

10 лет тестирования HER2-статуса рака молочной железы в России

Г.А. ФРАНК¹, Ю.Ю. АНДРЕЕВА¹, И.Ю. ВИНОГРАДОВ⁵, С.Б. ГЛАТКО⁴, М.З. ГОРЕЛИК⁸,
Л.Э. ЗАВАЛИШИНА¹, Е.Е. ЛЕЕНМАН⁷, А.Э. МАЦИОНИС², С.В. ПЕТРОВ³, С.В. САЗОНОВ⁶

¹ФГБУ «Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена» Минздравсоцразвития России; ²ГБУ РО «Патологоанатомическое бюро», Ростов-на-Дону; ³ГУЗ «Республиканский клинический онкологический диспансер», Казань; ⁴ГБУЗ «Омский клинический онкологический диспансер»; ⁵ГБУЗ «Рязанский клинический онкологический диспансер»; ⁶ГБУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», Екатеринбург; ⁷ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий» Минздравсоцразвития России, Санкт-Петербург; ⁸ГБУЗ «Приморское краевое патологоанатомическое бюро», Владивосток

10 years of testing of the HER2 status in breast cancer in Russia

G.A. FRANK¹, YU.YU. ANDREYEVA¹, I.YU. VINOGRADOV⁵, S.B. GLATKO⁴, M.Z. GORELIK⁸, L.E. ZAVALISHINA¹,
E.E. LEENMAN⁷, A.E. MATSIONIS², S.V. PETROV³, S.V. SAZONOV⁶

¹P.A. Herzen Moscow Oncology Research Institute, Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation; ²Morbid Anatomy Bureau, Rostov-on-Don; ³Republican Clinical Oncology Dispensary, Kazan; ⁴Omsk Clinical Oncology Dispensary; ⁵Ryazan Clinical Oncology Dispensary; ⁶Institute of Medical Cell Technologies, Yekaterinburg; ⁷Russian Research Center for Radiology and Surgical Technologies, Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation, Saint Petersburg; ⁸Primorye Territorial Morbid Anatomy Bureau, Vladivostok

Проведен анализ десятилетнего опыта тестирования HER2-статуса рака молочной железы в России. Рассмотрены рекомендации ASCO/CAP по HER2-тестированию применительно к работе патологоанатомов России.

Ключевые слова: HER2-тестирование, иммуногистохимия, гибридизация *in situ*.

The paper analyzes 10 years' experience in HER2 status testing in breast cancer in Russia. The ASCO/CAP HER2 testing guidelines adaptable to the work of pathologists in Russia are considered.

Key words: HER2 testing, immunohistochemistry, *in situ* hybridization.

С развитием таргетной терапии злокачественных новообразований важным разделом в работе патологоанатомов, специализирующихся в области онкоморфологии, стало предсказание чувствительности опухолей к новым лекарственным таргетным препаратам. Первым таким препаратом, определение чувствительности к которому стало проводиться на биопсийном и операционном материале, был трастузумаб (герцептин), применяющийся сейчас при лечении рака молочной железы и рака желудка только при наличии гиперэкспрессии белка или амплификации гена *HER2*. Для рака молочной железы трастузумаб используется в виде монотерапии, после одной или более схем химиотерапии в комбинации с паклитакселом или доцетакселом, в случае отсутствия предшествующей химиотерапии (первая линия) в комбинации с ингибиторами ароматазы. Герцептин представляет собой гуманизированное моноклональное антитело, специфичное к рецептору человеческого эпидермального фактора роста 2-го типа *HER2*. Ген рецептора *HER2* амплифицирован у 18–20% больных раком молочной железы. *HER2* — это гликопротеин с мол. массой 185 кД, обладающий тирозинкиназной активностью [1]. Амплификация гена приводит к гиперэкспрессии белка *HER2* [5, 6]. Определение *HER2*-статуса важно в нескольких аспектах, поскольку наличие его гиперэкспрессии является фактором:

- ассоциированным с худшим прогнозом (высокий риск рецидива и смертности);
- предиктором эффективности некоторых видов системной химиотерапии (относительная резистентность к гормонотерапии);
- определяющим чувствительность опухоли к таргетным препаратам трастузумаб и лапатиниб;
- предиктором ответа на лечение негормональными препаратами (хороший ответ на терапию антрациклинами в связи с коамплификацией гена *ТОР2А*) [7].

