

Andrzej Marszałek^{1,2}, Maciej Krzakowski³

¹Katedra Patologii i Profilaktyki Nowotworów, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

²Wielkopolskie Centrum Onkologii w Poznaniu

³Klinika Nowotworów Płuca i Klatki Piersiowej, Centrum Onkologii — Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie w Warszawie

Zalecenia dotyczące oceny czynnika predykcyjnego HER2 u chorych z rozpoznaniem inwazyjnego (naciekającego) raka piersi

Treść zaleceń zgodna z wytycznymi ASCO opublikowanymi 30 maja 2018 roku
 Stanowisko Konsultantów Krajowych w dziedzinie patomorfologii
 oraz onkologii klinicznej

Recommendations for evaluation of predictive marker HER2 in patients with invasive breast cancer

Publikacja ukáže się równolegle w czasopiśmie „Patologia Polska”

Artykuł jest tłumaczeniem pracy:

Marszałek A, Krzakowski M. Recommendations for evaluation of predictive marker HER2 in patients with invasive breast cancer. *Oncol Clin Pract* 2018; 14. DOI: 10.5603/OCP.2018.0034.

Należy cytować wersję pierwotną.

Adres do korespondencji:

Prof. dr hab. n. med. Andrzej Marszałek
 Katedra Patologii i Profilaktyki
 Nowotworów, Uniwersytet Medyczny
 im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu
 e-mail: amars@ump.edu.pl

STRESZCZENIE

Po długoletniej analizie skuteczności leczenia ukierunkowanego molekularnie z wykorzystaniem oceny predykcyjnego znaczenia stanu HER2, w maju 2018 roku opublikowano nowe zasady algorytmu określania wspomnianego wskaźnika w raku piersi. Podstawowa zmiana dotyczy wprowadzenia procedur mających na celu jednoznaczne określenie stanu HER2 jako dodatni lub ujemny, czyli wyeliminowania wyników tzw. „niejednoznacznych”. W zaleceniach przedstawione są obecne algorytmy postępowania.

Słowa kluczowe: HER2, rak piersi, zalecenia

ABSTRACT

After long-term analysis of clinical effectiveness of molecularly targeted treatment with the use of predictive value of HER2 status, new recommendations for evaluation of HER2 status (receptor or gene) in breast cancer were published. The new protocols were developed to eliminate equivocal cases, and the new procedure leads to final statement as HER2 positive or HER2 negative. Current testing algorithms are presented.

Key words: HER2, breast cancer, recommendations

Copyright © 2018 Via Medica

ISSN 2450–1646

Wstęp

Ocena czynników predykcyjnych w leczeniu chorób nowotworowych stała się działaniem standardowym i jest obecnie częścią prawidłowo przygotowanego rozpoznania patomorfologicznego. Zasady opracowania materiału diagnostycznego — materiału biopsyjnego,

oraz materiału pooperacyjnego — zostały opublikowane przez towarzystwa międzynarodowe: Światową Organizację Zdrowia (WHO, *World Health Organization*), Międzynarodową Agencję Badań nad Rakiem (IARC, *International Agency for Research on Cancer*), Amerykańskie Towarzystwo Patologów (CAP, *College of American Pathologists*) oraz zaadoptowane do warunków polskich

(patrz standardy opublikowane przez Polskie Towarzystwo Patologów — PTP) i są powszechnie znane.

