Поддерживающая диагностика статуса экспрессии HER2 при раке молочной железы

Демидова ИА
ГБуЗ «ДЗМ МГОБ №62 ДЗМ»

В чем особенность HER2 тестирования?

- HER2 тестирование больше напоминает срочное исследование, чем обычное гистологическое:

  -исследование одного стекла должно дать точный и крайне важный для клинициста и пациента ответ
- Основная цель рекомендаций ASCO/CAP по HER2 тестированию - обеспечить максимальную точность и воспроизводимость результата
- **Появление рекомендаций ASCO/CAP-2013 связано с публикацией новых данных, касающихся существующей практики тестирования (ASCO/CAP-2007) и необходимостью ее усовершенствования**

© 2013 College of American Pathologists. All rights reserved.

ASCO/CAP 2013
Что изменилось?

Новое в ASCO/CAP 2013

- Должны исследоваться все новые очаги опухоли (включая метастазы)
- Новые особенности проводки материала
- Новые алгоритмы тестирования и интерпретации результата
- Условия проведения повторного тестирования

Wolff AC et al. *J Clin Oncol*. 2013; Oct 7.

2013 HER2 Testing Guidelines Update:
Summary of Changes to the Testing Algorithm

HER2 Result	IHC	ISH
Positive	•**> 10%** of invasive tumor cells display strong circumferential membrane staining	Amplified ratio of **HER2/CEP17 of ≥ 2.0** or **average HER2 signals ≥6** signals/cell (regardless of ratio) in population of >10% of tumor cells
Negative	•IHC 0: No staining observed or membrane staining that is incomplete, faint/barely perceptible and within ≤10% of the invasive tumor cells •IHC 1+: Incomplete membrane staining that is faint/barely perceptible and within >10% of the invasive tumor cells	**HER2/CEP17 ratio < 2** and HER2 signals/cell < 4, regardless of ratio
Equivocal	•2+ based on circumferential membrane staining, incomplete, weak, or moderate within >10% of the invasive tumor cells; *or* **complete & circumferential membrane intense staining within ≤10% of the invasive tumor cells**	•Dual Probe ***HER2*/CEP17 ratio <2.0 with an average *HER2* copy number ≥4.0 and <6.0 signals/cell**
Indeterminate	• Technical issues prevent assay from being conclusive (e.g., issues with controls, specimen handling, artifacts, or analytical failure) • Assay must be repeated before diagnosis can be rendered	

Рекомендации ASCO/CAP 2013

(тестирование методом гибридизации in situ –ISH)

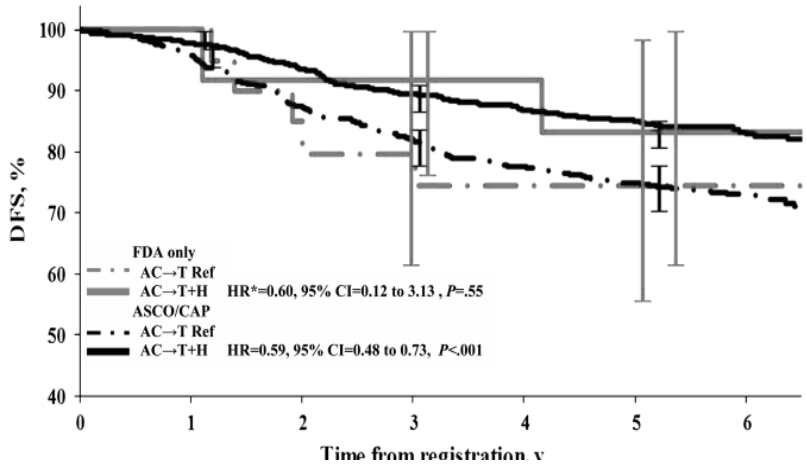
- Новые значения клинически значимой внутриопухолевой гетерогенности
- Новые подходы ее исследования
- Новые принципы в оценке случаев с полисомией 17 хромосомы
- Новые особенности оценки числа копий гена HER2

