

AKTUALNE REKOMENDACJE ASCO/CAP 2013 DOTYCZĄCE BADAŃ STATUSU RECEPTORA HER2 W RAKU PIERSI

MIROSLAW ŚNIETURA, DARIUSZ LANGE

Zakład Patologii Nowotworów, Centrum Onkologii – Instytut im M. Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach

1. Wstęp

Określenie statusu genu *HER2* u chorych na raka piersi jest obecnie istotnym i obowiązkowym elementem prawidłowo sformułowanego raportu histopatologicznego z co najmniej dwóch powodów. Po pierwsze umożliwia wskazanie typu molekularnego nowotworu, a co za tym idzie – stanowi czynnik prognostyczny. Po drugie jest czynnikiem predykcyjnym w odniesieniu do terapii celowanych skierowanych przeciwko białku receptora, zarówno z grupy przeciwciał (trastuzumab, pertuzumab), jak i inhibitorów drobnocząsteczkowych jego aktywności kinazowej (lapatinib).

Pierwotne zalecenia dotyczące oceny statusu genu *HER2* u chorych na raka piersi zdefiniowano w trakcie badań klinicznych związanych z rejestracją trastuzumabu przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (*Food and Drug Administration – FDA*).

Dopuszczone zostały wówczas do stosowania dwie metody diagnostyczne: badanie immunohistochemiczne (*immunohistochemistry – IHC*) oraz fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (*fluorescent in situ hybridization – FISH*) z wykorzystaniem pojedynczych lub podwójnych (z kontrolą centromerową) sond hybrydyzacyjnych. Kryteria kwalifikacji chorych do leczenia trastuzumabem w oparciu o wyniki hybrydyzacji *in situ* (*in situ hybridization – ISH*) obejmowały sytuacje określane mianem amplifikacji genu *HER2* i zdefiniowane zostały jako:

- stosunek liczby sygnałów hybrydyzacji z sondą *HER2* do liczby kopii sygnałów hybrydyzacji z sondą dla centromeru chromosomu 17: $HER2/CEP17 \geq 2,0$ lub
- liczba sygnałów hybrydyzacji z sondą *HER2* $\geq 6,0$ (dla sond bez kontroli centromerowej).

Kryterium immunohistochemicznym kwalifikacji do leczenia był silny dodatni odczyn w co najmniej 10% komórek nacieku nowotworowego (3+) lub odczyn oceniany jako 2+ z potwierdzeniem amplifikacji genu *HER2* metodą FISH.

W 2007 r. powołano panel ekspercki Amerykańskiego Towarzystwa Onkologii Klinicznej (*American*

Society of Clinical Oncology – ASCO) oraz Amerykańskiego Towarzystwa Patologów (*College of American Pathologists – CAP*), którego celem było przeanalizowanie aktualnych danych uzyskanych z zakończonych i trwających nowych badań klinicznych oraz opracowanie na ich podstawie wytycznych dotyczących wskazań oraz metodologii oceny statusu genu *HER2*. W rekomendacjach ASCO/CAP [1] eksperci zawarli szereg zaleceń dotyczących procesów preanalizacyjnych związanych z prawidłowym pozyskaniem i przygotowaniem materiału tkankowego do badań oraz oceny jego przydatności pod względem technicznym (definicja materiału niediagnostycznego). Zmieniono także zakresy wyników pozytywnych ($HER2/CEP17 > 2,2$ lub $HER2 > 6,0$) oraz negatywnych ($HER2/CEP17 < 1,8$ lub $HER2 < 4,0$), wprowadzając jednocześnie pojęcie wyniku niejednoznacznego, którego celem było wymuszenie ponownego oznaczenia statusu genu *HER2* inną metodą lub z innego materiału. Istotną częścią pierwotnej wersji rekomendacji, która praktycznie nie zmieniła się w najnowszych zaleceniach, był rozbudowany system wewnętrznej i zewnętrznej kontroli jakości oraz akredytacji laboratoriów wykonujących te badania.

Po 6 latach od publikacji pierwszej edycji zaleceń, w listopadzie 2013 r., na podstawie najnowszych danych literaturowych (155 pozycji piśmiennictwa z lat 2006–2013) oraz wyników ponownej retrospektywnej analizy badań z randomizacją pierwszej generacji, rekomendacje ASCO/CAP zostały zmodyfikowane i wydane w postaci uaktualnienia uzupełnionego o szereg suplementów [2, 3]. Najważniejsze zmiany dotyczą:

- kryteriów kwalifikacji do badań,
- dopuszczonych metod analitycznych i preanalizacyjnych,
- niewielkich zmian kryteriów rozpoznania w badaniach immunohistochemicznych,
- istotnych modyfikacji kryteriów rozpoznania w badaniach ISH, zwłaszcza w zakresie interpretacji i postępowania w przypadku wyników niejednoznacznych,

- postępowania w przypadkach trudnych („polisomia” chromosomu 17, niejednorodność materiału tkankowego),
- obowiązkowych elementów dokumentacji medycznej.

W dalszej części opracowania zostaną przedstawione i szczegółowo omówione te elementy rekomendacji, które zmieniły się w ostatniej jej edycji. W związku z tym dla pełni obrazu, zwłaszcza w zakresie tematyki kontroli jakości, czytelnik powinien się zapoznać z treścią poprzedniego wydania rekomendacji, dostępną także w języku polskim [1].

2. Kwalifikacja do badania

Zgodnie z aktualną treścią rekomendacji w każdym nowo zdiagnozowanym przypadku raka piersi istnieje obowiązek oznaczenia statusu receptora *HER2*. Ponadto istnieje wskazanie do ponownego oznaczenia tego statusu w razie istotnej zmiany biologii i/lub zaawansowania klinicznego choroby, ze szczególnym uwzględnieniem pojawienia się przerzutów odległych. W takim przypadku oznaczenie powinno być wykonane ponownie z materiału pochodzącego z przerzutu, jeśli jest dostępny lub istnieje możliwość jego pobrania.

3. Dopuszczone techniki badań

Dotychczas dopuszczonymi do rutynowego stosowania przy oznaczaniu statusu receptora *HER2* metodami diagnostycznymi były testy immunohistochemiczne oraz FISH mające stosowne certyfikaty umożliwiające ich zastosowanie w diagnostyce medycznej [FDA i/lub CE (*Conformité Européenne*)]. Testy oparte o FISH są dostępne w dwóch odmianach:

- z sondami podwójnymi (z kontrolą centromerową) dającymi sygnał fluorescencyjny dla genu *HER2* oraz centromeru chromosomu 17, w przypadku których wynik podawany jest w postaci ilorazu liczby sygnałów *HER2* i liczby sygnałów centromerowych,
- z sondą pojedynczą (bez kontroli centromerowej, w Polsce właściwie niewykonywane), znakującą wyłącznie *locus* genu *HER2*, dla których podawana jest bezwzględna liczba sygnałów *HER2* w jądrze komórki nowotworowej.

