Архив патологии
2023, т. 85, №4, с. 39-46
https://doi.org/10.17116/patol20238504139

Russian Journal of Archive of Patology =
Arkhiv patologii 2023, vol. 85, no 4, pp. 39-46
https://doi.org/10.17116/patol20238504139

Обновленные рекомендации CAP по определению молекулярно-биологических подтипов рака молочной железы

© Л.Э. ЗАВАЛИШИНА, Е.М. ОЛЮШИНА, Ю.Ю. АНДРЕЕВА, О.А. КУЗНЕЦОВА, Л.В. МОСКВИНА, Г.А. ФРАНК

ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, Москва, Россия

РЕЗЮМЕ

Представлены обновленные рекомендации 2023 г. Колледжа американских патологов (CAP), посвященные иммуногистохимическому определению рецептора эпидермального фактора роста человека 2-го типа (HER2), рецепторов эстрогена (ER) и прогестерона (PgR), а также белка-маркера клеточной пролиферации Ki-67 при раке молочной железы. Обращено внимание на появление двух новых терминов: ER Low Positive и HER2 Low для характеристики опухолей с низкой экспрессией рецепторов эстрогенов и HER2.

Ключевые слова: *рак молочной железы, рецептор эпидермального фактора роста человека 2-го типа, экспрессия HER2, экспрессия ER, экспрессия PgR, экспрессия Ki-67, HER2 Low.*

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ:
Завалишина Л.Э. — https://orcid.org/0000-0002-0677-7991
Олюшина Е.М. — https://orcid.org/0000-0002-7350-3552
Андреева Ю.Ю. — https://orcid.org/0000-0003-4749-6608
Кузнецова О.А. — https://orcid.org/0000-0002-9721-6355
Москвина Л.В. — https://orcid.org/0000-0001-8670-1366
Франк Г.А. — https://orcid.org/0000-0002-3719-5388
Автор, ответственный за переписку: Олюшина Е.М. — e-mail: catya.olyushina@yandex.ru

КАК ЦИТИРОВАТЬ:
Завалишина Л.Э., Олюшина Е.М., Андреева Ю.Ю., Кузнецова О.А., Москвина Л.В., Франк Г.А. Обновленные рекомендации CAP по определению молекулярно-биологических подтипов рака молочной железы. *Архив патологии*. 2023;85(4):39–46. https://doi.org/10.17116/patol20238504139

Updated CAP guidelines for determining molecular biological subtypes of breast cancer

© L.E. ZAVALISHINA, E.M. OLIUSHINA, YU.YU. ANDREEVA, O.A. KUZNETSOVA, L.V. MOSKVINA, G.A. FRANK

Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russia

ABSTRACT

Updated 2023 guidelines from the College of American Pathologists (CAP) on immunohistochemical detection of human epidermal growth factor receptor type 2 (HER2), receptors of estrogen (ER) and progesterone (PgR), and the cell proliferation marker Ki-67 in breast cancer are presented. Attention is drawn to the emergence of two new terms «ER Low Positive» and «HER2 Low» to characterize tumors with low expression of estrogen receptors and HER2.

Keywords: *breast cancer, human epidermal growth factor receptor type 2, HER2 expression, ER expression, PgR expression, Ki-67 expression, HER2 Low.*

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS:
Zavalishina L.E. — https://orcid.org/0000-0002-7850-7931
Oliushina E.M. — https://orcid.org/0000-0002-7350-3552
Andreeva Yu.Yu. — https://orcid.org/0000-0003-4749-6608
Kuznetsova O.A. — https://orcid.org/0000-0002-9721-6355
Moskvina L.V. — https://orcid.org/0000-0001-8670-1366
Frank G.A. — https://orcid.org/0000-0002-3719-5388
Corresponding author: Oliushina E.M. — e-mail: catya.olyushina@yandex.ru

TO CITE THIS ARTICLE:
Zavalishina LE, Oliushina EM, Andreeva YuYu, Kuznetsova OA, Moskvina LV, Frank GA. Updated CAP guidelines for determining molecular biological subtypes of breast cancer. *Archive of Pathology = Arkhiv patologii*. 2023;85(4):39–46. (In Russ.). https://doi.org/10.17116/patol20238504139

Стандартизация патоморфологических исследований является одной из важнейших задач патолого-анатомической службы. Установление молекулярно-биологического подтипа рака молочной железы (РМЖ) важно как для определения прогноза и клинического течения заболевания, так и для выбора эффективной тактики лечения. В практическом здравоохранении оценку молекулярно-генетических характеристик РМЖ проводят суррогатным методом, путем иммуногистохимического (ИГХ) исследования ключевых биологических маркеров РМЖ, таких как рецепторов эстрогена (ER), прогестерона (PgR), рецептора эпидермального фактора роста человека 2-го типа (HER2) и Ki-67 [1]. На основании уровня экспрессии данных биомаркеров опухоли РМЖ подразделяются на люминальный А, люминальный В HER2-негативный, люминальный В HER2-позитивный, нелюминальный HER2-позитивный и тройной негативный подтипы [2]. В связи с появлением новых лекарственных препаратов и тактик ведения пациенток с РМЖ необходимо сопутствующее обновление рекомендаций по интерпретации результатов исследований предиктивных биомаркеров РМЖ.

