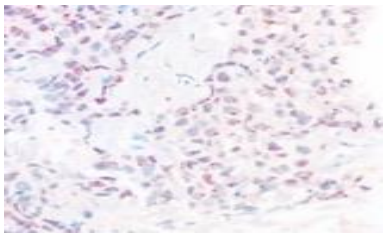
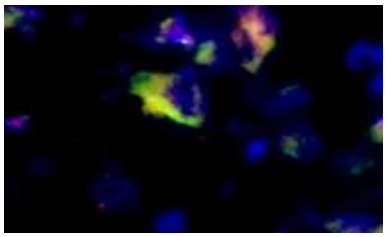
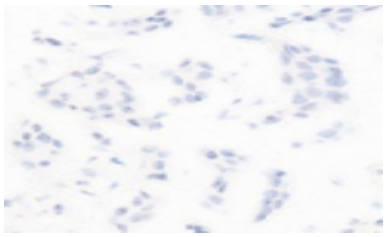
ตารางที่ 4.3 (ต่อ)

No	FISH	DISH
6		

ตารางที่ 4.4 ตารางแสดงผลเปรียบเทียบภาพที่วิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเทคนิค HER2 FISH กับ HER2 DISH ที่ให้ผล ต่างกัน 5 ตัวอย่าง

No	FISH	DISH
1		
2		
3		
4		
5		

ตารางที่ 4.5 ตารางแสดงผลเปรียบเทียบภาพที่วิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเทคนิค HER2 FISH กับ HER2 DISH ที่ให้การวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค HER2 FISH ไม่สามารถอ่านค่าได้

No	FISH	DISH
1		
2		

บทที่ 5

สรุป และวิจารณ์

จากการนำตัวอย่างจากสิ่งสิ่งตรวจทั้งหมด 55 ตัวอย่าง นำมาเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HER2 FISH กับ HER2 DISH พบว่าให้ผลการวิเคราะห์ที่เหมือนกันทั้งหมด 48 ตัวอย่าง (คิดเป็น 87.27% ของตัวอย่างทั้งหมด) และให้ผลที่ต่างกัน 5 ตัวอย่าง (คิดเป็น 9.10% ชองตัวอย่างทั้งหมด) และอ่านผลไม่ได้เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HER2 FISH แต่อ่านผลได้เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HER2 DISH จำนวน 2 ตัวอย่าง (คิดเป็น 3.63% ของตัวอย่างทั้งหมด) และเมื่อนำผลการทดลองทั้งหมดมาวิเคราะห์ทดสอบทางสถิติ โดยใช้ Paired-Samples T-Test ได้ค่า *P*-Value = 0.159 (Sig > 0.05 ยอมรับสมมติฐานหลัก) จึงสรุปได้ว่า การตรวจยีน HER-2 ด้วยเทคนิค FISH และ DISH ให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากการทดลองนี้พบว่าการวิเคราะห์ตัวอย่างเปรียบเทียบผลการตรวจยีน HER2 ด้วยเทคนิค FISH และ DISH (ใช้กลุ่มตัวอย่างเดียวกัน) ให้ผลไม่แตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกับงานวิจัยของ Aaron S. และคณะ[20] ที่ทำการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FISH และ DISH ทั้งหมด 251 ตัวอย่าง ซึ่งพบว่าให้ผลการวิเคราะห์ที่สอดคล้องกัน

และผลการวิเคราะห์ที่ให้ผลที่ต่างกันในกรณีที่ ค่าที่อ่านผลได้จาก HER2 FISH และ HER2 DISH ต่างกันอาจเกิดจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค DISH Ratio ระหว่าง HER2/centromere 17 น้อยกว่าเทคนิค FISH หรืออาจเกิดจากเทคนิค FISH ให้ค่า Ratio มากเกินไป[20]

ส่วนกรณีที่ตัวอย่างเดียวกันเมื่อนำมาวิเคราะห์ค่าด้วยเทคนิค HER2 FISH ไม่สามารถอ่านค่าได้ แต่สามารถอ่านค่าได้เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค DISH อาจเกิดจากเคสนั้นผ่านการ fix formalin ในระยะเวลาที่น้อยกว่า 6 ชั่วโมง หรือมากกว่า 48 ชั่วโมง ซึ่งจะส่งผลต่อยีน HER2 และโครโมโซม 17[34] ทำให้เกิดความจำเพาะต่ำ ส่งผลให้เมื่อย้อมด้วยเทคนิค HER2 FISH ไม่สามารถอ่านค่าได้