Najnowsza edycja rekomendacji ASCO/CAP dopuszcza ponadto do użytku certyfikowane testy w technice ISH zarówno z sondą pojedynczą, jak i podwójną, oceniane w świetle przechodzącym z użyciem tradycyjnego mikroskopu (CISH, SISH i techniki łączone). U podstaw pozytywnej rekomendacji dla technik ISH jasnego pola leży trzy przesłanki:

- metoda opiera się na tym samym ocenianym parametrze, jakim jest liczba kopii genu *HER2* (amplifikacja genu),

- obserwuje się wysoką zgodność wyników badania technikami ISH jasnego pola i FISH,
- występuje wysoka międzylaboratoryjna powtarzalność wyników.

Jednocześnie autorzy zaleceń podkreślają konieczność zwrócenia szczególnej uwagi na morfologię ocenianych sygnałów hybrydyzacji ze względu na większe ryzyko wystąpienia artefaktów w wypadku technik ISH jasnego pola. Charakter sygnałów w utkanu nowotworowym zawsze należy oceniać w odniesieniu do utkania prawidłowego i powinien on być do niego zbliżony. W przypadkach, które nie mogą być łatwo zaklasyfikowane jako negatywne lub pozytywne, należy zasięgnąć opinii eksperta lub posłużyć się techniką alternatywną.

4. Materiał do badania i elementy procesu preanalitycznego – materiał niediagnostyczny

4.1. Czas zimnego niedokrwienia

W związku z decydującym znaczeniem biomarkerów w wyborze najbardziej odpowiednich dla danego pacjenta opcji terapeutycznych istnieje potrzeba standaryzacji procesów preanalitycznych, zwłaszcza związanych z przygotowaniem i utrwalaniem tkanki, oraz dokumentowania wpływu tych czynników na uzyskane wyniki. Najnowsze badania wskazują, że duże znaczenie we właściwej ocenie statusu receptora *HER2* ma czas od momentu wycięcia tkanki do jej kontaktu z utrwalaczem. Zgodnie z rekomendacjami ASCO/CAP czas ten (*cold ischemic time*) nie powinien być dłuższy niż 120 minut. Przekroczenie go wiąże się z osłabieniem nasilenia odczynu immunohistochemicznego i/lub siły sygnałów hybrydyzacji. W związku z tym istotne wydaje się nie tylko szybkie umieszczenie tkanki w utrwalaczu, lecz także zapewnienie jego sprawnej penetracji do guza nowotworowego, co można osiągnąć w prosty sposób poprzez niezwłoczne nacięcie materiału.

4.2. Rodzaj i czas utrwalania

Kolejnymi kluczowymi elementami prawidłowego przygotowania tkanki do badań statusu *HER2* oraz innych markerów są rodzaj i czas utrwalania. Na podstawie danych literaturowych przywoływanych przez autorów rekomendacji jedynym dopuszczalnym utrwalaczem jest 10-procentowy buforowany roztwór formaliny (równoważny 4-procentowemu roztworowi formaldehydu). Czas utrwalania wg najnowszych zaleceń został ujednolicony dla obu technik: IHC oraz ISH, i powinien się bezwzględnie zawierać w przedziale 6–72 godzin. Każde odstępstwo od tej zasady powinno zostać ujęte w dokumentacji badania.

4.3. Rodzaj materiału tkankowego

Przedmiotem analiz prowadzonych w trakcie przygotowywania zaleceń stała się ocena przydatności materiału pochodzącego z biopsji gruboigłowych do oceny statusu receptora *HER2*. Autorzy zwrócili uwagę na dwie kwestie: problem reprezentatywności niewielkiego wycinka w stosunku do masy guza nowotworowego oraz szczegółów technicznych związanych z utrwalaniem bioptatów. Podkreślono dużą (98,8%) zgodność wyników uzyskanych z materiału biopsyjnego i odpowiadającego mu materiału pooperacyjnego pod warunkiem zachowania zalecanego powyżej reżimu dotyczącego metod i czasów utrwalania. W wybranych przypadkach wyników ujemnych lub niejednoznacznych uzyskanych z materiału biopsyjnego rekomendowane jest powtórne oznaczenie statusu *HER2* w materiale pooperacyjnym. Podobnie powtórne oznaczenie powinno zostać wykonane bez względu na rodzaj materiału tkankowego w przypadku niezgodności ze względu na cechy histologiczne. Sytuacje te wyszczególniono w tabeli I.

5. Metodologia oceny statusu receptora *HER2*

Kolejne etapy postępowania oraz interpretacja wyników badań immunohistochemicznych ekspresji receptora *HER2* i badania metodą ISH zgodne z zaleceniami ASCO/CAP zebrano poniżej. Szczegóły dotyczące kryteriów poszczególnych rozpoznań oraz algo-

rytmu oceny odczynów IHC i sygnałów ISH dla sond pojedynczych i podwójnych zestawiono odpowiednio w tabeli II oraz na rycinach 1.–3.

5.1. Algorytm diagnostyczny dla oznaczeń immunohistochemicznych

5.1.1. Ocena techniczna reakcji

Wstępnym etapem oceny ekspresji receptora *HER2* jest wykluczenie technicznych problemów w procesie barwienia poprzez analizę kontroli wewnętrznych (prawidłowe przewody i zraziki) oraz preparatów kontrolnych (kontrola dla serii). Barwienie należy powtórzyć w każdym przypadku stwierdzenia nieprawidłowości, w szczególności zaś wystąpienia barwienia cytoplazmatycznego przysłaniającego odczyn błonowy oraz ewidentnego barwienia cytoplazmy i/ lub silnego odczynu błonowego w prawidłowych przewodach i zrazikach (z wyłączeniem metaplastji apokrynowej).