В конце марта 2023 г. были выпущены обновленные рекомендации Колледжа американских патологов (CAP) по исследованию ключевых биомаркеров РМЖ, призванные улучшить диагностику и лечение карцином молочной железы.

Общие рекомендации

Исследование статуса гормональных рецепторов и HER2-статуса рекомендуется проводить во всех первичных инвазивных карциномах молочной железы, а также в метастатических опухолях и при рецидиве заболевания [3—6].

При отрицательном статусе гормональных рецепторов и HER2 при исследовании материала, полученного посредством пункционной биопсии, целесообразно рассмотреть возможность повторного тестирования на другом образце, особенно если иммунофенотип опухоли не совпадает с гистологическим вариантом карциномы [7].

При наличии нескольких очагов инвазивной опухоли должен быть исследован самый большой опухолевый очаг. Тестирование более мелких фокусов также оправдано, если они имеют иное гистологическое строение или более высокую степень злокачественности [7].

В настоящее время в обновленных рекомендациях 2023 г. эксперты CAP не считают строго обязательным определение экспрессии Ki-67 и других биомаркеров РМЖ, кроме гормональных рецепторов (ER и PgR) и HER2 [7].

Специалисты CAP рекомендуют обращать внимание клинициста в протоколе исследования на критические изменения отдельных преаналитических и аналитических параметров, которые могут повлиять на результаты тестирования [8, 9] такие как:

— время холодовой ишемии (время между удалением ткани из организма пациента и началом фиксации), а также время фиксации;

— тип фиксатора, если он отличается от забуференного формалина;

— обработка биологического образца специфическими реактивами, которая потенциально может изменить его иммунореактивность (например, декальцинация) [10];

— состояние внутренних и внешних контролей с ожидаемым уровнем экспрессии исследуемых антигенов;

— адекватность отобранного образца опухоли для исследования;

— клон первичного антитела;

— валидация и верификация анализа в лаборатории.

Исследование статуса гормональных рецепторов (ER, PgR)

Около 75—80% случаев инвазивного РМЖ экспрессируют рецепторы ER и PgR, позитивный гормональный статус характерен для большинства высокодифференцированных карцином молочной железы и связан с онкогенезом таких опухолей. Лекарственная блокада гормональных рецепторов позволяет подавить опухолевую прогрессию и значительно улучшить показатели выживаемости [4, 7, 8].

В рутинной клинической практике уровень экспрессии ER и PgR определяется ИГХ-методом в целях рационального отбора пациенток, которым необходима гормональная терапия [1, 7].

Целый ряд факторов может негативно повлиять на интерпретацию ИГХ-исследования гормонального статуса и привести как к ложноотрицательным, так и ложноположительным результатам, что влечет за собой неверную тактику ведения [8, 11—13].

Отсутствие ядерной экспрессии ER и PgR, как правило, связано с неадекватной преаналитической обработкой материала или же с нарушениями протокола проведения ИГХ-исследования. В рекомендациях CAP упоминаются следующие причины ложноотрицательных реакций с антителами к ER и PgR [7]:

— термическое повреждение опухолевой ткани, что возможно при выполнении хирургического вмешательства;

— длительное время холодовой ишемии, приводящей к разрушению исследуемых антигенов. Авторы рассматриваемых рекомендаций особо подчеркивают, что допустимое время холодовой ишемии не должно превышать 1 ч [14, 15];

— неправильное время фиксации биологического материала, отличное от рекомендуемого, которое составляет не менее 6 ч [8, 13, 16];

— неправильно подобранный тип фиксатора. Формалин должен быть забуферен для обеспечения диапазона pH от 7,0 до 7,4 (в более кислых фиксаторах происходит деградация белковых структур);

— предшествующая обработка исследуемого биологического материала реактивами для декальцинации, которая может привести к потере иммунореактивности определяемых гормональных рецепторов [10];

— неверно подобранное антитело для проведения ИГХ-исследования;

— слишком интенсивное окрашивание гематоксилином, маскирующее слабое окрашивание ядер диаминобензидином (DAB).

Для того чтобы избежать ошибочной трактовки гормонального статуса опухоли, патологоанатому следует обращать внимание на внутренние и внешние позитивные контроли. При отсутствии экспрессии ER и PgR как в опухолевых клетках, так и в нормальном эпителии молочной железы реакцию следует интерпретировать как неопределенную и повторить на другом блоке или образце повторной биопсии [7, 8].