Ze względu na rozwój technologiczny dostępne są coraz szerzej możliwości oceny wybranych markerów. W raku piersi — poza ustaleniem pełnego rozpoznania patomorfologicznego obejmującego także wskazanie obecności rzadziej występujących typów (wariantów) histologicznych — obowiązkowe jest określenie szerokości marginesów zdrowych tkanek oraz obecności przekraczania torebki węzła chłonnego w przypadkach przerzutów nowotworowych. Do niezwykle ważnych elementów decydujących o dalszym postępowaniu należy oznaczanie tak zwanych markerów mających znaczenie dla wyboru terapii, czyli obecności i odsetka komórek z receptorami dla estrogenów (ER, *estrogen receptor*), progesteronu (PgR, *progesterone receptor*) i dla ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu (HER2, *human epidermal receptor 2*), oraz określenie odsetka komórek nowotworowych będących w cyklu komórkowym na podstawie indeksu Ki67. Wszystkie wymienione elementy muszą być zawarte w rozpoznaniu patomorfologicznym. Ocena wymienionych wyżej markerów opiera się głównie na badaniach immunohistochemicznych (IHC, *immunohistochemistry*). Wyniki badań IHC mogą być obciążone „wrażliwością” na różne czynniki (m.in. czas tzw. zimnego i ciepłego niedokrwienia, temperatura utrwalacza, typ i stężenie utrwalacza, ilość utrwalacza w stosunku do tkanki) na etapie pobrania i transportu materiału do zakładu patomorfologii, a także mające wpływ na proces technologiczny (tj. w trakcie wykonywania procedur laboratoryjnych) przygotowania materiału do badania mikroskopowego. Wynik (ocena) reakcji IHC może podlegać wpływowi subiektywnej oceny, zwłaszcza u niedoświadczonego obserwatora. W badaniach IHC dla ER i PgR oraz Ki67 oceniana jest reakcja jądrowa, przy czym ocena polega na stwierdzeniu występowania lub niewystępowania reakcji wskazującej na obecność badanego markera. W omawianych przypadkach intensywność ocenianej reakcji ma mniejsze znaczenie. Odmienna sytuacja występuje w sytuacji oceny ekspresji HER2, co zostanie omówione poniżej.

Ekspresja HER2

Powszechnie używa się nazwy HER2 dla określenia obecności receptora, który odgrywa rolę w odbieraniu sygnałów zewnątrzkomórkowych przekazywanych przez naskórkowy czynnik wzrostu (EGF, *epidermal growth factor*). Sygnał z powierzchni komórki — po połączeniu liganda z receptorem — jest przekazywany do komórki poprzez wzrost aktywności kinazy tyrozynowej. Stąd wspomniany receptor należy do tak zwanej rodziny receptorów kinazy tyrozynowej.

Nazwa HER2 jest powszechnie znana, natomiast wnikliwy czytelnik może spotkać się innymi nazwami/synonimami HER2 obecnymi w piśmiennictwie, to jest w postaci: c-erbB2, ERBB2, neu, cząsteczka CD340 oraz przezłonowa glikoproteina p185 (czyli produkt genu *HER2*). Działanie receptora HER2 jest możliwe po jego aktywacji, do której dochodzi po dimeryzacji (połączenie się dwóch białek/peptydów w przypadku receptorów HER). Receptor HER2 tworzy zarówno homodimery, jak i heterodimery z innymi receptorami z rodziny EGFR. W warunkach prawidłowych receptor HER2 jest wykorzystywany między innymi w czasie embriogenezy, a także ma wpływ na różnicowanie, ruchliwość (mobilność) komórek oraz interakcje pomiędzy różnymi komórkami. W rakach piersi w celu określenia prawdopodobieństwa uzyskania korzyści terapeutycznych niezbędna jest ocena ekspresji białka HER2 (czyli receptora na powierzchni komórek nowotworowych), a w wybranych przypadkach ocenia się także liczbę kopii genu dla HER2. Ze względu na obciążony częściowo subiektywizmem sposób oceny ekspresji HER2, w celu ujednoczenia oraz zwiększenia powtarzalności wyników, wprowadzono kolejną modyfikację zaleceń. W ostatnio opublikowanej (30 maja 2018 roku) modyfikacji głównym celem zmiany algorytmu oceny patomorfologicznej oraz wskazań klinicznych jest wyeliminowanie tak zwanych wyników „niejednoznacznych” (*equivocal*) — pojęcie to oznacza, że na podstawie takiego wyniku nie ma bezpośrednich wskazań do wdrożenia lub odstąpienia od terapii lekami blokującymi HER2. Szczegóły protokołu badania oraz zasady oceny i interpretacji wyniku przedstawiono w dalszej części artykułu.

Zalecenia (standard)

Oceny nadekspresji lub amplifikacji (zwiększonej ponad normę ilości białka lub kopii genu) dokonuje się rutynowo w badaniach patomorfologicznych. Standardy opracowania materiału do diagnostyki przedstawiono poniżej.

