

*Коньшев К.В.^{1,2}, Сазонов С.В.^{1,2},
Бриллиант А.А.¹*

**ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ
ОНКОБЕЛКА HER2/NEU КЛЕТКАМИ РАКА
МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ РЕГИОНАРНОМ
МЕТАСТАЗИРОВАНИИ В СЛУЧАЯХ
С НЕОПРЕДЕЛЕННЫМ (2+)
УРОВНЕМ ЭКСПРЕССИИ HER2/NEU
В ТКАНИ ПЕРВИЧНОЙ ОПУХОЛИ**

¹ Институт медицинских клеточных технологий,
г. Екатеринбург, Российская Федерация

² Уральский государственный медицинский университет,
г. Екатеринбург, Российская Федерация

Резюме. Цель исследования — сравнить уровни экспрессии белка Her2/neu в ткани первичной опухоли и регионарных метастазов рака молочной железы (РМЖ) в группе с неопределенным уровнем экспрессии этого маркера (2+), а также сопоставить Her2/neu-статусы первичной и метастатической опухолей. Материалы и методы. На материале первичной опухоли и регионарных метастазов 25 больных РМЖ с неопределенным уровнем экспрессии Her2/neu (2+) в клетках первичной опухоли, не имевших неоадьювантной терапии, выполнялось ИГХ-исследование Her2/neu (клон 4B5, Ventana). В ткани первичного очага также исследовался уровень амплификации гена Her2/neu SISH-методом (Ventana). Оценка результатов реакций ИГХ и SISH проводилась в соответствии с рекомендациями ASCO/CAP 2013 года. Сравнивались уровни экспрессии белка Her2/neu и Her2/neu-статусы первичного и метастатического РМЖ. Для статистической обработки использовались знаково-ранговый тест Уилкоксона, точный тест Фишера и каппа Коэна.

Результаты. Из 25 исследованных случаев в 80% уровень экспрессии Her2/neu в метастазах ниже, чем в первичной опухоли (0 или 1+), в 4% — выше (3+), в 16% — не отличался (2+) ($p < 0,05$, точный тест Фишера). Медиана уровня экспрессии Her2/neu в ткани метастазов составляла 1+ (межквартильный размах 1), отличия от уровня экспрессии в первичной опухоли достоверны ($p < 0,001$, знаково-ранговый

тест Вилкоксона). Из 25 исследованных случаев в 20% обнаружена амплификация гена *Her2/neu* в ткани первичного очага, причем в 4% и уровень экспрессии *Her2/neu* в ткани метастаза был высоким (3+). *Her2/neu*-статусы первичной и метастатической опухолей совпали в 84% случаев (95% ДИ 63,1–94,8%). Значение каппы Козна для положительных и отрицательных *Her2/neu*-статусов ткани первичной и метастатической опухолей составило 0,29 (умеренная сходимость результатов).

Ключевые слова: рак молочной железы, иммуногистохимия, SISH, *Her2/neu*, гетерогенность опухоли, метастазирование

Рак молочной железы (РМЖ) является ведущей опухолевой нозологией среди женщин как по заболеваемости (более 1300000 случаев в год), так и по смертности (более 458300 случаев в год) в мире [1]. Распространенность РМЖ превышает распространенность опухолей любой другой локализации более, чем в два раза [2]. При этом РМЖ — гетерогенное заболевание, различные подгруппы которого отличаются по прогностическим и предиктивным характеристикам. Существует ряд подходов к исследованию опухолевой ткани с последующим отнесением случая к определенной подгруппе, включающий в себя как молекулярно-биологические методы исследования мультигенных сигнатур опухоли, так и суррогатный иммуногистохимический (ИГХ) метод оценки уровня экспрессии опухолевых биомаркеров. Последний метод является наиболее распространенным в мире ввиду умеренной стоимости исследования и высокой достоверности результатов для оценки прогноза и выбора персонализированной терапии [3]. «Золотым стандартом» ИГХ-исследования РМЖ является т.н. ИHC4, панель из четырех биомаркеров, включающая в себя рецепторы к эстрогену (ER), рецепторы к прогестерону (PR), *Her2/neu* и маркер пролиферации Ki67. ИГХ-исследование *Her2/neu* в случае неопределенного уровня экспрессии (2+) должно быть дополнено молекулярно-генетическим исследованием амплификации гена *ErbB2* методом гибридизации *in situ* (ISH).