Если же в исследуемом материале не определяются достоверные структуры неизмененных протоков и долек

Таблица 1. **Интерпретация результатов ИГХ-исследования рецепторов эстрогена (ER) и рецепторов прогестерона (PgR)**

Table 1. **Interpretation of the results of the IHC study of estrogen receptors (ER) and progesterone receptors (PgR)**

Результат	Критерий	Комментарий
Позитивный	Наличие 1% и более клеток с окрашенными ядрами	Инвазивные карциномы с ядерным окрашиванием от 1 до 10% клеток при исследовании экспрессии ER (но не PgR!) интерпретируются как Low Positive
Негативный	Менее 1% клеток с окрашенными ядрами	—

молочной железы, а экспрессия гормональных рецепторов отсутствует, то патологоанатом должен принять решение относительно того, можно ли считать данную реакцию истинно отрицательной, учитывая при этом гистологический вариант и степень дифференцировки опухоли, а также убедиться, что на результат ИГХ-исследования не повлияли такие факторы, как холодовая ишемия и время фиксации материала. Правильность протокола ИГХ-исследования можно определять только по окрашиванию внешнего позитивного контроля. При наличии оснований полагать, что отрицательная реакция с антителами к ER и PgR связана с какими-либо ошибками преаналитического этапа или с неверным протоколом исследования, патологоанатому необходимо обозначить в заключении статус гормональных рецепторов как «неопределенный» и повторить тестирование на другом образце [7].

Авторы рекомендаций CAP особо выделяют тот факт, что истинные ER-отрицательные, но при этом PgR-положительные РМЖ встречаются в клинической практике крайне редко, однако пациенткам с подобными опухолями также показано назначение гормональной терапии. Также авторы подчеркивают, что патологоанатома должна настораживать противоречивость морфологической картины и получаемого иммунофенотипа. Так, для карциномы молочной железы, имеющей grade 1 по Ноттингемской системе, нехарактерно полное отсутствие экспрессии эстрогенов [7].

Ложнопозитивные результаты определения рецепторов встречаются реже, чем ложнонегативные [17]. Основные причины ложнопозитивных результатов связаны с использованием антител, перекрестно реагирующих с другим антигеном, а также с ошибочной интерпретацией окрашенных ядер нормальных эпителиальных клеток или структур карциномы *in situ* как клеток инвазивной карциномы [7].

Компьютерные программы анализа изображений в случае неточной настройки параметров подсчета также могут выдавать ложнопозитивные результаты при подсчете перекрашенных гематоксилином ядер [7]. Это необходимо учитывать в связи с расширением применения искусственного интеллекта в патоморфологических исследованиях.

В обновленных протоколах CAP приводятся те же рекомендации по интерпретации ИГХ-исследования ER и PgR, что были предложены ASCO/CAP в 2020 г. **(табл. 1)** [7, 8].

Так как считается, что даже те карциномы молочной железы, в которых обнаружен всего лишь 1% позитивных клеток опухоли, демонстрируют ответ на лечение гормональными препаратами, поэтому в руководствах рекомендуется классифицировать все случаи РМЖ с наличием хотя бы 1% положительных опухолевых клеток как рецепторпозитивные [7, 8].

Особо выделена группа карцином, в которых наблюдается низкий уровень экспрессии рецепторов эстрогенов, составляющий от 1 до 10% слабоположительных клеток. Рецепторный статус ER для данной когорты РМЖ рекомендуется определять как Low Positive, в заключении патологоанатому следует указать следующий комментарий: «Опухоль в исследуемом образце имеет низкий уровень (1—10%) иммуногистохимической экспрессии ER». В настоящее время гормональная терапия считается приемлемым методом лечения подобных опухолей, однако сведения об эффективности таковой у пациенток с низким уровнем (1—10%) экспрессии ER ограничены. Также есть данные, свидетельствующие о том, что инвазивный рак с низкой экспрессией ER гетерогенен как по клиническому поведению, так и по биологии и часто имеет генетический профиль, схожий с ER-негативной опухолью [7].

Авторы отмечают, что термин Low Positive допустим только по отношению к инвазивной карциноме и только для характеристики экспрессии ER. Термин Low Positive не применяется для обозначения особенностей ИГХ-экспрессии рецепторов прогестерона или при описании гормонального статуса протоковой карциномы *in situ* (DCIS) [7].

Предложенные системы количественного определения ER- и PgR-статуса включают учет только доли позитивных клеток или же могут также дополняться оценкой интенсивности окрашивания. Количество позитивных клеток может быть указано в процентах или в пределах дискретной категории. На интенсивность окрашивания может влиять не только количество присутствующего белка, но и используемые антитела и системы детекции. В большинстве случаев РМЖ при исследовании ER- и PgR-статуса наблюдается гетерогенное окрашивание ядер от слабого до выраженного [7].

В рекомендациях CAP указаны два метода количественной оценки ER, учитывающих как интенсивность окрашивания, так и процент позитивных клеток — это система Allred **(табл. 2)** и система H Score **(табл. 3)** [7].

При использовании высокоаффинных антител и чувствительных систем детекции большинство карцином молочной железы, согласно системе оценки Allred, будут классифицированы либо как очевидно положительные (7 или 8 баллов), либо как явно отрицательные (0 баллов) [18, 19]. Небольшая группа карцином, составляющая менее 1%, характеризуется промежуточным уровнем иммунореактивности [7].