Materiał tkankowy (biopsja gruboigłowa, tzw. biopsja mammotomiczna, materiał pooperacyjny) musi być utrwalony w buforowanej 10-procentowej formalinie (tj. 4% wodny roztwór paraformaldehydu) natychmiast po pobraniu. Czas utrwalania nie może przekraczać 96 godzin. Nie można stosować innych rodzajów utrwalaczy. Następnie materiał musi zostać przygotowany do zatopienia w bloczkach parafinowych (w literaturze angielskiej używa się określenia FFPE — *formalin-fixed paraffin embeded*; materiał utrwalony w formalinie i zatopiony w parafinie). Z tak przygotowanego materiału wykonuje się skrawki parafinowe o grubości 3–4 mikrometrów, a następnie wykonuje się reakcję immunohistoche-

miczną (IHC) zgodnie ze standardowymi procedurami z użyciem przeciwciał pierwotnych i systemów detekcji posiadających odpowiednie certyfikaty z zachowaniem standaryzowanego protokołu wykonania oznaczenia zgodnego z zaleceniami producenta.

Obecnie obowiązujące zasady oceny patomorfologicznej

Wykonanie niżej opisanych procedur oceny patomorfologicznej z wykorzystaniem badania IHC oraz technik hybrydyzacji *in situ* (ISH, *in situ hybridization*), ma na celu wyeliminowanie z wyników określenia „HER2 wynik niejednoznaczny”. Wprowadzony algorytm ma doprowadzić do jednoznacznego ostatecznie stwierdzenia, wynik „HER2-dodatni” lub „HER2-ujemny”. Niemniej jednak klinicyści na podstawie swojego doświadczenia mogą podejmować u wybranych chorych decyzje terapeutyczne, proponując inne schematy leczenia. Stąd istotne jest zwrócenie uwagi, że ostateczny wynik „HER2-dodatni” lub „HER2-ujemny” w szczególnych przypadkach według nowych zasad powinien zostać opatrzone komentarzem. Niniejsze opracowanie nie zmienia zasad finansowania przez Narodowy Fundusz Zdrowia (NFZ) leczenia z wykorzystaniem blokerów HER2.

Oceny ekspresji białka HER2 w badaniach IHC oraz badaniach ISH dokonuje patolog. Jeżeli zgodnie z poniższymi procedurami należy ponownie dokonać oceny badań IHC lub ISH, lub obu badań łącznie, drugi patolog dokonujący oceny nie może znać poprzednich wyników (tzw. próba zaślepienia).

W badaniach ISH zaleca się stosowanie zestawów zawierających podwójne sondy (tj. dla oznaczenia obu badanych elementów w jednym badaniu).

Zasady oceny ekspresji HER2 w badaniach IHC przedstawiono w tabeli 1. Schemat decyzji po wykonaniu badania IHC znajduje się na rycinie 1.

Jeżeli w badaniach IHC stwierdzono HER2 2+, należy ocenić liczbę kopii genu *HER2* w badaniu ISH. Dostępne są zestawy z jedną sondą (tylko sonda dla genu *HER2*) lub podwójnymi sondami [tj. dla genu *HER2* oraz

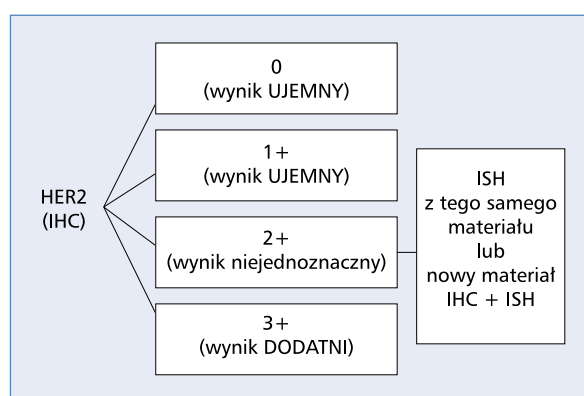
dla centromeru chromosomu 17 — CEP17 (najczęściej); lub dla genu *TP53* (wykorzystanie zestawu *HER2/TP53* ułatwia ocenę)]. Ze względu na opisane poniżej sytuacje zaleca się stosowanie zestawów z dwiema sondami.

W przypadku oceny ISH z użyciem jednej sondy stosuje się algorytm oceny przedstawiony na rycinie 2.