Результаты пяти международных рандомизированных клинических исследований показали, что адъювантная терапия трастузумабом снижает риск рецидива на 50% и риск смерти на 34% у пациенток при ранних стадиях рака молочной железы [7]. Герцептин активирует антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность, предотвращает образование белка p95, блокирует *HER2*-зависимую клеточную пролиферацию, ингибирует ангиогенез, регулируемый рецептором *HER2*. Все эти действия препарата подтверждают необходимость определения *HER2*-статуса для решения вопроса о проведении лекарственной терапии пациенткам с раком молочной железы и подчеркивают исключительную значимость корректной оценки экспрессии этого белка и/или амплификации гена.

Для определения HER2-статуса применяется несколько методов: иммуногистохимический (определение количества белка HER2 на клеточной поверхности) и гибридизация *in situ* в различных вариантах (определение количества копий гена *HER2*). Определять HER2-статус следует при первично установленном диагнозе всем больным раком молочной железы. Исследование проводится только в инвазивном компоненте опухоли на биопсийном и операционном материале, фиксированном нейтральным формалином в течение 6—24 ч (в зависимости от размера образца) и залитом в парафин [2, 3]. Для иммуногистохимического исследования (ИГХ) применяются антитела разных коммерческих фирм и разные клоны. Утвержденными для клинического морфологического использования Американской ассоциацией клинических онкологов и Коллегией американских патологов (ASCO/CAP) являются наборы Ventana CONFIRM HER2/Neu, 4B5 («Roche Tissue Diagnostics»), HercepTest, A0485 («Dako») [2—4]. Для подтверждения наличия амплификации гена используется метод гибридизации *in situ* (ГИС) — флюоресцентная *in situ* гибридизация с использованием наборов PathVysion («Abbott») или HER2 FISH pharm Dx («Dako») [2] — и гибридизация *in situ*, усиленная серебром (INORM HER2 DNA probe — SISH dual color («Ventana») [4]. Оценку гиперэкспрессии белка или амплификации гена проводят по утвержденным критериям. Иммуногистохимические реакции оцениваются по балльной шкале: 0, 1+, 2+ и 3+, а при оценке амплификации гена определяют соотношение количества сигналов, соответствующих гену *HER2* и центромерному участку хромосомы 17 (HER2/CEP17). В 2007 г. были изданы «Руководящие рекомендации ASCO/CAP по исследованию экспрессии HER2 при раке молочной железы» [7], в которых было изменено пограничное значение позитивно окрашенных клеток рака с 10 до 30% (табл. 1), хотя надо отметить, что в инструкции к диагностическому набору HercepTest, A0485 («Dako»), утвержденной FDA, осталось прежнее значение 10%. В рекомендациях ASCO/CAP описаны четкие критерии отрицательного, неопределенного и положительного HER-статуса как по ИГХ, так и по ГИС. Необходимость и актуальность этих рекомендаций связана с тем, что, по данным экспертов ASCO/CAP, примерно 20% всех результатов определения уровня экспрессии HER2 являются неточными [7].