Показатели выживаемости пациенток с карциномами, имеющими 2 балла по системе Allred (что соответствует менее 1% слабоположительных клеток), схожи с таковыми пациенток с РМЖ, в котором полностью отсутствует экспрессия ER [16]. Таким образом, 2 балла по системе Allred считается отрицательным результатом.

Карциномы молочной железы с менее чем 1% ER- и PgR-положительных клеток и интенсивностью 2 или 3 будут иметь общий суммарный балл 3 или 4 соответственно. Таким образом, их гормональный статус трактуется

Таблица 2. **Система Allred для оценки экспрессии рецепторов эстрогена и прогестерона**

Table 2. **Allred system for assessing the expression of estrogen and progesterone receptors**

Баллы	Положительные клетки, %	Интенсивность окрашивания	Оценка интенсивности
	0	—	0
1	Менее 1	Слабый	1
2	От 1 до 10	Средний	2
3	От 11 до 33	Сильный	3
4	От 34 до 66	—	—
5	67 и более	—	—

Примечание. При суммарном балле, равном 3 или более, гормональный статус считается позитивным. Если суммарный балл менее 3, гормональный статус считается негативным.

Таблица 3. **Система H Score для оценки экспрессии рецепторов эстрогена и рецепторов прогестерона**

Table 3. **H Score system for assessing the expression of estrogen and progesterone receptors**

Расчет Н-показателя		
Клеточный сигнал	Процент клеток	Умноженное значение
Клетки с отсутствием сигнала	%	×0 = 0%
Клетки со слабым сигналом	%	×1 =
Клетки с умеренно выраженным сигналом	%	×2 =
Клетки с сильно выраженным сигналом	%	×3 =
Общий балл =		

Примечание. Показатель Н определяется путем умножения процента окрашенных опухолевых клеток, демонстрирующих различную интенсивность (от 0 до 3), и сложения результатов. Согласно данной системе, отрицательным результатом считается менее 1% позитивных клеток.

как позитивный, подобные опухоли встречаются достаточно редко, ответ данных карцином на гормональную терапию специально не изучался [7].

Исследование HER2-статуса (ERBB)

Примерно от 15 до 20% карцином молочной железы экспрессируют рецептор эпидермального фактора роста человека 2-го типа (HER2; ERBB2). Повышенная экспрессия белка обычно связана с амплификацией соответствующего гена. Анализы числа копий гена, количества мРНК и белка обычно дают аналогичные результаты; амплификация гена коррелирует с гиперэкспрессией белка примерно в 95% случаев. В небольшом числе карцином (менее 5%) гиперэкспрессия белка HER2 может быть связана с различными иными механизмами [7].

Гиперэкспрессия HER2 играет прогностическую и предиктивную роль. В первую очередь HER2-статус оценивается для определения той группы пациенток, которым можно назначить специфическую таргетную анти-HER2-терапию. Также данное исследование может помочь выявить пациенток, которым показана адъювантная терапия на основе антрациклинов [7].

HER2-статус определяется ИГХ-методом или путем оценки количества копий гена *HER2* с помощью гибридизации *in situ* (ISH). Когда и ИГХ, и ISH выполняются на образце одной и той же опухоли, результаты должны быть сопоставлены. Наиболее вероятной причиной несоответствия является то, что одно из проведенных исследований выполнено или трактовано неверно, но в небольшом числе случаев может наблюдаться гиперэкспрессия белка без амплификации гена, также возможны вариант амплификации гена без гиперэкспрессии белка или выраженная внутриопухолевая гетерогенность [7].

К сожалению, факторы, влияющие на идентификацию HER2 (ERBB2) с помощью ИГХ-метода, не изучались также подробно, как для ER и PgR. Подготовка к исследованию включает фиксацию ткани опухоли в забуференном 10% формалине не менее 6 ч, если другой фиксатор не прошел валидацию [7].

Ложнопозитивные результаты при исследовании HER2-статуса могут быть обусловлены следующими факторами [7]:

— краевым артефактом, что возможно при исследовании образца кор-биопсии. При подобном артефакте опухолевые клетки по краям образца окрашиваются сильнее, чем в центре. Образцы с более сильным окрашиванием по краю исследуемой ткани следует оценивать с осторожностью;

— цитоплазматическим окрашиванием, которое может маскировать мембранное окрашивание и затруднять интерпретацию анализа;

— перекрашиванием образца (сильное окрашивание мембран нормальных клеток). Может быть связано со слишком высокой концентрацией антитела при титровании;

— оценкой окрашивания во внутрипротоковом компоненте (DCIS), а не в инвазивном раке. DCIS высокой степени злокачественности часто являются HER2-позитивными. При наличии в опухоли обширных очагов DCIS, преобладающих над инвазивной карциномой (особенно при микроинвазивной карциноме), оценка HER2-статуса может быть ошибочно выполнена для компонента DCIS. Необходимо с осторожностью оценивать подобные опухоли и оценивать окрашивание только в инвазивном компоненте.