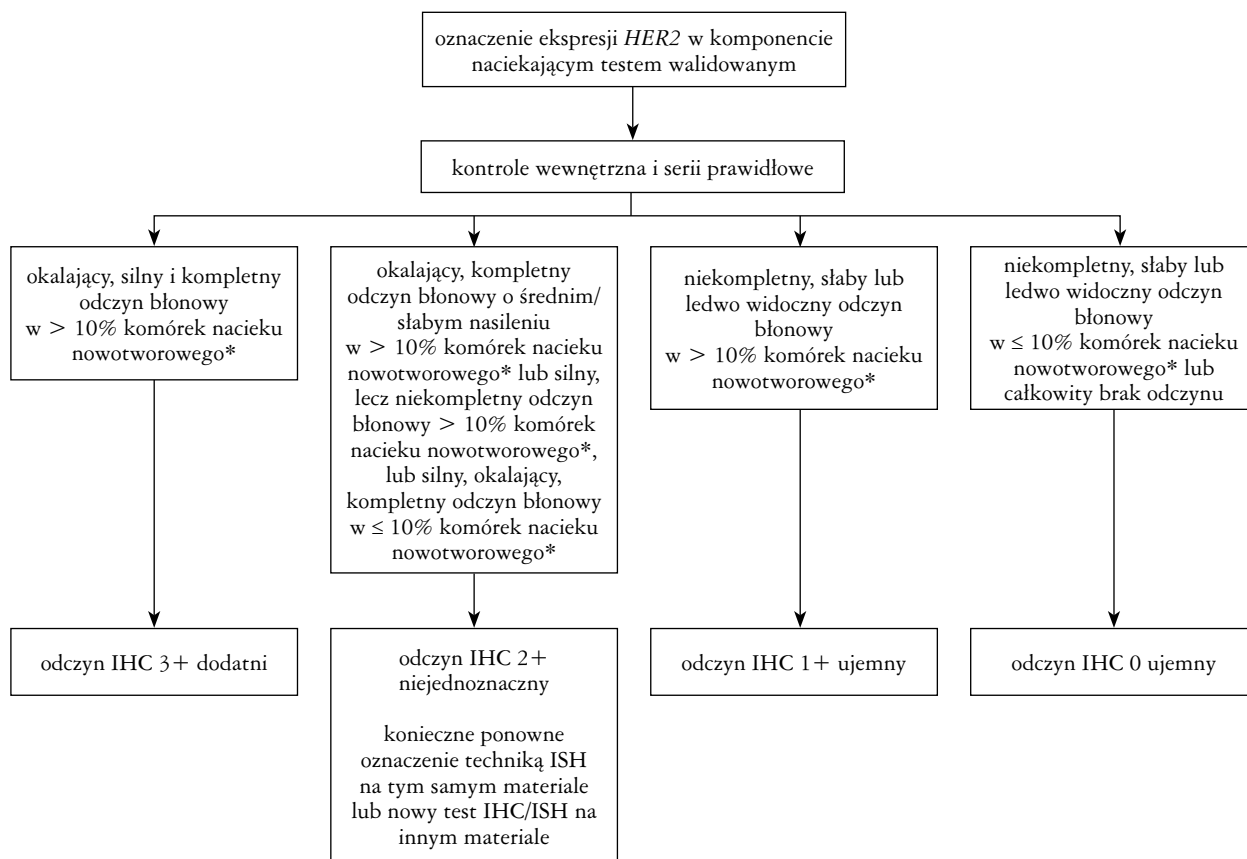
5.1.2. Identyfikacja rejonów zainteresowania i nasilenia odczynu

Intensywność odczynu IHC powinna być oceniona przez patologa w obszarach raka naciekającego o jednorodnej reakcji. Nie należy oceniać ekspresji *HER2* w komponente *in situ* (*ductal carcinoma in situ* – DCIS). Za dodatnie uważa się intensywne, okalające, kompletne i homogenne barwienie błonowe w co najmniej 10% komórek nacieku,

Tabela I. Definicje i postępowanie w przypadku niezgodności wyników *HER2*

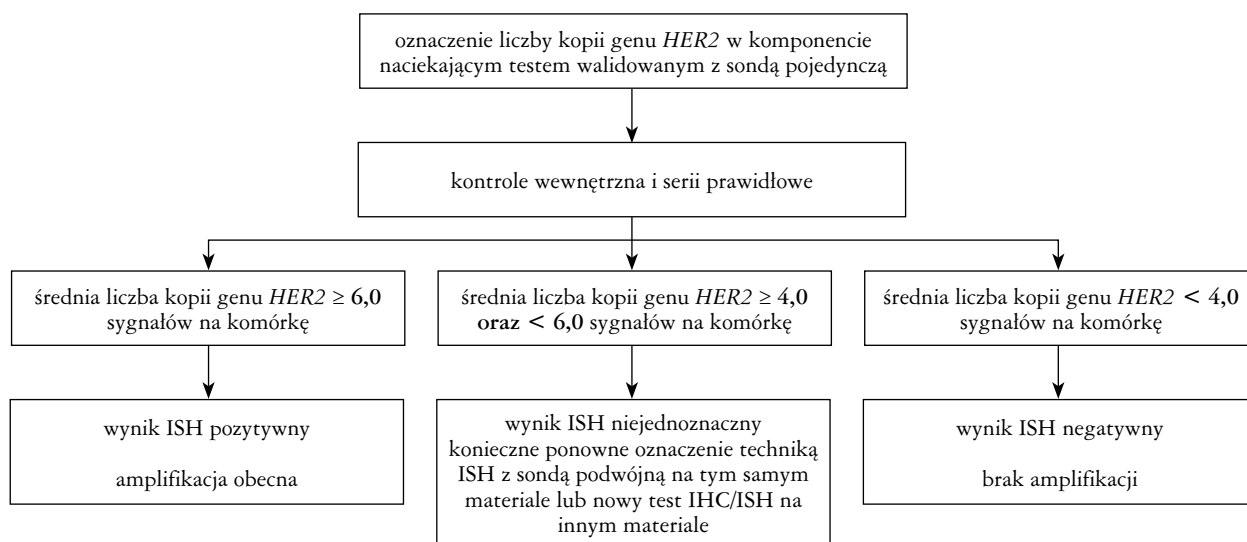
NIEZGODNOŚĆ POD WZGLĘDEM CECH HISTOLOGICZNYCH
Należy wykonać ponowne oznaczenie statusu receptora <i>HER2</i> , jeśli wynik pierwszego badania IHC lub ISH jest pozytywny i jednocześnie współistnieją wymienione poniżej cechy histologiczne:
rak o stopniu złośliwości G1
– przewodowy lub zrazikowy, naciekający, ER-/PR-dodatni
– typ cewkowy – co najmniej 90% utkania
– typ śluzowy – co najmniej 90% utkania
– typ sitowaty – co najmniej 90% utkania
– typ gruczołowo-torbielowaty – co najmniej 90% utkania (zwykle potrójnie negatywny)
NIEZGODNOŚĆ POD WZGLĘDEM RODZAJU BADANEGO MATERIAŁU
W przypadku materiału pozyskanego na drodze biopsji gruboigłowej należy wykonać ponowne oznaczenie statusu receptora <i>HER2</i> w materiale pooperacyjnym, jeśli wynik pierwszego badania IHC lub ISH jest ujemny oraz współistnieją następujące sytuacje:
– stopień złośliwości histologicznej G3
– ilość naciekającego utkania nowotworu w bioptacie jest niewielka
– materiał pooperacyjny zawiera składnik o wysokim stopniu złośliwości o morfologii innej niż obserwowana w bioptacie
– otrzymano dwukrotnie wynik niejednoznaczny jednocześnie w badaniu IHC i ISH
– istnieją wątpliwości dotyczące etapów preanalitycznych (czas utrwalania, rodzaj utrwalacza) lub patolog podejrzewa, że wynik ujemny uzyskano z przyczyn technicznych