В соответствии с Рекомендациями ASCO/CAP, по которым работают подавляющее большинство патологов в разных странах, в настоящее время утверждены алгоритм (см. рисунок) тестирования и критерии положительного, неопределенного или отрицательного HER2-статуса [7]:

— положительный HER2-статус определяется как ИГХ 3+ (выраженное мембранное окрашивание более чем 30% опухолевых клеток) или при ГИС, когда среднее значение количества копий гена *HER2* более 6 сигналов на ядро или соотношение HER2/CEP17 больше или равно 2,2;

— отрицательный HER2-статус определяется как ИГХ 0/1+ (отсутствие окрашивания или слабое неполное мембранное окрашивание в любом количестве клеток) или при ГИС, когда среднее значение количества копий гена *HER2* менее 4 сигналов на ядро или соотношение HER2/CEP17 менее 1,8;

— неопределенный HER2-статус оценивается как ИГХ 2+ (неполное выраженное мембранное окрашивание или слабое по интенсивности равномерное мембранное окрашивание более 10% опухолевых клеток либо выраженное мембранное окрашивание менее 30% опухолевых клеток) или при ГИС, когда среднее значение количества копий гена *HER2* 4—6 сигналов на ядро или соотношение HER2/CEP17 1,8—2,2.

Неопределенный HER2-статус по ИГХ 2+ требует проведения дополнительного исследования методом ГИС для определения амплификации гена *HER*. Неопределенный HER2-статус по ГИС (HER2/CEP17 1,8—2,2) требует анализа дополнительного количества ядер опухолевых клеток (не менее 40) или повторения ИГХ- и ГИС-исследований.

По результатам ИГХ- и ГИС-исследований терапия герцептином показана пациенткам с инфильтративным раком молочной железы только в следующих случаях: при гиперэкспрессии HER2 (ИГХ 3+), неопределенной экспрессии HER2 (ИГХ 2+) и выявленной амплификации гена, наличии амплификации гена *HER2* в случаях первичного тестирования методом ГИС.

В своих рекомендациях ведущие эксперты ASCO/CAP указывают, что лаборатория может проводить тестирование HER2-статуса, если методы, используемые в лаборатории, сопоставлены с уже стандартизованными, и их совпадение составило не менее 95% по положительным и отрицательным результатам, а в лаборатории ежегодно проводится не менее 250 тестирований методом ИГХ и не менее 100 — методом ГИС. Эти рекомендации являются значимыми и для тестирования, которое проводится в нашей стране.

В России HER2-тестирование рака молочной железы впервые начали проводить в 2000 г. в трех ведущих онкологических учреждениях — Российском онкологическом научном центре РАМН им. Н.Н. Блохина, Московском научно-исследовательском онкологическом институте им. П.А. Герцена, Онкологическом институте им. Н.И. Петрова. Во всех этих клинических центрах в течение 2000—2004 гг. было проведено всего немногим более 100 диагностических исследований иммуногистохимическим методом, а ГИС-исследование проведено впервые в МНИОИ им. П.А. Герцена в 2004 г., и за два года было выполнено около 10 анализов. Для проведения ИГХ-исследований использовались поликлональные концентрированные антитела к c-erbB-2 (A0485, «Dako»).

С 2005 г. началось российское многоцентровое исследование «Эпидемиологическая программа скрининга ис-

Таблица 1. Рекомендации ASCO/CAP 2007 г. по оценке иммуногистохимической реакции при HER2-тестировании рака молочной железы

ИГХ-реакция, баллы	Оценка экспрессии HER2	Картина реакции
0	Отрицательная	Отсутствие мембранного окрашивания или наличие слабого окрашивания менее 10% опухолевых клеток
1+	Отрицательная	Слабое мембранное окрашивание более 10% опухолевых клеток
2+	Неопределенная	Умеренное мембранное окрашивание более 10% опухолевых клеток или сильное мембранное окрашивание менее 30% опухолевых клеток
3+	Положительная	Сильное полное мембранное окрашивание более 30% опухолевых клеток