Ложнонегативные результаты при определении HER2-статуса могут быть связаны с такими факторами, как [7]:

— длительное время холодовой ишемии;

Таблица 4. **Интерпретация ИГХ-исследования HER2**

Table 4. **Interpretation of the HER2 IHC study**

Результат	Критерий
Отрицательный (ИГХ 0)	Окрашивание полностью отсутствует или наблюдается неполное мембранное окрашивание, слабое/едва заметное в 10% или менее опухолевых клетках
Отрицательный (ИГХ 1+)	Наблюдается неполное мембранное окрашивание, слабое/едва заметное более 10% опухолевых клеток
Неопределенный (ИГХ 2+)	Наблюдается от слабой до умеренной интенсивности полное мембранное окрашивание более 10% опухолевых клеток. Требуется обязательное проведение контрольного исследования на том же образце методом ISH или выполнение нового исследования на другом образце (при его наличии) методом ИГХ или ISH
Положительный (ИГХ 3+)	Наблюдается периферическое мембранное полное интенсивное окрашивание более 10% опухолевых клеток

Примечание. Окрашивание должно без труда оцениваться на малом увеличении и наблюдаться в однородной и непрерывной инвазивной клеточной популяции.

Таблица 5. **Оценка результатов определения амплификации HER2 методом однозондовой ISH**

Table 5. **Assessment of the results of determining the amplification of HER2 by the method of single-probe ISH**

Критерий	Результат
Среднее число копий HER2: — менее 4,0 сигналов на клетку; — 4,0 и более и менее 6,0 сигналов на клетку и одновременно ИГХ 0, 1+ или 2+; — 4,0 и более и менее 6,0 сигналов на клетку и одновременно группа ISH 5 (методом двухзондовой ISH)	Отрицательный
Среднее количество копий HER2: — 6,0 и более сигналов на клетку; — 4,0 и более и менее 6,0 сигналов на клетку и одновременно ИГХ 3+; — 4,0 и более и менее 6,0 сигналов на клетку и одновременно группа 1 ISH (методом двухзондовой ISH)	Положительный

— гетерогенность опухоли. Если негативный HER2-статус был определен на небольшом образце опухолевой ткани, целесообразно повторить анализ на другом образце, содержащем большее количество инвазивной карциномы, особенно если исследуемая опухоль имеет характеристики, связанные с HER2-позитивностью (т.е. имеет grade 2 или 3), слабую или негативную экспрессию PgR, повышенный индекс пролиферации);

— неправильное титрование антитела (слишком низкая концентрация) при использовании концентрированных антител.

Предотвратить ошибки при определении HER2-статуса помогает оценка внешних тканевых контролей, которые должны демонстрировать ожидаемый характер экспрессии HER2. Следует иметь в виду, что приемлемого внутреннего контроля для оценки экспрессии белка HER2 с помощью ИГХ-метода не существует [7].

Также патологоанатому необходимо сопоставлять HER2-статус с морфологией опухоли, в том числе с уровнем экспрессии других биологических маркеров. В случае сомнений в правильности определения HER2-статуса следует рассмотреть возможность повторного теста с помощью ISH [7].

В обновленных протоколах CAP приводятся те же рекомендации по интерпретации ИГХ-исследования HER2, что были предложены ASCO/CAP в 2018 г. **(табл. 4)** [9].

Исследования HER2-статуса методом флюоресцентной гибридизации *in situ* (FISH), хромогенной гибридизации *in situ* (CISH) и усиленной серебром гибридизации *in situ* (SISH) основаны на определении амплификации гена. В некоторых методиках используется один зонд для определения количества копий гена *HER2*, но методология большинства анализов включает также зонд для подсчета хромосом (CEP17) и определения отношения сигналов HER2 к копиям хромосомы 17. Хотя от 10 до 50% карцином молочной железы имеют более 2 копий CEP17, только от 1 до 2% карцином демонстрируют истинную полисомию (т.е. дупликацию всей хромосомы) [7].

Неудовлетворительные результаты при проведении ISH могут быть связаны [7]:

— с длительной фиксацией в формалине (более 1 нед) [20];

— с фиксацией в неформалиновых фиксаторах [21];

— с обработкой ткани или фиксацией с использованием кислоты (например, декальцинация), что может разрушить ДНК [22];

— недостаточной обработкой ткани протеазами.

Для правильной интерпретации результатов ISH-исследования патологоанатом должен точно определить на препарате, окрашенном гематоксилином и эозином, или на ИГХ-препарате (HER2) область инвазивной карциномы (не менее 20 неперекрывающихся опухолевых клеток), которая подлежит оценке методом ISH. Важно исключить из подсчета клетки протоковой карциномы *in situ* [7].

Рекомендации по интерпретации ISH-исследования HER2 на сегодняшний день не претерпели изменений **(табл. 5, 6)** [9]. Результаты двухзондовой ISH подразделяются на условные 5 групп [7, 9].

При выявлении 2, 3 и 4-й ISH-групп требуется сопутствующее проведение ИГХ-исследования для наиболее точного определения HER2-статуса (положительного или отрицательного) и окончательной постановки диагноза, основанного на комбинированной интерпретации результатов ISH и ИГХ **(табл. 7)** [23].