IHC (immunohistochemistry) – badanie immunohistochemiczne, ISH (*in situ* hybridization) – hybrydyzacja *in situ*

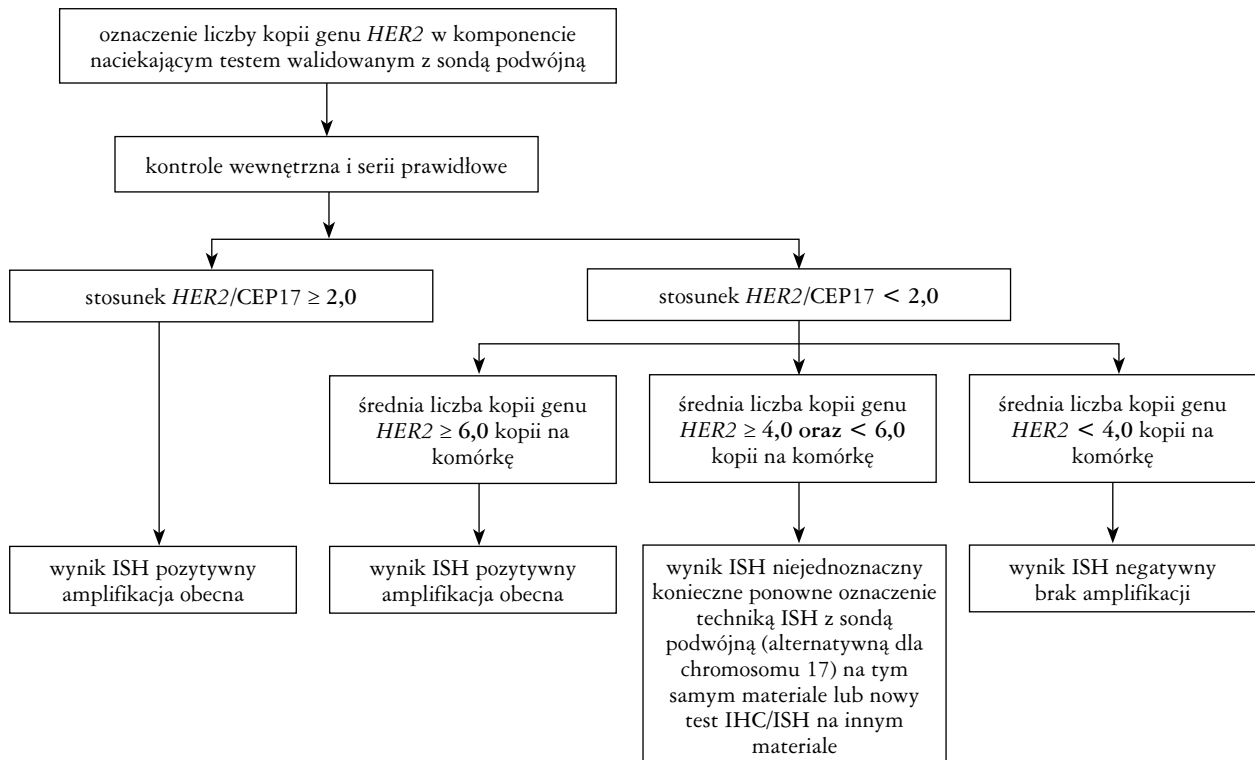


Rycina 1. Kryteria oceny ekspresji receptora HER2 w badaniu immunohistochemicznym

*Cechy wyraźnie dostrzegalne przy małym powiększeniu mikroskopu



Rycina 2. Kryteria oceny sygnałów i odpowiadające im kategorie wyników w badaniu metodą hybrydyzacji *in situ* z wykorzystaniem sondy pojedynczej



Rycina 3. Kryteria oceny sygnałów i odpowiadające im kategorie wyników w badaniu metodą hybrydyzacji *in situ* z wykorzystaniem sondy z kontrolą centromerową (podwójnej)

dające się łatwo zaobserwować już przy małym powiększeniu mikroskopu (obraz siatki ogrodzeniowej).

5.1.3. Sformułowanie wyniku

Ostateczne rozpoznanie jest ustalane przez patologa zgodnie z algorytmem i kryteriami przedstawionymi na rycinie 1. i w tabeli II, po wcześniejszym uwzględnieniu możliwych niezgodności ze względu na cechy histologiczne oraz rodzaj użytego materiału (patrz tabela I). Ustalenie rozpoznania niejednoznacznego powinno prowadzić do zlecenia ponownego oznaczenia statusu *HER2* metodą ISH ze stosowną adnotacją w dokumentacji badania.

5.2. Algorytm diagnostyczny dla oznaczeń metodą hybrydyzacji *in situ*

5.2.1. Ocena techniczna reakcji

Pierwszym etapem procesu diagnostycznego powinna być ocena techniczna procesu hybrydyzacji z uwzględnieniem wyników kontroli wewnętrznych oraz kontroli dla serii. W przypadku stwierdzenia nieprawidłowości na tym etapie oznaczenie należy powtórzyć na tym samym lub innym materiale – w zależności od przypuszczalnych przyczyn niepowodzenia.

5.2.2. Identyfikacja rejonów zainteresowania

Następnym krokiem jest ocena odpowiadającego, kolejnego, seryjnie skrojonego skrawka bada-

nej tkanki wybarwionego hematoksyliną i eozyną w celu identyfikacji i lokalizacji nacieku nowotworowego, w którym należy zliczać sygnały ISH. Oceny tej powinien dokonać patolog, natomiast samo zliczanie może być powierzone odpowiednio przeszkolonemu personelowi innych specjalności biomedycznych.

5.2.3. Określenie jednorodności biologicznej preparatu

Patolog powinien dokonać wstępnej oceny całego preparatu ISH w celu identyfikacji w nim wyżej wymienionych korespondujących obszarów oraz stwierdzenia ewentualnej niejednorodności tkanki (występowania różnych populacji komórek nowotworowych oraz ich udziału procentowego w całości) i wskazania ich do dalszej analizy.

5.2.4. Określenie zdolności preparatu do oceny

Jednocześnie z czynnościami opisanymi powyżej należy określić przydatność preparatu do oceny. Ścisłe kryteria w tym zakresie zbiorczo prezentuje tabela II. Szczególną uwagę należy zwrócić na morfologię sygnałów w technikach hybrydyzacji w jasnym polu (CISH, SISH i ich kombinacje). W każdym przypadku ich charakter należy oceniać w odniesieniu do utkania prawidłowego i powinien on być do niego zbliżony. Wszelkie niejednoznaczności powinny prowadzić do ponownego oznaczenia alternatywną techniką.

