

І.С. Шпонька
О.О. Бондаренко
Т.В. Шинкаренко


Дніпровський державний медичний університет
Дніпро

Надійшла: 26.11.2021

Прийнята: 15.12.2021

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2021.4.88-95>

ЕФЕКТИВНА ІМПЛЕМЕНТАЦІЯ СУЧАСНИХ АЛГОРИТМІВ ВИЗНАЧЕННЯ HER2-СТАТУСУ РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

Shpon`ka I.S. , Bondarenko O.O.  ✉, Shynkarenko T.V.  Effective implementation of modern algorithms for determining the HER2 status of breast cancer.

Dnipro State Medical University, Dnipro, Ukraine.

ABSTRACT. Background. HER2 status is considered the cornerstone of highly effective targeted therapy, mainly in carcinomas of the breast and stomach, as well as tumors of other localizations. The complex methodology for determining the amplification and overexpression of HER2 needs analysis and improvement. **Objective:** to develop an effective algorithm for the implementation of modern guidelines for determining the HER2 status of breast cancer using IHC and FISH based on the analysis of literature sources and our own experience. **Methods.** In situ fluorescence hybridization was performed with the ZytoLight SPEC ERBB2 CEN 17 Dual Color Probe followed by digital analysis of photographs. **Results.** The modern approach to determining HER2-status in classical and doubtful cases is shown on the example of our cases (in situ hybridization). The nature of the evolution of recommendations for determining HER2-status is presented, the modern approach of laboratories is given, the prospects of using sequencing for optimization and individualization of the forecast are covered. **Conclusions.** Immunohistochemical study and in situ hybridization (ISH) are the main methods for determining HER2 status. Detection of mutations in the HER2 gene based on next-generation sequencing (NGS) is becoming increasingly important in clinical practice. The most effective approach to determining HER2 status includes IHC studies, in which fuzzy results (IHC expression of HER2 2+) perform in situ hybridization, with questionable results (ISH groups 2-4) repeat IHC studies with other blocks.


Key words: immunohistochemistry, ISH, sequencing, breast cancer, HER2, algorithm.

Citation:

Shpon`ka IS, Bondarenko OO, Shynkarenko TV. [Effective implementation of modern algorithms for determining the HER2 status of breast cancer]. Morphologia. 2021;15(4):88-95. Ukrainian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2021.4.88-95>

 Shpon`ka I.S. 0000-0002-7561-6489

 Bondarenko O.O. 0000-0002-9739-9219

 Shynkarenko T.V. 0000-0002-3428-7949

✉ olex.o.bondarenko@gmail.com

© Dnipro State Medical University, «Morphologia»

Вступ

Гібридизація in situ HER2 в основному використовується при карциномі молочної залози і шлунка для уточнення сумнівних імуногістохімічних результатів (IHC2 +). HER2-спрямована терапія також використовується в другій і третій лінії лікування інших пухлин, особливо товстої кишки, жовчних проток і легень, що також пов'язано з виявленням HER2-позитивності (надекспресії або ампліфікації).

З введенням трастузумаба (Герцептін®) в якості таргетної терапії проти рецептора епідермального фактора росту 2 (ErbB2 або HER2) метастатичного раку молочної залози (1998), FDA

схвалив набір PathVision (Abbott, Des Plaines, IL, USA) для виявлення ампліфікації гена HER2 методом гібридизації in situ (ISH). В цьому флуоресцентному двухпробному тесті (FISH) число копій генів HER2 (HER2-CN) встановлюється по відношенню до числа сигналів хромосоми 17 (CEP-17); співвідношення HER2-CN/CEP-17 $\geq 2,0$ вказує на ампліфікацію гена HER2. У той час як відповідно до схвалення FDA, для цього необхідно підрахувати 20 пухлинних клітин, відповідно до доказової медицини ISH вимагає підрахунку 30 ядер пухлинних клітин. Згодом були схвалені владою інші двоколірні методи тестувань, наприклад, заснований на флуоресценції

набір PharmDX (DAKO Abbott, Санта-Клара, Каліфорнія, США) і, вперше, подвійний срібний ISH тест (DISHorSISH, InformHER2dual ISH, Roche Ventana, Тусон, AZ, США). Обидва методи тестування характеризуються високим ступенем узгодженості і знайшли широке застосування в повсякденному житті в рутинній діагностиці [1, 2]. Методи, засновані на світловій мікроскопії, мають перевагу у вигляді менших витрат на підготовку і в той же час кращої оцінки гістологічної структури пухлини. Крім інших двоколірних методів ISH (наприклад, PharmDxCISH DAKO-Abbott), доступні також одноколірні хромогенні набори (наприклад, SPoT-LightCISH Invitrogen Thermo Fisher, Waltham, MA, USA). Однак останні визначають тільки число копій HER2 і вимагають контролю за допомогою двокольорового теста для визначення співвідношення ($</ \geq 2,0$), якщо число копій підвищено незначно (від $\geq 4,0$ до $< 6,0$). У порівнянні з імуногістохімічним визначенням експресії рецептора HER2 (HER2-IHC), для якого завжди потрібна тканина для позитивного контролю, методи на основі ISH мають ту перевагу, що в якості внутрішнього контролю фарбування можна використовувати супутню пухлині нормальну тканину. Це дозволяє здійснювати внутрішній контроль якості фарбування тесту.