Для опухолей молочной железы, относящихся к группе ISH 2, данные об эффективности HER2-таргетной

Таблица 6. **Оценка результатов определения амплификации HER2 методом двухзондовой ISH**

Table 6. **Assessment of the results of determining the amplification of HER2 by the method of dual-probe ISH**

Группа	Критерий	Результат
ISH 1	Соотношение *HER2/CEP17* ⩾2,0; среднее количество копий гена *HER2* 4,0 и более сигналов на клетку	ISH-положительный
ISH 2	соотношение *HER2/CEP17* ⩾2,0; среднее количество копий гена *HER2* менее 4,0 сигналов на клетку	Обязательное дополнительное исследование
ISH 3	соотношение *HER2/CEP17*<2,0; среднее количество копий гена *HER2* 6,0 и более сигналов на клетку	То же
ISH 4	соотношение *HER2/CEP17* <2,0; среднее количество копий гена *HER2* 4,0 и более и менее 6,0 сигналов на клетку	» »
ISH 5	соотношение *HER2/CEP17* <2,0; среднее количество копий гена *HER2* менее 4,0 сигналов на клетку	ISH-отрицательный

Таблица 7. **Оценка результатов определения амплификации HER2 методом двухзондовой ISH для групп ISH 2—4**

Table 7. **Assessment of the results of determining the amplification of HER2 by the method of dual-probe ISH for ISH groups 2—4**

Критерий	Результат
ISH 2 и одновременно ИГХ 0-1+ или 2+ ISH 3 и одновременно ИГХ 0 и 1+ ISH 4 и одновременно ИГХ 0-1+ или 2+	Отрицательный
ISH 2 и одновременно ИГХ 3+ ISH 3 и одновременно ИГХ 2+ или 3+ ISH 4 и одновременно ИГХ 3+	Положительный

Примечание. Для групп ISH 2—4 окончательная интерпретация исследования основана на одновременной оценке ИГХ с повторной оценкой ISH вторым экспертом, если ИГХ составляет 2+ (в соответствии с рекомендациями ASCO/CAP 2018 г.).

терапии ограничены. При исследованиях адъюванта трастузумаба первого поколения в данной подгруппе пациенток не отмечалось улучшения безрецидивной или общей выживаемости, но таких случаев было слишком мало, для того чтобы сделать окончательные выводы. Для данных опухолей рекомендовано проведение дополнительного ИГХ-исследования. Если результат ИГХ-исследования отличается от 3+, рекомендовано считать данный образец HER2-негативным из-за низкого количества копий гена *HER2* по ISH и недостаточной экспрессии белка [7, 23].

Для карцином группы ISH 3, в которых отсутствует гиперэкспрессия белка, также недостаточно данных об эффективности HER2-таргетной терапии, так как пациентки с подобными опухолями не включались в клинические испытания адъюванта трастузумаба первого поколения. Таким образом, если для карциномы группы ISH 3 результаты ИГХ-исследования отрицательны (0 или 1+), то рекомендуется считать данную опухоль HER2-негативной [7, 23].

На сегодняшний день неизвестно, принесет ли пользу пациенткам с опухолями группы ISH 4 HER2-таргетная терапия при отсутствии гиперэкспрессии белка (ИГХ 3+). Подобные карциномы рекомендуется считать HER2-негативными [7, 23].

В обновленных протоколах CAP впервые отдельно упоминаются опухоли молочной железы со следующими характеристиками HER2-статуса: ИГХ1+ или ИГХ2+ с отсутствием амплификации HER2, с использованием методов ISH. Считается, что указанные карциномы реагируют на HER2-таргетную терапию новыми препаратами, что обусловливает клиническую важность их диагностики. При выявлении подобной опухоли патологоанатому следует определить ее HER2-статус как HER2 Low (HER слабоположительный статус) [7].

Исследование Ki-67

Ki-67 — ядерный белок, являющийся одним из наиболее известных маркеров клеточной пролиферации. Для ИГХ-оценки Ki-67 наиболее часто используются моноклональные антитела MIB-1 и 30-9. Процент Ki-67-позитивных опухолевых клеток, определенный с помощью ИГХ, часто применяется для разделения пациенток на группы в зависимости от прогноза и учитывается при определении молекулярно-генетического подтипа опухоли [7].

На сегодняшний день не установлено общепринятого порогового значения индекса Ki-67, свидетельствующего о высоком уровне экспрессии данного белка. Ведутся дискуссии относительно того, в каких именно участках опухоли необходимо оценивать пролиферативную активность (в зоне «фронта», в «горячих точках», в общем среднем значении с учетом всей площади опухоли) [24]. Также недостаточно данных о влиянии на особенности ИГХ- окрашивания Ki-67 преаналитических факторов, таких как время ишемии, продолжительность фиксации, детекция антигена [7]. В связи с этим рутинное исследование экспрессии Ki-67 в РМЖ в настоящее время не рекомендуется ни ASCO, ни National Comprehensive Cancer Network (NCCN) [7]. Однако в клинических рекомендациях «Рак молочной железы» Минздрава РФ отражены подходы к определению экспрессии Ki-67, использующиеся в Российской Федерации [2, 25].

