

**Казанская государственная медицинская академия
Клинический онкологический диспансер МЗ РТ
Казанский государственный медицинский университет**

Р.Ш.Хасанов, С.В.Петров, Г.А.Раскин

**О тестировании рака молочной железы на
онкоген HER2 (c-erbB2/neu)**

Методические рекомендации

Казань, 2007

Печатается по решению Ученого Совета Казанской государственной медицинской академии (№ 10/10 от 20.12.2006 г.)

Рецензент - заведующий кафедрой патологической анатомии КГМА, доктор медицинских наук Д.Э Цыплаков

О необходимости иммуногистохимического тестирования рака молочной железы на онкоген HER2 (c-erbB-2/neu)

Введение:

Современная диагностика опухолей требует не только верификации гистологического варианта и степени дифференцировки новообразования, но и обязательной оценки прогноза течения болезни и возможного ответа на терапию. В этом отношении чрезвычайно важен иммуногистохимический профиль рака, его морфофункциональная характеристика.

Особенно важными, например, при раке молочной железы, являются такие показатели, как наличие эстрогеновых и прогестероновых рецепторов и сверхэкспрессии онкогена HER2 (c-erbB-2/neu). Последняя характеристика, по данным многих исследователей, не только позволяет оценить прогноз болезни, особенно при наличии метастазов в регионарных лимфатических узлах, но и включить в лечебный комплекс новый патогенетический препарат - «Герцептин» («Трастузумаб»).

Однако для использования этого дорогостоящего препарата необходимо достоверно подтвердить наличие молекулярной мишени у каждой конкретной больной, поскольку в противном случае применение Герцептина оказывается бесполезным.

HER2 (с-erbB-2/neu) - онкоген, кодирующий трансмембранный протеин из семейства рецепторов эпидермального фактора роста. В норме экспрессируется на очень низком уровне и поэтому в клетках иммуногистохимически не выявляется. В то же время показано, что в 25% случаев рака молочной железы наблюдается сверхэкспрессия данного онкогена. Имеются сведения о наличии сверхэкспрессии HER2 и в раках других локализаций. Особенно это относится к раку желудка, и уже имеются отдельные случаи данных опухолей со сверхэкспрессией HER2, при которых успешно была проведена терапия Герцептином.

HER2, не имеет собственных лигандов, но является предпочтительным партнером для других членов семейства рецепторов эпидермального фактора роста. Он образует с ними гетеродимеры, обладающие высокой аффинностью связи, что ведет к пролонгированию внутриклеточного сигнала, запускающего патогенетический механизм, усиливающий злокачественность опухоли. При амплификации гена возможно образование и гомодимеров, обладающих таким же эффектом. Высокая концентрация димеров HER2 на клеточной мембране приводит, в конечном счете, к активации пролиферации, подавлению апоптоза, исчезновению молекул клеточной адгезии, что и определяет агрессивное поведение раковой клетки. Всё это требует ужесточения проводимой терапии и обязательного назначения Герцептина.

Определение экспрессии HER2 является рутинной диагностикой у всех больных раком молочной железы на этапе установления диагноза при первичном обращении больной, либо при развитии метастатического процесса. Показано, что

сверхэкспрессия HER2 является ранним генетическим событием в патогенезе рака молочной железы, и HER2 статус первичной опухоли и в метастатическом узле в большинстве случаев совпадают. HER2 чаще выявляется в протоковых раках молочной железы и часто сопровождается исчезновением прогестероновых и эстрогеновых рецепторов.

Методы **исследования**

Методом выбора для исследования HER2 статуса является иммуногистохимия (ИГХ). В подавляющем большинстве случаев она позволяет с высокой достоверностью определить степень экспрессии HER2 и, соответственно, обозначить прогноз для данного пациента и пригодность для назначения Герцептина. В спорных случаях проводится дополнительное генетическое исследование на предмет амплификации гена (увеличение числа копий гена). Таким методом является *in situ* гибридизация: при использовании флуоресцентной метки - FISH (флуоресцентная *in situ* гибридизация) и при использовании хромогенной метки - CISH (хромогенная *in situ* гибридизация).

Подготовка к иммуногистохимическому исследованию:

Для получения правильного результата необходимо четко придерживаться определенных правил. Ключевую роль

играет стандартизация следующих этапов, предшествующих тестированию:

- 1) время от момента взятия образца до фиксации;
- 2) длительность фиксации;
- 3) тип фиксирующей жидкости;
- 4) стандартная адекватная проводка и заливка в парафин.

Методические особенности:

1. Определение HER2 проводится только на парафиновых срезах верифицированной опухоли. Недопустимо использование замороженных (криостатных) срезов и цитологических мазков. Опухолевый образец должен быть погружен в фиксатор как можно раньше, лучше всего в течение 1 часа от момента взятия, с использованием стандартизованных процедур.
2. Оптимальная фиксация необходима для сохранения белка на поверхности клеток. Время такой фиксации может варьировать от 6 часов (минимальный срок) до 48 часов (максимальный срок).
3. Тип используемого фиксатора может влиять на чувствительность определения HER2 ИГХ методом и появление артефактов. Например, фиксация формалином связана с некоторой потерей белка, особенно если время фиксации менее 6 часов или более 48 часов. Фиксаторы на основе спирта, такие как Z-5 и др., при использовании ИГХ могут быть причиной ложно-положительных результатов. Для точного определения гиперэкспрессии HER2 предпочтительнее использовать 10 % нейтральный

формалин или формалин, стабилизированный фосфатным буфером.

4. При заливке в парафин не следует повышать его температуру выше установленных границ.