Her2/neu представляет собой рецепторную тирозинкиназу семейства *ErbB*, объединяющего различные варианты рецепторов к эпидермальному фактору роста. Особенностью *Her2/neu* является отсутствие необходимости в присоединении конкретного лиганда для активации соответствующего сигнального пути, ведущего к реализации клеточной опухолевой свойств, что делает экспрессию данной молекулы на

мембране клетки одним из ключевых элементов для определения прогноза, а также ответа на таргетную терапию анти-Her2-антителами. Клинически значимым является положительный или отрицательный Her2/neu-статус опухоли, причем положительным статус признается в случае экспрессии белка Her2/neu, определяемой методом ИГХ, на уровне 3+ или в случае положительной амплификации гена Erbb2, определяемой методом ISH, а отрицательным — в случае экспрессии белка на уровне 0 или 1+ или при отрицательной амплификации гена Erbb2.

Рекомендации ASCO/CAP 2013 года предусматривают оценку Her2/neu-статуса метастатической ткани рака молочной железы в тех случаях, когда метастатический очаг развивается метакронно [4], при этом в рекомендациях согласительных конференций St. Gallen 2015 и 2017 годов предусмотрено исследование Her2/neu-статуса только первичной опухоли [5, 6]. По мнению ряда авторов, различия статуса первичной опухоли и метастазов, продемонстрированные в ряде исследований, могут вести к неэффективности таргетной терапии и неточной оценке прогноза [7, 8].

В большинстве доступных работ показано существование феномена гетерогенности опухоли, проявляющейся в несоответствии Her2/neu-статусов первичной и метастатической опухолей при раке молочной железы. Однако данные о частотах и направлениях изменений Her2/neu-статуса опухоли при метастазировании разнородны и не позволяют сделать вывод о закономерностях, связанных с этими изменениями [9].

Причины различий уровней экспрессии Her2/neu в клетках первичной опухоли и регионарных метастазов не выяснены до конца. Предполагается, что этот феномен может наблюдаться вследствие клональной селекции опухолевых клеток в результате лекарственного давления или в силу биологических причин, биологической эволюции опухолевых клеток, или как артефакт, связанный с ошибками на разных этапах обработки и оценки материала [10].

В связи с отсутствием единого мнения о биологических причинах различий уровней экспрессии Her2/neu в ткани первичной и метастатической опухолей при РМЖ и значимости таких различий для оценки прогноза заболевания и принятия терапевтических решений, а также о закономерностях изменений иммунофенотипа опухоли при метастазировании, исследования различий уровней экспрессии онкобелка Her2/neu клетками первичной опухоли и регионарных метаста-

зов являются актуальными. Среди случаев инвазивного РМЖ особого внимания заслуживает группа с неопределенным уровнем экспрессии Her2/neu в клетках первичной опухоли (2+), в связи с чем представляется актуальным вопрос, изменится ли уровень экспрессии белка Her2/neu при метастазировании этой категории опухолей и как в таких случаях соотносится Her2/neu-статус ткани первичной опухоли, определенный с помощью ISH, со статусом метастатической опухолевой ткани.

Целью данного исследования стало выявить различия уровней экспрессии онкобелка Her2/neu (2+) в клетках регионарных метастазов и первичной опухоли при раке молочной железы в группе с неопределенным уровнем экспрессии этого биомаркера в ткани первичного очага, оценить степень этих отличий, а также сопоставить Her2/neu-статус ткани первичной и метастатической опухолей.

