

Wpływ zmiany wytycznych ASCO-CAP na ocenę statusu genu *HER2* metodą FISH w kwalifikacji do terapii anty-*HER2* w raku piersi

Urszula Piekarska¹, Agnieszka Chudy¹, Aneta Wojnowska¹, Katarzyna Olszewska¹,
Magdalena Grabowska-Kierył¹, Joanna Owczarek², Wojciech Olszewski²,
Michał Ł. Szafron¹, Barbara Pieńkowska-Grela¹

Wstęp. Rak piersi jest najczęstszym nowotworem u kobiet w Polsce. Nadmierna ekspresja białka *HER2* lub amplifikacja genu *HER2* jest związana ze złym rokowaniem i stanowi wskazanie do zastosowania terapii anty-*HER2*. W przypadkach wątpliwych rozstrzygającym badaniem jest ocena FISH, wskazująca status amplifikacji genu *HER2* według obowiązujących wytycznych ASCO-CAP, które w roku 2013 uległy zmianom. Celem pracy było sprawdzenie, czy i w jaki sposób zmiana zaleceń wpłynęła na rozkład wyników badań FISH w tej grupie pacjentów.

Materiały i metody. Analizie porównawczej poddano wyniki rutynowej diagnostyki metodą FISH w dwóch niezależnych grupach pacjentów z zastosowaniem dwóch różnych kryteriów oceny (ASCO-CAP 2007 dla n = 680 i ASCO-CAP 2013 dla n = 851) oraz w grupie 763 pacjentów, gdzie zastosowano równoległe obydwa kryteria oceny.

Wyniki. Porównanie wyników uzyskanych w dwóch niezależnych grupach wykazało brak istotnej zmiany odsetka wyników *HER2*-dodatnich (z amplifikacją) po zmianie kryteriów oceny. Istotnie statystycznie okazało się zmniejszenie grupy wyników *HER2*-negatywnych (bez amplifikacji) z 76,2% na 61,8% przy rozszerzeniu grupy niejednoznacznej (o nieokreślonym statusie amplifikacji) z 0,4% do 13,6%. Grupa badana równoległe wg kryteriów 2007 i 2013 wykazała różnice istotne statystycznie. Zanotowano wzrost przypadków *HER2*-pozytywnych z 10,6% do 16,8%, znaczny wzrost wyników niejednoznacznych, z 4,2% na 15,6%, przy równoczesnym spadku wyników negatywnych z 85,2% na 67,6%.

Wnioski. Zastosowanie nowych wytycznych ASCO-CAP 2013 w ocenie statusu genu *HER2* wpływa na zawężenie grupy wyników negatywnych, natomiast rozszerza grupę wyników pozytywnych i niejednoznacznych. Wynik taki wskazuje na rozszerzenie dostępu do kwalifikacji w kierunku terapii anty-*HER2*. Natomiast istotny wzrost odsetka pacjentów z wynikiem o nieokreślonym statusie amplifikacji genu *HER2* wskazuje na konieczność pogłębionej w tej grupie oceny FISH w celu uzyskania możliwości jednoznacznej stratyfikacji do grup ryzyka.

The impact of changes in ASCO-CAP recommendations on the FISH-based assessment of the *HER2* gene status in the qualification of breast cancer patients for *HER2*-targeted therapy

Introduction. Breast cancer is the most common cancer among Polish women. Overexpression of the *HER2* protein or *HER2* gene amplification is associated with a poor prognosis, simultaneously being an indication for the *HER2*-targeted therapy. In equivocal cases, the FISH assay is used for the final identification of the *HER2* gene status. This evaluation should be performed according to the ASCO-CAP guidelines which have been changed in 2013. The aim of this study was to assess whether and how the changes of recommendations affected the distribution of the FISH results.

Materials and methods. The results of routine diagnostic FISH analyses were compared for two independent groups of patients assessed with different evaluation criteria (ASCO-CAP 2007 for n = 680 and ASCO-CAP 2013 n = 851), and also in a group of 763 patients, where both criteria were used simultaneously.

¹Pracownia Genetyki Nowotworów

²Pracownia Patologii Narządowej Nowotworów

Zakład Patologii i Diagnostyki Laboratoryjnej

Centrum Onkologii — Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie

Results. A comparison of the results obtained in two independent groups showed that the change of evaluation criteria did not alter the percentage of HER2-positive tests (with *HER2* amplification). However, the frequency of HER2-negative analyses (without *HER2* amplification) diminished significantly from 76.2% to 61.8%, whereas the equivocal group (with an indefinite status of *HER2* amplification) increased from 0.4% to 13.6%. In the group where both criteria from 2007 and 2013 were used, we also discovered statistically significant differences. The frequency of HER2-positive results were elevated from 10.6% to 16.8%. The equivocal results were also found more often, rising from 4.2% to 15.6%, while the number of negative results lowered from 85.2% to 67.6%.

Conclusions. The use of ASCO/CAP recommendations for the assessment of the *HER2* gene status reduces the group of negative results, and concurrently enlarges the number of positive and equivocal ones. This indicates that the new criteria extends the access to HER2-targeted therapy. Nevertheless, they also raise the frequency of analyses with an indefinite status of the *HER2* gene. Our outcome suggests that there is a need for an enhanced FISH-based evaluation of this gene in the last group of patients in order to provide them with an unambiguous stratification to risk groups.

NOWOTWORY J Oncol 2016; 66, 2: 109–117

Słowa kluczowe: rak piersi, *HER2*, rekomendacje ASCO-CAP

Key words: breast cancer, *HER2*, ASCO-CAP guidelines

Wstęp

Rak piersi jest najczęstszym nowotworem złośliwym u kobiet w Polsce [1]. Według Krajowego Rejestru Nowotworów w 2012 roku zdiagnozowano w Polsce 17000 nowych przypadków zachorowania i 5574 zgonów spowodowanych tą chorobą (13,3% zgonów z powodu nowotworów złośliwych u kobiet). Zachorowalność na ten nowotwór u mężczyzn jest znacznie niższa, w roku 2012 odnotowano 144 nowych zachorowań [2]. Zaburzenia genu *HER2* (*human epidermal growth factor receptor*, częściej stosowane synonimy: *ERBB2*, *HER-2/neu*) stwierdza się w różnych nowotworach nabłonkowych, najczęściej jednak występują one u pacjentów z rakiem piersi i rakiem jajnika [3].