Внутриопухолевая гетерогенность

- Внутриопухолевая гетерогенность определяется как наличие субклонов опухолевых клеток с различной копийностью гена HER2 внутри одного опухолевого очага или между первичной опухолью и метастазами
- Клетки с увеличением копийности гена HER2 могут располагаться диффузно, в виде кластеров и определяться в различных соотношениях в первичной опухоли и метастазах
- ASCO/CAP 2013 рекомендует использовать пороговый уровень > 10% при подсчете клона с амплификацией гена HER2. Такие случаи должны быть расценены как HER2-позитивные
- Как отдельный клон должны рассматриваться в первую очередь клетки, организованные в виде кластеров.
- Копийность гена HER2 в каждом клоне должна подсчитываться отдельно

Tarah J. Ballinger et al , Clinical Br Cancer 2014

Почему был выбран пороговый уровень 10%?



Вероятность DFS для пациентов с >10% HER2 позитивных клеток (критерии FDA; серая линия) не отличалась от таковой для ббольных с ≥ 30% HER2 позитивных клеток (HR = 0.60, 95% CI = 0.12 to 3.13) (ASCO/CAP 2007; черная линия)(NSABP B-31 and NCCTG N9831)

Perez et al, JNCI 2012;104:159–162

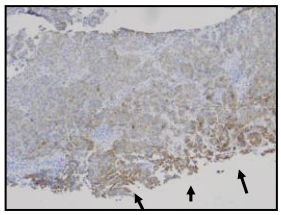
2013 HER2 Testing Guidelines Update: *What Remains the Same From 2007*

	Recommendations[1,2]
No Change From 2007[1]	• Optimal tissue specimen handling procedures • Tissue acquisition (ie, minimize cold ischemic time): <1 hour • Fixative: 10% neutral buffered formalin (NBF) • **Minimum** duration of fixation: 6 hours • Must document fixation time points in accession or report
	• Laboratory quality assurance processes, including proficiency testing and lab accreditation

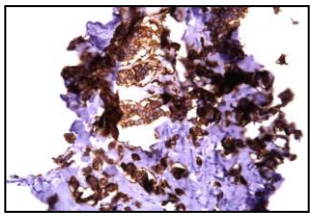
1. Wolff AC et al. *J Clin Oncol.* 2007;25:118-145; 2. Wolff AC et al. *J Clin Oncol.* 2013; Oct 7. [Epub ahead of print]

2013 HER2 Testing in BC Guidelines Update: *Tumor Specimen Selection*

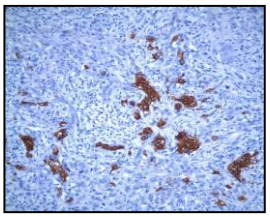
- Core samples may not be optimal in some situations
  - Crushing and surface artifacts in cores may hamper interpretation
  - Tumor on resection may show morphologic heterogeneity
  - Tumor on resection may show intratumoral heterogeneity
  - Tissue is not fixed for adequate length of time