Виникає питання про шляхи імплементації існуючих діагностичних рекомендацій для молочної залози.

Мета запропонувати ефективний алгоритм імплементації сучасних рекомендацій щодо визначення HER2-статусу раку молочної залози за допомогою ІГХ та FISH на основі аналізу літературних джерел та власного досвіду.

Матеріали та методи

Парафінові блоки відібраних випадків були взяті з архіву онкологічного відділення Дніпропетровського обласного патологоанатомічного бюро для демонстрації застосування FISH дослідження ампліфікації гену ERBB2 (Her2/neu).

Флюоресцентна гібридизація in situ

Підготовлені зрізи товщиною 4 мкм, нанесені на адгезивні предметні скельця Superfrost (Thermo, Німеччина), оброблялися термічно шляхом їх нагрівання на водяній бані в цитратному буфері (pH=6.0) упродовж 15 хвилин при температурі 98⁰ С, промивалися у дистильованій воді та інкубувалися розчином свиного пепсину в 0,01M HCl при 37°C протягом 15 хвилин. Потім зрізи промивалися в одинарному розчині натрій-цитратного буферу (1x SCC), дегідрувалися у розчинах ізопропанолу з висхідними концентраціями та висушувалися на повітрі. На висушені зрізи у темному приміщенні наносилися 10 мкл ДНК зонду ZytoLight SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe (ZytoVision, Німеччина), покривалися покривними скельцями 15×15 мм та герметизувалися гумовим клеєм. Підготовлені

таким чином зразки розміщували у гібридизаційній камері CytoBrite (США) та, згідно програми, обробляли термічно 10 хвилин при 75°C з подальшою інкубацією при 37°C протягом 18 годин. Після проведення гібридизації, обережно знімали гумовий клей та промивали зрізи у 0,4x SCC на водяній бані при 75°C, зневоднювали, висушували та дофарбовували флюоресцентним ядерним барвником DAPI (Sigma, Німеччина) у темному приміщенні протягом 15 хвилин. Після завершення протоколу забарвлення, зрізи вивчали та фотографували за допомогою мікроскопу Axio Imager 2 (Zeiss, Німеччина) на збільшеннях ×400, ×630 та ×1000 у флюоресцентному режимі.

Результати та їх обговорення

Випадок 1. Пацієнтка С., 1965 р.н., трепан-біопсія новоутворення правої молочної залози. Патогістологічний діагноз інфільтративна карцинома, а з даних імуногістохімічного дослідження було відомо лише напівкількісний показник експресії Her2 2+. Матеріал направлено на проведення дослідження ампліфікації гену ERBB2 (Her2) методом FISH. Після інкубації зразку із зондами, що специфічні до генного локусу 17q12 та центромерної області хромосоми 17 (СЕР17) було підраховано 50 ядер клітин, в яких у середньому спостерігалися 3,6 сигналів для 17q12 та 1,8 для СЕР17 (Рис. 1А). У середньому пухлинні клітини демонстрували <4 сигналів для 17q12 із співвідношенням =2. Така комбінація показників відносить даний випадок до 2 групи за ASCO/CAP, а діагностично розцінюється як граничний результат: незначна ампліфікація локусу гену 17q12 з частковою втраченою сигналом центромер 17 хромосоми. Даний результат вимагає проведення повторного ІГХ для визначення експресії HER2, яка виявилася «2+». Таким чином, описана комбінація молекулярно-генетичних даних та діагностичного алгоритму свідчить про негативний результат щодо ампліфікації гену ERBB2 (Her2).

Випадок 2. Пацієнтка С., 1980 р.н., трепан-біопсія новоутворення правої молочної залози. Патогістологічно підтверджено інфільтративну карциному, дані імуногістохімічного дослідження містили лише напівкількісний показник експресії Her2 2+. Матеріал було направлено на проведення дослідження ампліфікації гену ERBB2 (Her2) методом FISH. Після пробопідготовки, інкубації з відповідними зондами, та підрахування сигналів, було виявлено, що у середньому спостерігалися 2,5 сигналів для 17q12 та 1,5 для СЕР17 (Рис. 1Б). У середньому пухлинні клітини демонстрували <4 сигналів для 17q12 із співвідношенням <2. Описана комбінація показників відносить даний випадок до **5 групи за ASCO/CAP**, що свідчить про відсутність ампліфікації локусу гену 17q12 (негативний результат).

