

УДК 614

Грищенко Наталия Викторовна

кандидат биологических наук,
научный сотрудник лаборатории иммунологии гемопоэза
централизованного клиничко-лабораторного отдела НИИ и КО,
НМИЦ онкологии им.Н.Н. Блохина» Минздрава России
natali-2712@mail.ru

Глухов Евгений Вячеславович

кандидат медицинских наук,
научный сотрудник отделения опухолей печени и поджелудочной железы
(хирургическое отделение №7),
ФГБУ «НМИЦ онкологии им.Н.Н. Блохина» Минздрава России.
Drgluhov@mail.ru

Natalia V. Grishchenko

Candidate of Biological Sciences
Scientific employee of the laboratory of hematopoiesis immunology
of the centralized clinical and laboratory department
of the Research Institute and КО,
NMI of Oncology named after N.N. Blokhin "
of the Ministry of Health of Russia
natali-2712@mail.ru

Evgeny V. Glukhov

Candidate of medical sciences
Research associate of office of tumors of a liver and pancreas
(surgical office No. 7),
Federal State Budgetary Institution NMITs onkologii im.
N. N. Blochina of the Russian Ministry of Health.
Drgluhov@mail.ru

**Стандартизированная система подсчета и интерпретации результатов
определения экспрессии HER2/neu**

**Standardized system for counting and interpreting the results of HER2 /
neu expression determination**

Аннотация: С развитием методов биологии принципиально изменился подход к терапии пациентов с РМЖ. Исследования в области молекулярной биологии при РМЖ чрезвычайно обширны, что диктует необходимость их систематизации с целью формирования в среде практических онкологов перехода от эмпирического системного лечения РМЖ к индивидуализированному сегодня, и персонифицированному в ближайшем будущем. Важным достижением современной лекарственной

терапии РМЖ является создание таргетных препаратов с новым, уникальным, индивидуальным механизмом действия.

Ключевые слова: рак молочной железы (РМЖ), иммуногистохимический метод (ИГХ), таргетная терапия, HER2/neu, трастузумаб, лапатиниб, пертузумаб, FISH анализ, иммуноферментный метод (ELISA).

Annotation: *With the development of biology methods, the approach to therapy of patients with breast cancer has changed fundamentally. Research in the field of molecular biology in breast cancer is extremely extensive, which necessitates their systematization in order to form among practical oncologists transition from empirical systemic treatment of breast cancer to individualized today, and personalized in the near future. An important achievement of modern drug therapy of breast cancer is the creation of targeted drugs with a new, unique, individual mechanism of action.*

Keywords: *breast cancer (breast cancer), immunohistochemical method (IHC), target therapy, HER2 / neu, trastuzumab, lapatinib, pertuzumab, FISH analysis, enzyme immunoassay (ELISA).*

Рак молочной железы (РМЖ) является наиболее распространенным онкологическим заболеванием среди женщин во многих странах. По данным Всемирной Организацией Здравоохранения (ВОЗ), в мире каждый год регистрируется 1,1 млн. новых случаев заболевания. Ежегодно от РМЖ погибают более 411 тысяч женщин.

Благодаря открытиям в молекулярной биологии ученые пришли к выводу, что понятие РМЖ объединяет гетерогенную группу опухолей, существенно различающихся по своему генетическому профилю. Этот профиль определяет особенности клинического течения, чувствительность к терапии, индивидуальный прогноз, а также лежит в основе современной персонализации лечения РМЖ. В углубленных научных программах выделяется большое число различных вариантов РМЖ, однако в клинической практике по-прежнему пользуются классификацией на основе наличия/отсутствия рецепторов эстрогенов (ER), прогестерона (PR) и гиперэкспрессия/амплификация HER2/neu [2].

С развитием методов биологии принципиально изменился подход к терапии пациентов с РМЖ. Несмотря на эмпирический характер подобной терапии, улучшение результатов было достигнуто за счет дифференцированного подхода, учитывающего рецепторный статус конкретной опухоли (клиническое решение принимается на основании молекулярно-генетической или иммуногистохимической классификации РМЖ). Вторым важным достижением современной лекарственной терапии РМЖ является создание таргетных препаратов с новым, уникальным, индивидуальным механизмом действия. Таргетная терапия рака также осуществляется с учетом рецепторного статуса опухоли.