Tabela II. Zestawienie kryteriów dla poszczególnych rozpoznań

<p>WYNIK UJEMNY WYNIK IHC/ISH SPEŁNIAJĄCY JEDNO (JEŚLI WYKONANO OZNACZENIE TYLKO JEDNĄ Z METOD) LUB OBA Z NIŻEJ WYMIENIONYCH KRYTERIÓW</p>
<ul style="list-style-type: none"> • IHC 0/1+ <ul style="list-style-type: none"> – IHC 0 niekompletny, słaby lub ledwo widoczny odczyn błonowy w $\leq 10\%$ komórek nacieku nowotworowego* lub całkowity brak odczynu w badaniu immunohistochemicznym – IHC 1+ niekompletny, słaby lub ledwo widoczny odczyn błonowy w $> 10\%$ komórek nacieku nowotworowego w badaniu immunohistochemicznym* • ISH (–) <ul style="list-style-type: none"> – przeciętnie $< 4,0$ sygnałów <i>HER2</i> na komórkę nowotworową w badaniu ISH z sondą pojedynczą – wartość stosunku liczby sygnałów <i>HER2/CEP17</i> $< 2,0$ przy przeciętnie $< 4,0$ sygnałów <i>HER2</i> na komórkę
<p>WYNIK DODATNI</p>
<ul style="list-style-type: none"> • IHC 3+ kompletny, okalający i silny odczyn błonowy w $> 10\%$ komórek nacieku nowotworowego (obraz siatki ogrodzeniowej)* • ISH (+) <ul style="list-style-type: none"> – przeciętnie $\geq 6,0$ sygnałów <i>HER2</i> na komórkę nowotworową w badaniu ISH z sondą pojedynczą – wartość stosunku liczby sygnałów <i>HER2/CEP17</i> $\geq 2,0$ bez względu na przeciętną liczbę sygnałów <i>HER2</i> na komórkę – wartość stosunku liczby sygnałów <i>HER2/CEP17</i> $< 2,0$ z przeciętną liczbą sygnałów <i>HER2</i> na komórkę $\geq 6,0$
<p>WYNIK NIEJEDNOZNACZNY KONIECZNE WYKONANIE NOWEGO OZNACZENIA ALTERNATYWNĄ METODĄ NA TYM SAMYM MATERIALE ALBO TĄ SAMĄ LUB ALTERNATYWNĄ METODĄ NA INNYM MATERIALE</p>
<ul style="list-style-type: none"> • IHC 2+ <ul style="list-style-type: none"> – okalający, kompletny odczyn błonowy o średnim lub słabym nasileniu w $> 10\%$ komórek nacieku nowotworowego* – silny, lecz niekompletny odczyn błonowy w $> 10\%$ komórek nacieku* – silny, kompletny i okalający odczyn błonowy (obraz drucianej siatki) w $\leq 10\%$ komórek nacieku nowotworowego* • ISH <ul style="list-style-type: none"> – przeciętnie $\geq 4,0$ i $< 6,0$ sygnałów <i>HER2</i> na komórkę nowotworową w badaniu ISH z sondą pojedynczą – przeciętnie $\geq 4,0$ i $< 6,0$ sygnałów <i>HER2</i> na komórkę nowotworową i jednocześnie stosunek liczby sygnałów <i>HER2/CEP17</i> $< 2,0$ w badaniu ISH z sondą podwójną
<p>WYNIK NIEDIAGNOSTYCZNY ROZPOZNIANIE USTALANE W KAŻDEJ SYTUACJI, GDY NIE MA MOŻLIWOŚCI OKREŚLENIA WYNIKU W KATEGORII DODATNI/UJEMNY/ NIEJEDNOZNACZNY. NALEŻY WYKONAĆ PONOWNE OZNACZENIE NA INNYM MATERIALE I/LUB ALTERNATYWNĄ METODĄ, PODAJĄC PRZYPUSZCZALNĄ PRZYCZYNĘ NIEPOWODZENIA.</p>
<ul style="list-style-type: none"> • IHC <ul style="list-style-type: none"> – nieprawidłowe wyniki kontroli wewnętrznych i/lub serii – artefakty obejmujące większą część preparatu – barwienie cytoplazmatyczne przysłaniające odczyn błonowy – ewidentne barwienie cytoplazmy i/lub silny odczyn błonowy w prawidłowych przewodach i zrazikach (z wyłączeniem metaplastji apokrynowej) • ISH <ul style="list-style-type: none"> – nieprawidłowe wyniki kontroli wewnętrznych i/lub serii – nie można zidentyfikować co najmniej 2 obszarów nacieku nowotworowego zdalnych do oceny – $> 25\%$ sygnałów jest zbyt słabych do oceny – $> 10\%$ sygnałów stwierdza się w obszarach odpowiadających cytoplazmie – źle zachowana morfologia jąder komórkowych, która nie pozwala na ich wyodrębnienie z grupy – silna autofluorescencja
<p>*dostrzegalne przy małym powiększeniu mikroskopu</p>

IHC (immunohistochemia) – badanie immunohistochemiczne, ISH (in situ hybridization) – hybrydyzacja in situ

5.2.5. Zliczanie sygnałów hybrydyzacji

Zliczanie poszczególnych sygnałów hybrydyzacji powinno się odbywać w co najmniej dwóch różnych obszarach naciekającego raka. Wstępnie należy ocenić minimum po 10 jąder komórkowych w każdym z obszarów (razem 20 jąder). W przypadku uzyskania wartości stosunku liczby sygnałów *HER2*/CEP17 z zakresu 1,8–2,2 lub $HER2 \geq 4,0$ i $< 6,0$ druga osoba powinna ocenić kolejne 20 jąder komórkowych. Ich morfologia w ocenianych obszarach powinna umożliwiać jednoznaczną identyfikację poszczególnych jąder. W przypadku stwierdzenia występowania różnych populacji komórek nowotworowych należy postępować zgodnie z algorytmem przedstawionym na rycinie 4.