следования HER2-статуса у пациенток с раком молочной железы». Уже в первый год действия программы с 2005 по 2006 г. было протестировано 1198 образцов рака молочной железы, а в 2007 г. все лаборатории, участвующие в программе, исследовали 25 756 образцов. В итоге с 2001 по 2011 г. в России было протестировано более 170 тыс. больных раком молочной железы. В настоящее время в России определение HER2-статуса рака молочной железы проводится в 89 лабораториях, включая 8 референсных центров по всей стране. В 2011 г. лаборатории и референсные центры, участвующие в скрининге, протестировали 43 322 пациенток, из них в Северо-Западном федеральном округе — 5293, Центральном федеральном округе — 15 589 (включая Москву — 6343), Уральском федеральном округе — 4544, Южном федеральном округе — 4628, Северо-Кавказском федеральном округе — 543, Приволжском федеральном округе — 7057, Сибирском федеральном округе — 4203, Дальневосточном федеральном округе — 1465 больных. Также весьма показательны данные, иллюстрирующие увеличение ГИС-исследований: в 2007 г. — 335 исследований, которые выполнялись в двух лабораториях, а в 2011 г. — 3862 исследования в 14 лабораториях. В 2009 г. ГИС-исследования провели в 26,26% случаев с неопределенным статусом по ИГХ 2+, в 2010 г. — в 52,82%, в 2011 — в 76,39%, что указывает на распространение ГИС-исследования в крупных клинических онкологических центрах России и повышение уровня квалификации патологоанатомов, использующих самые современные технологии. Для исследования амплификации гена *HER2* в настоящее время в нашей стране в подавляющем большинстве случаев используется либо методика флюоресцентной, либо хромогенной усиленной серебром гибридизации *in situ*. Из 43 322 случаев, протестированных в 2011 г., положительный HER2-статус по ИГХ 3+ был выявлен в 6700 случаях, и в 1134 случаях (из 3662 образцов ИГХ 2+) была обнаружена амплификация гена *HER2*. Иными словами, положительный HER2-статус был определен в 18,08% всех наблюдений. Эти результаты практически полностью совпадают с результатами зарубежных клинических исследований [8] и показывают в целом удовлетворительное качество проведения тестирования. Однако следует отметить, что результаты региональных лабораторий и референсных центров различны, а совпадение варьирует от 60 до 95%.

Сравнение числа пациенток с положительным HER2-статусом (ИГХ 3+ и ИГХ 2+/ГИС+), выявленных в 2010 г. — 15,82 и в 2011 г. — 18,08, показало, что внедрение автоматизированного иммуногистохимического метода с помощью иммуногистостейнеров, которые за последний год появились во многих лабораториях, улучшает качество тестирования и позволяет исключить ряд ошибок, обусловленных человеческим фактором. На повышение уровня HER2-тестирования в регионах большое влияние оказывает и сама система референсных центров, созданная под эгидой Российского общества патологоанатомов.

В соответствии с принятыми решениями все лаборатории, участвующие в программе, направляют свои материалы для проведения контрольных ИГХ- и ГИС-исследований в соответствующие референсные центры. В 2011 г. референсные центры вступили в международную систему контроля качества иммуногистохимических исследований, что позволяет соответствовать всем международным стандартам.

До 2010 г. лаборатории, проводящие тестирование, пользовались критериями оценки, утвержденными FDA, т.е. пограничным для ИГХ 3+ считалось значение в 10% клеток опухоли с выраженным полным мембранным окрашиванием. В 2010 г. на Форуме экспертов по раку молочной железы было принято решение о переходе всех лабораторий на критерии оценки, выработанные и рекомендованные ASCO/CAP, в которых пограничным значением для оценки ИГХ 3+ принято значение в 30% клеток опухоли с выраженным полным мембранным окрашиванием. Поэтому в 2011 г. стало возможным проанализировать изменение результатов референсных центров по HER2-тестированию в зависимости от используемых критериев оценки. Анализ этих данных показал, что при применении стандартизованных иммуногистохимических методов количество случаев, имеющих оценку ИГХ 3+ с критерием в 10%, составило 14,73%, а при 30% — 15,32%. Статистическая обработка этих результатов показала недостоверность различий в целом. Однако для групп с оценкой ИГХ 1+ и 2+ выявленные различия являются достоверными (табл. 2). В большинстве референсных центров произошло увеличение числа образцов, имеющих статус ИГХ 1+ и 2+, т.е. снизилось количество ложнопозитивных (ИГХ 3+) случаев (табл. 3). Это свидетельствует об улучшении качества тестирования, снижении количества неоправданного назначения дорогостоящего таргетного препарата, что способствует выработке адекватного индивидуального плана лечения для каждого пациента.

