

С.В. Клименко
Л.М. Захарцева

Научный центр радиационной
медицины АМН Украины

Киевская городская
онкологическая больница,
Киев, Украина

Ключевые слова: рак молочной
железы, диагностика, Her2/neu,
мутация, иммуногистохимический
метод, флуоресцентная
гибридизация *in situ*.

ОЦЕНКА МУТАЦИОННОГО СТАТУСА ГЕНА *HER2/NEU* В КЛЕТКАХ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Резюме. Проанализированы литературные данные и результаты собственных наблюдений в отношении оценки мутационного статуса гена *Her2/neu* у больных раком молочной железы. Обсуждается алгоритм обследования этих пациентов с использованием иммуногистохимического исследования и флуоресцентной гибридизации *in situ*.

Ген *Her2/neu*, расположенный на длинном плече хромосомы 17 (17q12–q21), кодирует трансмембранный протеин массой 185 кДа с выраженной тирозинкиназной активностью [1, 20]. Белковый продукт гена относится к семейству рецепторов эпидермального фактора роста, вовлеченных в активацию сигнальных путей регуляции нормального роста и развития ткани молочной железы [5, 7, 38]. Гиперэкспрессия протоонкогена *Her2/neu* является распространенным генетическим нарушением при раке молочной железы (РМЖ) [3]. В ранних работах аномалия этого гена выявлена у 30% больных [26, 27]; в последующих исследованиях, более корректных в отношении включения пациентов, частота гиперэкспрессии *Her2/neu* установлена на уровне 20% [17, 39].

Гиперэкспрессия *Her2/neu* относится к важным прогностическим маркерам и предопределяет более частое рецидивирование, снижение показателя выживаемости у больных с впервые выявленным РМЖ. Данные о статусе рецептора *Her2/neu* могут помочь принять оптимальное решение при выборе схем адьювантной терапии и прогнозировать эффективность противоопухолевых препаратов различных классов. Пациенты с повышенной экспрессией *Her2/neu* характеризуются худшим ответом на гормональную [6, 25] и цитостатическую терапию, не включающую антрациклиновые антибиотики [16, 21, 30]. В то же время таксаны, наряду с антрациклинами, демонстрируют хорошую эффективность как при первичном, так и метастатическом *Her2/neu*-позитивном РМЖ [13, 21, 30, 33].

С введением в клиническую практику **трастузумаба (Герцептина)** — высокоэффективного специфического гуманизованного моноклонального антитела (МкАТ) против *Her2/neu*, корректная оценка статуса этого рецептора стала ключевым моментом в принятии решения о тактике лечения пациента с РМЖ. Назначение трастузумаба как в виде монотерапии, так и в комбинации с другими противоопухолевыми агентами, сопровождается повышением уровня ответа, удлинением интервала до прогрессирования заболевания и улучшением общей выживаемости при лечении пациентов с метастатическим *Her2/neu*-позитивным раком [28]. Результаты проспективных рандомизирован-

ных клинических исследований продемонстрировали, что трастузумаб на $\frac{1}{2}$ снижает риск рецидивирования и на $\frac{1}{3}$ — смертность больных с РМЖ ранних стадий [12, 19, 24]. Однако терапия трастузумабом не лишена недостатков. Во-первых, это значительная стоимость препарата при необходимости длительной терапии. Во-вторых, лечение трастузумабом ассоциируется с риском кардиотоксичности. Риск не столь значителен, однако в ряде случаев приводит к развитию таких серьезных осложнений, как застойная сердечная недостаточность [10, 29]. Все вместе взятое, а именно ожидаемая при *Her2/neu*-позитивном РМЖ высокая эффективность трастузумаба, существенная стоимость и потенциальная кардиотоксичность препарата, требует корректной оценки статуса рецептора *Her2/neu*. Поэтому Американское общество клинической онкологии в 2001 г. рекомендовало оценку статуса *Her2/neu* в качестве рутинной диагностической процедуры для всех пациентов с РМЖ [2]. В подавляющем большинстве случаев (до 90%) причиной гиперэкспрессии белка является амплификация гена *Her2/neu* [23]. Усиленная вследствие амплификации гена экспрессия соответствующего белка на поверхности опухолевой клетки предопределяет специфичность терапии трастузумабом.