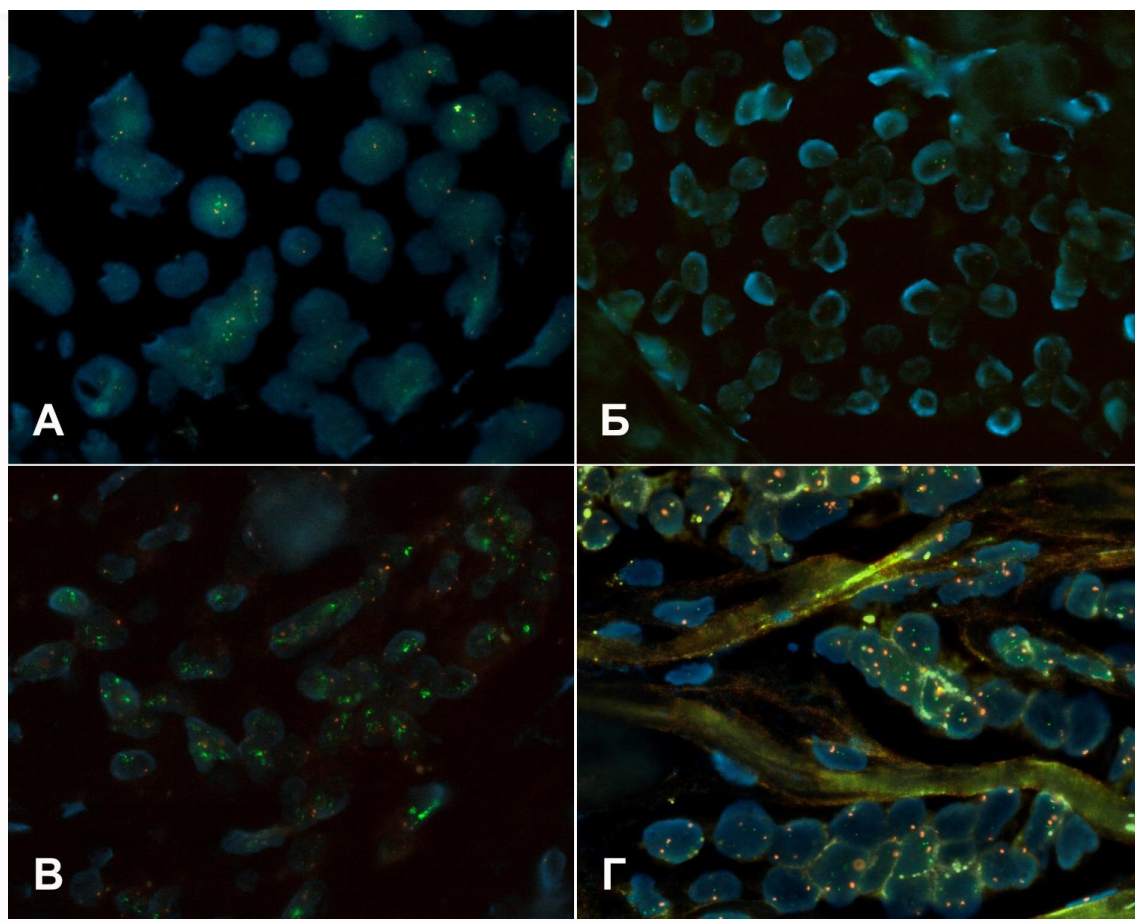


Рис. 1. Результати гібридизації in situ (ДНК-зонд ZytoLight SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe). А. <4 копій із співвідношенням = 2 (випадок 1). Б. <4 копій із співвідношенням <2 (випадок 2). В. >4 копій із співвідношенням >2 (випадок 3). Г. ≥ 4 , але <6 копій із співвідношенням <2 (випадок 4). А-Г. Зелений колір (спектр FITC) 17q12, оранжевий колір (спектр Rhodamine) CEP17, блакитне забарвлення хроматину DAPI.