Edge Artifact



Crush

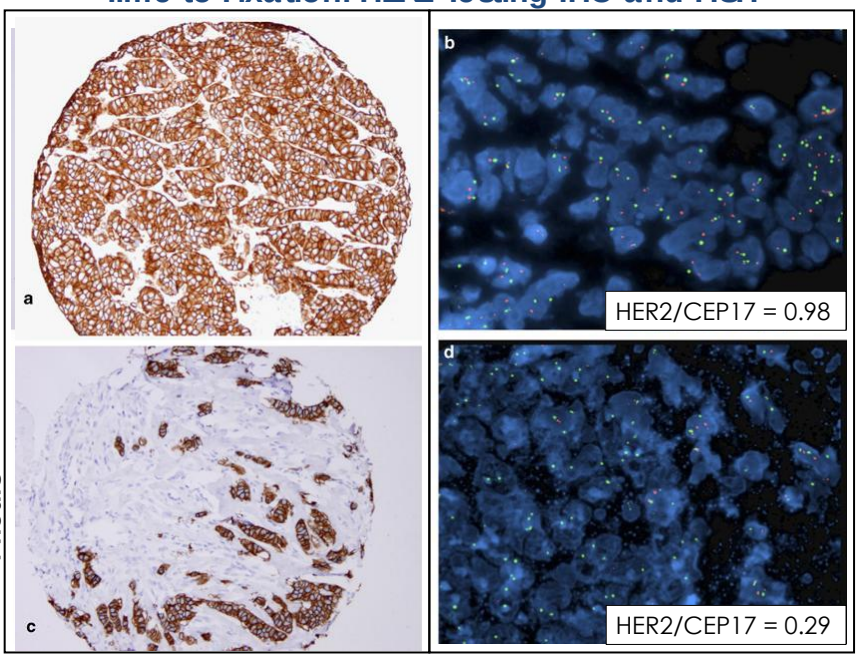


Intratumoral heterogeneity

If core results are questionable, test the excision specimen

12

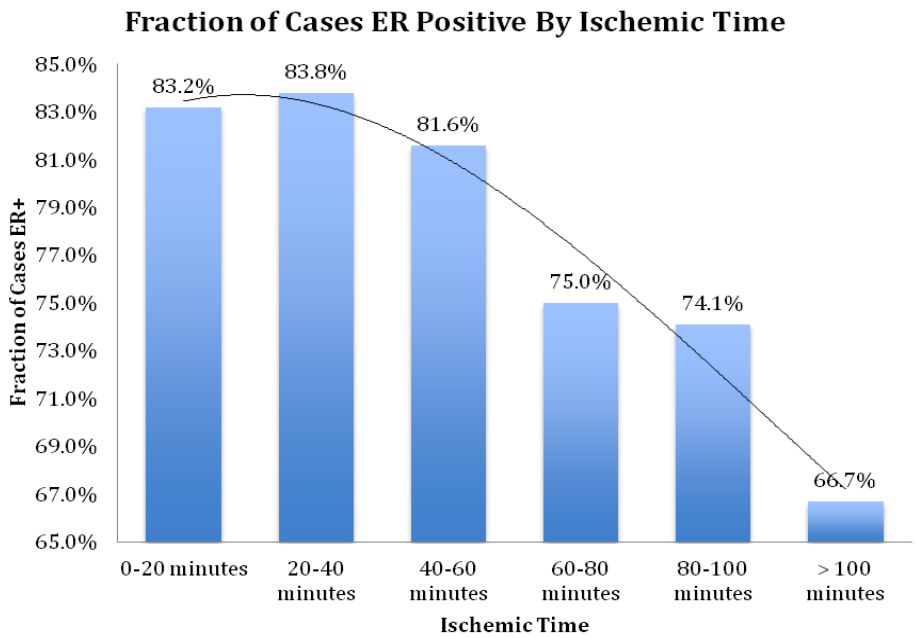
Time to Fixation: HER2 Testing IHC and FISH



a, 30 min IHC; **b**, 30 min FISH; **c**, 4 h immunohistochemistry; **d**, 4 h FISH

Khoury T, et al., Mod Pathol. 2009 Nov;22(11):1457-67

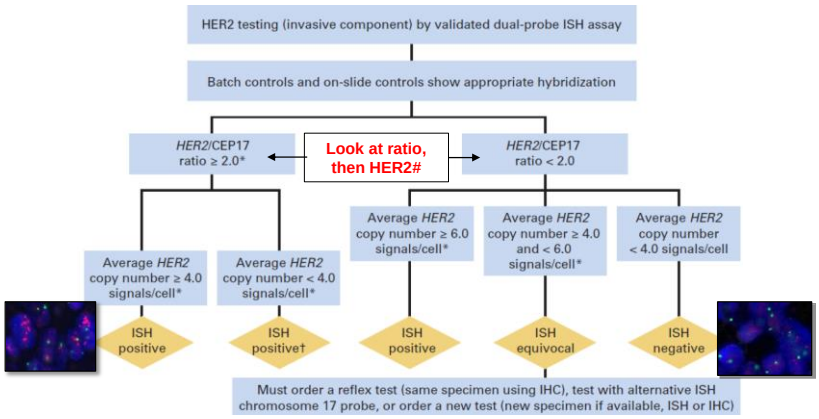
15



736 breast cancer specimens, the mean TTF was 53.8 min (SD=37.8min). 453 (61.5%) cases had an TTF less than 1 hour and 283 (38.5%) had TTF greater than an hour