Согласно клиническим рекомендациям Минздрава России от 2021 г., значение индекса Ki-67 следует оценивать, исходя из опыта патоморфологической лаборатории: например, если медиана значений Ki-67 при гормонозависимом РМЖ составляет в данной лаборатории 20%, то значение этого показателя, равное 10% и менее, следует трактовать как однозначно низкое, а 30% и более — как однозначно высокое; при уровне Ki-67 от 20 до 30% при решении вопроса о тактике лечения клиницисту следует учитывать другие клинико-морфологические факторы прогноза (включая стадию, степень злокачественности, морфологический вариант опухоли и др.) [2, 25].

Обсуждение

В заключение необходимо отметить, что основная часть обновлений связана с введением новых терминов, таких как ER Low Positive и HER2 Low, что обусловлено

изменениями к подходу в лечении опухолей молочной железы, характеризующихся низкой экспрессией рецепторов эстрогена и HER2.

Также CAP уделяет особое внимание преаналитическим факторам, искажающим результаты проведенного ИГХ-исследования, отдельно упомянуто время холодовой ишемии, подчеркнута необходимость своевременной фиксации биологического материала. Обращено внимание на обязательное использование контрольных материалов, указаны рекомендованные клоны антител и подходы к использованию тестов, разработанных в самих лабораториях (LDT-тесты). Приведены параметры, которые обязательно должны быть отражены в ответе (время фиксации, время холодовой ишемии, использованные реагенты и контрольные материалы).

Избежать ошибок при проведении исследования позволяет как грамотное соблюдение всех его этапов, так и проверка правильности прошедшей ИГХ-реакции путем оценки экспрессии определяемых биомаркеров во внутренних и внешних тканевых контролях с ожидаемым уровнем экспрессии исследуемых антигенов. Патологоанатому также крайне важно обращать внимание на соответствие иммунофенотипа опухоли ее морфологии.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
The authors declare no conflicts of interest.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Франк Г.А., Завалишина Л.Э., Андреева Ю.Ю., ред. *Рак молочной железы. Морфологическая диагностика и генетика. Руководство для врачей*. 2-е изд. М.: Практическая медицина; 2021.
Frank GA, Zavalishina LE, Andreeva YuYu, eds. *Breast cancer. Morphological diagnostics and genetics. A guide for doctors*. 2nd ed. M.: Prakticheskaya Meditsina; 2021. (In Russ.).
2. Ассоциация онкологов России, Общероссийская общественная организация «Российское общество клинической онкологии», Общероссийская общественная организация «Российское общество онкомаммологов». Клинические рекомендации. *Рак молочной железы*. 2021;93.
Association of Oncologists of Russia, All-Russian public organization «Russian Society of Clinical Oncology», All-Russian public organization «Russian Society of Oncologists». Clinical guidelines. *Breast Cancer*. 2021;93. (In Russ.).
3. National Comprehensive Cancer Network. (NCCN) Clinical Practice Guideline in Oncology. *Breast cancer*. Version 3.2017. Accessed December 18, 2017.
www.nccn.org/professionals/physician_gls/PDF/breast.pdf
4. Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S, Somerfield MR, Hayes DF, Bast RC Jr.; American Society of Clinical Oncology. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2007;25(33):5287-5312.
https://doi.org/10.1200/JCO.2007.14.2364
5. Pusztai L, Viale G, Kelly CM, Hudis CA. Estrogen and HER-2 receptor discordance between primary breast cancer and metastasis. *Oncologist*. 2010;15(11):1164-1168.
https://doi.org/10.1634/theoncologist.2010-0059
6. Arslan C, Sari E, Aksoy S, Altundag K. Variation in hormone receptor and HER-2 status between primary and metastatic breast cancer: review of the literature. *Expert Opin Ther Targets*. 2011;15(1):21-30.
https://doi.org/10.1517/14656566.2011.537260
7. Fitzgibbons PL, Connolly JL. *Template for reporting results of biomarker testing of specimens from patients with carcinoma of the breast*. Version: 15.0.1. College of American Pathologists; 2023;19.
https://documents.cap.org/documents/Breast.Bmk_1.5.0.1.REL_CAPCP.pdf
8. Allison KH, Hammond MEH, Dowsett M, McKernin SE, Carey LA, Fitzgibbons PL, Hayes DF, Lakhani SR, Chavez-MacGregor M, Perlmutter J, et al. Estrogen and progesterone receptor testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Update. *Arch Pathol Lab Med*. 2020;144(5):545-563.
https://doi.org/10.5858/arpa.2019-0904-SA
9. Wolff AC, Hammond MEH, Allison KH, Harvey BE, Mangu PB, Bartlett JMS, Bilous M, Ellis IO, Fitzgibbons P, Hanna W, et al. Human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. *Arch Pathol Lab Med*. 2018;142(11):1364-1382.
https://doi.org/10.5858/arpa.2018-0902-SA
10. Arber JM, Arber DA, Jenkins KA, Battifora H. Effect of decalcification and fixation in paraffin-section immunohistochemistry. *Appl Immunohistochem*. 1996;4:241-248.
11. Yaziji H, Taylor CR, Goldstein NS, Dabbs DJ, Hammond EH, Hewlett B, Floyd AD, Barry TS, Martin AW, Badve S, et al.; Members of the Standardization Ad-Hoc Consensus Committee. Consensus recommendations on estrogen receptor testing in breast cancer by immunohistochemistry. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2008;16(6):513-520.
https://doi.org/10.1097/PAI.0b013e31818a9d3a
12. Allred DC. Problems and solutions in the evaluation of hormone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26(15):2433-2435.
https://doi.org/10.1200/JCO.2007.15.7800
13. Arber DA. Effect of prolonged formalin fixation on the immunohistochemical reactivity of breast markers. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2002;10(2):183-186.
https://doi.org/10.1097/00129039-200206000-00015
14. Yildiz-Aktas IZ, Dabbs DJ, Bhargava R. The effect of cold ischemic time on the immunohistochemical evaluation of estrogen receptor, progesterone receptor, and HER2 expression in invasive breast carcinoma. *Mod Pathol*. 2012;25(8):1098-1105.
https://doi.org/10.1038/modpathol.2012.59
15. Neumeister VM, Anagnostou V, Siddiqui S, England AM, Zarrella ER, Vassilakopoulou M, Parisi F, Kluger Y, Hicks DG, Rimm DL. Quantitative assessment of effect of preanalytic cold ischemic time on protein expression in breast cancer tissues. *J Natl Cancer Inst*. 2012;104(23):1815-1824.
https://doi.org/10.1093/jnci/djs438
16. Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol*. 1999;17(5):1474-1481.
https://doi.org/10.1200/JCO.1999.17.5.1474
17. Viale G, Regan MM, Maiorano E, Mastropasqua MG, Dell'Orto P, Rasmussen BB, Raffoul J, Neven P, Orosz Z, Braye S, et al. Prognostic and predictive value of centrally reviewed expression of estrogen and progesterone receptors in a randomized trial comparing letrozole and tamoxifen adjuvant therapy for postmenopausal early breast cancer: BIG 1-98. *J Clin Oncol*. 2007;25(25):3846-3852.
https://doi.org/10.1200/JCO.2007.11.9453
18. Collins LC, Botero ML, Schnitt SJ. Bimodal frequency distribution of estrogen receptor immunohistochemical staining results in breast cancer: an analysis of 825 cases. *Am J Clin Pathol*. 2005;123(1):16-20.
https://doi.org/10.1309/hcf035n9wk40etj0
19. Nadji M, Gomez-Fernandez C, Ganjei-Azar P, Morales AR. Immunohistochemistry of estrogen and progesterone receptors