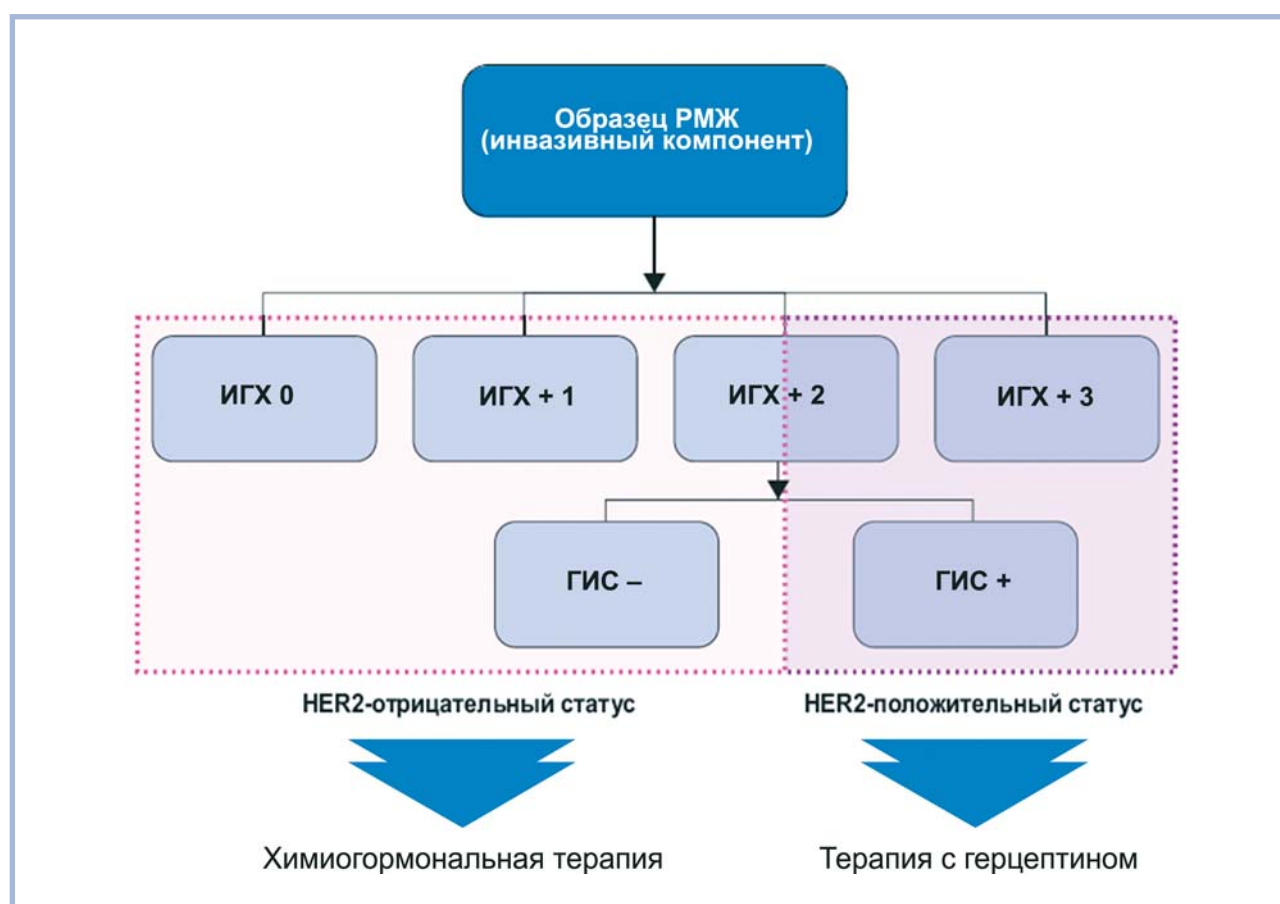
Во всех лабораториях, проводящих HER2-тестирование, обязательным является также оценка рецепторного статуса рака молочной железы, т.е. всегда определяются наличие рецепторов эстрогенов, прогестерона и экспрессия HER2. В ряде лабораторий проводится также определение уровня экспрессии показателя пролиферативной активности белка Ki-67. Анализ экспрессии рецепторов эстрогена и прогестерона и HER2, по данным ряда референсных центров, показал, что опухоли с нали-