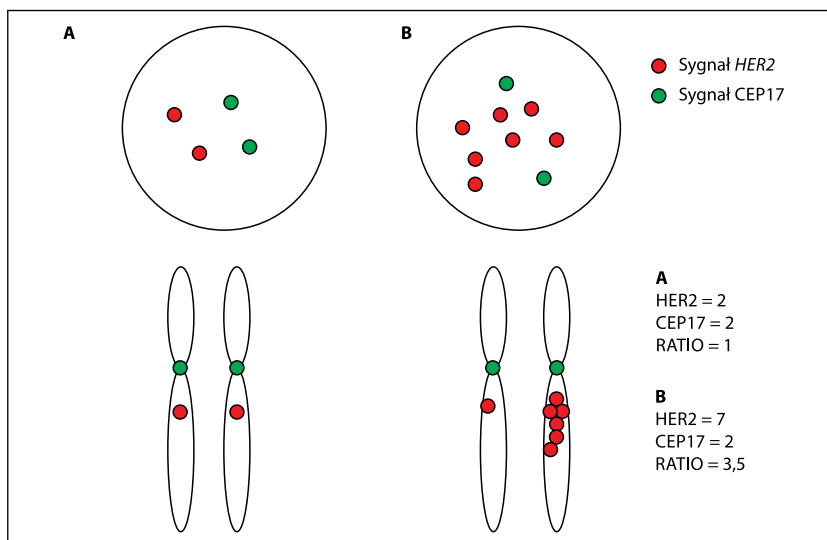
Gen *HER2* jest protoonkogenem zlokalizowanym na długim ramieniu chromosomu 17, w prążku q12, kodującym białkowy receptor dla czynnika wzrostu [4]. Prawidłowe komórki somatyczne zawierają dwie kopie genu *HER2* i mają na swojej powierzchni niewielkie ilości białka *HER2*, z niewielkim zakresem zmienności pomiędzy różnymi tkankami. Te powierzchniowe glikoproteiny są zaangażowane w przekazywanie sygnałów związanych z kontrolą wzrostu i funkcjonowania komórek [5]. Nadekspresja receptora *HER2* występuje u 10%–20% chorych na raka piersi [6]. Podstawowym mechanizmem nadekspresji genu *HER2* jest jego amplifikacja, powodująca stymulację mitogenną zmienionych komórek [7, 8]. W raku piersi wzmożona ekspresja białka *HER2* stanowi istotny czynnik rokowniczy i predykcyjny. Jej obecność powoduje większą agresywność choroby, krótszy czas całkowitego przeżycia oraz skrócenie czasu do nawrotu choroby, tak więc jest związana ze złym rokowaniem [9].

Wykazanie zależności pomiędzy statusem ekspresji białka *HER2* a rokowaniem oraz dostępność leczenia adiuwantowego anty-*HER2* (trastuzumab, herceptyna — zhumanizowane przeciwciało monoklonalne) sprawiły, że określenie

statusu genu *HER2* stało się integralnym etapem procesu diagnostycznego w raku piersi [10]. Nadmierna ekspresja białka *HER2* lub amplifikacja genu *HER2* stanowią wskazanie do zastosowania terapii adiuwantowej. Skuteczne leczenie anty-*HER2* jest możliwe w przypadkach raka piersi z potwierdzoną nadekspresją białka i/lub amplifikacją genu *HER2*, dlatego ważne jest wyselekcjonowanie pacjentów potencjalnie wrażliwych.

Rutynowo badanie statusu *HER2* w tkance guza jest procesem dwustopniowym. W pierwszym etapie wykonuje się ocenę ekspresji białka *HER2* w badaniu immunohistochemicznym (IHC). Technika ta polega na przyłączaniu przeciwciał przeciwko badanemu białku oraz na ocenie stopnia wybarwienia błon cytoplazmatycznych w komórkach raka. Stopień i ciągłość wybarwienia klasyfikuje się w czterostopniowej skali: 0, 1, 2, 3. Uzyskanie wartości 0–1 świadczy o braku nadekspresji, wartość 3+ wskazuje jednoznacznie na obecność nadekspresji. Ocena 2+ stanowi wartość pośrednią — taki wynik uznawany jest za niejednoznaczny i wymaga precyzyjnego określenia statusu genu metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH). Sytuację taką obserwuje się w 15%–24% badanych prób [9,11].

Technika FISH pozwala na bezpośrednią ocenę liczby kopii genu *HER2* w komórkach nowotworu. Metoda jest bardziej czuła i swoista w porównaniu z IHC [12]. Badanie wykonywane jest na skrawkach tkankowych uzyskanych z blozków parafinowych, ocenionych uprzednio przez lekarza patomorfologa. Detekcji genu dokonuje się za pomocą sond DNA. Sondy są to znakowane fluorescencyjnie fragmenty oligonukleotydów, komplementarne do ocenianego regionu DNA. Dla oznaczenia statusu genu *HER2* używa się komplementarnej do niego sondy. Zliczenie fluorescencyjnych sygnałów sondy znakującej *HER2* w poszczególnych jądrach interfazowych pozwala na bezpośrednią ocenę liczy-



Rycina 1. Sonda podwójna — obraz widziany w mikroskopie fluorescencyjnym (górna część schematu) oraz schematyczne przedstawienie pochodzenia wzoru znakowania przy zastosowaniu sondy podwójnej. A — brak amplifikacji, wynik negatywny; B — obecna amplifikacja, wynik pozytywny

by kopii badanego genu na komórkę. Dla lepszej kontroli stosuje się sondę podwójną (*dual-color, dual-probe*). Obok sondy HER2 zawiera ona równolegle drugą sondę, znakującą odmiennym fluorochromem chromatynę okołocentromerową chromosomu 17 (*CEP17 chromosome enumeration probe 17*) (ryc. 1).