Jeżeli w badaniu patomorfologicznym biopsji gruczołowej nie stwierdzono nadekspresji HER2 (wynik ujemny — *negative HER2 test*), w uzasadnionych kryteriach klinicznych (tj. np. rak o stopniu złośliwości G3) przypadkach MOŻNA wykonać ponownie ocenę ekspresji HER2 z materiału pooperacyjnego. Szczegóły decyzji klinicznych przedstawiono w dalszej części artykułu.

W przypadkach wymagających wykonania oceny genu *HER2* z wykorzystaniem technik ISH niezbędna jest ocena preparatów ISH łącznie z preparatami IHC przez tego samego patologa (patrz ryc. 2). Ma to zastosowanie szczególnie w poniższych przypadkach:

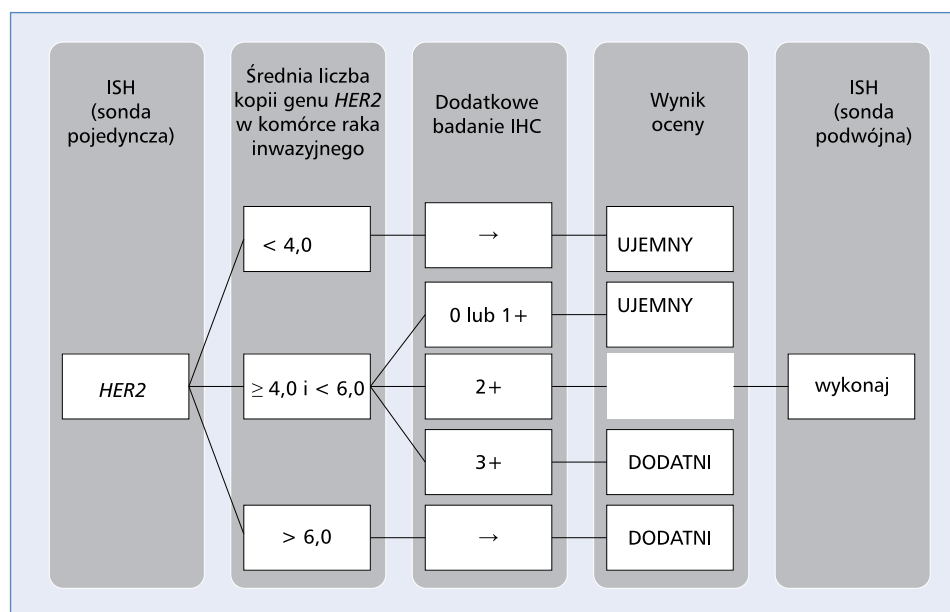
- A) przypadki, w których wynik współczynnika (*ratio*) *HER2/CEP17* [liczba kopii genu *HER2* na liczbę centromeru chromosomu 17 (*chromosome enumeration probe 17*)] jest równy lub większy 2, ale liczba kopii *HER2* niższa niż 4, wówczas trzeba dokonać łącznej oceny preparatów ISH i IHC wykonanych



Rycina 1. Schemat decyzji po wykonaniu badania immunohistochemicznego (IHC, *immunohistochemistry*). ISH (*in situ hybridization*) — hybrydyzacja *in situ*

Tabela 1. Zasady oceny ekspresji HER2

Wynik oceny	Opis obserwowanych zmian	Interpretacja
HER2 0	Brak reakcji lub reakcja błonowa nieciągła słaba lub ledwie widoczna i obecna w mniej lub równo 10% komórek nowotworowych	Wynik UJEMNY
HER2 1+	Reakcja błonowa nieciągła słaba lub ledwie widoczna i obecna w powyżej 10% komórek nowotworowych	Wynik UJEMNY
HER2 2+	Obecna ciągła błonowa reakcja o słabym lub o średnim nasileniu w więcej niż 10% komórek raka naciekającego	Wynik NIEJEDNOZNACZNY (<i>equivocal</i>)
HER2 3+	Silna ciągła reakcja błonowa w powyżej 10% komórek nowotworowych	Wynik DODATNI