Материал и методы

В исследование вошли 25 пациенток с инвазивным неспецифическим раком молочной железы, имеющих регионарные метастазы, не получавших до операции химио- или радиотерапию, с неопределенным уровнем экспрессии Her2/neu (2+) в клетках первичной опухоли. Гистологические препараты первичной опухоли и регионарных лимфоузлов были пересмотрены для подтверждения диагноза инвазивного неспецифического рака молочной железы и метастатического поражения регионарных лимфатических узлов.

Фиксированная формалином, залитая в парафиновые блоки ткань первичной опухоли и регионарных метастазов исследовалась иммуногистохимическим методом, ткань первичной опухоли дополнительно исследовалась методом хромогенной гибридизации *in situ* (SISH). Для проведения ИГХ-исследования с блоков изготавливались срезы толщиной 4 мкм, депарафинировались, обрабатывались и окрашивались моноклональными антителами к Her2/neu (Ventana, клон 4B5) с использованием автостейнера Ventana Benchmark GX (Ventana, США). Оценка уровня экспрессии проводилась в соответствии с рекомендациями ASCO/CAP 2013 года. Для выполнения гибридизации *in situ* изготавливались срезы толщиной 3 мкм, SISH-исследование проводилось в иммуностейнере Ventana Benchmark XT (Ventana, США), с использованием систем визуализации UltraView Red ISH DNP, UltraView SILVERISH и зонда INFORM HER2 DualISH DNA Probe Cocktail. Наличие или отсутствие амплификации гена *ErbB2* опреде-

лялось путем подсчета сигналов HER2/CEP17 в ядрах 20 опухолевых клеток [1].

Положительный или отрицательный Her2/neu-статус определялся в первичной опухоли в соответствии с результатом SISH-исследования (наличие или отсутствие амплификации гена). В метастатической опухоли случаям с уровнем экспрессии Her2/neu 3+ присваивался положительный статус, а случаям с другими уровнями экспрессии (0, 1+, 2+) присваивался отрицательный статус.

При статистической обработке для сравнения частот повышения и понижения уровня экспрессии Her2/neu при метастазировании использовался точный тест Фишера, для сравнения уровней экспрессии Her2/neu в ткани первичной и метастатической опухолей использовался знаково-ранговый тест Вилкоксона, для оценки сходимости частот положительных и отрицательных Her2/neu-статусов первичной опухоли, определенной методом SISH, и метастатической опухоли, определенной методом ИГХ, рассчитывалась каппа Коэна. Наблюдаемые различия считались достоверными при уровне значимости $\leq 0,05$. Статистическая обработка проводилась с помощью программ Gretl и MS Excel 2007 согласно общепринятым методам.

Результаты и обсуждение

Уровень экспрессии Her2/neu в ткани первичной опухоли у всех пациенток составлял 2+, медиана значений уровня экспрессии Her2/neu в ткани метастазов составляла 1+ (межквартильный размах — 1), полученные различия достоверны ($p < 0,001$, знаково-ранговый тест Вилкоксона) (рис. 1). При этом уровень экспрессии Her2/neu был выше в ткани метастазов в 1 случае (4%, 95% ДИ 0,2–22,3%), понизился в 20 случаях (80%, 95% ДИ 58,7–92,4%), остался прежним в 4 случаях (16%, 95% ДИ 5,2–36,9%). При сравнении частот случаев с понижением и повышением уровня экспрессии Her2/neu при регионарном метастазировании обнаружено достоверное преобладание частоты случаев с понижением уровня экспрессии Her2/neu при метастазировании ($p < 0,05$, точный тест Фишера) (рис. 2).

Из 25 случаев, включенных в исследование, в 5 ткань первичной опухоли имела Her2/neu-положительный статус (обнаружена амплификация гена Her2/neu), в 20 случаях — Her2/neu-отрицательный статус (отсутствие амплификации гена Her2/neu). В одном случае метастатическая опухоль имела Her2/neu-положительный статус (уровень экспрессии 3+), причем в этом случае и статус первичной опухоли

ли был положительным. Частота совпадения Her2/neu-статусов ткани первичной опухоли и регионарных метастазов составила 84% (95% ДИ 63,1–94,8%) (рис. 3). Для оценки сходимости частот положительных и отрицательных Her2/neu-статусов первичной и метастатической опухолей была рассчитана каппа Коэна, значение которой составило 0,29, что соответствует умеренному уровню сходимости.