จากการทดลองนี้จึงแสดงให้เห็นว่าการตรวจวิเคราะห์ยีน HER2 ด้วยเทคนิค HER2 FISH กับ HER2 DISH ไม่แตกต่างกัน แต่ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความต้องการของโรงพยาบาลสามารถเลือกวิธีวิเคราะห์ให้เหมาะสมกับบุคลากร สถานที่ห้องปฏิบัติการ งบประมาณ รวมทั้งอุปกรณ์ที่มีในโรงพยาบาลให้สอดคล้องกับการเปิดบริการตรวจวิเคราะห์ยีน HER2

เอกสารอ้างอิง

(1) ชลทิศ อุไรฤกษ์กุล. (2022-1-20). ภาพรวมของสถานะการณ์และยุทธศาสตร์ในการควบคุมมะเร็งเต้านม. เนื้อหาในบทเรียน สืบค้นจาก http://doh.hpc.go.th/bs/topicDisplayCategory.php?id=631

(2) Lal P, Salazar PA, Hudis CA, et al. (2004). Her-2 testing in breast cancer using immunohistochemical analysis and fluorescence in situ hybridization: a single-institution experience of 2,279 cases and comparison of dual-color and single-color scoring. Am J Clin Pathol; 121:631-636.

(3) Owens MA, Horten BC, Da Silva MM. (2004). HER2 ampliflication ratios by fluorescence in situ hybridization and correlation with immunohistochemistry in a cohort of 6556 breast cancer tissues. Clin Breast Cancer. 5:63-69.

(4) Yaziji H, Goldstein LC, Barry TS, et al. (2004). HER-2 testing in breast cancer using parallel tissue-based methods.JAMA. 291:1972-1977.

(5) ภัทรพิมพ์ สรรพวีรวงศ์. (2548). สารยับยั้งการทำงานของ Tyrosine kinase receptor: เป้าหมายระดับอณูของการรักษามะเร็งชนิด solid tumor. สงขลานครินทร์เวชสาร. 24(1), 43-52.

(6) อดิศร เจษฎ์ปิยะวงศ์. อนันท์นุช ศักดิ์อภิบุญนันท์. สมชาย ธนะสิทธิชัย. (2560). P95HER2 กับมะเร็งเต้านม. วารสารโรคมะเร็ง. 37(3), 114-122.

(7) Wei Zhang, and Yingyan Yu. (2011). The Important Molecular Markers on Chromosome 17 and Their Clinical Impact in Breast Cancer. International Journal of Molecular Sciences. 12, 5672-5683.

(8) Vince D. Cataldo, Don L. Gibbons, Román Pérez-Soler, et al. (2011). Treatment of Non–Small-Cell Lung Cancer with Erlotinib or Gefitinib. The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE. 364, 947-955.

(9) Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al. (2004). Human breast cancer using immunohistochemical analysis and fluorescence in situ hybridization: a single-institution experience of 2, 279 case and comparison of dual-color and single-color scoring. Am J Clim Pathol. 121:631-636.

(10) Joensuu H, Kellokumpu-Lehtinen PL, Bono P, et al. (2006). Adjuvant docetaxel or vinorelbine with or without trastuzumab for breast cancer. N Engl Med. 354:809-820

(11) Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, et al. (2005). Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in Her2-Positive breast cancer. N Engl J Med. 353:1659-1672.

(12) Romond EH, Perez EA, Bryant J, et al. (2005). Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable Her2-positive breast cancer. N Engl J Med. 353:1673-1684.

(13) Slamon D, Eiermann W, Robett N, et al. (2011). Adjuvant trnstuzumab in Her2-Positive breast cancer. N Engl J Med. 365:1273-1283.

(14) Geyer CE, Forster J, Lindquist D, et al. (2006). Lapatinib plus capecitabine for Her2-Positive advanced breast cancer. N Engl J Med. 355:2733-2743.

(15) Marty M, Cognetti F, MaraninChi D, et al. (2005). Randomized phase II trial of the efficacy and safety of trastuzumab combined with docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-Positive metastatic breast cancer administered as first-line treatment: the M77001 study group. J Clin Oncol. 23:4265-4274.

(16) Perez EA, Suman VJ, Rowland KM, et al. (2005). Two concurrent phase II trials of paclitaxel/carboplatin/trastuzumab (weekly or every-3-week schedule) as first-line therapy in women with Her2-overexpressing metastatic breast cancer: NCCTG study 983252. Clin Breast Cancer. 6:425-432.

(17) Salmon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. (2001). Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses Her2. N Engl J Med. 344:783-792.

(18) Valero V, Forbes J, Pegram MD, et al. (2001). Multicenter phase III randomized trial comparing docetaxel and trastuzumab with docetaxel, carboplatin, and trastuzumab as first-line chemotherapy for patients with Her2-gene-amplified metastatic breast cancer (BCIRG 007 study): two highly active therapeutic regimens. J Clin Oncol. 29:149-156.