Таблица 3. Изменения результатов ИГХ-тестирования (в %) в различных референсных центрах при введении новой шкалы тестирования

ИГХ	Референсный центр			
	A	B	C	D
3+	-7,6	+2,13	-2	-1
2+	+3	+8,22	+5	+3
1+	+6	+6,45	-6	+1,5

Таблица 2. Результаты HER2-тестирования (в %) при использовании различных критериев оценки

ИГХ	2009 г., 10% критерий	2011 г., 30% критерий	Достоверность различий
3+	14,73	15,32	p>0,05
2+	12,97	15,65	p<0,05
1+	26,86	30,61	p<0,05
0	45,43	38,42	p<0,05



Алгоритм HER2-тестирования рака молочной железы.

чием рецепторов эстрогенов и прогестерона более чем в 1% опухолевых клеток и с гиперэкспрессией HER2 (ИГХ 3+) составляют около 9% всех исследованных случаев, а трижды негативные опухоли (экспрессия гормональных рецепторов и HER2-отрицательная) — 16%.

Таким образом, опыт десятилетнего тестирования HER2-статуса рака молочной железы в России показал, что повышение квалификации персонала, как врачей-патологоанатомов, так и лабораторных техников, внедрение стандартизованных методов работы и стандартных реа-

гентов, автоматизация лабораторий, использование внешней системы контроля качества в референсных центрах приводят к улучшению качества тестирования чувствительности к таргетным лекарственным препаратам, снижению числа ложноположительных и ложноотрицательных результатов, тем самым способствуя развитию индивидуализированной медицины и адекватному использованию экономических ресурсов.

Исследование проводится при поддержке ЗАО «РОШ-Москва».

ЛИТЕРАТУРА

1. Герштейн Е.С., Кушлинский Н.Е. Тканевые маркеры как факторы прогнозов при раке молочной железы. Практическая онкология. 2002; 3 (1): 38—44.
2. Завалишина Л.Э., Андреева Ю.Ю., Рязанцева А.А., Франк Г.А. Методические рекомендации по проведению HER2-тестирования рака молочной железы. Архив патологии. 2011; Приложение.
3. Завалишина Л.Э., Франк Г.А. Морфологическое исследование HER2-статуса рака молочной железы. М.: Media Medica; 2010.
4. Франк Г.А., ред. Руководство по интерпретации HER2-статуса методом in situ-гибридизации Ventana INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail Assay. М.: Рош Диагностика Рус; 2011.
5. Slamon D.J., Godolphin W., Yones I.A., Holt J.A., Wong S.G., Keith D.E. et al. Studies of HER2/neu protooncogene in human breast cancer and ovarian cancer. Science. 1989; 244: 707—12.
6. Slamon D.J., Leyland-Jones B., Shak S., Fuchs H., Paton V. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against her2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER-2. N. Engl. J. Med. 2001; 344 (11): 783—92.
7. Wolf A.S., Hammond M.E.H., Schwartz J.N., Hagerty K.L., Allred D.C., Cote R.J. American Society of Clinical Oncology / College of American Pathologist guideline recommendations for human epidermal growth receptor 2 testing in breast cancer. Arch. Pathol. Lab. Med. 2007; 131 (1): 18—43.
8. Yaziji H., Goldstein L.C., Barry T.S., Werling R., Hwang H., Elis G.K. et al. HER2 testing in breast cancer using parallel tissue based methods. J. A. M. A. 2004; 291: 1972—7.

Поступила 15.06.2012