

ДОСВІД ВИКОРИСТАННЯ РЕКОМЕНДАЦІЙ ASCO/CAP 2007, 2013 ТА 2018 РОКІВ ПРИ ТЕСТУВАННІ АМПЛІФІКАЦІЙНОГО СТАТУСУ ГЕНА *HER-2/NEU* У ХВОРИХ НА РАК МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

Б. Т. КЛІМУК¹, О. М. ДУГАН², С. І. ПОЛІНИК¹, Л. А. РИБЧЕНКО¹, С. В. КЛИМЕНКО¹

¹Державна установа «Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії медичних наук України»
 Україна, Київ, 04050, вул. Юрія Ілленка, 53
 e-mail: bogdana11@ukr.net

²Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»
 Україна, Київ, 03056, пр. Перемоги, 37

Мета. Оцінити значущість змін в діагностиці ампліфікаційного статусу гена *Her-2/neu* за використання рекомендацій ASCO/CAP 2007, 2013 та 2018 років шляхом ретроспективного оцінювання результатів тестування зразків тканин раку молочної залози (PM3) методом флуоресцентної гібридизації *in situ* (FISH). **Методи.** Дані FISH тестування з подвійним зондом 797 зразків PM3 були переоцінені у відповідності до вимог чергових оновлених рекомендацій ASCO/CAP. **Результати.** Частка випадків без ампліфікації гена *Her-2/neu* за критеріями ASCO/CAP 2013 та 2018 років була меншою на 11,0 % чим за критеріями ASCO/CAP 2007 року. Статистично значущої різниці щодо кількості *Her-2/neu* позитивних випадків при застосуванні критеріїв ASCO/CAP 2007, 2013 та 2018 років не було. Частка випадків з сумнівним результатом за використання ASCO/CAP 2018 року була значно більшою (12,2 %, $p < 0,01$) у порівнянні з такими за ASCO/CAP 2007 та 2013 років (1,9 % та 6,6 % $p < 0,05$ відповідно). **Висновки.** Отримані дані порівняльного перегляду (відповідно до критеріїв ASCO/CAP 2018 року) результатів FISH дослідження випадків PM3 демонструють практичні відмінності за використання рекомендацій ASCO/CAP 2007, 2013 років. Частка зразків, для проведення додаткових досліджень збільшується з кожним переглядом рекомендацій на тлі розширення групи випадків з сумнівним ампліфікаційним статусом гена *Her-2/neu* методом FISH з подвійним зондом.

Ключові слова: ASCO/CAP, ампліфікаційний статус гена *Her-2/neu*, рак молочної залози.

Вступ. Рак молочної залози (PM3) за даними Міжнародного агентства по дослідженню раку (International Agency for Research in Cancer) займає перше місце серед усіх неоплазій жіночого населення України у 2018 році та складає 21,6 % (<http://www.iarc.fr>).

В випадках PM3, які характеризуються агресивним перебігом, метастазуванням на ранніх стадіях та стійкістю до хіміо- і гормональної терапії, спостерігається гіперекспресія рецептору *Her-2/neu*, якій належить до сімейства епідермального фактора росту (Vuzdar et al., 2005)

У разі нормального стану клітини на поверхні її мембрани знаходиться близько 20 тис. рецепторів *Her-2/neu*. За гіперекспресії на поверхні клітин PM3 кількість даного рецептору може збільшуватися більше ніж в 100 разів (Loibl, Gianni, 2017), що призводить до порушень клітинного циклу та неконтрольного поділу (de Melo Gagliato et al., 2016).

Наявність взаємного зв'язку між поганим клінічним прогнозом, гіперекспресією та наявністю ампліфікації гена *Her-2/neu* дозволяє використовувати ці параметри при плануванні лікування PM3. Рецептор *Her-2/neu* є мішенню в терапії для направленої інгібування тирозинкіназної активності при використанні препарату з механізмом протипухлинної дії — трастузумабу (McKeage, Perry, 2002).

Для проведення адекватного оцінювання *Her-2/neu*-статусу доцільно використовувати біопсійний та післяопераційний матеріал пацієнтів з РМЗ, які, за можливості, не проходили специфічне лікування. На сьогодні широко розповсюдженні два методи визначення рівня активності гена *Her-2/neu*: імуногістохімічний метод (ІГХ) та флуоресцентна гібридизація *in situ* (FISH) (Fan et al., 2016).