Существует целый ряд методов, позволяющих прогнозировать эффективность лечения трастузумабом. Так как трастузумаб специфично связывается с белком *Her2/neu*, оценка этой молекулы предоставляет информацию о целесообразности назначения препарата тому или иному пациенту. Уровень экспрессии белка *Her2/neu* можно определить с помощью Вестерн-блоттинга, методов иммунного окрашивания *in situ*, в частности иммунофлуоресцентного (ИФ) и иммуногистохимии (ИГХ). ИГХ метод нашел широкое применение в связи с тем, что повседневно используется для оценки экспрессии многих других протеинов и может быть выполнен на срезах парафиновых блоков ткани, фиксированной формалином. Согласно консенсуса американских патологов и управления по контролю за пищевыми продуктами и лекарственными средствами США (FDA) [37] система оценки результатов ИГХ-исследования экспрессии *Her2/neu* включает 4 категории (0, 1+, 2+, 3+); результат является позитивным — 3+, если

более 30% клеток инвазивной опухоли демонстрируют равномерное окрашивание мембраны. При несомненных достоинствах ИГХ-метода, а именно легкой воспроизводимости и относительной дешевизне, он имеет и недостатки. Возможны ложнопозитивные результаты, обусловленные техническим несовершенством метода. Кроме того, гиперэкспрессия протеина может быть и несвязанной с амплификацией гена *Her2/neu*. Возможны и ложноотрицательные результаты теста. В некоторых случаях, после заливки в парафин, ткани РМЖ, характеризующиеся амплификацией гена *Her2/neu* и гиперэкспрессией соответствующего белка, могут терять рецепторы на поверхности мембраны и утрачивать способность давать специфическое окрашивание при проведении ИГХ-исследования [27].

Значительно более надежным методом выявления амплификации гена *Her2/neu* является флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH) — золотой стандарт в диагностике *Her2/neu*-позитивных РМЖ [15, 37]. Все большее количество клиник использует его в рутинной практике. Метод позволяет оценить количество копий гена в клетке, а более совершенный его вариант — определить количество хромосом 17. Именно этот вариант выбран для данной работы. Считается, что результат теста является положительным, если соотношение среднего количества копий гена *Her2/neu* и среднего числа центромер хромосомы 17 в клетке превышает 2,2 [37].

При должной стандартизации методик данные ИГХ-исследования как при *Her2/neu*-негативном (категории 0 и 1+), так и *Her2/neu*-позитивном РМЖ (категория 3+) подтверждаются результатами FISH. В лаборатории LabCorp соответствие результатов двух методов отмечали у 82% проанализированных пациентов; амплификацию гена определяли в 4,2, 6,7 и 89,3% случаев, относящихся к гистохимическим категориям 0, 1+ и 3+ соответственно [4, 28, 34]. У 4% больных *Her2/neu*-позитивность по результатам ИГХ-исследования (категория 3+) не подтвердилась результатами FISH [22]. Приемлемой для стандартизованной лаборатории считается 5% частота ложнонегативных результатов. Лабораториям рекомендуется проводить параллельную оценку статуса *Her2/neu* с использованием ИГХ-метода и FISH до тех пор, пока у менее 5% больных, относящихся по данным ИГХ-исследования к категории 0/1+, результаты окажутся позитивными при проведении FISH-теста [40].

Большую проблему составляют случаи РМЖ, относящиеся к категории сомнительных по данным ИГХ-исследования. В 15% случаев 10 и более процентов клеток инвазивного рака демонстрируют полное, однако неравномерное окрашивание мембран очевидного радиального характера. Очень редко отмечают вариант интенсивного окрашивания всей мембраны в 30 и менее процентах опухолевых клеток. Эти паттерны относят к категории 2+. Результаты крупных многоцентровых исследований продемонстрировали, что только в части случаев (от 12 до 24%), относящихся к категории 2+, при проведении FISH выявляют ам-

плификацию гена и они являются в действительности *Her2/neu*-позитивными [4, 18, 28, 34].