Исследования в области молекулярной биологии при РМЖ чрезвычайно обширны, что диктует необходимость их систематизации с целью формирования в среде практических онкологов перехода от эмпирического системного лечения РМЖ к индивидуализированному сегодня, и персонифицированному в ближайшем будущем [2,3].

Иммуногистохимический метод (ИГХ), наиболее широко используемый для определения гиперэкспрессии белка HER2/neu, числа копий или амплификации гена HER2/neu используется метод флюоресцентной гибридизации *in situ* (Fluorescent In Situ Hybridization - FISH). Иммуногистохимический метод получивший наибольшее распространение в клинической практике, стал «золотым стандартом» в определении рецепторов эстрогенов, прогестерона и гиперэкспрессии белка HER2/neu в клетках РМЖ. Метод позволяет определить процент положительно реагирующих клеток, оценить степень интенсивности реакции и дать точную рецепторную характеристику опухоли.

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 [1,5].

В настоящее время, с появлением коммерческих наборов для проведения иммуногистохимического анализа, стало возможным стандартизировать методики определения экспрессии HER-2/neu. Американское Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (Food and Drug Administration) одобрило два вида антител для иммуногистохимического определения выявления больных, являющимися кандидатами для терапии Герцептином. Они включают Herceptest (DAKO Cytomation, Copenhagen, Denmark) и Pathway (Ventana, Medical Systems, Tucson, AZ). Стандартизированная система подсчета и интерпретации результатов иммуногистохимического анализа была разработана с помощью стандартных клеточных линий [1].

Система оценки результатов ИГХ-исследования экспрессии HER2/neu включает следующие критерии (0, 1+, 2+, 3 +):

«0» - отсутствие окрашивания или окрашивание менее 30% опухолевых клеток с любой интенсивностью;

«1+» - слабое неполное мембранное окрашивание более 30% опухолевых клеток;

«2+» - от слабого до умеренного окрашивание всей цитоплазматической мембраны более

30% опухолевых клеток;

«3 +» - сильное окрашивание всей цитоплазматической мембраны более 30% опухолевых клеток [5].

ИГХ 0/1+ случаи рассматриваются как негативные, ИГХ 3 + как позитивные. В отношении ИГХ 2 + случаев проводится повторное тестирование с использованием метода FISH, позволяющего оценить количество копий гена HER2/neu и хромосомы 17.

Согласно современной молекулярной классификации, выделяют HER2/neu(+) РМЖ, т.е вариант опухолей, в которых при иммуногистохимическом исследовании на поверхности опухолевой клетки выявляется повышенная экспрессия рецептора эпидермального фактора роста HER2/neu или определяется амплификация соответствующего кодирующего гена при флюоресцентной/хромогенной гибридизации *in situ* (FISH/CISH). Еще раз подчеркнем, что определение статуса HER2/neu (с помощью ИГХ или FISH/CISH) является сегодня стандартной процедурой (по аналогии с ER и PgR), которая должна обязательно выполняться в рамках первичной диагностики. Пациентам HER2/neu(+)РМЖ (ИГХ 3 + или FISH+) показано назначение различных вариантов анти-HER2 терапии. До последнего времени возможности клиницистов ограничивались наличием только двух анти-HER2 препаратов трастузумаба и лапатиниба [2, 9].

Трастузумаб –гуманизированное моноклональное антитело, связывается с субдоменом IV рецептора в результате чего HER2 блокируется и активируются механизмы антителозависимой клеточной цитотоксичности, а также ингибируется лиганд-независимая HER2 опосредованная активация митогенного сигнала и снижается плотность рецепторов на поверхности опухолевой клетки [2].

Трастузумаб является основным блокирующим HER2 агентом при всех стадиях HER2 позитивного РМЖ, изменяющим при этом естественное течение заболевания [6]. До введения в рутинную практику моноклонального антитела трастузумаба прогноз пациентов с данным подтипом опухоли был неблагоприятным, показатели выживаемости были низки, отмечался высокий риск прогрессирования и смерти. Введение в адьювантные режимы трастузумаба позволило снизить риск прогрессирования до 50% и риск смерти до 30% при раннем раке молочной железы [4].