Базовим методом поки що є ІГХ, який базується на техніці специфічного забарвлення клітинної стінки з метою визначення рівня експресії білка. (Lim et al., 2016)

Для визначення кількості копій гена використовують FISH, в основі якого лежить детекція специфічних ДНК-последовностей на досліджуваних ділянках хромосоми. (Beatty et al., 2002). Використання FISH дозволяє оцінити кількість генів у ядрах пухлинних клітин РМЗ, що беруть участь у продукції рецептора *Her-2/neu*.

Мета роботи полягала в оцінці значимості змін в діагностиці ампліфікаційного статусу гена *Her-2/neu* за використання рекомендацій ASCO/CAP 2007, 2013 та 2018 років шляхом ретроспективного оцінювання результатів тестування зразків РМЗ.

Матеріали і методи

До перегляду результатів FISH щодо ампліфікаційного статусу гена *Her-2/neu* відповідно до рекомендацій ASCO/CAP від 2007, 2013 та 2018 років було залучено біологічний матеріал 797 пацієнтів з встановленим діагнозом РМЗ. В дослідженні використовували комерційну пробу HER2/CEP 17 (Vysis, Inc., Downers Grove, IL, USA), яка представляє собою суміш пофарбованої SpectrumGreen™ проби до альфа сателіту ДНК, розміщеного на хромосомі 17 (17q11.1-r11.1) та пофарбованої SpectrumOrange™ проби до гена *Her-2/neu* (17q11.2-q12). Проведення гібридизації проводили згідно інструкції виробника. До аналізу кожного зразку залучалося як мінімум 60 клітин. Аналіз препаратів проводили за допомогою флуоресцентного мікроскопу з фільтрами для DAPI, Cy3, TRITC, ртутною лампою 100 Вт BX 51 та програмою аналізу зображень CytoVision/V. 3.00 build 61 (Applied Imaging Corp., Santa Clara, CA, USA). Всі проаналізовані випадки РМЗ після проведення FISH у відповідності до ASCO/CAP від 2007, 2013 та 2018 років (табл. 1) розподілили на три групи: без ампліфікації, з визначеною ампліфікацією та випадки з сумнівним результатом.

Таблиця 1. Критерії розподілу РМЗ на групи відповідно до ампліфікаційного статусу гена *Her-2/neu* за рекомендаціями ASCO/CAP від 2007, 2013 та 2018 років

Ампліфікаційний статус гена <i>Her-2/neu</i>	Рекомендації ASCO/CAP		
	2007	2013	2018
Відсутність ампліфікації, (співвідношення (<i>Her-2/neu</i>)/ <i>CEP17</i>)	< 1,8	< 2,0, при <i>Her-2/neu</i> < 4,0	< 2,0, при <i>Her-2/neu</i> < 4,0
Визначена ампліфікація (співвідношення (<i>Her-2/neu</i>)/ <i>CEP17</i>)	> 2,2	< 2,0, при <i>Her-2/neu</i> ≥ 6; ≥ 2,0	≥ 2,0, при <i>Her-2/neu</i> ≥ 4,0
Випадки з сумнівним результатом (співвідношення (<i>Her-2/neu</i>)/ <i>CEP17</i>)	> 1,8 < 2,2	< 2,0, при <i>Her-2/neu</i> ≥ 4,0 та < 6,0	≥ 2,0, при <i>Her-2/neu</i> < 4,0 < 2,0, при <i>Her-2/neu</i> ≥ 4,0

Результати та обговорення

Оцінювання результатів, отриманих з використанням методу FISH за критеріями ASCO/CAP 2007, 2013 та 2018 років проводили для 797 випадків хворих на РМЗ. Розподіл зраз-

ків РМЗ на підгрупи (без ампліфікації гена *Her-2/neu*, з ампліфікацією гена *Her-2/neu* та випадки із сумнівними результатами) при застосуванні критеріїв ASCO/CAP від 2007, 2013 та 2018 років представлений у таблиці 2.