Хранение образцов, заключенных в парафин/срезы опухолей, и неокрашенных срезов

Парафиновые блоки могут храниться при комнатной температуре (20-25°C) в течение неопределенного времени. Согласно рекомендациям из руководства по использованию ГерцепТеста, срезы с опухолевых блоков могут храниться при комнатной температуре в течение 4-6 недель без потери антигенной активности. Толщина приготовленных срезов также может влиять на оценку результатов исследования. Для ИГХ исследования толщина срезов должна составлять 3-5 мкм.

Иммуногистохимический анализ

Методология

Факторами, влияющими на точность оценки сверхэкспрессии HER2 с помощью ИГХ метода, являются: чувствительность и специфичность антител; использование «демаскирующих» антиген методик; разведение антител; pH буфера; чувствительность и специфичность проявляющей системы.

На сегодняшний день наиболее широко используемыми антителами против HER2 антигена являются: поликлональные антитела (фирма Dako), использующиеся в ГерцепТесте, моноклональные антитела CB11 (Ventana, Novocastra,) и моноклональные кроличьи антитела серии SP фирмы Lab Vision. «Открытие» антигенных детерминант с использованием метода т.н. «демаскировки» должно проводиться с использованием тепловой обработки срезов в 10 mM цитратном буфере в течение 30 минут при 95-99°C на водяной бане. Использование микроволновой печи для «демаскировки» антигена менее предпочтительно из-за трудностей в стандартизации процесса. «Демаскировка» антигена повышает чувствительность антител и интенсивность реакции.

Для контроля рекомендуется использовать срезы ткани нормального эпителия молочной железы, который не окрашивается антителами к HER2. Если же получено положительное окрашивание эпителия нормальных долек, то результат следует считать ложно-положительным и не принимать в расчет. В таких случаях требуется повторить исследование. Разведение антител должно быть подобрано для каждой конкретной лаборатории, перепроверяться в начале использования каждой партии новых реагентов. В качестве хромогена обычно используют диаминобензидин (DAB).

Контроль качества

Под термином «контроль качества» понимается внутренняя процедура контроля, гарантирующая точность оценки результата при проведении исследования. В ГерцепТесте

при каждой постановке ИГХ реакции следует использовать срезы с заведомо известным HER2 статусом (положительным и отрицательным). Оценивать реакцию на онкобелок HER2 в исследуемой опухоли можно только при адекватном окрашивании контрольных срезов.

Оценка результатов

При интерпретации результатов рекомендуется придерживаться следующих правил:

- оценивают только мембранную реакцию в опухолевых клетках, цитоплазматическое окрашивание клеток не принимается во внимание;
- оценивается окрашивание инвазивного компонента опухоли, а не *in situ* компонента;
- клетки нормального эпителия молочных желез не должны окрашиваться; если их окрашивание наблюдается, исследование должно быть повторено;
- необходимо помнить о том, что артефакты, связанные с плохой фиксацией блоков, могут быть ошибочно интерпретированы как положительные.

Для оценки сверхэкспрессии HER2 традиционно используются следующие критерии:

- «0» - отсутствие окрашивания или окрашивание менее 10 % опухолевых клеток с любой интенсивностью;

- «1+» - слабое неполное мембранное окрашивание более 10 % опухолевых клеток;
- «2+» - от слабого до умеренного окрашивания всей цитоплазматической мембраны более 10 % опухолевых клеток;
- «3+» - сильное окрашивание всей цитоплазматической мембраны более 10% опухолевых клеток.

Для оценки сверхэкспрессии HER2 используют следующий алгоритм. Оценивают окрашивание при низком увеличении (x100). В большинстве положительных случаев (3+) уже при этом увеличении наблюдается значительное окрашивание мембран опухолевых клеток (участки опухоли напоминают сетку-рабицу - переплетение темнокоричневых и коричневых «колец», окружающих клетки). В основном все случаи оценивают при таком увеличении. Если оценка пограничных случаев «1+/2+» сложна, то оценивают реакцию под большим увеличением.

Опухоли, в которых реакция оценена как «0» или «1+» обозначаются как HER2 - негативные, а «2+» или «3+», как позитивные. Герцептин назначается больным, имеющим сверхэкспрессию HER2 с оценкой «3+». При окраске «2+» рекомендуется проведение FISH (или CISH) анализа, и только у FISH/CISH-положительных больных назначают Герцептин.

Заключение о проведенном исследовании

В заключении по исследованию HER2 статуса должна быть указана методология проведенного исследования, которая включает следующую обязательную информацию: метод оценки HER2 статуса (например, ИГХ); использованные антитела или пробы; использованные контроли; система подсчета результатов; окончательная интерпретация критериев оценки.

Рекомендуемая литература:

Завалишина Л.Э., Франк Г.А. Морфологическое исследование НЕК2-статуса. Методические рекомендации и атлас. М.: Медиа Медика, 2006.-60 с.

Пожарисский К.М., Леенман Е.Е. Прогностическое и предсказательное значение иммуногистохимических маркеров. В кн.: «Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека» под ред. Петрова С.В., Райхлина Н.Т., Казань, 2004. - Стр. 310-329.

Подписано в печать 22.05.2007. Бумага офсетная.
Гарнитура «Arial». Формат 60x84_{1/16}. Усл. печ. л. 0,75.
Печать ризографическая. Тираж 200 экз. Заказ 05/53.

Отпечатано с готового оригинал-макета
на полиграфическом участке ООО «Куратор».
420029, г. Казань, ул. Сибирский тракт, 34. Тел. 513-00-88