Лапатиниб – ингибитор тирозинкиназы рецепторов эпидермального фактора роста 1 (HER1) и 2 (HER2/neu). Несмотря на противоопухолевую активность этих двух агентов, у определенной подгруппы пациентов с ранними стадиями HER2-позитивного РМЖ отмечаются рецидивы, при метастатическом заболевании первичная или вторичная резистентность

развивается неизбежно. Именно поэтому ведется разработка методов лечения с использованием множества новых анти-HER2 таргетных агентов с различными механизмами действия.

Пертузумаб являясь человеческим моноклональным антителом, связывается с доменом II димеризации HER2, блокируя лиганд-индуцированную HER2/HER3 гетеродимеризацию. Эта димеризация является важным молекулярным событием, отвечающим за злокачественную прогрессию клеток HER2 позитивного РМЖ через свою потенциальную способность активировать сигнальный путь PI3K/Akt/mTOR [6].

Таблица 1. Механизмы действия анти-HER2 блокирующих агентов [6].

Класс препаратов	Агент	Механизм действия
Моноклональные антитела	Трастузумаб, Пертузумаб	<ul style="list-style-type: none"> • Ингибирование лиганднезависимой HER2/3-димеризации • Ингибирование HER2 опосредованных внутриклеточных сигналов • Индукция антителозависимой клеточной цитотоксичности
Конъюгаты «антитело-лекарственное средство»	T- DM1	<ul style="list-style-type: none"> • Активация трастузумаба • Селективная доставка антимикротрубочкового агента DM1
Малые молекулы	Лапатиниб	<ul style="list-style-type: none"> • Обратимое ингибирование киназной активности HER2 • Обратимое ингибирование киназной активности p95 HER2
	Афатиниб, Нератиниб	<ul style="list-style-type: none"> • Необратимое ингибирование киназной активности EGFR/ HER2/ HER4 • Ингибирование киназной активности мутированного HER2

Совместное использование комбинации трастузумаба с лапатинибом, которые могут полностью заблокировать ErbB2 сигнальный путь и обеспечить максимальный противоопухолевый эффект в сравнении с монотерапией каждым из них. В исследовании Blackwell K.L. с соавт. комбинация трастузумаба и лапатиниба позволила увеличить 6-месячную выживаемость без прогрессирования в сравнении с монотерапией трастузумабом [9].

Даже двойная блокада HER2, HER1, HER3 с помощью комбинаций «трастузумаб+пертузумаб» или «трастузумаб+лапатиниб» (без химиотерапии) приводит к полному патоморфологическому регрессу первичной опухоли у 16–27% пациентов. Это означает, что значительное число пациентов с HER2-позитивной опухолью (по ИГХ) не чувствительны к одной таргетной терапии без сопровождающей

цитотоксической химиотерапии таксанами, антрациклинами и/или платиной. Гетерогенность ответа на HER2 – таргетную терапию связывается с биологическим подтипом, гормонально-рецепторным статусом, изменениями в сигнальных патогенетических путях, таких как фосфатидилинозитол 3-киназа (PI3K), а также с противоопухолевыми иммунными ответами [7].

К одной из наиболее неблагоприятных форм опухоли относятся трижды-негативный РМЖ (ТНРМЖ) с отсутствием экспрессии стероидных гормонов (ER/PR) и HER2.

Для трижды-негативного РМЖ характерно преобладание висцерального метастазирования, включающего легкие и головной мозг, реже метастазирование только в кости, что встречается преимущественно при люминальных подтипах РМЖ, а HER2 гиперэкспрессированные опухоли чаще метастазируют в печень. Пациенты с ТНРМЖ более чувствительны к неоадьювантной химиотерапии и достигают лучших результатов лечения в виде полного ответа (20-30% патологически полного ответа против 5-15% для других подтипов рака молочной железы). Несмотря на это, чем лучший результат получен на неоадьювантном этапе лечения, тем хуже прогноз в послеоперационном периоде, короче безрецидивная и общая выживаемость ($p < 0,0001$) при трижды-негативных вариантах РМЖ. Данный феномен носит название «парадокс трижды-негативного рака молочной железы» [8]. Пациенты с ТНРМЖ согласно рекомендациям St. Gallen-2015 и ESMO подлежат химиотерапии, включающей таксаны, антрациклины (94% поддержки экспертов ST. Gallen's), при наличии мутации BRCA 1/2 возможно назначение препаратов платины (51% голосовавших) [7].