Таблиця 2. Розподіл груп у відповідності до мутаційного статусу гена *Her-2/neu* при РМЗ у відповідності до Рекомендації ASCO/CAP 2007, 2013 та 2018 років

Мутаційний статус гена <i>Her-2/neu</i>	Рекомендації ASCO/CAP		
	2007	2013	2018
Відсутність ампліфікації, (Довірчий інтервал), [χ^2]	408(± 12,6)[9,85]	320(± 9,4)[2,46]	320(± 9,4)[2,46]
Визначена ампліфікація (Довірчий інтервал), [χ^2]	374(± 11,3)[0,89]	424(± 13,1) [2,50]	380(± 11,6)[0,41]
Сумнівні випадки (Довірчий інтервал), [χ^2]	15(± 1,3)[29,09]	53(± 1,8)[0,07]	97(± 0,6)[32,07]
Сума	797	797	797

Частки пацієнтів, в яких не була визначена ампліфікація гена *Her-2/neu* при використанні критеріїв ASCO/CAP 2018 року у порівнянні з ASCO/CAP 2013 року не відрізнялися ($p > 0,05$). Хоча кількості випадків РМЗ у групі з позитивним ампліфікаційним статусом гена *Her-2/neu* відповідно до рекомендацій ASCO/CAP 2018 року менша від аналогічної групи за ASCO/CAP 2013 року ($p = 0,056$). Група випадків із сумнівними результатами FISH при застосуванні кожного із оновлень ASCO/CAP 2013 та 2018 років, статистично значуще збільшувалася (з 6,6 % до 12,2 %, $p < 0,05$).

Застосування оновлених критеріїв оцінки мутаційного статусу гена *Her-2/neu* ASCO/CAP в діагностичній практиці спричинили зменшення кількості *Her-2/neu*-негативних пацієнок з 51,2 % (за критеріями ASCO/CAP 2007 року) до 40,2 % (за критеріями ASCO/CAP 2013 та 2018

років) (тест МакНемара $\chi^2 = 6,52$, $df = 1$, $p = 0,01$). У підгрупах із визначеною ампліфікацією гена *Her-2/neu* статистично значущої різниці не було 46,9 % (ASCO/CAP 2007 року) та 53,2 % (ASCO/CAP 2013 року) проти 47,7 % (ASCO/CAP 2018 року) (тест МакНемара $\chi^2 = 2,20$, $df = 1$, $p = 0,14$).

При застосуванні рекомендацій ASCO/CAP 2007, 2013 та 2018 років для оцінювання мутаційного статусу гена *Her-2/neu* методом FISH статистично значуще збільшувалась частка випадків РМЗ із сумнівними результатами щодо ампліфікаційного статусу гена *Her-2/neu* з 15 (1,9 %) (за критеріями ASCO/CAP 2007) до 53 (6,6 %) (тест МакНемара $\chi^2 = 634,71$, $df = 1$, $p < 0,01$), а в разі використання ASCO/CAP 2018 року до 97 (12,2 %) (тест МакНемара $\chi^2 = 496,21$, $df = 1$, $p < 0,01$) (рис. 1).

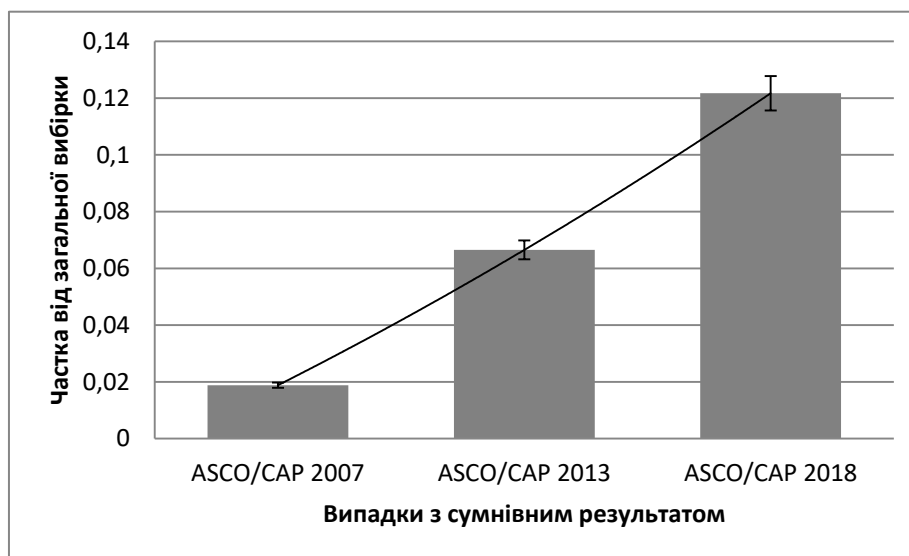


Рис. 1. Розподіл випадків РМЗ по підгрупам у відповідності до статусу гена *Her-2/neu* за критеріями оцінювання ASCO/CAP від 2007, 2013 та 2018 років.