Випадок 3. Пацієнтка К., 1963 р.н., трепан-біопсія новоутворення лівої молочної залози. Патогістологічно підтверджено інфільтративну карциному, а з даних імуногістохімічного дослідження було відомо лише напівкількісний показник експресії Her2 2+. Матеріал направлено на проведення дослідження ампліфікації гену ERBB2 (Her2) методом FISH. Після проведення усіх необхідних етапів FISH-дослідження, було виявлено, що в ядрах пухлини у середньому спостерігалися 11 сигналів для 17q12 та 2,4 для CEP17 (Рис. 1В). У середньому пухлинні клітини демонстрували >4 сигналів для 17q12 із співвідношенням >2 . Дана комбінація показників відносить цей випадок до 1 групи за ASCO/CAP, що свідчить про виразну ампліфікацію локусу гену 17q12 (позитивний результат).

Випадок 4. Пацієнтка Б., 1955 р.н., трепан-біопсія новоутворення лівої молочної залози. Патогістологічно підтверджено інфільтративну карциному, а імуногістохімічне дослідження виявило 10% мембранної експресії Her2 (2+), Ki67 25%, рецептор естрогену 90%, прогестерону 100%. Парафіновий блок доставлено для дослідження

ампліфікації гену ERBB2 методом гібридизації in situ. Після застосування стандартного протоколу FISH-дослідження із відповідними діагностичними зондами було підраховано 50 ядер клітин, в яких у середньому спостерігалися 5 сигналів для 17q12 та 3 для CEP17 (Рис. 1Г). У середньому пухлинні клітини демонстрували ≥ 4 , але <6 сигналів для 17q12 із співвідношенням <2 . Таке сполучення показників відносить даний випадок до 4 групи за ASCO/CAP, а діагностично розцінюється, знову ж таки, як граничний результат: помірна ампліфікація локусу гену 17q12 у комбінації з анеуплоїдією 17 хромосоми. Даний результат, згідно діагностичного алгоритма, вимагає проведення повторного ПГХ для визначення експресії Her2. Після отримання імуногістохімічного результату «2+» стосовно вищезазначеного маркера, був зроблений висновок про негативний результат щодо ампліфікації гену ERBB2 (Her2).

Виявлення HER2-позитивності (тобто імуногістохімічної надекспресія, IHC3+ або ISH-ампліфікації) є необхідною умовою для HER2-спрямованої терапії. В даний час затвержені

препарати включають антитіла (трастузумаб, пертузумаб, трастузумаб-dkst), кон'югати антитіло-ліки (трастузумаб + TDM1, трастузумаб-дерукстекал) і малі молекули, що інгібують внутрішньоклітинний домен кінази HER2 (лапатиніб, нератиніб, тукатиніб). Більшість з них використовуються для лікування карциноми молочної залози в метастатичному, ад'ювантному і неоад'ювантному випадках. При метастатичному або неоперабельному раці шлунка в якості першої лінії терапії доступний тільки трастузумаб [3]. Ряд інших препаратів, спрямованих на HER2, в даний час проходять випробування, в основному за умови, що HER2-позитивність була доведена за допомогою ІНС та або ISH. Останнім часом ефективність HER2-таргетних препаратів все частіше перевіряється і при наявності онкогенних мутацій в HER2 [3, 4].

Для підвищення точності діагностики HER2 при раку молочної залози Американське асоціа-

ція онкології (ASCO) та Коледж американських патологів (CAP) випустили кілька рекомендацій (перша в 2007 році, наступні у вигляді оновлення в 2013 році і, нарешті, "сфокусоване оновлення" в 2018 році) [5-7]. Перша версія була направлена в першу чергу на поліпшення кореляції між імуногістохімічними показниками надекспресії HER2 (IHC3+) і ампліфікацією гена. Це також спростовує широко поширену думку про те, що HER2 ISH є золотим стандартом тестування на HER2 і найкраще підходить для прогнозування успіху терапії [8]. Визначення HER2-позитивності було змінено, тобто замість не менше 10%, як вимагало FDA, тепер не менше 30% пухлинних клітин повинні бути імуногістохімічно сильно позитивними і кільцеподібними, щоб вважатися HER2-позитивними. Спочатку HER2-ISH вважався однозначно ампліфікованим тільки при співвідношенні > 2,2 (табл. 1).