reconsidered: experience with 5,993 breast cancers. *Am J Clin Pathol*. 2005;123(1):21-27.
https://doi.org/10.1309/4wv79n2ghj3x1841

20. Selvarajan S, Bay BH, Choo A, Chuah KL, Sivaswaren CR, Tien SL, Wong CY, Tan PH. Effect of fixation period on HER2/neu gene amplification detected by fluorescence in situ hybridization in invasive breast carcinoma. *J Histochem Cytochem*. 2002;50(12):1693-1696.
https://doi.org/10.1177/002215540205001215
21. Willmore-Payne C, Metzger K, Layfield LJ. Effects of fixative and fixation protocols on assessment of Her-2/neu oncogene amplification status by fluorescence in situ hybridization. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2007;15(1):84-87.
https://doi.org/10.1097/01.pai.0000209866.20581.8e
22. Brown RS, Edwards J, Bartlett JW, Jones C, Dogan A. Routine acid decalcification of bone marrow samples can preserve DNA for FISH and CGH studies in metastatic prostate cancer. *J Histochem Cytochem*. 2002;50(1):113-115.
https://doi.org/10.1177/002215540205000113
23. Завалишина Л.Э., Андреева Ю.Ю., Олюшина Е.М., Москвина Л.В., Франк Г.А. Обновленные рекомендации 2018 г. ASCO/CAP по определению рецептора эпидермального фактора роста человека 2-го типа (HER2) при раке молочной железы. *Архив патологии*. 2019;81(6):82-85.
Zavalishina LÉ, Andreeva YuYu, Olyushina EM, Moskvina LV, Frank GA. Updated 2018 ASCO/CAP recommendations on the definition of human epidermal growth factor receptor type 2 (HER2) in breast cancer. *Arkhiv Patologii*. 2019;81(6):82-85. (In Russ.).
https://doi.org/10.17116/patol20198106182
24. Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, Bartlett J, Coombes RC, Cuzick J, Ellis M, Henry NL, Hugh JC, Lively T, et al.; International Ki-67 in Breast Cancer Working Group. Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group. *J Natl Cancer Inst*. 2011;103(22):1656-1664.
https://doi.org/10.1093/jnci/djr393
25. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, Senn HJ; Panel members. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol*. 2013;24(9):2206-2223.
https://doi.org/10.1093/annonc/mdt303

Поступила 04.05.2023
Received 04.05.2023
Принята в печать 19.05.2023
Accepted 19.05.2023