2013 HER2 Testing in BC Guidelines Update:

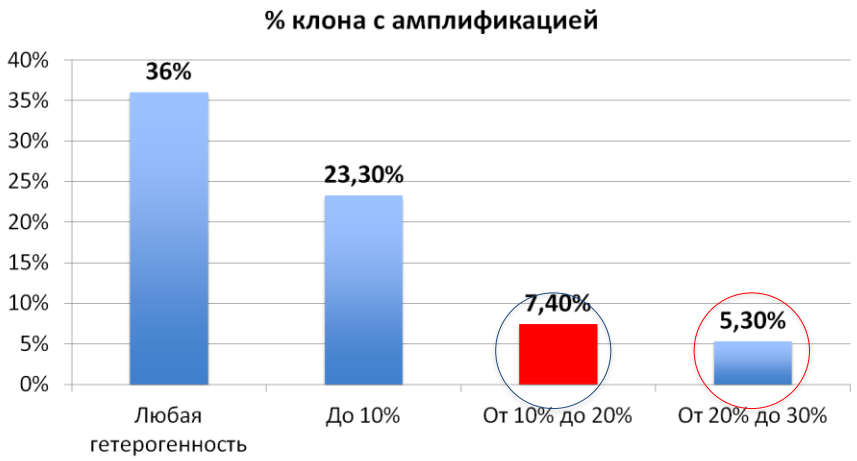
HER2 Testing of the Invasive Component by Dual Probe ISH



If the pathologist or oncologist observes an apparent histopathologic discordance after HER2 testing, the need for additional HER2 testing should be discussed.

Wolff AC et al. *J Clin Oncol*. 2013; Oct 7. [Epub ahead of print]

Внутриопухолевая гетерогенность



Как оценивать низкопроцентную гетерогенность?

- Группа с количеством позитивных клеток > 20<30% - безусловно переходит в категорию позитивных случаев
- Группа с количеством позитивных клеток > 10<20% - требует тестирования дополнительного образца
- По нашему опыту -удалось провести у 57% пациентов – 24 из 42 больных
- Из них- 11 пациентов были расценены как позитивные

Методы исследования HER2-позитивности, их преимущества и недостатки

- IHC - тест недихотомический – есть серая зона. Однако квалифицирует большую часть образцов
- Различные методы используются для диагностики сомнительного по Her2neu позитивности РМЖ

Преимущества и недостатки различных методов

Метод	Преимущества	Недостатки
ИГХ	Непосредственное определение мишени для таргетной терапии. Относительная дешевизна	Сложности в интерпретации, особенно на некачественном материале
ПЦР	Быстрый, дешевый количественный метод	Основан на исследовании РНК, особенно чувствительной к правильной обработке материала, чувствителен к примеси нормальных клеток
FISH	Метод, позволяющий полностью охарактеризовать сомнительные и гетерогенные опухоли	Чувствителен к качеству материала, длительное хранение невозможно
CISH/SISH	Позволяет работать со стандартным световым микроскопом, образцы устойчивы к длительному хранению	Не все сложные случаи могут быть правильно интерпретированы

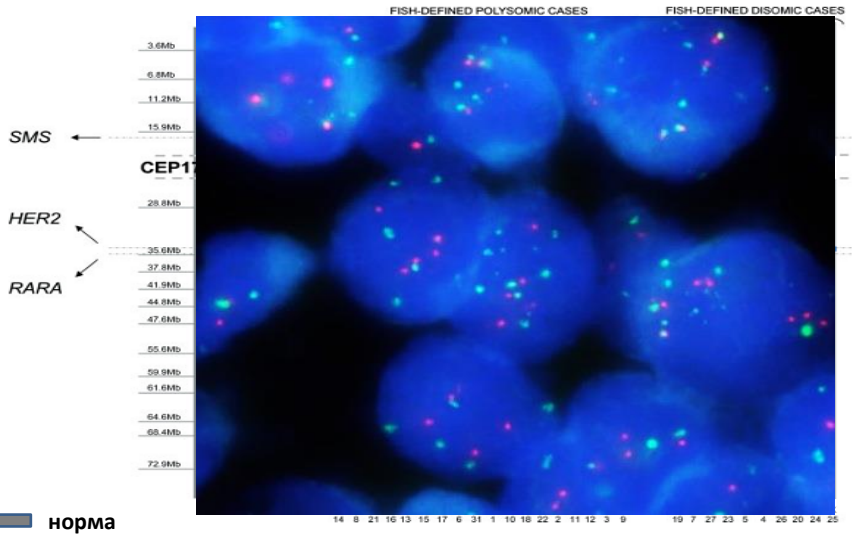
Furrer et al, *m J Clin Pathol* 2015;144:686-703