(19) Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, et al. (2007). American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. Arch Pathol Lab Med. 131:18-43.

(20) Aron S, Mansfield, William R, Jeanette E. Eckel-Passow, et al. (2013). Comparison of Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) and Dual-ISH (DISH) in the determination of Her2 Status in Breast Cancer. Am J Clin Pathol. 139:144-150.

(21) มะเร็งเต้านม (Breast Cancer) เทคนิค FISH (Fluorescence in situ hybridization) https://www.rama.mahidol.ac.th/patho/sites/default/files/u2/patho/Doc_Form/Breast%20Cancer.pdf

(22) Pooja P Advani, Jennifer A Crozier, & Edith A Perez. HER2 testing and its predictive utility in anti-HER2 breast cancer therapy. BIOMARKERS IN MEDICINE. 2015, Vol 9 No1. Published Online: 21 Jan 2015 https://doi.org/10.2217/bmm.14.95

(23) INTERPRETATION GUIDE, VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail Assay, ENGLISH (CE-IVD)

(24) Template for Reporting Results of Biomarker Testing of Specimens From Patients With Carcinoma of the Breast.

(25) https://diagnostics.roche.com/us/en/landing-pages/ventana-her2-dual-ish.html

(26) Edelweiss M. Sebas tiaoet A, Oen H, et al. (2019). HER2 Assessment by Bright-Field Dual In Situ Hybridization in Cell Blocks of Recurrent and Metastatic Breast Carcinoma, Cancer Cytopathology, 684-690.

(27) Tauangtham Anekpuritanang, Thiamjit Chaichana, Preecha Ruangvejvorachai, et al. (2015). REPRODUCIBILITY IN THE ASSESSMENT OF HER2 DISH IN BREAST CANCER. The Bangkok Medical Journal. (10):1-5. ISSN 2287-0237(online)/2687-9674(print).

(28) Carlson B., New Automated HER2 Test Promises Faster, More Accurate Testing, Biotechnology Healthcare, 2011:32-33.

(29) Furrer D. Sanscnagrin F, Jacob S, et al. (2015). Advantages and Disadvantages of Technologies for HER2 Testing in Breast Cancer Specimens, Am J Clin Pathol. 144:686-703

(30) VENTANA HER2 Dual ISH package insert

(31) Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor HER2 Testing in Breast Cancer.

(32) INTERPRETATION GUIDE, VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail Assay, ENGLISH (CE-IVD)

(33) Template for Reporting Results of Biomarker Testing of Specimens From Patients With Carcinoma of the Breast.

(34) Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, et al. (2007). American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. J Clin Oncol. 25:18–43.

ภาคผนวก

1. การเตรียมสารเคมี

1.1 เตรียม 20X SSC

20X SSC	66 กรัม (มากับ kit)
น้ำกลั่น	200 มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน ปรับ pH เป็น 5.3 โดยใช้ Conc. HCL ปรับ Final volume เป็น 250 ml ด้วยน้ำกลั่น เก็บไว้ได้นาน 6 เดือน ที่อุณหภูมิห้อง

1.2 เตรียม Post-hybridization solution

20X SSC, pH 5.3	100 ml
น้ำกลั่น	874 ml
NP-40	3 ml (อยู่ใน kit)

ผสมให้เข้ากัน ปรับ pH เป็น 7.3 ด้วย 1 N NaOH ปรับ Final volume เป็น 1,000 ml ด้วยน้ำกลั่น โดยใช้ volumetric flask กรองผ่าน 0.45 µm filter เก็บไว้ได้นาน 6 เดือน ที่อุณหภูมิห้อง

ข้อควรระวัง

1. ต้องควบคุมให้อุณหภูมิของ water bath และค่า pH ของสารละลายอยู่ในช่วงที่กำหนด เพราะทั้งสองสิ่งนี้มีอิทธิพลอย่างยิ่งกับผลการย้อมที่ได้
2. สไลด์ที่ทำการนับผลเสร็จเรียบร้อยแล้ว ต้องเก็บรักษาไว้ในที่มืดและเย็น (ช่องน้ำแข็งของตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส) เพื่อยืดระยะเวลาไม่ให้สัญญาน (signal) จางลงเร็ว