Диагностический поиск амплификации гена *Her2/neu* еще более усложнен из-за частой выявляемости при РМЖ полисомии хромосомы 17 [31, 35]. До 35% случаев заболевания характеризуются полисомией хромосомы 17 низкой степени и 8% — высокой [8, 15]. Полисомия сопровождается соответствующим увеличением количества копий генов, расположенных на хромосоме, и, как правило, — повышенной экспрессией кодируемых белков. При проведении ИГХ-оценки статуса *Her2/neu* это часто приводит к ложнопозитивной интерпретации результатов теста.

В данной работе авторы провели в ряде случаев РМЖ параллельную оценку статуса *Her2/neu* — определяли гиперэкспрессию белка *Her2/neu* с помощью ИГХ-метода, а амплификацию гена *Her2/neu* — с помощью FISH. Для иммуногистохимического окрашивания использовали набор Herceptest производства «Dako» (Дания), для FISH — набор PathVysion производства «Vysis» (США) согласно инструкциям фирм-изготовителей. Сопоставление результатов двух методов оценки статуса *Her2/neu* продемонстрировало высокую сопоставимость данных ИГХ- и FISH-методов в отношении случаев РМЖ категории 0, 1+ и 3+ (рисунок а, б) и подтвердило необходимость обязательного использования FISH для подтверждения *Her2/neu*-позитивности у больших, относящихся по данным исследования ИГХ к категории 2+. По нашим данным у меньше 25% пациентов с РМЖ отмечают полисомию хромосомы 17, в большом количестве случаев не сопровождающуюся амплификацией гена *Her2/neu* (см. рисунок в). Чаще отмечали полисомию низкой степени, согласно критериям S. Wang и соавторов [35], со средним количеством хромосом 17 у больных с аномалией, составлявшим 3,3 на клетку. Результаты исследований подтверждают, что ИГХ 3+-клетки РМЖ могут не характеризоваться амплификацией гена *Her2/neu*; гиперэкспрессия протеина в такой ситуации может быть обусловлена полисомией хромосомы 17. При сомнительном результате ИГХ-исследования, соответствующем категории 2+, полисомия хромосомы 17 также весьма вероятна. В этой связи закономерен вопрос, насколько полисомия 17 является причиной несоответствия результатов ИГХ- и FISH-методов определения амплификаций гена *Her2/neu*. Y. Ma и соавторы [15] при анализе результатов обследования пациентов без амплификации гена *Her2/neu* выявили существенно более высокую частоту полисомии хромосомы 17 в группе ИГХ 3+ пациентов, чем в группе ИГХ 0/1+/2+. D. Varshney и соавторы [32] отмечали у больных с РМЖ без амплификации гена *Her2/neu* полисомию 17 в 4% ИГХ 2+ случаев и в 5,5% — ИГХ 0/1+, в 47% — ИГХ 3+. Данные свидетельствуют, что полисомия 17 чаще обуславливает значительную гиперэкспрессию белка *Her2/neu*. Увеличение количества хромосом 17 в клетках опухоли без амплификации гена *Her2/neu* статистически значимо коррелирует с ложной позитивностью ИГХ 3+ случаев РМЖ [14].