Rycina 2. Algorytm decyzji diagnostycznych, po wykonaniu badań hybrydacji *in situ* (ISH, *in situ hybridization*) z wykorzystaniem sondy pojedynczej (dla genu *HER2*). IHC (*immunohistochemistry*) — badanie immunohistochemiczne

z tego samego materiału (błoczek) i najlepiej w tym samym zakładzie. Wynik takiej oceny jest jak następuje:

- Aa) wynik HER2-dodatni: jeżeli w badaniu IHC uzyskano wynik HER2 3+;
 - Ab) jeżeli po ponownej ocenie badania IHC ponownie uzyskano wynik oceny HER2 2+:
 - należy wykonać dodatkową ocenę w badaniu ISH w co najmniej 20 komórkach w obszarach raka inwazyjnego HER2 2+ przez innego, jeżeli jest to możliwe, patologa (**Uwaga!** W badaniu ISH trzeba oceniać te same obszary, w których w badaniu IHC stwierdzono HER2 2+ w raku naciekającym); w wyniku oceny należy ustalić jednoznacznie HER2-dodatni/-ujemny (**Uwaga!** Dotyczy to szczególnie sytuacji, gdy dochodzi do zmiany wartości HER2/CEP17 w stosunku do zliczenia wykonanego przez pierwszego patologa); jest to wynik ostateczny,
 - jeżeli w wyniku ponownie wykonanego badania ISH i ocenionego przez innego patologa uzyskano współczynnik HER2/CEP17 równy lub większy od 2, ale liczba kopii genu *HER2* jest poniżej 4, wówczas w wyniku należy wpisać „HER2-ujemny” i opatrzyć go komentarzem;
 - Ac) wynik HER2-ujemny, jeżeli w ponownie wykonanym badaniu IHC wynik oceny to: HER2 0 lub HER2 1+;
- B) przypadki, w których w badaniu ISH stwierdzono średnią liczbę kopii genu *HER2* większą lub równą 6 przy jednoczesnym współczynniku

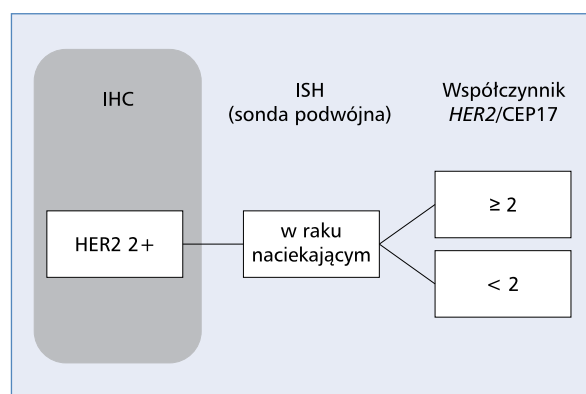
HER2/CEP17 poniżej 2, wówczas należy dokonać ponownej oceny (lub jeżeli badania ISH oraz IHC były wykonane z różnych materiałów, należy wykonać badanie IHC z tego samego materiału FFPE, w którym wykonano badanie ISH) i dokonać łącznej oceny preparatów ISH i IHC wykonanych w z tego samego materiału (FFPE/błoczek) i najlepiej w tym samym zakładzie. Wynik takiej oceny jest jak następuje:

- Ba) wynik HER2-dodatni: jeżeli badaniu IHC uzyskano wynik HER2 3+;
- Bb) jeżeli po ponownej ocenie badania IHC uzyskano wynik oceny HER2 2+:
 - należy wykonać dodatkową ocenę w badaniu ISH w co najmniej 20 komórkach w obszarach raka inwazyjnego HER2 2+ przez innego, jeżeli jest to możliwe, patologa (**Uwaga!** W badaniu ISH trzeba oceniać te same obszary, w których w badaniu IHC stwierdzono HER2 2+ w raku naciekającym); w wyniku oceny należy ustalić jednoznacznie HER2-dodatni/-ujemny (**Uwaga!** Dotyczy to szczególnie sytuacji, gdy dochodzi do zmiany wartości HER2/CEP17 w stosunku do zliczenia wykonanego przez pierwszego patologa); jest to wynik ostateczny;
 - jeżeli w wyniku ponownie wykonanego badania ISH i ocenionego przez innego patologa uzyskano współczynnik HER2/CEP17 mniejszy od 2, ale liczba kopii genu *HER2* jest powyżej 6, wówczas w wyniku należy wpisać „HER2-dodatni”;