Гиперэкспрессия онкобелка Her2/neu (оцениваемая как 3+) на клетках опухоли возникает, как правило, вследствие амплификации гена *ErbB2*. В таких случаях онкогенные эффекты белка Her2/neu, приводящие к активации клеточных сигнальных путей MAPK и PI3K, очень выражены, поскольку количество молекул Her2/neu на мембране опухолевой клетки многократно превосходит количество таких молекул на мембранах опухолевых клеток в случаях с другими уровнями экспрессии Her2/neu в опухолевой ткани [11].

Экспрессия онкобелка Her2/neu на мембране опухолевых клеток при раке молочной железы на уровне 2+, как правило, возникает в случае активной транскрипции неамплифицированного гена *ErbB2*. При этом количество молекул Her2/neu на мембране опухолевых клеток недостаточно для возникновения выраженных онкогенных эффектов. Транскрипция гена *ErbB2* регулируется молекулами ряда кофакторов, в частности, принадлежащими к семейству AP-2 (AP-2 α и AP-2 γ) и SRC. При условии достаточного количества молекул таких кофакторов происходит транскрипция гена *ErbB2*, приводящая к синтезу умеренного количества его белкового продукта — молекул Her2/neu.

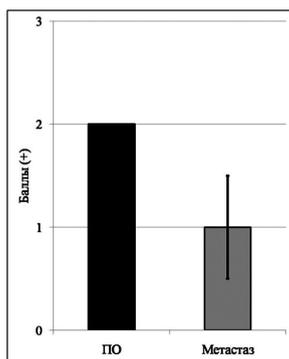


Рис. 1. Уровни экспрессии Her2/neu в ткани первичной опухоли (ПО) и регионарных метастазов при раке молочной железы в случаях с неопределенным уровнем экспрессии (2+) Her2/neu в ткани первичной опухоли.

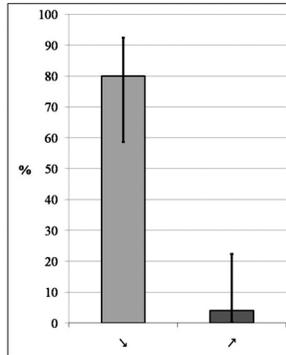


Рис. 2. Частоты случаев с понижением и с повышением уровня экспрессии Her2/neu при регионарном метастазировании рака молочной железы в исследованной группе случаев.

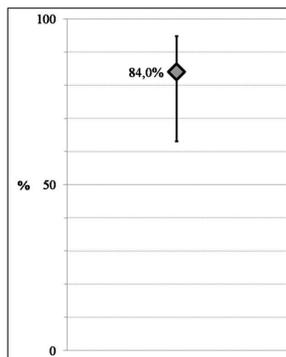


Рис. 3. Частота совпадений Her2/neu-статусов ткани первичной опухоли и регионарных метастазов в исследованной группе случаев.

В случаях с неопределенным уровнем экспрессии онкобелка Her2/neu (2+) развитие опухоли происходит за счет других механизмов активации различных этапов онкогенеза, в частности, метастазирования. При этом кофакторы транскрипции AP-2 и SRC, необходимые для их реализации, могут быть вовлечены в процессы транскрипции различных генов, и не участвовать в транскрипции ErbB2. В таком случае экспрессия онкобелка Her2/neu клетками метастазов будет отсутствовать [12].