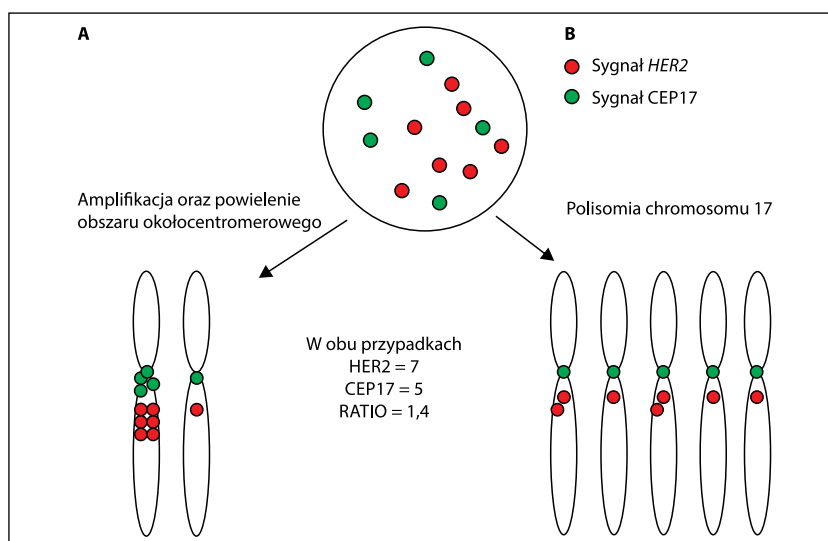
Status genu *HER2* (amplifikacja vs brak amplifikacji) określa się, oceniając liczbę sygnałów pochodzących z sondy w każdej z analizowanych komórek, następnie wylicza się średnią ilość sygnałów na komórkę w obrębie badanej próbki. W systemie sondy podwójnej zlicza się liczby sygnałów pochodzących z sondy znakującej obszar genu *HER2* (sygnał czerwony) i centromeru 17 (sygnał zielony) (ryc. 1). *RATIO*, które oznacza stosunek średniej liczby sygnałów pochodzących od genu *HER2* do średniej liczby sygnałów obszaru CEP17 (*HER2*: *CEP17*), wyznacza się na podstawie analizy minimum 20 dobrze wyznakowanych jąder interfazowych w reprezentatywnym obszarze preparatu. Przed zliczaniem sygnałów należy przejrzeć cały preparat w celu sprawdzenia, czy nie występuje zauważalna heterogenność tkanki, ujawniająca się zróżnicowaną ilością sygnałów. Zalecenia dobrej praktyki laboratoryjnej wymagają, aby mikroskopowa ocena FISH została powtórzona niezależnie przez drugiego obserwatora [13].

Interpretacja uzyskanego wyniku powinna odbywać się zgodnie z aktualnie obowiązującymi zaleceniami ekspertów. Obecnie obowiązują kryteria ASCO-CAP 2013, stworzone przez Amerykańskie Stowarzyszenie Onkologów Klinicznych oraz Amerykańskie Towarzystwo Patologów (*American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists*) [14, 15].

Wytyczne dotyczące interpretacji wyników FISH stopniowo ulegają zmianom. Zgoda FDA (*Food and Drug Administration*) na użycie techniki FISH w ocenie statusu genu *HER2* nastąpiła w 2002 roku. Pierwsze wytyczne zakładały, że przy zastosowaniu sondy pojedynczej na wynik pozytywny, tj. amplifikację genu *HER2*, wskazuje średnia liczba sygnałów sondy *HER2* powyżej 4,0 na komórkę. W przypadku zastosowania sondy podwójnej wynik pozytywny stwierdzano, gdy stosunek (*RATIO*) liczby kopii *HER2* do CEP17 był większy lub równy 2,0 [16–19].

W 2007 roku ASCO-CAP wydało oficjalne rekomendacje dotyczące oceny receptora *HER2* w raku piersi, gdzie uszczegółowiono zasady interpretacji wyników [20]. W przypadku zastosowania sondy pojedynczej wynik pozytywny wskazywała średnia wartość powyżej 6,0 sygnałów na komórkę, wynik negatywny — poniżej 4,0 na komórkę. W analizie z zastosowaniem sondy podwójnej za wynik pozytywny uznawano przypadki, w których *RATIO* przekraczało 2,2, natomiast wartości *RATIO* mniejsze niż 1,8 wskazywały wynik negatywny. Nowością było wprowadzenie grupy granicznej, o niezdefiniowanym statusie genu *HER2*, do której zaliczono przypadki z wartością *RATIO* w przedziale 1,8–2,2 lub liczbą sygnałów *HER2* 4,0–6,0 dla sondy pojedynczej. W tak określonej grupie granicznej mieściły się przypadki o heterogennym znakowaniu oraz takie, gdzie trudność z określeniem statusu *HER2* wynikała z podwyższonej liczby sygnałów CEP17.

Nieprawidłowości w ilości sygnałów CEP17 mogą być spowodowane polisomią chromosomu 17 bądź wybiórczym powieleniem okolicy centromerowej chromosomu 17 (ryc. 2). Tego rozróżnienia nie da się jednak wykazać w badaniu



Rycina 2. Obraz widziany w mikroskopie fluorescencyjnym i schematyczne przedstawienie możliwości pochodzenia wzoru znakowania. A — amplifikacja obszaru okołocentromerowego i genu *HER2*; B — polisomia chromosomu 17

Tabela I. Porównanie wytycznych ASCO-CAP 2007 i ASCO-CAP 2013 dla oceny statusu genu *HER2* metodą FISH z zastosowaniem sondy podwójnej, znakującej *HER2* i *CEP17*

Wytyczne ASCO-CAP 2007	Wytyczne ASCO-CAP 2013
Wynik pozytywny (<i>HER2</i> -dodatni) — amplifikacja obecna	
RATIO* > 2,2	RATIO ≥ 2,0
	RATIO < 2,0 oraz średnia liczba sygnałów <i>HER2</i> na komórkę ≥ 6,0
Wynik niejednoznaczny — status amplifikacji nieokreślony	
RATIO 1,8–2,2	RATIO < 2,0 oraz średnia liczba sygnałów <i>HER2</i> na komórkę ≤ 4,0 oraz < 6,0
Wynik negatywny (<i>HER2</i> -ujemny) — brak amplifikacji	
RATIO < 1,8	RATIO < 2,0 oraz średnia liczba sygnałów <i>HER2</i> na komórkę < 4,0

*RATIO — stosunek liczby *HER2*:*CEP17*

wykonywanym na materiale jąder interfazowych, nieujawniającym morfologii chromosomu 17. Obecnie uważa się, że prawdziwa polisomia, czyli powielenie całego chromosomu 17, jest w raku piersi zjawiskiem bardzo rzadkim, częściej zaś występuje wybiórcze powielenie obszaru okołocentromerowego [21–23].

