

Радаев Никита Евгеньевич, студент

Номер группы: МБЛ-401

Российский университет дружбы народов (РУДН) имени Патриса

Лумумбы

ФЛЮОРЕСЦЕНТНАЯ ГИБРИДИЗАЦИЯ IN SITU (FLUORESCENT IN SITU HYBRIDIZATION — FISH) ГЕНА HER2/NEU

Введение

Флуоресцентная гибридизация in situ (FISH, от англ. Fluorescent In Situ Hybridization) — это лабораторный метод, используемый для визуализации конкретных последовательностей ДНК на хромосомах. Относится к методам цитогенетики. Метод основан на использовании флуоресцентных зондов, которые комплементарно связываются с целевыми молекулами нуклеиновых кислот. Огромный интерес в практической медицине представляет обнаружение гена HER2/neu. Гиперэкспрессия данного гена может приводить к возникновению особого вида рака груди (HER2/neu-положительного), лечение которого зачастую возможно таргетной терапией без употребления агрессивной и тяжелой для пациента химиотерапии. Традиционно для поиска гиперэкспрессии гена HER2/neu использовалась процедура иммуногистохимии (сокращенно и далее — ИГХ), но с 1990-2000-х годов стала возможным новая более точная процедура поиска данного гена — флуоресцентная гибридизация in situ (на английском “Fluorescent In Situ Hybridization”, сокращенно и далее — “FISH”). В данном реферате будут затронуты темы диагностики рака груди (особенно метода FISH), протокола проведения FISH гена HER2/neu, краткой истории данного метода, часто совершаемыми ошибками при совершении метода, а также влияния HER2/neu статуса на лечение рака груди.

Основная часть

Рак груди является одним из наиболее часто диагностируемых видов онкологии — 22,9% в мире (Ghoncheh M, Pournamdar Z, Salehiniya H. Incidence and mortality and epidemiology of breast cancer in the world. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2016;17(S3):43–46. doi: 10.7314/apjcp.2016.17.s3.43. doi:10.7314/apjcp.2016.17. s3.43; <https://koreascience.or.kr/article/JAKO201608967044280.page>); в России цифры подобные — 23% (Состояние онкологической помощи населению России в 2018 году под ред. Каприна А.Д., Старинского В.В., Петровой Г.В./- М.: МНИОИ им. П.А. Герцена филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России; 2019). В 2019 году рак груди был диагностирован у 73 366 женщин в России (Состояние онкологической помощи населению России в 2018 году под ред. Каприна А.Д., Старинского В.В., Петровой Г.В./- М.: МНИОИ им. П.А. Герцена филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России; 2019). Риск возникновения данного заболевания связан с менопаузой у женщин; пик заболеваемости приходится на 35-55 лет. Важно отметить, что рак груди также может встречаться и у мужчин, но это происходит крайне редко — около 1% случаев (Plasilova ML, Hayse B, Killelea BK, Horowitz NR, Chagpar AB, Lannin DR. Features of triple-negative breast cancer: analysis of 38,813 cases from the national cancer database. *Medicine (Baltimore)* 2016. ; 95 (35): e4614; doi: 10.1097/MD.0000000000004614; <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27583878/>).

Ген HER2/neu (историческое название “ERBB2”) — это ген, кодирующий белок HER2 (от английского “Human Epidermal growth factor Receptor 2” — “Рецептор 2 эпидермального фактора роста человека”), который является рецептором для фактора роста эпидермиса. Этот белок играет важную роль в регуляции роста и деления клеток. Расположен на коротком плече 17-й хромосомы человека (17q12-21.32) (Ravi R, Haider G, Ahmed K, Zahoor S, Sami A, Lata R. Frequency of Hormone Receptors and Her-2/Neu Receptor Positivity In Different Histology In Breast Cancer Patients. J