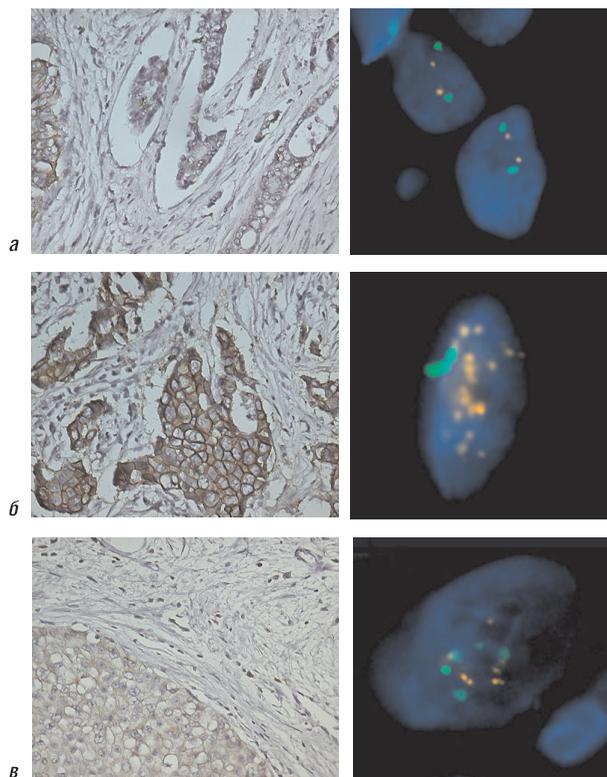


Рисунок. Результаты оценки мутационного статуса *Her2/neu* у больных с РМЖ методом ИГХ (слева, $\times 200$) и флуоресцентной гибридизации *in situ* (справа, $\times 1000$, зеленые сигналы соответствуют центромерам хромосомы 17, оранжевые — копиям гена *Her2/neu*): а — ИГХ 1+ случай без амплификации гена *Her2/neu*; б — ИГХ 3+ случай с амплификацией гена *Her2/neu*; в — ИГХ 2+ случай без амплификации гена *Her2/neu* с полисомией хромосомы 17

Полисомия хромосомы 17 — важный клинический маркер, а ее наличие ассоциируется с метастатическим поражением лимфатических узлов [11] и рядом других факторов неблагоприятного прогноза [36]. Однако более важным и актуальным до настоящего времени является вопрос, будет ли эффективной терапия трастузумабом у больных с полисомией хромосомы 17? По мнению некоторых исследователей, полисомия 17, не сопровождающаяся значительным увеличением количества копий *Her2/neu*, как в случае амплификации гена, не приводит к достаточному для целенаправленной терапии моноклональным антителом повышению уровня экспрессии белка *Her2/neu* [35]. Однако большинство авторов полагают [15, 36], что при гиперэкспрессии белка *Her2/neu* пациентов с полисомией хромосомы 17 следует лечить трастузумабом даже при отсутствии его амплификации. Ожидаемые результаты проспективных клинических исследований дадут окончательный ответ на этот вопрос.

В отношении диагностики данные авторских наблюдений и результаты, опубликованные во множестве работ, свидетельствуют о необходимости чрезвычайной деликатности в интерпретации результатов определения гиперэкспрессии *Her2/neu*, что обусловлено частым несоответствием данных

ИГХ- и FISH-методов, а также вероятностью полисомии хромосомы 17. Большинство исследователей [37] считают целесообразным проведение анализа экспрессии *Her2/neu* по консенсусному алгоритму. На первом этапе проводится скрининг с использованием ИГХ-метода: ИГХ 3+ случаи рассматривают как позитивные, ИГХ 0/1+ — как негативные. В отношении ИГХ 2+ случаев проводится повторное тестирование с использованием метода FISH, позволяющего оценить количество копий гена *Her2/neu* и хромосомы 17. В некоторых странах, таких как Бельгия и Финляндия, для повышения точности результатов повторному тестированию с помощью FISH подвергают все случаи, относящиеся к ИГХ-категориям 2+ и 3+. Группа канадских исследователей рекомендует использовать FISH для анализа ИГХ 2+ больных и всех других случаев, в которых может быть заподозрена *Her2/neu*-позитивность [9]. Рациональным подходом, который может быть использован в Украине, является тестирование с помощью FISH-метода случаев РМЖ, относящихся по данным ИГХ-исследования к категории 2+, и всех пациентов, которым планируется назначение терапии с включением трастузумаба.