Флюоресцентная гибридизация in situ, используется для определения HER-2/neu статуса - это FISH анализ. Преимущество флюоресцентной гибридизации заключается в возможности определить амплификацию или количество копий гена, кодирующего рецептор HER-2/neu. Техника FISH анализа очень надежна, обеспечивая чувствительность 95,5% и 100% специфичность для обнаружения амплификации гена HER-2/neu. В настоящее время применяются два коммерческих набора для FISH анализа, разрешенные к применению FDA: PathVysion (Vysis, Downers Grove, IL), рекомендованный для пациенток с региональными метастазами, подлежащих адьювантной терапии антрациклин-содержащими схемами, а также для выявления группы больных, у которых возможна терапия Герцептином, и Inform Test (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ), используемый в качестве прогностического фактора у пациенток с раком молочной железы (РМЖ) без региональных метастазов [1].

Иммуногистохимический метод достаточно прост в выполнении и может применяться в условиях большинства патологоанатомических лабораторий, FISH-метод более дорогостоящий и трудоемкий, требующий

специального оборудования. Поэтому, как правило, второй метод используется для подтверждения или уточнения результатов, полученных с использованием иммуногистохимического анализа.

Табл 2. Взаимосвязь иммуногистохимического и FISH методов по определению статуса HER2/neu [1].

	ИГХ метод	FISH метод
HER2/neu	3+	90% (+)
HER2/neu	2+	20-25(+)
HER2/neu	0-1+	10%(+)

Позже был предложен новый метод CISH (chromogenic in situ hybridization), как альтернатива FISH методу. Данный метод основан, в отличие от флюоресцирующей техники, на пероксидазной реакции, которая может визуализироваться с помощью обычного микроскопа и устраняет потребность во флуоресцентном оборудовании. Хотя технические преимущества CISH по сравнению с FISH методом были продемонстрированы, однако, в настоящее время FDA не рекомендует использовать данную методику в клинической практике. Необходимо продолжать исследования, чтобы с полной уверенностью утверждать об адекватности двух методов. Сравнивающей иммуногистохимический и FISH методы, показал значительную степень соответствия результатов. Множество сообщений говорит о более чем 90% совпадений ИГХ и FISH результатов при гиперэкспрессии HER2/neu (3+), в некоторых случаях достигая 100%.

Третий метод, используемый для определения статуса HER2/neu – это *иммуноферментный метод* (ELISA). Он может использоваться для количественного определения всего белка p185 в опухоли или его циркулирующего растворимого фрагмента в плазме или сыворотке крови. Zabrecky и др., используя моноклональные антитела, направленные на ВКД HER2, продемонстрировали, что фрагмент рецептора HER2/neu мигрировал во внеклеточную среду. В последние несколько лет описано множество иммуноферментных методик, используемых для определения ВКД в плазме и сыворотке больных РМЖ и контрольных группах здоровых женщин. Однако отсутствие стандартизации этих методов затрудняет сравнение результатов, полученных разными авторами. В целом, иммуногистохимический и FISH методы - это единственные тесты, рекомендованные FDA для выявления групп больных метастатическим РМЖ, подлежащих терапии Герцептином. В настоящее время иммуногистохимический и FISH методы используются в комплексе, что позволяет более точно отбирать группы пациенток для таргетной терапии [1].

Литература:

1. Алексанян С.Г. Методы исследования онкобелка HER2/. Национальный центр онкологии им. В.А.Фанарджяна. Научно-медицинский журнал НИЗ №3. 2011.

2. Артамонова Е.В., Манзюк Л.В. HER2-позитивный метастатический рак молочной железы: новые возможности терапии/ Маммология №3-4, 2013. С. 60-66.