Obowiązujące obecnie wytyczne ASCO-CAP 2013 wprowadziły istotne zmiany w ocenie statusu genu *HER2*, szczególnie w przypadku stosowania sondy podwójnej. Uprzednio ocenę wykonywano, wyznaczając RATIO, natomiast obecnie należy dokonać równoległej oceny średniej ilości sygnałów pochodzących z sondy znakującej gen *HER2* [14, 15]. W przypadku, gdy RATIO wynosi co najmniej 2,0, wynik badania jest pozytywny i wskazuje na obecność amplifikacji. Za pozytywne uznane są również przypadki z RATIO poniżej 2,0, w których średnia ilość sygnałów *HER2* na komórkę wynosi co najmniej 6,0. Przypadki o negatywnym statusie genu *HER2* wykazują RATIO mniejsze od 2,0 przy średniej liczbie sygnałów *HER2* na komórkę poniżej 4,0.

Znacznemu rozszerzeniu uległa grupa wyników niejednoznacznych (dawniej granicznych). Są to przypadki, w których RATIO jest mniejsze niż 2,0, a średnia liczba sygnałów pochodzących od genu *HER2* mieści się w przedziale od 4,0 do poniżej 6,0 (tab. I) [14, 15].

Kryteria oceny w przypadku zastosowania sondy pojedynczej uległy niewielkim korektom. Wynik pozytywny stwierdza się, gdy średnia liczba sygnałów *HER2* na komórkę jest większa lub równa 6,0 (wg ASCO-CAP 2007 — jeśli przekracza 6,0). Wynik niejednoznaczny wyznacza obecnie średnia liczba sygnałów *HER2* większa lub równa 4,0, a mniejsza niż 6,0 (wg ASCO-CAP 2007 > 4,0 i < 6,0). Wartości dotyczące wyniku negatywnego pozostały bez zmian: średnia poniżej 4,0 kopii na komórkę [14, 15].

Celem niniejszej pracy była demonstracja wpływu zmiany wytycznych ASCO-CAP na ocenę statusu genu *HER2* metodą FISH. Przeprowadzono analizę statusu genu *HER2* u pacjentów diagnozowanych w naszej pracowni zgodnie z rekomendacjami ASCO-CAP 2007 i ASCO-CAP 2013.

Tabela II. Rozkład wyników analizy statusu genu *HER2* jednolitej grupy 763 tych samych pacjentów według dwóch różnych systemów wytycznych (ASCO-CAP 2007 i ASCO-CAP 2013)

Status genu <i>HER2</i>	Wynik	ASCO-CAP 2007		ASCO-CAP 2013		Istotność statystyczna
		Odsetek przypadków	Liczba przypadków	Odsetek przypadków	Liczba przypadków	
Amplifikacja	pozytywny	10,6%	n = 81	16,8%	n = 128	p = 0,0005
Brak amplifikacji	negatywny	85,2%	n = 650	67,6%	n = 516	p < 0,0001
NDO*	graniczny/ /niejednoznaczny**	4,2%	n = 32	15,6%	n = 119	p < 0,0001
Suma		100%	n = 763	100%	n = 763	

*NDO — nie do oceny

**Wynik graniczny/niejednoznaczny — brak możliwości jednoznacznej oceny statusu genu *HER2*
Różnice istotne statystycznie zaznaczono pogrubioną czcionką

Materiały i metody

Analizę porównawczą przeprowadzono w oparciu o wyniki uzyskane z rutynowej oceny statusu genu *HER2* metodą FISH, na materiale tkankowym utrwalonym w formalinie i zatopionym w parafinie. Badanie wykonywano w komórkach inwazyjnego raka piersi w materiale ocenionym uprzednio przez patologa dla potwierdzenia obecności i zasięgu utkania nowotworowego.

Pierwszą badaną grupę stanowiło 763 przypadków ocenianych w laboratorium w trakcie jednego roku. Z grupy poddanej analizie wyłączono przypadki niediagnostyczne, z niezadowalającą jakością znakowania lub zbyt skąpym utkaniem nowotworowym. W tej grupie u wszystkich pacjentów zastosowano równolegle dwa kryteria oceny: ASCO-CAP z roku 2007 i ASCO-CAP z roku 2013. Porównano wyniki uzyskane w obu trybach analizy.

Ponadto porównano wyniki analizy FISH uzyskane w dwóch różnych, niezależnych grupach pacjentów badanych rutynowo w naszym laboratorium w latach 2013 i 2014. Grupa 680 pacjentów z 2013 roku analizowana była według kryteriów ASCO-CAP 2007. Grupę 851 pacjentów z 2014 roku analizowano według kryteriów ASCO-CAP 2013. Do analizy porównawczej włączono zarówno wyniki diagnostyczne, jak i niediagnostyczne.

Procedurę FISH przeprowadzano przy użyciu aparatów VP2000 (ABBOTT) i ThermoBrite (ABBOTT). Do znakowania użyto podwójnej sondy PathVysion HER-2 DNA Probe Kit II z certyfikatem CE-IVD (Vysis, ABBOTT), zgodnie z zaleceniami producenta. Sonda znakująca gen *HER2* była znakowana na czerwono, centromer 17 — na zielono. Pod uwagę brano jedynie preparaty, w których widoczne były obydwa kolory znakowania. Analizy znakowania dokonano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego BX41 (Olympus). RATIO wyznaczano na podstawie zliczonych sygnałów z minimum 60 jąder komórkowych w reprezentatywnym obszarze preparatu.

Analiza statystyczna została przeprowadzona testem zgodności χ^2 .