За критеріями ASCO/CAP 2018 року (Wolff et al., 2018). для визначення мутаційного статусу гена *Her-2/neu* при РМЗ слід використовувати подвійний зонд FISH та у разі виявлення випадку з сумнівним результатом додатково оцінювати ІГХ. (Press et al., 2016a, Ballard et al., 2017)

За критеріями ASCO/CAP 2007 року кількість випадків із сумнівним результатом була мінімальна у порівнянні з рекомендаціями наступних переглядів. Подальша робота з такими зразками не проводилася і всі випадки розцінювалися як негативні щодо мутаційного статусу. Проведення клінічних досліджень (Shah et al., 2014) призвело до перегляду діагностичних критеріїв у 2013 році, тим самим збільшивши групу випадків із сумнівним результатом (Wolff et al., 2013). Але при цьому, ASCO/CAP 2013 року у випадку сумнівності пропонує додаткове дослідження для виключення полісомії, тим самим дає можливість остаточної відповіді щодо мутаційного статусу гена *Her-2/neu* (Klimuk et al., 2017). Накопичення даних щодо клінічних трайлів з приводу терапевтичних ефектів при застосуванні трастузумабу при РМЗ (Press et al., 2016b) призвели до збільшення груп випадків із сумнівним результатом FISH за рахунок розширення меж критеріїв тестування. Для отримання остаточної відповіді щодо мутаційного статусу гена *Her-2/neu* в такому разі, за ASCO/CAP 2018 року, пропонується повторне проведення імуногістохімічного дослідження для оцінки білку *Her-2/neu* (Wolff et al., 2018).

Таким чином, напрямок подальшого дослідження концентрується на продукті експресії гена *Her-2/neu*, оскільки механізм дії специфічної терапії базується саме на впливі на відповідний рецептор.

Висновки

Отже, нами було встановлено, що кількість випадків із сумнівним результатом FISH була більше при використанні рекомендацій ASCO/CAP 2018 року, у порівнянні з 2013 та 2007 роками (12,2 %, 6,6 % та 1,9 %, $p < 0,05$ відповідно). Що в свою чергу потребує більш детального вивчення даної групи з метою пошуку додаткових предикторів задля визначення можливості застосування найкращого лікування.