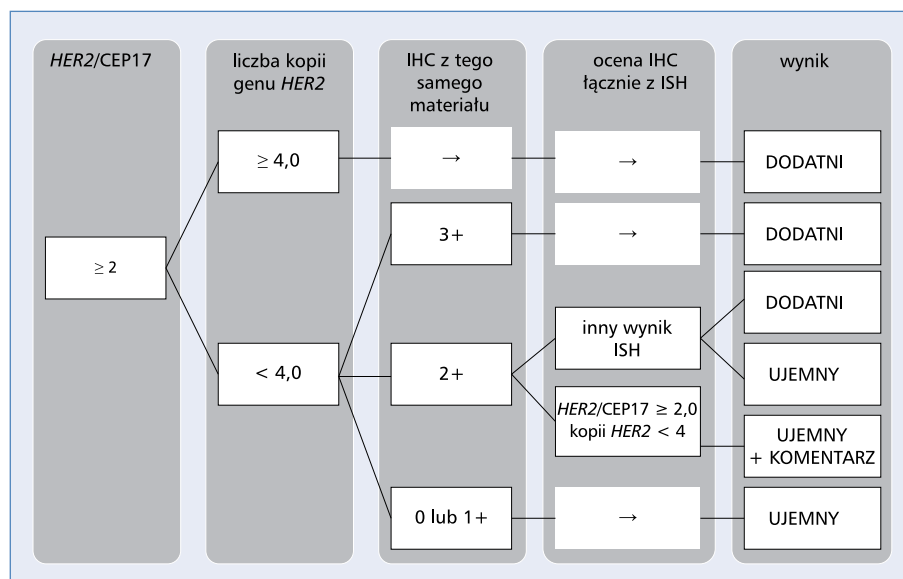
- Bc) jeżeli w ponownie wykonanym badaniu IHC wynik oceny to: HER2 0 lub HER1+, wówczas w wyniku należy wpisać „HER2-ujemny” i opatrzyć go komentarzem;
- C) przypadki, w których w badaniu ISH stwierdzono średnią liczbę kopii genu *HER2* większą lub równą 4, ale mniejszą niż 6 przy jednoczesnym współczynniku HER2/CEP17 poniżej 2, wówczas należy dokonać ponownej oceny (lub jeżeli badania ISH oraz IHC były wykonane z różnych materiałów, należy wykonać badanie IHC z tego samego materiału FFPE, w którym wykonano badanie ISH) i dokonać łącznej oceny preparatów ISH i IHC wykonanych w z tego samego materiału (FFPE/bloczka), najlepiej w tym samym zakładzie. Wynik takiej oceny jest jak następuje:
 - Ca) wynik HER2-dodatni, jeżeli w badaniu IHC uzyskano wynik HER2 3+;
 - Cb) jeżeli po ponownej ocenie badania IHC uzyskano wynik oceny HER2 2+:
 - należy wykonać dodatkową ocenę w badaniu ISH w co najmniej 20 komórkach w obszarach raka inwazyjnego HER2 2+ przez innego, jeżeli jest to możliwe, patologa (**Uwaga!** W badaniu ISH trzeba oceniać te same obszary, w których w badaniu IHC stwierdzono HER2 2+ w raku naciekającym); w wyniku oceny należy ustalić jednoznacznie HER2-dodatni/-ujemny (**Uwaga!** Dotyczy to szczególnie sytuacji, gdy dochodzi do zmiany wartości HER2/CEP17 w stosunku do zliczenia wykonanego przez pierwszego patologa); jest to wynik ostateczny;

- jeżeli w wyniku ponownie wykonanego badania ISH i ocenionego przez innego patologa liczba kopii genu *HER2* jest większa lub równa 4, ale mniejsza niż 6, a współczynnik HER2/CEP17 mniejszy od 2, wówczas w wyniku należy wpisać „HER2-ujemny” i opatrzyć go komentarzem;
- Cc) jeżeli w ponownie wykonanym badaniu IHC wynik oceny to: HER2 0 lub HER2 1+, wówczas w wyniku należy wpisać „HER2-ujemny” i opatrzyć go komentarzem.