Wyniki

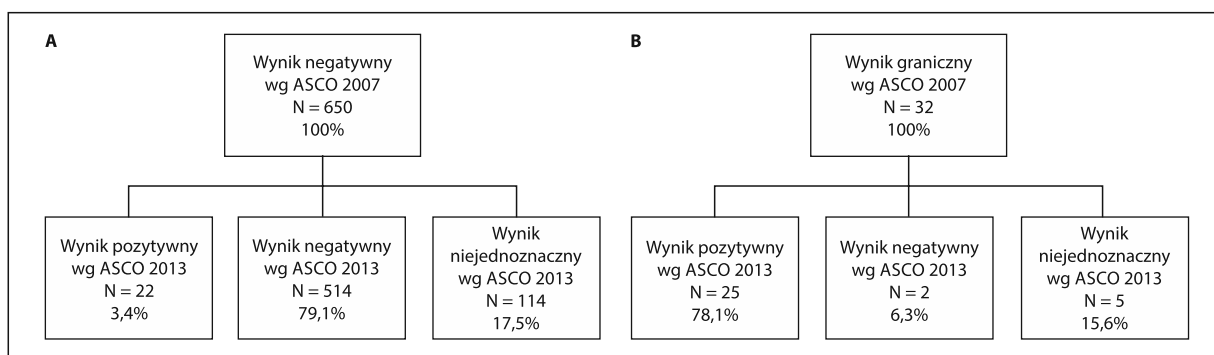
Wyniki analizy porównawczej statusu genu *HER2*, ocenianego na podstawie zaleceń ASCO-CAP 2007 oraz ASCO-CAP 2013, w jednolitej grupie 763 pacjentów zestawiono w tabeli II.

Analiza przeprowadzona według wytycznych ASCO-CAP 2007 ujawniła wynik pozytywny, oznaczający amplifikację genu *HER2*, u 10,6% (n = 81) przebadanych pacjentów. W przypadkach tych RATIO zawierało się w granicach od 2,21 do > 10. Wynik negatywny (brak amplifikacji *HER2*) stwierdzono w 85,2% (n = 650) przypadków, gdzie RATIO zawierało się w zakresie od 0,45 do 1,79. Wynik pozostał niejednoznaczny, niepozwalający na jednoznaczne zdefiniowanie statusu powielenia *HER2*, w 4,2% (n = 32) przypadków (RATIO od 1,81 do 2,19).

Powtórna analiza przeprowadzona w tej samej grupie pacjentów według wytycznych ASCO-CAP 2013 ujawniła wynik pozytywny u 16,8% (n = 128) pacjentów (RATIO od 1,12 do > 10). Wynik był negatywny w 67,6% (n = 516) z RATIO w zakresie od 0,45 do 1,94. Natomiast w 15,6% (n = 119) uzyskano wynik niejednoznaczny (RATIO od 0,96 do 1,93).

Zmiana kwalifikacji wyniku oceny statusu genu *HER2* dotyczyła 21,4% przebadanych przypadków. Wszystkie wyniki pozytywne uzyskane według wytycznych ASCO-CAP 2007 u 81 pacjentów pozostały pozytywne po zastosowaniu wytycznych z 2013 roku. W grupie 650 wyników negatywnych według ASCO-CAP 2007 po zastosowaniu nowych wytycznych 79,1% (n = 514) przypadków ponownie zostało zakwalifikowanych jako negatywne, 3,4% (n = 22) reklasyfikowano na wynik pozytywny, natomiast 17,5% (n = 114) na wynik niejednoznaczny (ryc. 3A). W grupie 32 wyników granicznych według ASCO-CAP 2007 po zastosowaniu nowych wytycznych 15,6% (n = 5) nie zmieniło swojego statusu, 78,1% (n = 25) zostało zaklasyfikowanych jako pozytywne, natomiast 6,3% (n = 2) jako negatywne (ryc. 3B).

Porównanie wyników uzyskanych w dwóch różnych grupach pacjentów ocenianych w kolejnych latach zgodnie



Rycina 3. Wpływ zmiany zasad klasyfikacji ASCO-CAP na kwalifikację wyników tej samej grupy 763 pacjentów. A — zmiany w grupie wyników negatywnych wg 2007; B — zmiany w grupie wyników granicznych wg 2007

Tabela III. Rozkład wyników dwóch niezależnych grup pacjentów, analizowanych według dwóch różnych systemów wytycznych

Status genu <i>HER2</i>	Wynik	ASCO-CAP 2007 Grupa (n = 680)		ASCO-CAP 2013 Grupa (n = 851)		Istotność statystyczna
		Odsetek przypadków	Liczba przypadków	Odsetek przypadków	Liczba przypadków	
Amplifikacja	pozytywny	15,6%	n = 106	15,4%	n = 131	p = 0,92
Brak amplifikacji	negatywny	76,2%	n = 518	61,8%	n = 526	p < 0,0001
NDO*	graniczny/niejednoznaczny**	0,4%	n = 3	13,6%	n = 116	p < 0,0001
NDO	niediagnostyczne**	7,8%	n = 53	9,2%	n = 78	p = 0,34

*NDO — nie do oceny

**Wynik graniczny/niejednoznaczny — brak możliwości jednoznacznej oceny statusu genu *HER2*

Różnice istotne statystycznie zaznaczono pogrubioną czcionką

z zaleceniami ASCO-CAP 2007 i ASCO-CAP 2013 przedstawiono w tabeli III. Wyniki badania FISH u 680 pacjentów diagnozowanych w roku 2013 oceniano według wytycznych ASCO-CAP 2007. Wyniki badania FISH 815 pacjentów diagnozowanych w roku 2014 oceniano według wytycznych ASCO-CAP 2013.

Porównanie to ujawniło brak znaczących zmian w odsetku przypadków *HER2*-pozytywnych. W grupie pacjentów ocenianej wg zasad 2007 uzyskano 15,6% wyników pozytywnych, w grupie ocenianej wg zasad 2013 uzyskano 15,4% wyników pozytywnych, a stwierdzona różnica nie jest istotna statystycznie. Jednocześnie w grupie analizowanej według wytycznych 2013 stwierdzono spadek odsetka wyników *HER2*-negatywnych w porównaniu z grupą analizowaną według wytycznych 2007 (61,8% vs 76,2%). Znacznemu rozszerzeniu uległa grupa z wątpliwym statusem genu *HER2*: z 0,4% (wg wytyczne 2007) do 13,6% (wg wytyczne 2013). Grupa przypadków niediagnostycznych, w których jakość materiału lub zbyt skąpe utkanie nowotworowe uniemożliwiły wykonanie badania, pozostała na podobnym poziomie (7,8 vs 9,2%).

Dyskusja

Interpretacja wyniku badania FISH, przeprowadzonego dla oceny statusu genu *HER2* w celu wyselekcjonowania

pacjentów z amplifikacją tego genu, powinna odbywać się zgodnie z aktualnie obowiązującymi zaleceniami ekspertów ASCO-CAP 2013 [14, 15].