ЛИТЕРАТУРА

1. Akiyama T, Sudo C, Ogawara H, *et al.* The product of the human c-erbB-2 gene: a 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. *Science* 1986; **232**: 1644–6.
2. Bast RC Jr, Ravdin P, Hayes DF, *et al.* 2000 update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer: Clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* 2001; **19**: 1865–78.
3. Brison O. Gene amplification and tumor progression. *Biochim Biophys Acta* 1993; **1155**: 25–41.
4. Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, *et al.* Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol* 1999; **17**: 2639–48.
5. Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC, *et al.* Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGC receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science* 1985; **230**: 1132–9.
6. De Placido S, Carlomagno C, De Laurentis M, Bianco AR. C-erbB2 expression predicts tamoxifen efficacy in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 1998; **52**: 55–64.
7. Di Augustine RP, Richards RG, Sebastian J. EGF-related peptides and their receptors in mammary gland development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1997; **2**: 109–17.
8. Downs-Kelly E, Yoder BJ, Stoler M, *et al.* The influence of polysomy 17 on HER2 gene and protein expression in adenocarcinoma of the breast: A fluorescent *in situ* hybridization, immunohistochemical, and isotopic mRNA *in situ* hybridization study. *Am J Surg Pathol* 2005; **29**: 1221–7.
9. Hanna W, O'Malley F. Updated recommendations from the HER2/neu consensus meeting. *Current Oncology* 2002; **9** (Suppl 1): 18–9.
10. Hayes DF, Picard MH. Heart of darkness: The downside of trastuzumab. *J Clin Oncol* 2006; **24**: 4056–8.
11. Ichikawa D, Hashimoto N, Hoshima M, *et al.* Analysis of numerical aberrations of specific chromosomes by fluorescent *in situ* hybridization as a diagnostic tool in breast cancer. *Cancer* 1996; **77**: 2064–9.