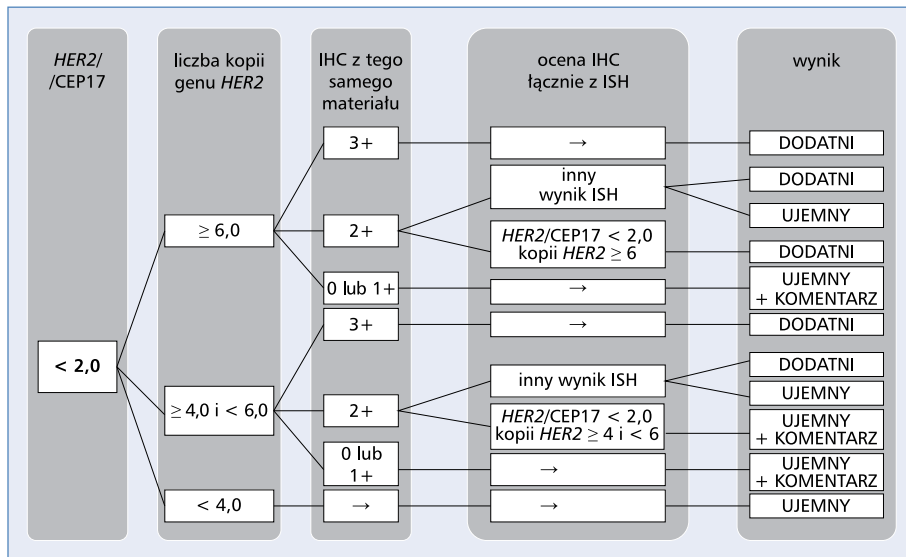
Dla opisanych powyżej sytuacji algorytmy postępowania zostały przedstawione na rycinach 3–5.



Rycina 3. Algorytm oceny liczby kopii genu *HER2* z wykorzystaniem badań metodą hybrydyzacji *in situ* (ISH, *in situ hybridization*) z zestawem sond podwójnych (dla genu *HER2* oraz centromeru chromosomu 17; CEP17). IHC (*immunohistochemistry*) — badanie immunohistochemiczne



Rycina 4. Algorytm postępowania i oceny liczby kopii genu *HER2* dla przypadków, w których współczynnik (*ratio*) HER2/CEP17 jest równy lub większy od 2. IHC (*immunohistochemistry*) — badanie immunohistochemiczne. ISH (*in situ hybridization*) — hybrydyzacja *in situ*

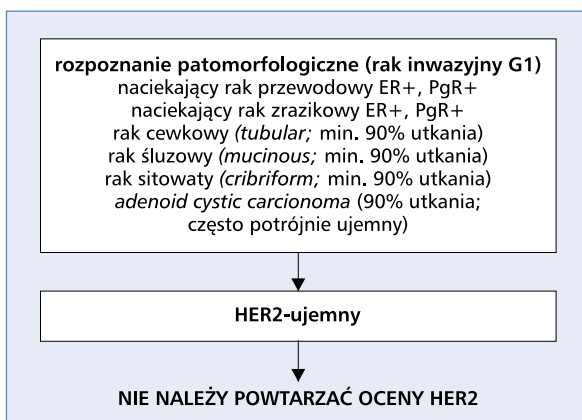


Rycina 5. Algorytm postępowania i oceny liczby kopii genu *HER2* dla przypadków, w których współczynnik (*ratio*) *HER2/CEP17* jest mniejszy od 2. IHC (*immunohistochemistry*) — badanie immunohistochemiczne; ISH (*in situ hybridization*) — badanie metodą hybrydyzacji *in situ*

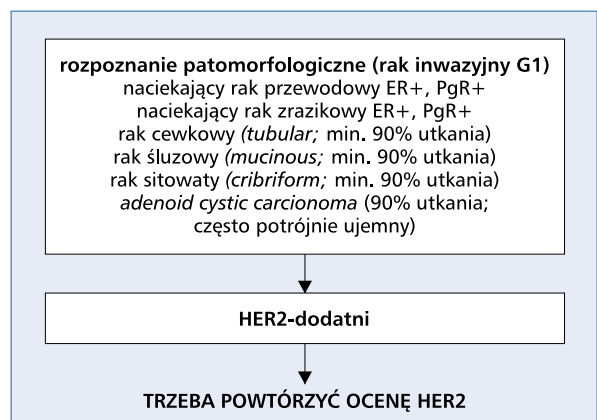
Obecnie obowiązujące zasady decyzji o ponownym wykonaniu badania HER2 z powodu rozbieżności pomiędzy uzyskanym wynikiem oceny HER2 a typem histologicznym raka inwazyjnego piersi