Таблиця 1
Рекомендації по проведенню тесту на HER2 при раку молочної залози (ASCO CAP2007-2018) [5-7] у порівнянні з FDA

Тест	Результат	2007	2013	2018	FDA	
ГХ	3+ (рівномірна інтенсивна реакція)	>30%	>10%	>10%	>10%	Частка позитивних клітин Забарвлення мембрани
	2+ (слабка або помірна реакція)	циркулярна	неповна	циркулярна	циркулярна	
ISH	+	Співвідношення >2,2 або >6,0	Співвідношення $\geq 2,0$ або <2,0+ КК $\geq 6,0$	ISH група 1	Співвідношення $\geq 2,0$	КК HER2/17 хромосом КК HER2
	+/-	Співвідношення 1,8-2,2 та КК 4-6	Співвідношення <2,0 та КК 4-6	ISH групи 2-4	-	КК HER2/17 хромосом КК HER2
	-	Співвідношення <1,8 або КК <4,0	Співвідношення <2,0 та КК <4,0	ISH група 5	Співвідношення <2,0	КК HER2/17 хромосом КК HER2

Впровадження межових категорій в аналіз ISH (співвідношення 1,8-2,2) призвело до численних повторних процедур тестування з високою вартістю без очевидної користі. Крім того, більше випадків були класифіковані як негативні за результатами імуногістохімії, так що через недостатню доказову базу для змінених порогових значень ІНС і ISH, виникла необхідність поновлення рекомендацій при якому було повернуто порогове значення FDA в 10% [6]. Як нововведення, правило 10%, що раніше застосовувалося тільки для ІНС, вперше було застосовано для аналізу ISH. Відповідно до цього, пухлинні клітини з ампліфікацією повинні також утворювати суцільну асоціацію, що займає не менше 10% пухлини, що дозволяє при необхідності використовувати ІНС в якості орієнтира для визначення місця розташування ампліфікованих

ділянок, що повинно було поліпшити кореляцію між ІНС і ISH. Насправді, подальші дослідження показали, що за рекомендаціями 2013 року все більше карцином молочної залози виявилися HER2-позитивними [9, 10].

В даний час функціонує третя редакція рекомендацій щодо проведення тесту на HER2 при раку молочної залози, який, крім точнішого визначення статусу ІНС2+, фокусується на новій класифікації результатів ISH з урахуванням їх прогностичної значимості для відповіді на HER2-таргетну терапію [7]. У той же час підкреслюється важливість імуногістохімії для підтвердження межових результатів ISH. Якщо в 2013 році кожна пухлина з коефіцієнтом $\geq 2,0$ або генним числом $\geq 6,0$ автоматично класифікувалась як HER2-позитивна, то тепер це не актуально (табл. 2). Відповідно, всі карци-

номи молочної залози з співвідношенням $\geq 2,0$ і медіанною кількістю генів < 4 (ISH група 2) вимагають імуногістохімічного підтвердження (IHC 3+). Навіть в карциномах з коефіцієнтом $< 2,0$ і генним числом ≥ 6 (ISH група 3) рішення про позитивність HER2 може бути прийняте тільки в поєднанні з імуногістохімічним дослідженням; при цьому повинна бути отримана оцінка IHC не нижче 2+. Нарешті, від категорії "еквівокальний" відмовилися при співвідношенні $< 2,0$ і кількості генів від 4 до < 6 з межовими ре-

зультатами IHC (оцінка 2+). Для цих пацієнтів відповідно до рекомендацій 2013 року все ще існувала можливість проведення HER2-направленого терапевтичного втручання. Тепер ці пухлини класифікуються як HER2-негативні (група ISH 4). У таких випадках, можливо, слід провести повторне дослідження, наприклад, на іншому пухлинному блоці. Тим не менш, даних для проведення таргетної терапії при сумнівних результатах (група 2-4, "негатив + коментар") недостатньо.

Таблиця 2

Співставлення рекомендацій 2013 і 2018 років ASCO\CAP

		2013				
		ISH				
		Співвідношення $\geq 2,0$		Співвідношення $< 2,0$		
		Копій $\geq 4,0$	Копій $< 4,0$	Копій $\geq 6,0$	4,0 < Копій $< 6,0$	Копій $< 4,0$
IHC	0	+	+	+	-	-
	1	+	+	+	-	-
	2	+	+	+	+/-	-
	3	+	+	+	+	+
		2018				
		ISH				
		Співвідношення $\geq 2,0$		Співвідношення $< 2,0$		
		Копій $\geq 4,0$	Копій $< 4,0$	Копій $\geq 6,0$	4,0 < Копій $< 6,0$	Копій $< 4,0$
IHC	0	+	_*	_*	-	-
	1	+	_*	_*	_*	-
	2	+	_*	+	_*	-
	3	+	+	+	+	+

Примітка: * при дослідженні ISH потрібне додаткове IHC-дослідження

У цьому контексті слід згадати огляд G. Viale і F. Penault-Llorca, в якому автори узагальнюють карциноми молочної залози з негативним ISH і низькою експресією рецептора (IHC1+, 2+) терміном "HER2-low BC". Зокрема, для категорій, що відносяться до групи 2-4 ISH, вони ставлять питання про те, чи можуть нові HER2-таргетні препарати, такі як кон'югати антитілоліки і малі молекули, виявитися ефективними в майбутньому для цих карцином [11]. Тому при інтерпретації згаданих результатів ISH/IHC необхідно завжди враховувати аспект розробки нових ліків.