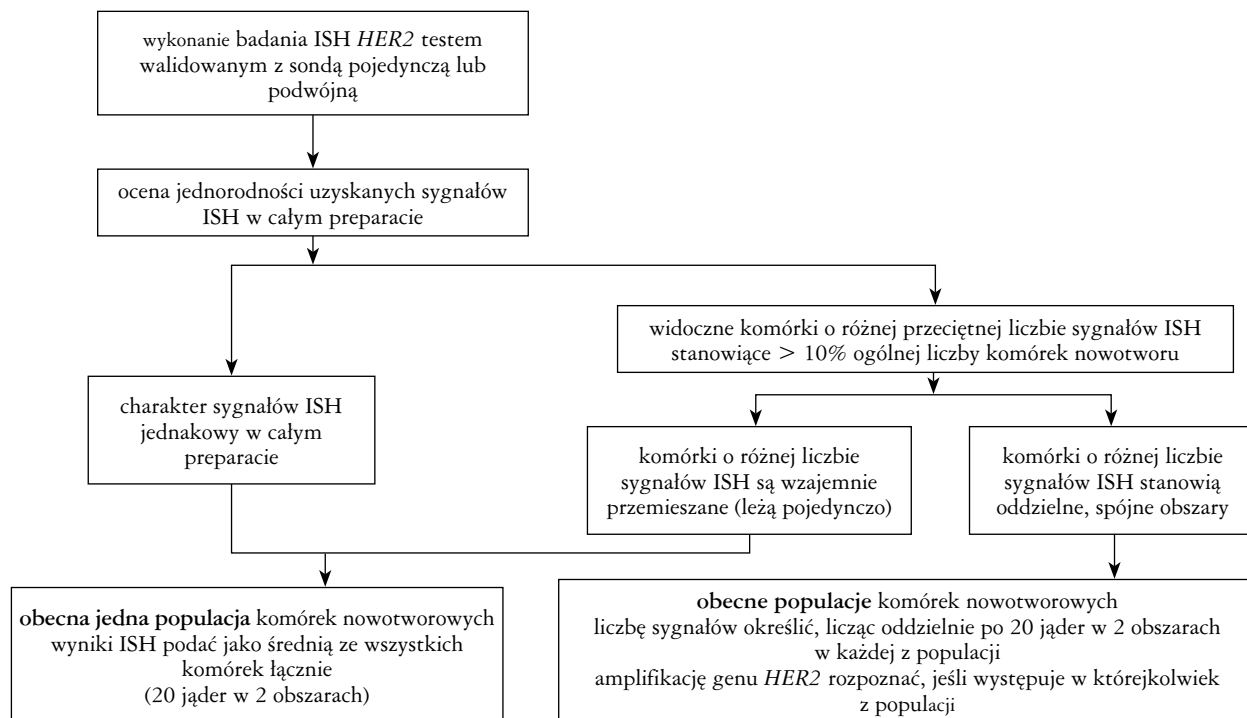
5.2.6. Formułowanie wyniku

Ostateczne rozpoznanie ustalane jest przez patologa zgodnie z algorytmem i kryteriami przedstawionymi na rycinach 2. i 3. oraz w tabeli II, po wcześniejszej weryfikacji prawidłowości zliczenia sygnałów hybrydyzacji oraz uwzględnieniu możliwych niezgodności ze względu na cechy histologiczne oraz rodzaj użytego materiału (patrz tabela I).

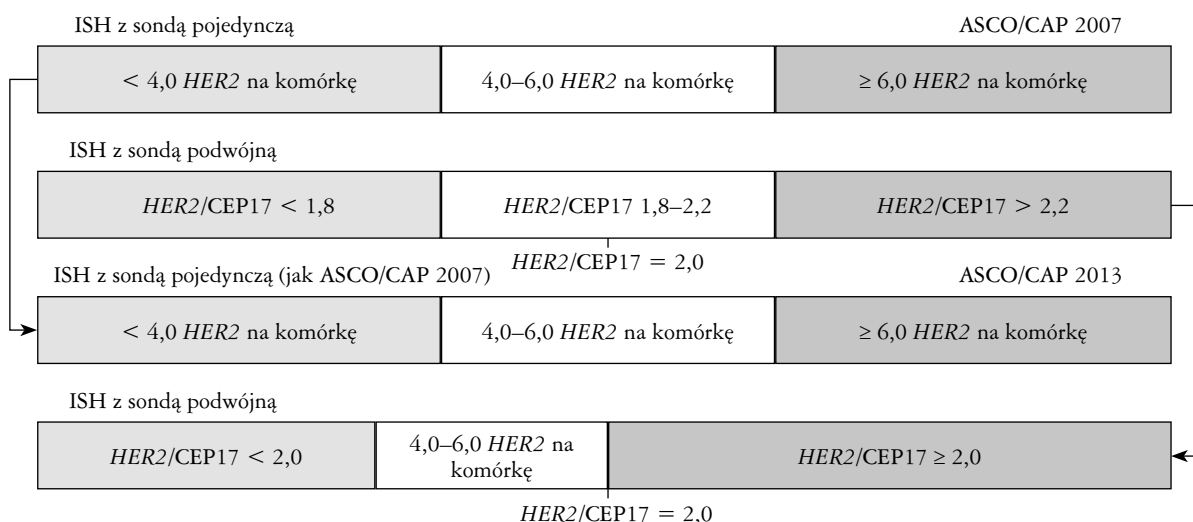
5.3. Wynik niejednoznaczny – postępowanie

Podstawowym celem wprowadzenia kategorii wyniku niejednoznacznego w pierwszej edycji rekomendacji i jej podtrzymanie w uaktualnieniu z 2013 r.