2. ค่าต่างๆ ที่ได้จากการทดลอง

ตารางแสดงค่า HER2 FISH กับ HER2 DISH ที่ให้ผล Positive เหมือนกัน 32 ตัวอย่าง

No	FISH		ผล	DISH		ผล
	Ratio	Average		Ratio	Average	
1	4.8	14.1	Positive	3.0	9.5	Positive
2	5.4	14.5	Positive	3.7	8.4	Positive
3	4.2	11.0	Positive	4.3	10.1	Positive
4	3.3	6.0	Positive	3.5	8.0	Positive
5	4.7	9.4	Positive	2.7	7.7	Positive
6	7.0	11.9	Positive	4.8	7.0	Positive
7	6.4	10.2	Positive	7.5	12	Positive
8	7.4	9.3	Positive	5.5	7.8	Positive
9	6.0	13.7	Positive	5.5	9.7	Positive
10	3.1	6.6	Positive	2.8	7.4	Positive
11	4.2	9.2	Positive	2.9	10.45	Positive
12	13.4	16.1	Positive	5.62	9.0	Positive
13	7.6	13.7	Positive	7.9	13.1	Positive
14	11.7	20.6	Positive	7.6	14.5	Positive
15	11.2	15.7	Positive	8.2	16.4	Positive
16	8.9	12.5	Positive	3	10.3	Positive
17	11.3	16.4	Positive	11.41	25.1	Positive
18	5.6	17.4	Positive	6.49	21.1	Positive
19	6.6	14.6	Positive	8.9	18.0	Positive
20	9.6	15.0	Positive	3.7	9.3	Positive
21	6.7	14.4	Positive	7.8	13.3	Positive
22	4.7	8.2	Positive	4.28	9.0	Positive
23	11.2	18.0	Positive	8.9	14.8	Positive
24	7.8	14.4	Positive	8.7	18.3	Positive
25	8.8	27.7	Positive	6.7	21.2	Positive
26	14.7	19.9	Positive	12.08	24.15	Positive

ตารางแสดงค่า HER2 FISH กับ HER2 DISH ที่ให้ผล Positive เหมือนกัน 32 ตัวอย่าง (ต่อ)

No	FISH		ผล	DISH		ผล
	Ratio	Average		Ratio	Average	
27	6.5	8.5	Positive	3.04	7.45	Positive
28	4.6	9.7	Positive	3.8	8.2	Positive
29	8.8	12.4	Positive	5.7	9.4	Positive
30	7.5	10.9	Positive	2.8	5.4	Positive
31	7.7	11.2	Positive	8.4	18.6	Positive
32	3.6	8.9	Positive	3.6	7.6	Positive

ตารางแสดงค่า HER2 FISH กับ HER2 DISH ที่ให้ผล Negative เหมือนกัน 10 ตัวอย่าง

No	FISH		ผล	DISH		ผล
	Ratio	Average		Ratio	Average	
1	1.2	2.6	Negative	0.7	1.4	Negative
2	1.2	2.1	Negative	1.3	3.9	Negative
3	1	1.5	Negative	0.68	1.2	Negative
4	1.3	1.7	Negative	1.3	1.9	Negative
5	1.1	1.4	Negative	0.8	1.5	Negative
6	0.9	1.3	Negative	1.2	2.7	Negative
7	1.1	1.8	Negative	1.6	2.9	Negative
8	1	1.6	Negative	1.4	3.6	Negative
9	1	1.8	Negative	1.4	3.6	Negative
10	1.3	2.6	Negative	1.3	2.9	Negative

ตารางแสดงค่า HER2 FISH กับ HER2 DISH ที่ให้ผล Equivocal เหมือนกัน 6 ตัวอย่าง

No	FISH		ผล	DISH		ผล
	Ratio	Average		Ratio	Average	
1	1.7	5.0	Equivocal	1.5	4.4	Equivocal
2	1.6	4.2	Equivocal	1.4	4.6	Equivocal
3	1.5	4.4	Equivocal	1.95	4.0	Equivocal
4	1.5	5.0	Equivocal	1.9	6.9	Equivocal
5	1.2	4.6	Equivocal	0.9	4.7	Equivocal
6	1.1	5.0	Equivocal	1.14	4.58	Equivocal

ตารางแสดงค่า HER2 FISH กับ HER2 DISH ที่ให้ผลที่ต่างกัน 5 ตัวอย่าง

No	FISH		ผล	DISH		ผล
	Ratio	Average		Ratio	Average	
1	5.9	11.6	Positive	1.7	7.3	Equivocal
2	2.2	5.1	Positive	1.1	1.65	Negative
3	1.4	3.6	Negative	2.0	3.6	Equivocal
4	1.5	3.4	Negative	1.9	4.0	Equivocal
5	1.3	4.3	Equivocal	1.2	2.45	Negative

ตารางแสดงค่า HER2 FISH ที่ไม่สามารถอ่านค่าได้ กับ HER2 DISH ที่สามารถอ่านค่าได้ 2 ตัวอย่าง

No	FISH		ผล	DISH		ผล
	Ratio	Average		Ratio	Average	
1	-	-	อ่านไม่ได้	0.6	1.3	Negative
2	-	-	อ่านไม่ได้	2.5	3.9	Equivocal