Rekomendacja z 2007 roku definiowała przypadki z amplifikacją, przypadki bez amplifikacji i przypadki graniczne, o niemożliwym do zdefiniowania statusie genu *HER2* [20]. Dla uściślenia wyniku stosowano zliczanie sygnałów w dodatkowych jądrach, a gdy wynik pozostawał niejednoznaczny, zalecano powtórzenie badania FISH lub IHC. Mankamentem tej klasyfikacji była zależność wyniku od rodzaju użytej sondy. Zdarzały się sytuacje, gdy u tego samego pacjenta można było uzyskać wynik pozytywny w przypadku użycia sondy znakującej tylko gen *HER2* lub wynik negatywny — przy użyciu sondy podwójnej, znakującej dodatkowo obszar CEP17. Sytuacja taka pojawiała się, gdy średnia liczba sygnałów *HER2* na komórkę była większa niż 6 (wynik pozytywny), natomiast RATIO było mniejsze od 1,8 (wynik negatywny). Zaniżenie wskaźnika RATIO wynikało tu z podwyższonej liczby kopii CEP17.

Obecnie obowiązujące wytyczne ASCO-CAP 2013 zobowiązują do równoległej oceny średniej ilości sygnałów pochodzących z sondy znakującej gen *HER2* z analizą RATIO [14, 15]. Jest to zatem połączenie dwóch metod analizy dla uzyskania jak najbardziej wiarygodnego wyniku. Utrzymano podział na przypadki pozytywne, z jednoznaczną amplifika-

cją, oraz negatywne, z jednoznacznym brakiem amplifikacji. Grupa przypadków o nieustalonym statusie genu *HER2* nazwana została grupą niejednoznaczną. Odpowiada ona po części dawnej grupie przypadków granicznych oraz negatywnych. Zmiana zasad kwalifikacji spowodowała zmianę w proporcji liczebności grup pacjentów z wykazaną amplifikacją, bez amplifikacji oraz przypadków niezdefiniowanych wobec statusu genu *HER2*.

W przeprowadzonych przez nas badaniach analiza wyników uzyskanych na tej samej grupie pacjentów przy użyciu dwóch systemów klasyfikacji potwierdziła tę tendencję. Wszystkie wyniki pierwotnie pozytywne (wg ASCO-CAP 2007) pozostały takimi po zastosowaniu wytycznych ASCO-CAP 2013. Z grupy wyników pierwotnie negatywnych ponad 3% zostało przeniesionych do grupy wyników pozytywnych, zaś prawie 18% — do grupy niejednoznacznej. Pierwotne wyniki graniczne zostały w większości uznane za pozytywne (78% grupy), w niewielkiej części — za negatywne (6%), a niecałe 16% pozostało niezdefiniowane pod względem statusu genu *HER2*, zasilając ostatecznie grupę wyników niejednoznacznych. Sumarycznie, po reklasyfikacji grupa przypadków *HER2*-pozytywnych wzrosła z 81 do 128 przypadków, co stanowi ponad 6% grupy badanej. Największy wzrost, o ponad 11%, odnotowano w grupie przypadków niejednoznacznych: z 4,2% do 15,6%. Obok przypadków z wyjściowej grupy granicznej do przypadków niejednoznacznych zaliczono nowe, które pochodziły z grupy wyjściowo ocenionej jako negatywne. Po reklasyfikacji odnotowano spadek odsetka przypadków z wynikiem negatywnym z 85,2% do 67,6%; zmiana ta stanowiła ponad 17%. Wszystkie wykazane różnice były istotne statystycznie. Uzyskane przez nas rezultaty potwierdziły przewidywaną teoretycznie zmianę proporcji liczbowych poszczególnych grup pacjentów.

Podobne wyniki otrzymano w Mayo Clinic. Po przeprowadzonej analizie 321 przypadków stwierdzono zmianę statusu genu *HER2* u 15% badanych (w naszym laboratorium ponad 21%). Grupa z wynikiem pozytywnym wzrosła z 14% do 25%, natomiast negatywna zmalała z 82% do 70%, odpowiednio wytyczne 2007 vs 2013. Inaczej niż w naszych badaniach, tylko niewielkiemu powiększeniu uległa grupa przypadków niejednoznacznych z 3,5% do 4% [24]. W badaniach w Kanadzie stwierdzono reklasyfikację wyników w ponad 9% z 904 przebadanych przypadków [25]. W grupie przypadków pierwotnie zaklasyfikowanych jako negatywne 7,3% zmieniło kwalifikację na wynik niejednoznaczny, a 0,7% na wynik pozytywny. W grupie przypadków pierwotnie niejednoznacznych 1% otrzymało wynik pozytywny, zaś 0,4% wynik negatywny. Wszystkie wyniki pozytywne pozostały pozytywne. W grupie pozytywnej odnotowano niewielki wzrost, o 1,7%, natomiast w grupie przypadków niejednoznacznych odnotowano wzrost z 2,3% do 7,3% przypadków [25].

Porównanie naszych wyników rutynowych badań FISH, przeprowadzanych w dwóch kolejnych latach, w niezależnych grupach pacjentów o podobnej liczebności, wykazało istotny statystycznie spadek liczebności grupy *HER2*-ujemnej z 76,2% do 61,8%. Wzrost odsetka przypadków niejednoznacznych przekroczył 13%. Liczebność grupy o nieustalonym statusie *HER2* zmieniła się najbardziej. W wyniku opisanego porównania stwierdzono ponadto utrzymanie poziomu przypadków pozytywnych (*HER2*-dodatnich) na poziomie 15% (różnica nieistotna statystycznie). Taki rezultat może wynikać z odmiennego doboru grupy kierowanej na badanie FISH w kolejnych latach. Po zmianie wytycznych ASCO-CAP modyfikacji uległy również zalecenia dotyczące oceny badania immunohistochemicznego, w tym definicje IHC 3+, 2+, 1+ i 0. W szczególności zostało zmienione kryterium oznaczenia 3+ (z 30% do 10% — silne wybarwienie błony), co mogło wpłynąć na zmniejszenie odsetka przypadków ewidentnie pozytywnych, kierowanych wcześniej do badania FISH. Dodatkowo rozszerzono grupę 2+, wymagającą badania FISH, o przypadki, które według poprzednich rekomendacji kwalifikowane były jako *HER2*-negatywne [26, 27].