Перелік літератури

1. Ballard M., Jalikis F., Krings G., et al. «Non-classical» HER2 FISH results in breastcancer: A multi-institutional study. *Mod Pathol.* 2017. Vol. 30. P. 227–235. doi: 10.1038/modpathol.2016.175.
2. Beatty B., Mai S., Squire J. FISH: a practical approach, Practical approach series. — Oxford, Oxford University Press, 2002. P. 100–102.
3. Buzdar A. U., Ibrahim, N. K., Francis, D. et al. Significantly higher pathologic complete remission rate after neoadjuvant therapy with trastuzumab, paclitaxel, and epirubicin chemotherapy: results of a randomized trial in human epidermal growth factor receptor 2-positive operable breast cancer. *Journal of clinical oncology.* 2005. Vol. 23(16). P. 3676–3685. doi: 10.1200/JCO.2005.07.032.
4. de Melo Gagliato D., Jardim, D. L. F., Marchesi, M. S. P., Hortobagyi, G. N. Mechanisms of resistance and sensitivity to anti-HER2 therapies in HER2+ breast cancer. *Oncotarget.* 2016. Vol. 7(39), P. 64431–64446. doi: 10.18632/oncotarget.7043.
5. Fan Yao-Shan et al. HER2 FISH classification of equivocal HER2 IHC breast cancers with use of the 2013 ASCO/CAP practice guideline. *Breast cancer research and treatment.* 2016. Vol. 155.3. P. 457–462. doi: 10.1007/s10549-016-3717-z.
6. Lim T. H., Lim, A. S. T., Thike, A. A. et al. Implications of the updated 2013 American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations on human epidermal growth factor receptor 2 gene testing using immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization for breast cancer. *Archives of pathology & laboratory medicine.* 2016. Vol. 140(2), P. 140–147. doi: 10.5858/arpa.2015-0108-OA.
7. Loibl Sibylle, and Luca Gianni. HER2-positive breast cancer. *The Lancet.* 2017. Vol. 389.10087. P. 2415–2429. doi: 10.1016/S0140-6736(16)32417-5.
8. McKeage K., & Perry, C. M. Spotlight on Trastuzumab in Metastatic Breast Cancer Overexpressing HER2. *American Journal of Cancer.* 2002. Vol. 1(3), P. 217–221. doi: 10.2165/00024669-200201030-00006.
9. Press M. F., Villalobos I., Santiago A. et al. Assessing the new American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guidelines for HER2 testing by fluorescence in situ hybridization: Experience of an academic consultation practice. *Arch Pathol Lab Med.* 2016a. Vol. 140. P. 1250–1258. doi: 10.5858/arpa.2016-0009-OA.
10. Press Michael F., et al. HER2 gene amplification testing by fluorescent in situ hybridization (FISH): Comparison of the ASCO-College of American Pathologists guidelines with FISH scores used for enrollment in breast cancer international research group clinical trials. *Journal of Clinical Oncology.* 2016b. Vol. 34.29. P. 3518–3530. doi: 10.1200/JCO.2016.66.6693.
11. Shah Mithun Vinod, et al. Changing pattern for HER2 positivity due to updated ASCO/CAP guide-

- lines for HER2 testing and its impact. *Journal of Clinical Oncology*. 2014. P. 523–523. doi: 10.1200/jco.2014.32.15_suppl.523.
12. Wolff Antonio C., 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. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2018. Vol. 142.11. P. 1364–1382. doi: 10.5858/arpa.2018-0902-SA.
 13. Wolff Antonio C., et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*. 2013. Vol. 138.2. P. 241–256. doi: 10.5858/arpa.2018-0902-SA.
 14. Клімук Б. Т., et al. Результати мутаційного статусу гена HER-2/NEU у хворих на рак молочної залози в Україні. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2017. Т. 21. С. 321–324.
- ### References
1. Ballard M., Jalikis F., Krings G., et al. «Non-classical» HER2 FISH results in breastcancer: A multi-institutional study. *Mod Pathol*. 2017. Vol. 30. P. 227–235. doi: 10.1038/modpathol.2016.175.
 2. Beaty B., Mai S., Squire J. FISH: a practical approach, Practical approach series. — Oxford, Oxford University Press, 2002. P. 100–102.
 3. Buzdar A. U., Ibrahim, N. K., Francis, D. et al. Significantly higher pathologic complete remission rate after neoadjuvant therapy with trastuzumab, paclitaxel, and epirubicin chemotherapy: results of a randomized trial in human epidermal growth factor receptor 2-positive operable breast cancer. *Journal of clinical oncology*. 2005. Vol. 23(16). P. 3676–3685. doi: 10.1200/JCO.2005.07.032.
 4. de Melo Gagliato D., Jardim, D. L. F., Marchesi M. S. P., Hortobagyi, G. N. Mechanisms of resistance and sensitivity to anti-HER2 therapies in HER2+ breast cancer. *Oncotarget*. 2016. Vol. 7(39), P. 64431. doi: 10.18632/oncotarget.7043.
 5. Fan Yao-Shan, et al. HER2 FISH classification of equivocal HER2 IHC breast cancers with use of the 2013 ASCO/CAP practice guideline. *Breast cancer research and treatment*. 2016. Vol. 155.3. P. 457–462. doi: 10.1007/s10549-016-3717-z.
 6. Lim T. H., Lim, A. S. T., Thike A. A. et al. Implications of the updated 2013 American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations on human epidermal growth factor receptor 2 gene testing using immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization for breast cancer. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2016. Vol. 140(2), P. 140–147. doi: 10.5858/arpa.2015-0108-OA.
 7. Loibl Sibylle, and Luca Gianni. HER2-positive breast cancer. *The Lancet*. 2017. Vol. 389.10087. P. 2415–2429. doi: 10.1016/S0140-6736(16)32417-5.
 8. McKeage K., & Perry, C. M. Spotlight on Trastuzumab in Metastatic Breast Cancer Overexpressing HER2. *American Journal of Cancer*. 2002. Vol. 1(3), P. 217–221. doi: 10.2165/00024669-200201030-00006.
 9. Press M. F., Villalobos I., Santiago A. et al. Assessing the new American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guidelines for HER2 testing by fluorescence *in situ* hybridization: Experience of an academic consultation practice. *Arch Pathol Lab Med*. 2016a. Vol. 140. P. 1250–1258. doi: 10.5858/arpa.2016-0009-OA.
 10. Press Michael F., et al. HER2 gene amplification testing by fluorescent in situ hybridization (FISH): Comparison of the ASCO-College of American Pathologists guidelines with FISH scores used for enrollment in breast cancer international research group clinical trials. *Journal of Clinical Oncology*. 2016b. Vol. 34.29. P. 3518. doi: 10.1200/JCO.2016.66.6693.
 11. Shah Mithun Vinod, et al. Changing pattern for HER2 positivity due to updated ASCO/CAP guidelines for HER2 testing and its impact. *Journal of Clinical Oncology*. 2014. P. 523–523. doi: 10.1200/jco.2014.32.15_suppl.523.
 12. Wolff Antonio C., 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. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2018. Vol. 142.11. P. 1364–1382. doi: 10.5858/arpa.2018-0902-SA.
 13. Wolff Antonio C., et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*. 2013. Vol. 138.2. P. 241–256. doi: 10.5858/arpa.2018-0902-SA.
 14. Klimuk B.T. et al. Results of mutation status gene HER-2/NEU in patients with breast cancer in Ukraine. *Fakt. eksp. evol. org*. 2017. Vol. 21. P. 321–324.