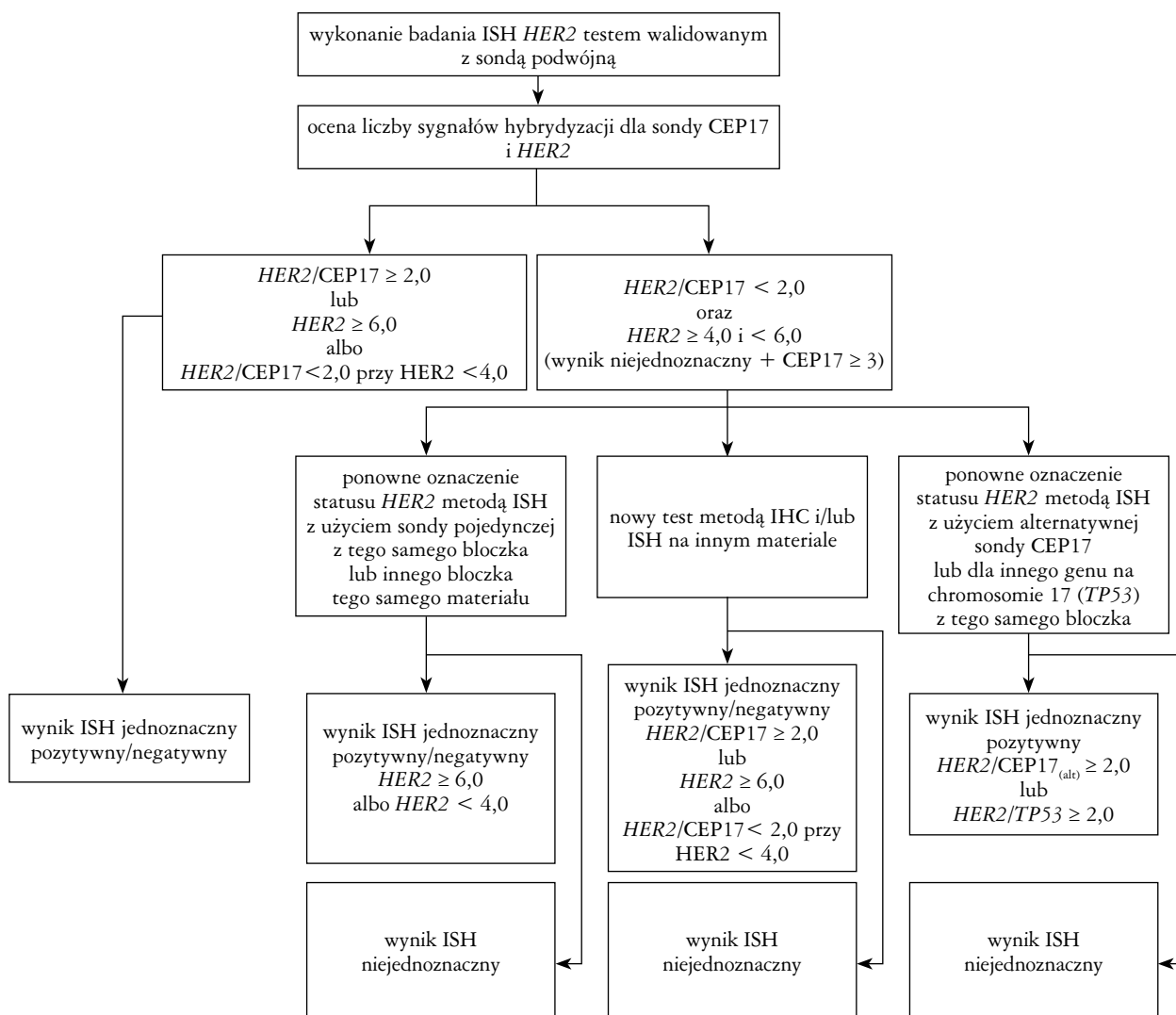
jest wymuszenie ponownego oznaczenia statusu genu *HER2*. W najnowszych zaleceniach przededefiniowano istotnie kryteria dla wyników niejednoznacznych w badaniach ISH. Zrezygnowano z definicji opartej na wartości stosunku liczby sygnałów *HER2*/CEP17 w przedziale 1,8–2,2 dla sond podwójnych, wprowadzając dla nich kryteria oparte o bezwzględną liczbę sygnałów *HER2* stosowane dotychczas tylko dla sond pojedynczych (z liczbą sygnałów *HER2* w przedziale 4,0–6,0 – patrz ryc. 5.). Tak zdefiniowany zakres niejednoznaczności obejmuje przypadki, które do tej pory uznawane były za ujemne, co powoduje wzrost liczby wyników niejednoznacznych. Obserwacje własne autora (dane niepublikowane z 2013 r.) potwierdzają wspomnianą zależność, wskazując jednocześnie na jej związek ze zjawiskiem „polisomii” chromosomu 17. Biorąc to pod uwagę, jak również fakt, iż w Polsce badanie ISH wykonywane jest prawie zawsze jako drugie po badaniu IHC z wynikiem niejednoznacznym (IHC 2+), szczególnie przydatny wydaje się algorytm postępowania z wykorzystaniem alternatywnej sondy do określania liczby kopii chromosomu 17 (ryc. 6.). W przypadku braku możliwości technicznych wykonania takiego oznaczenia zaleca się przeprowadzenie ponownego badania ISH z sondą pojedynczą z innego bloczka tego samego materiału lub ponownego oznaczenia taką samą lub alternatywną metodą na innym materiale, jeśli jest dostępny. W polskich warunkach najszerzej dostępną, alternatywną do FISH metodą diagnostyczną są techniki ISH jasnego pola. Dodatkowo, używając



Rycina 4. Algorytm postępowania w przypadku stwierdzenia niejednorodności genetycznej próbki (obecności dwóch lub więcej populacji o różnych liczbach sygnałów hybrydyzacji w badaniu hybrydyzacji *in situ*)



Rycina 5. Kryteria dla wyników niejednoznacznych w badaniu hybrydyzacji *in situ* z sondą pojedynczą i podwójną. W górnej części przedstawiono kryteria zgodne z pierwszą edycją rekomendacji, w dolnej – po wprowadzeniu uaktualnienia z 2013 r.



Rycina 6. Algorytm postępowania w przypadku stwierdzenia wyniku niejednoznacznego ze współistniejącą „polisomią” chromosomu 17 (≥ 3 sygnały centromeru chromosomu 17 przypadające na jądro komórkowe). CEP17_{alt} – alternatywna sonda centromerowa dla chromosomu 17, HER2/TP53 – stosunek liczby sygnałów hybrydyzacji z sondą HER2 do liczby sygnałów z sondą dla genu TP53

testów z sondą pojedynczą, należy mieć na uwadze większy wpływ grubości skrawka na uzyskiwaną przeciętną liczbę sygnałów *HER2* na komórkę niż w metodach z zastosowaniem sondy podwójnej.

W podsumowaniu podrozdziału warto podkreślić, że wg aktualnych kryteriów Narodowego Funduszu Zdrowia (NFZ) do leczenia adiuwantowego trastuzumabem kwalifikują się chorzy z potwierdzonym histopatologicznie zajęciem węzłów chłonnych dołu pachowego lub z guzem o minimalnym wymiarze powyżej 1 cm [4]. W wypadku niespełnienia wymienionych kryteriów korzystniejsze wydaje się szybkie włączenie leczenia niż opóźnianie go do momentu ustalenia jednoznacznego rozpoznania odnośnie do statusu receptora *HER2*.

6. Przypadki szczególne

6.1. „Polisomia” chromosomu 17

Polisomię definiuje się jako stan, w którym w komórce występuje jedna lub więcej dodatkowych kopii całego chromosomu. Kliniczne znaczenie polisomii chromosomu 17 przy braku nadekspresji receptora *HER2* nie jest znane. Sytuację komplikuje brak jednolicie stosowanego kryterium rozpoznania „polisomii” chromosomu 17. Najszerzej akceptowalną wartością jest przeciętnie ≥ 3 sygnałów hybrydyzacji przypadających na jedno jądro komórkowe. Tak zdefiniowana polisomia jest zjawiskiem dość częstym w raku piersi, raportowanym w zależności od opracowania w 3–46% przypadków, zwłaszcza w grupie IHC 2+ [5]. Choć nie wykazano zależności między polisomią w badaniu ISH z sondą centromerową a ekspresją *HER2* oraz odpowiedzią na trastuzumab, to zwrócono jednak uwagę na możliwość fałszywego zaniżenia w takich przypadkach wartości stosunku liczby sygnałów hybrydyzacji *HER2/CEP17*, co mogłoby prowadzić do ustalenia wyniku ujemnego i wykluczenia chorej z terapii trastuzumabem. Jednocześnie szereg badań innymi metodami biologii molekularnej (aCGH, MALP, FISH z alternatywną sondą) wykazało, że rzeczywiste zwielokrotnienie całego chromosomu 17 występuje w 6–17% przypadków z „polisomią” rozpoznaną na podstawie liczby sygnałów sondy *CEP17* [5]. Fenomen ten tłumaczy się zjawiskiem koamplifikacji *locus* genu *HER2* i centromeru chromosomu 17 w związku z ich bliskim sąsiedztwem na chromosomie [3, 5]. W takich przypadkach autorzy rekomendacji proponują jeden z dwóch możliwych schematów postępowania:

- wykonanie ponownego oznaczenia statusu *HER2* metodą ISH z pojedynczą sondą (lub IHC – jeśli pierwszym i jedynym testem było badanie ISH) z tego samego materiału i tego samego lub innego bloczka albo ponownego badania IHC i/lub ISH z innego materiału,

- powtórzenie oznaczenia na tym samym materiale/bloczku z użyciem alternatywnej sondy centromerowej lub sondy dla genu zlokalizowanego na chromosomie 17 w większym oddaleniu od *locus* genu *HER2* (*SMS*, *RARA*, *TP53*). Na szczególne polecenie zasługuje sonda *TP53* ze względu na odległą lokalizację genu w dystalnej części krótkiego ramienia chromosomu 17.