В практичній діяльності більша частина лабораторій Європи керуються рекомендаціями 2013 року з первинним визначенням HER2-статусу при карциномі молочної залози за допомогою IHC [12]. Кожен випадок із співвідношенням $\geq 2,0$ класифікується як HER2-позитивний. Якщо при використанні ISH також немає чіткого результату (співвідношення $< 2,0$ і кількість генів 4- < 6), слід провести повторне тестування на тому ж або іншому матеріалі, при необхідності також використовуючи альтернативні HER2-ISH зонди. У разі співвідношення $\geq 2,0$ і низького генного числа < 4 , ніяких спеціальних

рекомендацій в явному вигляді не вказано. В рамках дослідження HERA 6018 пухлин були протестовані методом FISH на наявність ампліфікації HER2. У 97% (n = 5837) показали чіткий результат, тобто або HER2-позитивний (48,7% і 6,3% з співвідношенням $\geq 2,0$ і генним числом ≥ 6 і 4 < 6 , відповідно), або HER2-негативних (42% з співвідношенням $< 2,0$ і генним числом < 4). Більш складні для інтерпретації групи (2-4) торкнулися тільки 3% (n = 181) випадків (0,8%, 0,4% і 1,9%) [13].

Мутації HER2, які піддаються лікуванню. Крім надекспресії і ампліфікації гена, останнім часом в поле зору потрапила третя група змін гена HER2. Вони можуть бути надійно виявлені за допомогою секвенування наступного покоління (NGS) і відкривають нові терапевтичні підходи [3]. Найбільша поширеність була виявлена серед пухлин сечового міхура (11%), потім слідує карциноми шлунка, товстої кишки, молочної залози, голови та шиї і ендометрію (в межах 2-4%). Рідко ($< 1\%$) мутації HER2 були виявлені в підшлунковій залозі, простаті, щитовидній залозі та гліомах [4]. Спектр мутацій варіюється в залежності від пухлини і зачіпає весь ген кіназного рецептора HER2 у

позаклітинному, трансмембранному і внутрішньоклітинному доменах. Близько двох третин з них є онкогенними мутаціями-драйверами, які потенційно піддаються терапії. За допомогою NGS, крім мутацій в гені HER2, що викликають резистентність (наприклад, якщо вони впливають на домен, що зв'язує трастузумаб), можуть бути виявлені супутні мутації в інших генах (часто в генах ERBB3, RAF1, PIK3CA і PIK3R2), які слід враховувати при прийнятті рішення про подальшу терапію.

Цікаво, що мутації HER2 майже ніколи не зустрічаються разом з мутаціями в онкогені KRAS, що вказує на важливість шляхів MAPK і PI3K в опосередкування онкогенного ефекту мутацій в гені HER2. За допомогою таких докладних аналізів геному можна точно молекулярно націлити HER2-таргетну терапію і адаптувати її до стану розробки ліків. Наприклад, резистентні мутації при раку легень в генах EGFR і HER2 (в обох випадках екзон 20ins), тепер можуть успішно лікуватися незворотнім інгібітором кінази (rozotinib TAK188), також були виявлені в карциномі сечового міхура [14]. Слід зазначити, що 2,94% пацієнтів з недрібноклітинним раком легень мають мутації в гені HER2. Оскільки в екзоні 20, крім інших, існують мутації "гарячих точок", їх також можна виявити за допомогою секвенування за методом Сенгера [15]. Слід зазначити, що дані про поширеність ампліфікації гена HER2, отримані за допомогою NGS, як правило, трохи нижче значень, визначених за допомогою ISH, оскільки ISH, як правило, виявляє навіть рідкісні клони з ампліфікацією.

Висновки

1. Імуногістохімічне дослідження та гібридизація *in situ* (ISH) є основними методами визначення статусу HER2. Виявлення мутацій в гені HER2 на основі секвенування наступного покоління (NGS) набуває все більше значення у клінічній практиці.

2. При сумнівних результатах (ISH групи 2-4/ІГХ експерсія HER2 2+) слід порівняти обидва методи (ISH і ІГХ) і, при необхідності, провести повторне дослідження на другому блоці (біопсія проти резектата).

3. Найбільш ефективний підхід визначення HER2-статусу включає ІГХ дослідження, при нечітких результатах якого (ІГХ експерсія HER2 2+) проводять гібридизацію *in situ*, при сумнівному результаті якої (ISH групи 2-4) проводять повторне ІГХ дослідження з інших блоків.