В люминальных подтипах рака молочной железы основным внутриклеточным активатором онкогенных механизмов является молекула рецептора к эстрогену. Ядерные рецепторы к эстрогену способны

образовывать комплексы с молекулами SRC и изменять соотношение молекул AP-2 α и AP-2 γ , что ведет к существенному снижению транскрипции гена ErbB2 [13]. В большинстве случаев, включенных в данную работу, при неопределенном уровне экспрессии Her2/neu (2+) и умеренном уровне экспрессии рецепторов к эстрогену в ткани первичной опухоли наблюдалось одновременное снижение уровня экспрессии Her2/neu до уровня экспрессии 1+ или 0 и повышение уровня экспрессии рецепторов к эстрогену до высокого уровня в ткани метастазов.

Выводы

1. В случаях с неопределенным уровнем экспрессии онкобелка Her2/neu (2+) в ткани первичной опухоли при раке молочной железы уровень экспрессии этого биомаркера понижается при регионарном метастазировании.

2. Her2/neu-статус опухолевой ткани сохраняется при метастазировании рака молочной железы в случаях с неопределенным уровнем экспрессии Her2/neu в ткани первичной опухоли.

ЛИТЕРАТУРА

1. Франк Г.А., Завалишина Л.Э., Пожариский К.М. Рак молочной железы. Практическое руководство для врачей. М.: Практическая медицина; 2014.

2. Lakhani S.R., Ellis I.O., Schnitt S.J., Tan P.H., van de Vijver M.J. WHO Classification of Tumors of the Breast. Lyon: IARC; 2012.

3. Кит О.И., Дерижанова И.С., Карнаухов Н.С. Вопросы классификации нейроэндокринных опухолей желудка. Вопросы онкологии. 2016; 62 (5): 573-579.

4. Wolff A.C., Hammond M.E.H., Hicks D.G., Dowsett M., McShane L.M., Allison K.H. 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. Arch. Pathol. Lab. Med. 2014; 138 (2): 241–56.

5. Coates A.S., Winer E.P., Goldhirsch A., Gelber R.D., Gnant M., Piccart-Gebhart M. et al. Tailoring therapies - improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. Ann. Oncol. 2015; 26 (8): 1533–1546.

6. Gnant M., Harbeck N., Thomssen C. St. Gallen/Vienna 2017: A Brief

Summary of the Consensus Discussion about Escalation and De-Escalation of Primary Breast Cancer Treatment. *Breast Care*. 2017; 12 (2): 102–107.

7. Aitken S.J., Thomas J.S., Langdon S.P., Harrison D.J., Faratian D. Quantitative analysis of changes in ER, PR and HER2 expression in primary breast cancer and paired nodal metastases. *Ann. Oncol.* 2010; 21 (6): 1254–1261.

8. Ufen M.-P., Kohne C.H., Wischneswky M., Wolters R., Novopashenny I., Fischer J., et al. Metastatic breast cancer: are we treating the same patients as in the past?. *Ann. Oncol.* 2013; 25 (1): 95–100.

9. Aurilio G., Disalvatore D., Pruneri G., Bagnardi V., Viale G., Curigliano G., et al. A meta-analysis of oestrogen receptor, progesterone receptor and human epidermal growth factor receptor 2 discordance between primary breast cancer and metastases. *Eur. J. Cancer.* 2014; 50 (2): 277–289.

10. Thompson A.M., Jordan L.B., Quinlan P. Prospective comparison of switches in biomarker status between primary and recurrent breast cancer: the Breast Recurrence In Tissues Study (BRITS). *Breast. Cancer. Res.* 2010; 12 (6): R92.

11. Moasser M.M. The oncogene HER2; Its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene.* 2007; 26 (45): 6469–6487.

12. Hurst H.C. Update on HER-2 as a target for cancer therapy: the ERBB2 promoter and its exploitation for cancer treatment. *Breast cancer res.* 2001; 3 (6): 395–398.

13. Powe D.G., Akhtar G., Habashy H.O., Abdel-Fatah T., Rakha E.A., Green A.R. et al. Investigating AP-2 and YY1 protein expression as a cause of high HER2 gene transcription in breast cancers with discordant HER2 gene amplification. *Breast. Cancer. Res.* 2009; 11 (6): R90.