Efektem nowych wytycznych ASCO-CAP 2013 miało być umożliwienie zastosowania terapii celowanej przeciwko *HER2* u jak największej grupy pacjentów potencjalnie wrażliwych na takie leczenie oraz zmniejszenie ryzyka otrzymania wyniku fałszywie negatywnego [14, 25]. Skutkiem zmian w rekomendacjach było rozszerzenie grupy przypadków *HER2*-dodatnich (z amplifikacją), a zawężenie grupy przypadków *HER2*-ujemnych (bez amplifikacji). Rozszerzenie grupy wyników niejednoznacznych połączono ze wskazaniem możliwości zastosowania terapii anty-*HER2* także u niektórych pacjentów z tej grupy. Zakładano przy tym, iż w przypadkach, bez jednoznacznie stwierdzonej lub wykluczonej amplifikacji genu *HER2*, ostateczna decyzja o odpowiednim protokole leczenia, zostanie podjęta w wyniku konsultacji lekarza onkologa i patologa na podstawie analizy całościowych danych klinicznych [14, 25].

Na podstawie wyników własnych możemy stwierdzić, że zastosowanie obowiązujących wytycznych ASCO-CAP 2013 zwiększyło grupę przypadków niejednoznacznych, o niezdefiniowanym statusie genu *HER2*. Pacjenci ci stanowią obecnie szczególny problem diagnostyczny. W warunkach polskich, gdzie decyzje o podjęciu leczenia są podejmowane administracyjnie (zalecenia NFZ), wzrastająca grupa przypadków niejednoznacznych, niekwalifikowanych do terapii celowanej, rodzi liczne wątpliwości i dylematy diagnostyczne i kliniczne.

Niejednoznaczny wynik FISH może wynikać z trzech zasadniczych przyczyn. Pierwszą może być gorsza jakość badanego materiału biologicznego, drugą zaś jego heterogenność, oznaczająca niejednorodność genetyczną próbek. Trzecią możliwą przyczyną niejednoznaczności wyniku jest

brak możliwości rozróżnienia ko-amplifikacji *HER2*/CEP17 od polisomii chromosomu 17 w badaniu rutynowym.

Powtórzenie rutynowego badania FISH na innym błoczku czy analiza większej populacji komórek mogą być skuteczne w dwóch pierwszych przypadkach, jednak nie rozstrzygają wątpliwości w trzeciej grupie przypadków niejednoznacznych, z nietypowym obrazem znakowania [18, 25].

Heterogenność materiału oznacza tu, że w guzie występują różne populacje komórek nowotworowych, w tym klon obciążony amplifikacją *HER2*. Zjawisko takie może dotyczyć nawet 40% przypadków [18]. Komórki z amplifikacją *HER2* mogą być umiejscowione w wyodrębnionych obszarach guza bądź być przemieszane z komórkami bez amplifikacji [15]. Dowiedziono, że praktyczny wpływ na przebieg choroby ma obecność klonów wyodrębnionych, o liczebności nie mniejszej niż 10% badanej populacji, a obszary te powinny być oceniane oddzielnie [15, 18]. Ocena heterogenności próbki powinna być więc nieodłączną częścią rutynowej analizy FISH, zaś w przypadkach niejednoznacznych powinna być przeprowadzona powtórnie.

Nietypowe znakowanie, czyli równoczesne zwielokrotnienie liczby sygnałów genu *HER2* i centromeru chromosomu 17, notowane jest nawet w 46% przypadków raka piersi [18]. Analiza FISH w jądrach interfazowych pozwala na określenie liczby kopii znakowanego obszaru, ale nie ich wzajemne położenie. Tak więc nadliczbowe kopie *HER2* mogą być zgromadzone na jednym, zmienionym chromosomie 17 (amplifikacja) lub występować na wielu kopiach prawidłowego chromosomu 17 (polisomia/poliploidia). Zalecane użycie innej sondy znakującej centromer 17 lub sond znakujących inne geny leżące na tym chromosomie, np. *TP53*, *SMS*, *RARA*, ma ujawnić zaburzenia morfologii lub liczby kopii chromosomu 17 [6, 14, 15, 18, 23]. Celem rozszerzonego badania FISH jest więc wykazanie statusu genu *HER2* wobec morfologii chromosomu 17 w przypadkach, gdzie stosunek *HER2*/CEP17 wynosi poniżej 2,0, a liczba kopii genu *HER2* nie osiąga 6,0. Jeśli doszło do ko-amplifikacji (równoczesnego powielenia) CEP17 i *HER2* w jednej z dwóch kopii chromosomu 17, skutek kliniczny jest równoznaczny z amplifikacją (wynik *HER2*+). Jeśli zaś przyczyną powielenia sygnałów jest polisomia (obecność kilku kopii) chromosomu 17 bądź poliploidia komórek (powielenie kopii wszystkich chromosomów), wynik będzie ujemny lub pozostanie niejednoznaczny. Dotychczasowe badania z zastosowaniem takich metod jak MLPA, aCGH czy FISH z użyciem innych sond znakujących chromosom 17 sugerują, iż podwyższona wartość CEP17 rzadko jest skutkiem polisomii 17 [18, 21, 28], co jest argumentem na rzecz wykonywania pogłębionych badań w przypadkach niejednoznacznych. Takie postępowanie może wskazać grupę przypadków z amplifikacją, nieujawnioną w badaniu rutynowym.

Niestety, pogłębiona analiza FISH istotnie podnosi koszty rutynowej procedury oznaczania, co przy obecnym stanie

finansowania badań genetycznych może stanowić istotny problem dla szpitali. Dysponując szerokim materiałem diagnostycznym, podjęliśmy próbę ustalenia optymalnej procedury pogłębionego badania FISH w przypadkach niejednoznacznych. Wyniki badania zostaną przedstawione w osobnej publikacji.

Wnioski

Wykazano, że zmiana wytycznych ASCO-CAP wpłynęła istotnie na rezultat oznaczenia statusu genu *HER2* metodą FISH. Efektem obecnej zmiany jest rozszerzenie grupy wyników *HER2*-dodatnich przy jednoczesnym zmniejszeniu grupy *HER2* — ujemnej. Znaczny wzrost liczby grupy wyników niejednoznacznych implikuje potrzebę wdrożenia procedury ich weryfikacji.