3. Бондаренко И.Н., Эльхажж М.Х., Прохач А.В., Завизион В.Ф., Чебанов К.О / Рак молочной железы. От молекулярной биологии к персонифицированной терапии/ Мофология. №1. Т. 10. 2016. С. 18-25.

4. Колядина И.В., Гетерогенность рака молочной железы и стадии: биологическое и прогностическое значение. / И.В., Колядина, И.В. Поддубная., Г.А.Франк, Д.В. Комов., А.И.Карселадзе, В.Д. Ермилова, Я.В. Вишневская. - Злокачественные опухоли. 2015;(1):35-45.

5. Савостикова, М.В. Преимущества иммуноцитохимического определения гормонального статуса, онкопротеина HER2/neu и белка пролиферативной активности KI67 у больных раком молочной железы / М.В. Савостикова, Л.В. Мехеда, И.Ю. Коротких, К.П. Лактионов. Онкогинекология №1. 2013. С. 59-64.

6. В.Ф.Семиглазов., В.В.Семиглазов, К.С. Николаев, Г.А.Дашян, Р.М.Палтуев, Р.В.Донских/ Новые возможности лечения HER2-позитивного рака молочной железы. / Эффективная фармакотерапия №14, 2014. С. 8-16.

7. Семиглазов В.Ф.Многоликая биология рака молочной железы: поиски адекватного лечения. Журнал «Злокачественные опухоли. №3 – 2016 г. (19). С.5-10.

8. Смирнова О.В., БОРИСОВ В.Е., ГЕНС Г.П. Эволюция представлений о тройном негативном раке молочной железы: от биологии опухоли к современному лекарственному лечению. Злокачественные опухоли. 2017;(1): 5-17.

9. Стенина, М.Б. Рак молочной железы: наиболее важные научные события и выводы последних лет / М.Б. Стенина, М.А. Фролова. – Практическая онкология – Т.12, №1 – 2011. С.6-11.

Literature:

1. Aleksanyan S. G. Research methods HER2/onkobelka. National center of oncology of V.A. Fanardzhyan. NIZ scientific and medical magazine No. 3. 2011.

2. Artamonova E.V., Manzyuk L.V. HER2 positive metastatic breast cancer: new opportunities Therapy / Mammology No. 3-4, 2013. Page 60-66.

3. Bondarenko I.N., Elkhazhzh M.H., Pro-khach A. V., Zavizion V.F., Chebanov K. About / the Breast cancer. From molecular biology to personified by therapy / *Mofologiya*. No. 1. T. 10. 2016. Page 18-25.

4. Kolyadina I.V., Heterogeneity of a breast cancer and stage: biological and predictive value. / I.V., Kolyadina, I.V. Poddubnaya., G.A. Frank, D.V. Komov., A.I. Karseladze, V.D. Yermilova, Ya.V. Vishnevskaya. - *Malignant tumors*. 2015; (1):35-45.

5. Savostikova, M.V. Advantages of immunocytochemistry determination of the hormonal status, an onkoprotein of HER2/neu and protein of proliferative activity of KI67 at patients with cancer of a mammary gland / M.V. Savostikov, L.V. Mekheda, I.Yu. Korotky, K.P. Laktionov. *Onkoginekologiya* No. 1. 2013. Page 59-64.

6. V.F. Semiglazov., V.V. Semiglazov, K.S. Nikolaev, G.A. Dashyan, R.M. Paltuyev, R.V. Don / new opportunities of treatment of a HER2 positive breast cancer. / *Effective pharmacotherapy* No. 14, 2014. Page 8-16.

7. Semiglazov V.F. Many-sided biology of a breast cancer: search of adequate treatment. Magazine "*Malignant tumors*. No. 3 – 2016 (19). Page 5-10.

8. Smirnovao. Century, Borisov V.E., G.P. GENS. Evolution of ideas of a threefold negative breast cancer: from tumor biology to modern medicinal treatment. *Malignant tumors*. 2017; (1): 5-17.

9. Stenina, M.B. Breast cancer: the most important scientific events and conclusions of the last years / M.B. Stenina, M.A. Frolova. – *Practical oncology* – T.12, No. 1 – 2011. Page 6-11.