IMPACT OF ASCO/CAP 2007, 2013 AND 2018 RECOMMENDATIONS ON *HER-2/NEU* GENE AMPLIFICATION STATUS TESTING IN PATIENTS WITH BREAST CANCER

B. T. Klimuk¹, O. M. Duhar², S. I. Polinyk¹, L. A. Rybchenko¹, S. V. Klymenko¹

¹State Institution National Research Center for Radiation Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine
Ukraine, 02000, Kiev, 04050, street Yuri Illenko, 53
e-mail: bogdana11@ukr.net

²National Technical University of Ukraine «Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute»
Ukraine, 03056, Kiev, Prospect Peremogy, 37

Aim. To Assess the significance of changes in the diagnostics of *Her-2/neu* gene amplification status using the ASCO/CAP 2007, 2013 and 2018 recommendations by retrospective evaluation of breast cancer (BC) tissue test results performed by fluorescence in situ hybridization (FISH). **Methods.** *Her-2/neu* FISH dual probe test data of 797 BC specimens were re-evaluated in

accordance with the requirements of the consecutive updated ASCO/CAP recommendations. **Results.** The proportion of cases without *Her-2/neu* gene amplification by the ASCO/CAP 2013 and 2018 criteria was 11,0 % lower than by the 2007 ASCO/CAP criteria. There was no statistically significant difference between the number of *Her-2/neu* gene amplification positive cases according to ASCO/CAP 2007, 2013 and 2018 criteria. The proportion of cases with a doubtful outcome for the use of ASCO/CAP in 2018 was significantly higher (12,2 %, $p < 0,01$) compared to that by ASCO/CAP 2007 and 2013 (6,6 % and 12,2 % accordingly). **Conclusions.** The findings of a re-benchmarking review (in accordance with the 2018 ASCO/CAP criteria) of the FISH case study results show practical differences from the previous ASCO/CAP 2007, 2013 recommendations. The proportion of samples, which needs the additional research, increases with each revision of the recommendations against the backdrop of the expansion of the case group with questionable amplification status of the *Her-2/neu* gene by the FISH double probe method.

Keywords: ASCO/CAP, amplification status of the gene *Her-2/neu*, breast cancer.