Szczegółowo algorytm postępowania przedstawiono na rycinie 6. Jego klinicznym uzasadnieniem są cytowane w rekomendacjach ASCO/CAP wnioski ponownej retrospektywnej analizy wyników badania klinicznego N9831. Wskazują one na potencjalne korzyści ze stosowania trastuzumabu u chorych IHC 3+ [czas wolny od choroby (*disease-free survival* – DFS) ryzyko względne (*hazard ratio* – HR): 0,57, 95% CI: 0,08–3,89], a także IHC $\leq 2+$ (DFS HR: 0,51, 95% CI: 0,21–1,23) z jednoczesną wartością stosunku liczby sygnałów *HER2/CEP17* $< 2,0$ [3].

6.2. Niejednorodność próbki

Wiele najnowszych doniesień dowodzi, że niejednorodność genetyczna guza nowotworowego jest zjawiskiem częstszym, niż pierwotnie przypuszczano (5–40%) [5], wskazując tym samym dodatkową podgrupę pacjentów mogących odnieść korzyści z terapii celowanej. Pojęciem heterogenności guza określa się stan, gdy w tym samym guzie współistnieją dwie lub więcej populacji komórek nowotworowych. Zjawisko to może przybierać trzy formy:

- rozłącznych, jednorodnych obszarów zajętych przez różne klony,
- przemieszanych klonów komórek z amplifikacją i bez niej, zajmujących ten sam obszar,
- pojedynczych komórek z amplifikacją w przeważającej masie komórek bez amplifikacji.

Eksperti są zgodni, iż praktyczne znaczenie mogą mieć populacje w postaci spójnych obszarów (pierwszy z wymienionych przypadków) przy założeniu, że jeden z klonów stanowi co najmniej 10% całego preparatu. W takiej sytuacji zliczenie sygnałów hybrydyzacji i wyliczenie wartości stosunku *HER2/CEP17* wykonuje się oddzielnie dla każdego z nich, wydając wynik pozytywny przy stwierdzeniu amplifikacji w którymkolwiek z klonów (ryc. 4.). W rekomendacji zwrócono również uwagę na konieczność analizy całego preparatu w celu wykluczenia możliwości zliczenia tylko jednej, przypadkowo wybranej populacji. W pozostałych sytuacjach oceniany obszar traktuje się jako całość, a parametry podaje jako średnią ze wszystkich zliczonych komórek (z amplifikacją i bez niej łącznie). W przypadku przemieszanych komórek różnych klonów stanowiących 1–10% całej populacji niektórzy autorzy sugerują ocenę dodatkowych komórek do osiągnięcia łącznej ich liczby 60 lub powtórzenie oznaczenia w materiale z przetrzutu do węzła chłonnego [5].

7. Raportowanie wyników

Wspólnymi elementami obowiązkowo umieszczanymi na wyniku badania zarówno IHC, jak i ISH są:

- dane osobowe pacjenta,
- data badania,
- identyfikator próbki,
- typ i miejsce pobrania próbki,
- rodzaj zastosowanej metody (nazwa testu/producenta, klon lub rodzaj sondy, posiadane certyfikaty),
- wyniki kontroli wewnętrznych,
- przydatność preparatu do oceny.

Dane dotyczące etapu preanalizy, takie jak czas do umieszczenia w utrwalaczu, czas utrwalania oraz rodzaj użytego utrwalacza, powinny być dokumentowane jedynie w protokole laboratoryjnym. W przypadku odstępstw od przyjętych procedur w treści wyniku powinna się znaleźć stosowna adnotacja.

W przypadku ekspresji *HER2* na wydruku wyniku należy umieścić informację o obecności i odsetku komórek wykazujących kompletne, okalające barwienie błonowe oraz ostateczne rozpoznanie z kategorii: wynik pozytywny, negatywny, niejednoznaczny lub niediagnostyczny. W uzupełnieniu wyniku niediagnostycznego należy podać przypuszczalną przyczynę niepowodzenia. Zlecenie ponownego oznaczenia powinno być odnotowane w komentarzu (wynik niejednoznaczny lub niediagnostyczny).

Elementy obowiązkowe raportu z badania ISH obejmują następujące informacje:

- liczbę osób oceniających preparat,
- liczbę ocenianych populacji, a dla każdej z nich:
 - liczbę ocenionych komórek nowotworowych,
 - średnią liczbę sygnałów *HER2* przypadających na jądro komórkowe,
 - średnią liczbę sygnałów centromerowych przypadających na jądro komórkowe,
- wartość stosunku *HER2/CEP17* (dla sond podwójnych),
- rozpoznanie z kategorii: wynik pozytywny, negatywny, niejednoznaczny, niediagnostyczny – z obowiązkiem podania przypuszczalnej przyczyny niepowodzenia.

Parametry dotyczące liczby ocenionych komórek, sygnałów *HER2*, *CEP17* oraz wartość stosunku *HER2/CEP17* są również obowiązkowym elementem składowym rekomendowanego przez Polskie Towarzystwo Patologów raportu histopatologicznego dotyczącego raka piersi [6].

Piśmiennictwo

1. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25: 118-145.

2. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, 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. *J Clin Oncol* 2013; 31: 3997-4013.
3. American Society of Clinical Oncology; College of American Pathologists. ASCO/CAP Guidelines: 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 – Data supplement. Pobrane 7.11.2014 z http://www.asco.org/sites/www.asco.org/files/her2_testing_ds_10-28-14.pdf.
4. Programy lekowe – choroby onkologiczne – Leczenie raka piersi. Pobrane 7.11.2014 z http://www.mz.gov.pl/_data/assets/word_doc/0019/24904/B.9.-nowy_od_11.2014.docx.
5. Hanna WM, Rüschoff J, Bilous M, et al. *HER2* in situ hybridization in breast cancer: clinical implications of polysomy 17 and genetic heterogeneity. *Mod Pathol* 2014; 27: 4-18.
6. Zalecenia do diagnostyki histopatologicznej nowotworów. Nasierowska-Guttmajer A, Górnicka B (red.). Polskie Towarzystwo Patologów, Centrum Onkologii, Oddział Gliwice, Warszawa 2013.