Полисомия 17 хромосомы

- Истинная полисомия определяется как наличие в клетки дополнительной полной копии хромосомы
- В рекомендациях ASCO/CAP 2007 3 и более копий центромерного региона 17 считались признаком полисомии (частота при РМЖ -3 -46%)
- Однако последние исследования показывают, что истинная полисомия 17 хромосомы – крайне редкое событие при РМЖ, и увеличение копийности центромерного региона говорит скорее об амплификации крупного участка хромосомы, включающего как центромеру, так и генCEP17 HER2

Hanna et al, Modern Pathology (2014) 27, 4–18; Perez et al, J Clin Oncol(2010) 28:4307-4315

Исследования «полисомии» методами FISH и сравнительной геномной гибридизации (CGH)



норма
увеличение копийности
амплификация

Marchio C, J Pathol 2009

ASCO/CAP 2013 – оценка копийности гена HER2

- Все случаи с ≥ 6 копий *HER2* в клетке должны счbтаться позитивными вне зависимости от соотношения *HER2/CEP17*
- Все случаи с соотношением *HER2/CEP17* ≥2 должны считаться позитивными вне зависимости от копийности *HER2*
- Все случаи с ≥4 *HER2* <6 должны исследоваться с для определения копийности других генов 17 хромосомы (*SMS* (17p11.2), *RARA* (17q21.2), *TOP2* (17q21.3-22), and *p53* (17p13.1), для лучшего понимания размера амплифицированного участка исключения коамплификации.

Wolff et al, JCO (2013), 31 (Vol31) 3997-4014

Собственный опыт МГОБ 62

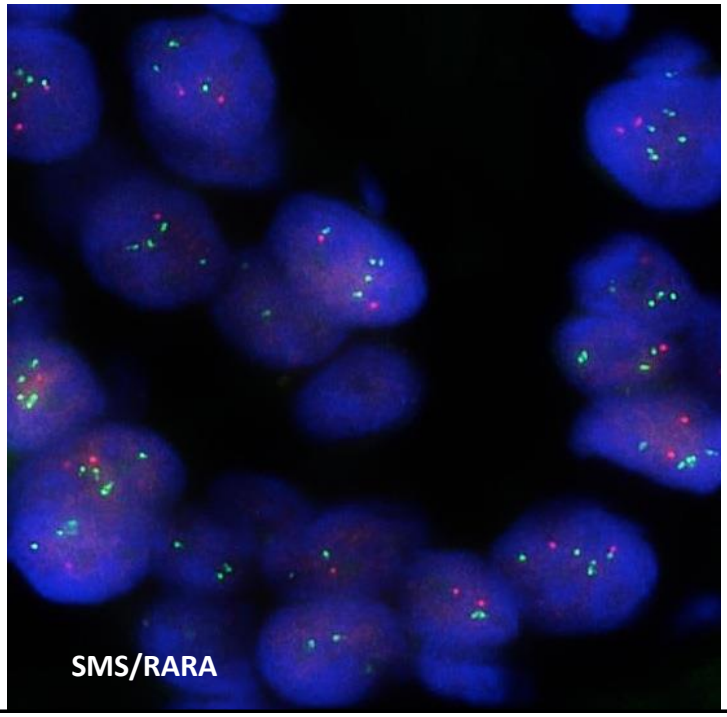
- Всего за 2017 год в лабораторию поступило 572 образца для проведения FISH
- Все случаи были первоначально протестированы методом ИГХ, установлен промежуточный уровень экспрессии протеина (2+), в 80% случаев – по критериям ASCO/CAP 2013
- Позитивный результат FISH (по критерию HER2/CEP17≥2 и гетерогенность≥30%) был определен в 25% образцов
- Важно: 86% образцов были получены в результате проведения трепанобиопсии