Перспективи подальших розробок.

Актуальними проблемами визначення HER2-статусу є потенціал терапевтичного впливу на пухлинні клітини, які набули неампліфікаційні мутації гена HER2.

Джерела фінансування

Дослідження проведено в рамках науково-дослідної теми «Морфологічні та молекулярно-генетичні критерії діагностики та прогнозу перебігу передпухлинних станів та новоутворень різних локалізацій» (номер державної реєстрації 0119U100027).

Інформація про конфлікт інтересів

Потенційних або явних конфліктів інтересів, що пов'язані з цим рукописом, на момент публікації не існує та не передбачається.

Літературні джерела References

1. Diel M, Ellis IO, Höfler H, Kreipe H, Moch H, Dankof A, Kölbl K, Kristiansen G. Comparison of automated silver enhanced *in situ* hybridization (SISH) and fluorescence ISH (FISH) for the validation of HER2 gene status in breast carcinoma according to the guidelines of the American Society of Clinical Oncology and the College of American Pathologists. *Virchows Archiv.* 2007 Jul;451(1):19-25. DOI 10.1007/s00428-007-0424-5

2. Papouchado BG, Myles J, Lloyd RV, Stoler M, Oliveira AM, Downs-Kelly E, Morey A, Bilous M, Nagle R, Prescott N, Wang L. Silver *in situ* hybridization (SISH) for determination of HER2 gene status in breast carcinoma: comparison with FISH and assessment of interobserver reproducibility. *The American journal of surgical pathology.* 2010 Jun 1;34(6):767-76. doi: 10.1097/PAS.0b013e3181d96231

3. Meric-Bernstam F, Johnson AM,

Dumbrava EE, Raghav K, Balaji K, Bhatt M, Murthy RK, Rodon J, Piha-Paul SA. Advances in HER2-targeted therapy: novel agents and opportunities beyond breast and gastric cancer. *Clinical Cancer Research.* 2019 Apr 1;25(7):2033-41. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-18-2275

4. Subramanian J, Katta A, Masood A, Vudem DR, Kancha RK. Emergence of ERBB2 mutation as a biomarker and an actionable target in solid cancers. *The oncologist.* 2019 Dec;24(12):e1303. doi: 10.1634/theoncologist.2018-0845

5. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, Dowsett M, Fitzgibbons PL, Hanna WM, Langer A, McShane LM. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Archives of pathology & laboratory medicine.* 2007 Jan;131(1):18-43.

DOI:10.1200/JCO.2006.09.2775

6. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, Allred DC, Bartlett JM, Bilous M, Fitzgibbons P, Hanna W. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. Archives of Pathology and Laboratory Medicine. 2014 Feb;138(2):241-56. doi: 10.5858/arpa.2013-0953-SA

7. Wolff AC, Hammond ME, Allison KH, Harvey BE, Mangu PB, Bartlett JM, Bilous M, Ellis IO, Fitzgibbons P, Hanna W, Jenkins RB. Human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline focused update. Archives of pathology & laboratory medicine. 2018 Nov;142(11):1364-82. doi: 10.5858/arpa.2018-0902-SA

8. Sauter G, Lee J, Bartlett JM, Slamon DJ, Press MF. Guidelines for human epidermal growth factor receptor 2 testing: biologic and methodologic considerations. Journal of Clinical Oncology. 2009 Mar 10;27(8):1323-33. DOI: 10.1200/JCO.2007.14.8197

9. Panigrahi MK, Kumar D, Mehta A, Saikia KK. Outcome of HER2 Testing by FISH applying ASCO/CAP 2007 and 2013 guideline in IHC equivocal group of breast cancer: experience at tertiary cancer care centre. South Asian journal of cancer. 2017 Apr;6(02):45-6. <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/pdf/10.4103/2278-330X.208841.pdf>

10. Tchrakian N, Flanagan L, Harford J, Gannon JM, Quinn CM. New ASCO/CAP guideline

recommendations for HER2 testing increase the proportion of reflex in situ hybridization tests and of HER2 positive breast cancers. Virchows Archiv. 2016 Feb 1;468(2):207-11. <https://doi.org/10.1007/s00428-015-1871-z>

11. Tarantino P, Hamilton E, Tolaney SM, Cortes J, Morganti S, Ferraro E, Marra A, Viale G, Trapani D, Cardoso F, Penault-Llorca F. HER2-low breast cancer: pathological and clinical landscape. Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2020 Jun 10;38(17):1951-62. DOI <https://doi.org/10.1200/JCO.19.02488>

12. AWMF S3 Leitlinie Mammakarzinom (Langversion 4.4 Juni 2021), https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-045OLI_S3_Mammakarzinom_2021-07.pdf