Konflikt interesów: nie zgłoszono

Mgr Urszula Piekarska

Pracownia Genetyki Nowotworów
Zakład Patologii i Diagnostyki Laboratoryjnej
Centrum Onkologii — Instytut
im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie
ul. Roentgena 5, 02–781 Warszawa
e-mail: unajmola@coi.waw.pl

Otrzymano: 30 listopada 2015 r.

Przyjęto do druku: 16 lutego 2016 r.

Piśmiennictwo

1. Jassem J, Krzakowski M, Bobek-Billewicz i wsp. *Rak piersi*. W: Jassem J, Krzakowski M (red.). *Zalecenia postępowania diagnostyczno-terapeutycznego w nowotworach złośliwych — 2013*. Gdańsk: Via Medica, 2013; 212–263.
2. Wojciechowska U, Didkowska J. *Zachorowania i zgony na nowotwory złośliwe w Polsce*. Krajowy Rejestr Nowotworów, Centrum Onkologii — Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie (<http://onkologia.org.pl/raporty/>).
3. Salamon DJ, Godolphin W, Jones LA i wsp. Studies of the *HER-2/neu* proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989; 244: 707–712.
4. Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC i wsp. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with *neu* oncogene. *Science* 1985; 230: 1132–1139.
5. Hynes NE, Stern DF. The biology of *erbB-2/neu/HER-2* and its role in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1198: 165–184.
6. Tse CH, Hwang HC, Goldstein LC i wsp. Determining true *HER2* gene status in breast cancers with polysomy by using alternative chromosome 17 reference genes: implications for anti-*HER2* targeted therapy. *J Clin Oncol* 2011; 29: 4168–4174.
7. Roskoski R Jr. The *ErbB/HER* receptor protein-tyrosine kinases and cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 319: 1–11.
8. Di Fiore PP, Pierce JH, Kraus MH i wsp. *erbB-2* is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells. *Science* 1987; 237: 178–182.
9. Dowsett M, Procter M, McCaskill-Stevens W i wsp. Disease-free survival according to degree of *HER2* amplification for patients treated with adjuvant chemotherapy with or without 1 year of trastuzumab: the *HERA* Trial. *J Clin Oncol* 2009; 27: 2962–2969.
10. Ross JS, Slodkowska EA, Symmans WF i wsp. The *HER2*-receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-*HER-2* therapy and personalized medicine. *The Oncologist* 2009; 14: 320–368.
11. Olszewski WP. Status *HER2* w raku piersi — informacje praktyczne dla lekarzy. *Nowa Medycyna* 2005; 12: 4–10.
12. Krasieńska L, Jassem J. Kliniczne znaczenie zaburzeń *HER2* w raku piersi z uwzględnieniem metod ich oznaczania. *Nowotwory J Onkol* 2003; 53: 68–71.

13. European Cytogeneticists Association (E.C.A.) Permanent Working Group for Cancer cytogenetics solid tumor studies. Interphase FISH on solid tumors: recommendations for use on histological sections in daily practice. *Newsletter* 2011; 27: 5–11.
14. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG i wsp. 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. *J Clin Oncol* 2013; 31: 3997–4013.
15. Wolff AC, Hammond ME, David G i wsp. 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. *Arch Pathol Lab Med* 2014; 138: 241–256.
16. Śnietura M, Lange D. Aktualne rekomendacje ASCO/CAP 2013 dotyczące badań statusu receptora HER2 w raku piersi. *Polish Journal of Pathology* 2014; 65 (Suplement 2): S32–41.
17. Olszewski WT, Krzakowski M i wsp. Rekomendacje polskiej grupy badawczej ds. HER2. *Nowotwory J Oncol* 2004; 54: 500–505.
18. Hanna WM, Rüschoff J, Bilous M i wsp. HER2 in situ hybridization in breast cancer: clinical implications of polysomy 17 and genetic heterogeneity. *Mod Pathol* 2014; 27: 4–18.
19. Perez EA, Cortes J, Gonzalez-Angulo AM i wsp. HER2 testing: current status and future directions. *Cancer Treat Rev* 2014; 40: 276–284.
20. Wolff AC, Hammond ME, Schwarz JN i wsp. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2007; 131: 18–43.
21. Gunn S, Yeh IT, Lytvak I i wsp. Clinical array-based karyotyping of breast cancer with equivocal HER2 status resolves gene copy number and reveals chromosome 17 complexity. *BMC Cancer* 2010; 10: 396.
22. Vranic S, Teruya B, Repertinger S i wsp. Assessment of HER2 gene status in breast carcinoma with polysomy of chromosome 17. *Cancer* 2011; 117: 48–53.
23. Egervari K, Kosa C, Szollosi Z, Impact of chromosome 17 centromere region assessment on HER2 status reported in breast cancer. *Pathol Res Pract* 2011; 207: 468–471.
24. Shah MV, Wiktor AE, Meyer RG i wsp. Changing pattern for HER2 positivity due to updated ASCO/CAP guidelines for HER2 testing and its impact. *Journal of Clinical Oncology. ASCO Annual Meeting Abstracts* 2014; 32: 523.
25. Bethune GC, Veldhuijzen van Zaten D, MacIntosh RF i wsp. Impact of the 2013 American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologist guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) testing of invasive breast carcinoma: a focus on tumors assessed as 'equivocal' for HER2 gene amplification by fluorescence in-situ hybridization. *Histopathology* 2015; 67: 880–887.
26. Rakha EA, Starczynski J, Lee AH i wsp. The updated ASCO/CAP guideline recommendations for HER2 testing in the management of invasive breast cancer: a critical review of their implications for routine practice. *Histopathology* 2014; 64: 609–615.
27. Garbar C, Savoye AM, Mascaux C i wsp. The human epidermal growth factor receptor 2 screening test for breast cancer suggested by the new updated recommendation of American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists will involve a rise of the in-situ hybridization test for the European laboratories of pathology. *ISRN Oncology* 2014; 2014: ID 793695.
28. Moelans CB, de Weger RA, van Diest PJ, Absence of chromosome 17 polysomy in breast cancer: analysis by CEP17 chromogenic in situ hybridization and multiplex ligation-dependent probe amplification. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 120: 1–7.