Самые проблемные случаи: с копийностью ≥4HER2<6

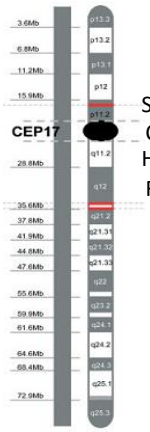
- В подобных случаях ASCO/CAP рекомендует дополнительное исследование других генов короткого и длинного плеча 17 хромосомы методом FISH
- Минимальный объем исследования – ген *RARA* на длинном плече и ген *SMS* - на коротком
- Всего было исследовано 30 образцов (5,2% от общей популяции)
- Отсутствие полисомии подтверждено в 53% случаев (2,8% от общей популяции)

Клинический случай

- Пациентка 64 лет, рак правой молочной T2N0M0, выполнена биопсия опухоли
- Морфологически - Инвазивный неспецифицированный рак молочной железы, 2 степени злокачественности
- ИГХ - ER+, PR+, Ki67 30%, Her2 2+
- Образец направлен на FISH
- В клетках опухоли выявлено среднее количество копий HER2neu – 4,3; CEP17- 3,15
- Проведено дополнительное исследование



Оценка полученных данных



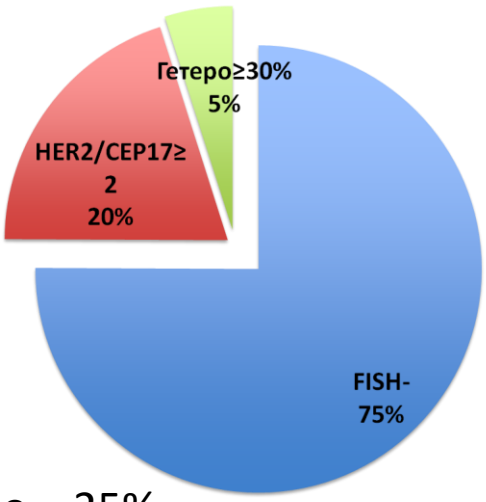
SMS 17p11.2
CEP 17
HER2 17q11.2-q12
RARA 17q12.2-q21

Копийность не изменена

Увеличение копийности

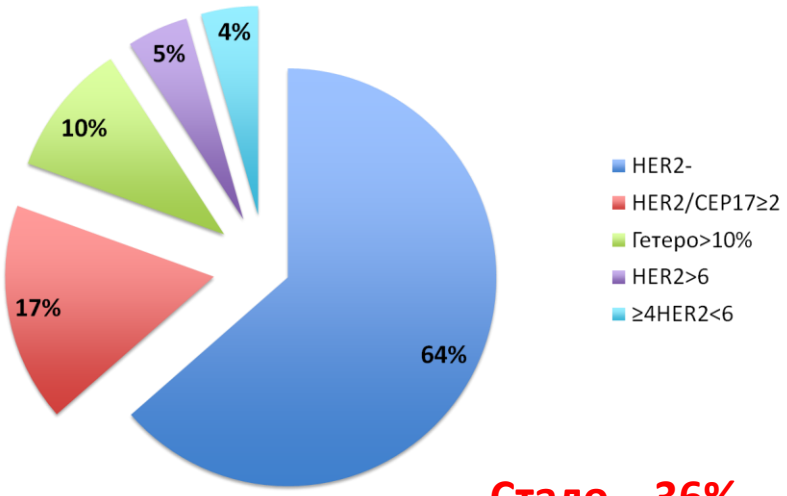
Полисомия, скорее всего, отсутствует, выявляется сочетанное увеличение копийности генов на q –плече и центромерного региона, что может быть расценено как амплификация гена HER2 низкой степени

Как результаты работы изменили количество HER2-позитивных пациентов?



Было – 25%

Как результаты работы изменили количество HER2-позитивных пациентов?



Стало – 36%