12. Joensuu H, Kellokumpu-Lehtinen P-L, Bono P, *et al.* Adjuvant docetaxel or vinorelbine with or without trastuzumab for breast cancer. *N Engl J Med* 2006; **354**: 809–20.
13. Konecny GE, Thomssen C, Luck HJ, *et al.* Her-2/neu gene amplification and response to paclitaxel in patients with metastatic breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2004; **96**: 1141–51.
14. Lal P, Salazar PA, Ladanyi M, Chen B. Impact of Polysomy 17 on HER-2/neu Immunohistochemistry in Breast Carcinomas without HER-2/neu Gene Amplification. *J Mol Diagn* 2003; **5**: 155–9.
15. Ma Y, Lespagnard L, Durbecq V, *et al.* Polysomy 17 in HER-2/neu status elaboration in breast cancer: effect on daily practice. *Clin Cancer Res* 2005; **11**: 4393–9.
16. Menard S, Valagussa P, Pilotti S, *et al.* Response to cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in lymph node-positive breast cancer according to HER2 overexpression and other tumor biologic variables. *J Clin Oncol* 2001; **19**: 329–35.
17. Owens MA, Horten BC, Da Silva MM. HER2 amplification ratios by fluorescence in situ hybridization and correlation with immunohistochemistry in a cohort of 6556 breast cancer tissues. *Clin Breast Cancer* 2004; **5**: 63–9.
18. Perez EA, Roche PC, Jenkins RB, *et al.* HER2 testing in patients with breast cancer: Poor correlation between weak positivity by immunohistochemistry and gene amplification by fluorescence in situ hybridization. *Mayo Clin Proc* 2002; **77**: 148–54.
19. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, *et al.* Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005; **353**: 1659–72.
20. Popescu NC, King CR, Kraus MH. Localization of the human erbB-2 gene on normal and rearranged chromosomes 17 to bands q12-21.32. *Genomics* 1989; **4**: 362–6.
21. Pritchard KI, Shepherd LE, O'Malley FP, *et al.* HER2 and responsiveness of breast cancer to adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med* 2006; **354**: 2103–11.
22. Reddy JC, Reimann JD, Anderson SM, *et al.* Concordance between central and local laboratory HER2 testing from a community-based clinical study. *Clin Breast Cancer* 2006; **7**: 153–7.
23. Reese D, Slamon DJ. ERBB2 signal transduction in human breast and ovarian cancer. *Stem Cells* 1997; **15**: 1–8.
24. Romond EH, Perez EA, Bryant J, *et al.* Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005; **353**: 1673–84.
25. Ross JS, Fletcher JA. The Her-2/neu oncogene: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. *Semin Cancer Biol* 1999; **9**: 125–38.
26. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, *et al.* Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987; **235**: 177–82.
27. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, *et al.* Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989; **244**: 707–12.
28. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, *et al.* Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001; **344**: 783–92.
29. Tan-Chiu E, Yothers G, Romond E, *et al.* Assessment of cardiac dysfunction in a randomized trial comparing doxorubicin and cyclophosphamide followed by paclitaxel, with or without trastuzumab as adjuvant therapy in node-positive, human epidermal growth factor receptor 2-overexpressing breast cancer: NSABP B-31. *J Clin Oncol* 2005; **23**: 7811–9.
30. Thor AD, Berry DA, Budman DR, *et al.* ErbB-2, p53, and efficacy of adjuvant therapy in lymph node-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998; **90**: 1346–60.
31. Tsukamoto F, Miyoshi Y, Egawa C, *et al.* Clinicopathologic analysis of breast carcinoma with chromosomal aneusomy detected by fluorescence in situ hybridization. *Cancer* 2001; **93**: 165–70.
32. Varshney D, Zhou YY, Geller SA, Alsabeh R. Determination of HER-2 status and chromosome 17 polysomy in breast carcinomas comparing HercepTest and Path-Vysion FISH assay. *Am J Clin Pathol* 2004; **121**: 707–9.
33. Villman K, Sjostrom J, Heikkila R, *et al.* TOP2A and HER2 gene amplification as predictors of response to anthracycline treatment in breast cancer. *Acta Oncol* 2006; **45**: 590–6.
34. Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, *et al.* Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2002; **20**: 719–26.
35. Wang S, Saboorian MH, Frenkel EP, *et al.* Aneusomy 17 in breast cancer: its role in HER-2/neu protein expression and implication for clinical assessment of HER-2/neu status. *Mod Pathol* 2002; **15**: 137–45.
36. Watters AD, Going JJ, Cooke TG, Bartlett JM. Chromosome 17 aneusomy is associated with poor prognostic factors in invasive breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 2003; **77**: 109–14.
37. Wolff AC, Hammond MEH, Schwartz JN, *et al.* 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* 2007; **25**: 118–45.
38. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signaling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; **2**: 127–37.
39. Yaziji H, Goldstein LC, Barry TS, *et al.* HER-2 testing in breast cancer using parallel tissue-based methods. *JAMA* 2004; **291**: 1972–7.
40. Zarbo RJ, Hammond ME. Her-2/neu testing of breast cancer patients in clinical practice. *Arch Pathol Lab Med* 2003; **127**: 549–53.

THE ASSESSMENT OF HER2/NEU GENE MUTATIONAL STATUS IN BREAST CANCER CELLS

S.V. Klymenko, L.M. Zakcharceva

Summary. *The data of literature and own observations were analyzed with respect to Her2/neu gene mutational status assessment. The algorithm of immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization performance for breast cancer patients was discussed.*

Key Words: breast cancer, diagnostics, Her2/neu, mutation, immunohistochemistry, fluorescent *in situ* hybridization.

Диагностические центры, проводящие исследования Her2-неу-статуса с помощью иммуногистохимического и FISH-методов:

Захарцева Л.М.

03115, Киев, ул. Верховинная, 69

Киевская городская онкологическая больница, отделение патанатомии

E-mail: lmz@list.ru

Клименко С.В.

04050, Киев, ул. Мельникова, 53

Научный центр радиационной медицины

АМН Украины, отдела гематологии

и трансплантологии

E-mail: klymenko_sergiy@yahoo.co.uk