W wybranych przypadkach klinicznych, zwłaszcza w sytuacjach, gdy ocena patomorfologiczna oraz badania

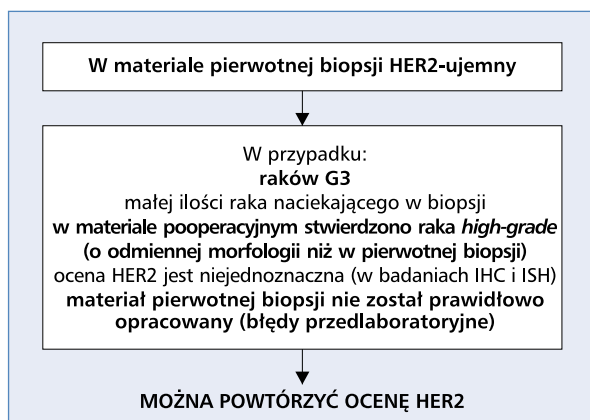
IHC są wykonane w różnych jednostkach, może pojawić się rozbieżność pomiędzy spodziewanym wynikiem wyżej wymienionych badań w wybranych jednostkach klinicznych. Na podstawie badań klinicznych i danych epidemiologicznych wiadomo, że niektóre typy inwazyjnych raków piersi w większości przypadków są HER2-dodatnie lub HER2-ujemne. Jeżeli pojawi się opisana rozbieżność, w tych sytuacjach mają zastosowanie poniższe algorytmy postępowania (ryc. 6–8).



Rycina 6. Jeżeli w badaniach immunohistochemicznych (IHC, *immunohistochemistry*) uzyskano wynik HER2-ujemny, w wymienionych powyżej przypadkach nie należy powtarzać badań w kierunku oceny HER2. ER (*estrogen receptor*) — receptory dla estrogenów; PgR (*progesterone receptor*) — receptory dla progesteronu



Rycina 7. Jeżeli w badaniach immunohistochemicznych (IHC, *immunohistochemistry*) uzyskano wynik HER2-dodatni, w wymienionych powyżej przypadkach trzeba powtórzyć badania w kierunku oceny HER2. ER (*estrogen receptor*) — receptory dla estrogenów; PgR (*progesterone receptor*) — receptory dla progesteronu



Rycina 8. Jeżeli w badaniach immunohistochemicznych (IHC, *immunohistochemistry*) uzyskano wynik HER2-ujemny, w wymienionych powyżej przypadkach można rozważyć wykonanie badań w kierunku oceny HER2 z materiału pooperacyjnego. ISH (*in situ hybridization*) — hybrydyzacja *in situ*

Piśmiennictwo

1. www.pathologyoutlines.com (26.09.2018).
2. Wolff AC, Hammond MEH, Allison KH, 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. *JCO*. 2018; 36: 1–20.
3. Olszewski W, Chmielik E, Kordek R. *Pol J Pathol*. 2015; 66(4; Suppl 1): 30–35.
4. Yildiz-Aktas IZ, Dabbs DJ, Cooper KL, et al. The effect of 96-hour formalin fixation on the immunohistochemical evaluation of estrogen receptor, progesterone receptor, and HER2 expression in invasive breast carcinoma. *Am J Clin Pathol*. 2012; 137(5): 691–698, doi: [10.1309/AJCPQRAG67GJRPMT](https://doi.org/10.1309/AJCPQRAG67GJRPMT), indexed in Pubmed: [22523206](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22523206/).
5. Hanna W, Barnes P, Berendt R, et al. Testing for HER2 in breast cancer: current pathology challenges faced in Canada. *Curr Oncol*. 2012; 19(6): 315–323, doi: [10.3747/co.19.1173](https://doi.org/10.3747/co.19.1173), indexed in Pubmed: [23300357](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23300357/).