13. Stoss OC, Scheel A, Nagelmeier I, Schildhaus HU, Henkel T, Viale G, Jasani B, Untch M, Rüschoff J. Impact of updated HER2 testing guidelines in breast cancer—re-evaluation of HERA trial fluorescence in situ hybridization data. Modern Pathology. 2015 Dec;28(12):1528-34. DOI <https://doi.org/10.1038/modpathol.2015.112>

14. Madison RW, Gupta SV, Elamin YY, Lin DI, Pal SK, Necchi A, Miller VA, Ross JS, Chung JH, Alexander BM, Schrock AB. Urothelial cancer harbours EGFR and HER2 amplifications and exon 20 insertions. BJU international. 2020 May;125(5):739-46. DOI: 10.1111/bju.15006

15. AACR Project Genie Consortium. AACR Project GENIE: powering precision medicine through an international consortium. Cancer discovery. 2017 Aug 1;7(8):818-31. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-17-0151

Шпонька І.С., Бондаренко О.О., Шинкаренко Т.В. Ефективна імплементація сучасних алгоритмів визначення HER2-статусу раку молочної залози.

РЕФЕРАТ. Актуальність. HER2-статус вважається наріжним каменем високоефективної таргетної терапії переважно при карциномах молочної залози та шлунку, а також пухлин інших локалізацій. Складна методологія визначення ампліфікації та надекспресії HER2 потребує аналізу та удосконалення. **Мета:** розробити ефективний алгоритм імплементації сучасних рекомендацій щодо визначення HER2-статусу раку молочної залози за допомогою ІГХ та FISH на основі аналізу літературних джерел та власного досвіду. **Методи.** Проведено флюоросцентну гібридизацію *in situ* із ДНК-зондом ZytoLight SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe з подальшим цифровим аналізом фотографій препаратів. **Результати.** На прикладі власних досліджень (гібридизація *in situ*) показано сучасний підхід до визначення HER2-статусу у класичних та сумнівних випадках. Наведено природу еволюції рекомендацій щодо визначення HER2-статусу, надано сучасний підхід лабораторій, освітлено перспективи використання секвенування для оптимізації та індивідуалізації прогнозу. **Висновки.** Імуногістохімічне дослідження та гібридизація *in situ* (ISH) є основними методами визначення статусу HER2. Виявлення мутацій в гені HER2 на основі секвенування наступного покоління (NGS) набуває все більше значення у клінічній практиці. Найбільш ефективний підхід визначення HER2-статусу включає ІГХ дослідження, при нечітких результатах якого (ІГХ експресія HER2 2+) проводять гібридизацію *in situ*, при сумнівному результаті якої (ISH групи 2-4) проводять повторне ІГХ дослідження з інших блоків.

Ключові слова: імуногістохімія, ISH, секвенування, рак молочної залози, HER2, алгоритм.

Шпонька И.С., Бондаренко А.А., Шинкаренко Т.В. Эффективная имплементация современных алгоритмов определения HER2-статуса рака молочной железы.

РЕФЕРАТ. Актуальность. HER2-статус считается основополагающим элементом высокоэффективной таргетной терапии преимущественно при карциномах молочной железы и желудка, а также опухолей других локализаций. Сложная методология определения амплификации и сверхэкспрессии HER2 требует анализа и усовершенствования. **Цель:** разработать эффективный алгоритм имплементации современных рекомендаций по определению HER2-статуса рака молочной железы с помощью ИГХ и FISH на основе анализа литературных источников и опыта учреждения. **Методы:** Проведена флюоресцентная гибридизация *in situ* с ДНК-зондом ZytoLight SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe с последующим цифровым анализом фотографий препаратов. **Результаты.** На примере собственных исследований (гибридизация *in situ*) показан современный подход к определению HER2-статуса в классических и сомнительных случаях. Приведена природа эволюции рекомендаций по определению HER2-статуса, предоставлен современный подход лабораторий, освещены перспективы использования секвенирования для оптимизации и индивидуализации прогноза. **Выводы.** Иммуногистохимическое исследование и гибридизация *in situ* (ISH) являются основными методами определения статуса HER2. Выявление мутаций в гене HER2 на основе секвенирования следующего поколения (NGS) приобретает все большее значение в клинической практике. Наиболее эффективный подход определения HER2-статуса включает ИГХ исследование, при нечетких результатах которого (ИГХ экспрессия HER2 2+) проводят гибридизацию *in situ*, при сомнительном результате которой (ISH группы 2-4) проводят повторное ИГХ исследование из других блоков.

Ключевые слова: иммуногистохимия, ISH, секвенирование, рак молочной железы, HER2, алгоритм.