Ayub Med Coll Abbottabad. 2020;32(3):323–326; <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32829544/>). При некоторых мутациях возможно многократное увеличение копий (амплификация) гена HER2/neu, что приводит к гиперэкспрессии белка HER2 и может приводить к возникновению некоторых видов рака: раку яичников, желудка, поджелудочной железы, предстательной железы, колоректальному раку, раку легких (Ahmad A, Bano U, Gondal M, Khan A. Her-2/neu Gene Overexpression in Breast Carcinoma and its association with clinicopathological characteristics of the disease. J Col Physicians Surg Pak. 2009;19(5):297–299; <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19409162/>) и особенно часто к раку груди. Рак груди может быть вызван разными причинами, но именно связанный с HER2 рак представляет огромный интерес для диагностики, так как только его возможно лечить более щадящей чем химиотерапией таргетной терапией. Основным лекарством таргетной терапии данного заболевания является открытый в 1991 году трастузумаб (альтернативное название — герцептин; одобрен Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (the Food and Drug Administration — FDA) в 1998 году) (N M Diaz, 2001; Laboratory testing for HER2/neu in breast carcinoma: an evolving strategy to predict response to targeted therapy, DOI: 10.1177/107327480100800504, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11579337/>; Geeta et al., 2019; FISH and HER2/neu equivocal immunohistochemistry in breast carcinoma, DOI: 10.4103/ijc.IJC_333_18, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31062729/>). HER2-положительными является 20-30% случаев рака груди (N M Diaz, 2001; Laboratory testing for HER2/neu in breast carcinoma: an evolving strategy to predict response to targeted therapy, DOI: 10.1177/107327480100800504, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11579337/>). В последнее время (с 1990-2000-х, на практике широко употребляется с 2010-х) используется Флуоресцентная гибридизация in situ (FISH-анализ) гена HER2/neu. Данный

анализ высокоточный и чувствительный, но сравнительно финансово затратный, доступный не во всех сравнительно небольших городах.

Традиционно для поиска HER2/neu статуса при раке груди использовался иммуногистохимический (ИГХ) анализ, фактически представляющий собой модификацию Northern- (используется для фореаза (“разгонки”) мРНК) или Western- (используется для фореаза (“разгонки”) белков) блоттинга (N M Diaz, 2001; Laboratory testing for HER2/neu in breast carcinoma: an evolving strategy to predict response to targeted therapy, DOI: 10.1177/107327480100800504, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11579337/>). На практике чаще всего используется именно ИГХ белка HER2 (Westernblotting). Выделяют несколько стадий активности гена HER2/neu при определении по ИГХ:

- 1) 0-1 — отсутствие активности HER2/neu;
- 2) 2 — “серая зона” (промежуточный результат);
- 3) Более 3 — увеличенная экспрессия гена HER2/neu.

Метод ИГХ прост, надежен и дешев, но имеет огромный недостаток — на промежуточных значениях (2+) метод ИГХ часто выдает ложноположительные результаты, что может привести к неправильному лечению транстузумабом, которое не будет давать никакого положительного эффекта. Количество ложноположительных результатов — около 17%, что является высоким показателем ошибок для диагноза в онкологии (N M Diaz, 2001; Laboratory testing for HER2/neu in breast carcinoma: an evolving strategy to predict response to targeted therapy, DOI: 10.1177/107327480100800504, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11579337/>). В то же время, точность анализов с очень высокой или, наоборот, очень низкой экспрессией гена в методе ИГХ довольно высока. Поэтому большинство врачей-клиницистов к концу 2010-х годов пришло к выводу, что ИГХ может быть отличным скрининговым методом по поиску HER2/neu статуса пациента, но при любых значениях, близких к

промежуточным (около 2+), пациента необходимо направить на уточнение анализа FISH методом; при этом некоторые специалисты даже настаивают на том, что на FISH анализ должен быть направлен любой пациент вне зависимости от результатов ИГХ для подтверждения анализа (Zubaria Mukhtar et al., 2023; Correlation between HER2/neu protein overexpression on Immunohistochemistry and Fluorescent in Situ Hybridization (FISH) in breast carcinoma: Problems in developing countries; DOI: 10.12669/pjms.39.6.6704; <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37936749/>).

Главным аргументом в пользу широкого использования ИГХ метода в клинике до сих пор (2025 год) является его относительная дешевизна (вывод сделан при прочтении сравнительно большого количества указанных в разделе “Источники” статей за 2001-2023 годы). По состоянию на май 2025 года анализ определения HER2/neu статусом методом ИГХ стоил 5 730 рублей (округленно 71 доллар США), в то время как тот же анализ методом FISH стоил 35 085 рублей (округленно 433 доллара США) — то есть, можно заметить ощутимую разницу в 6,1 раз (Российская Федерация, город Москва, частная лаборатория “INVITRO”; <https://www.invitro.ru/analizes/for-doctors/svetliy/139/73314/>; <https://www.invitro.ru/analizes/for-doctors/139/38025/>).

Американское общество клинической онкологии (the American Society of Clinical Oncology — ASCO) и Коллегия американских патологоанатомов (the College of American Pathologists — CAP) рекомендуют следующий протокол FISH анализа активности гена HER2/neu (2018 год):

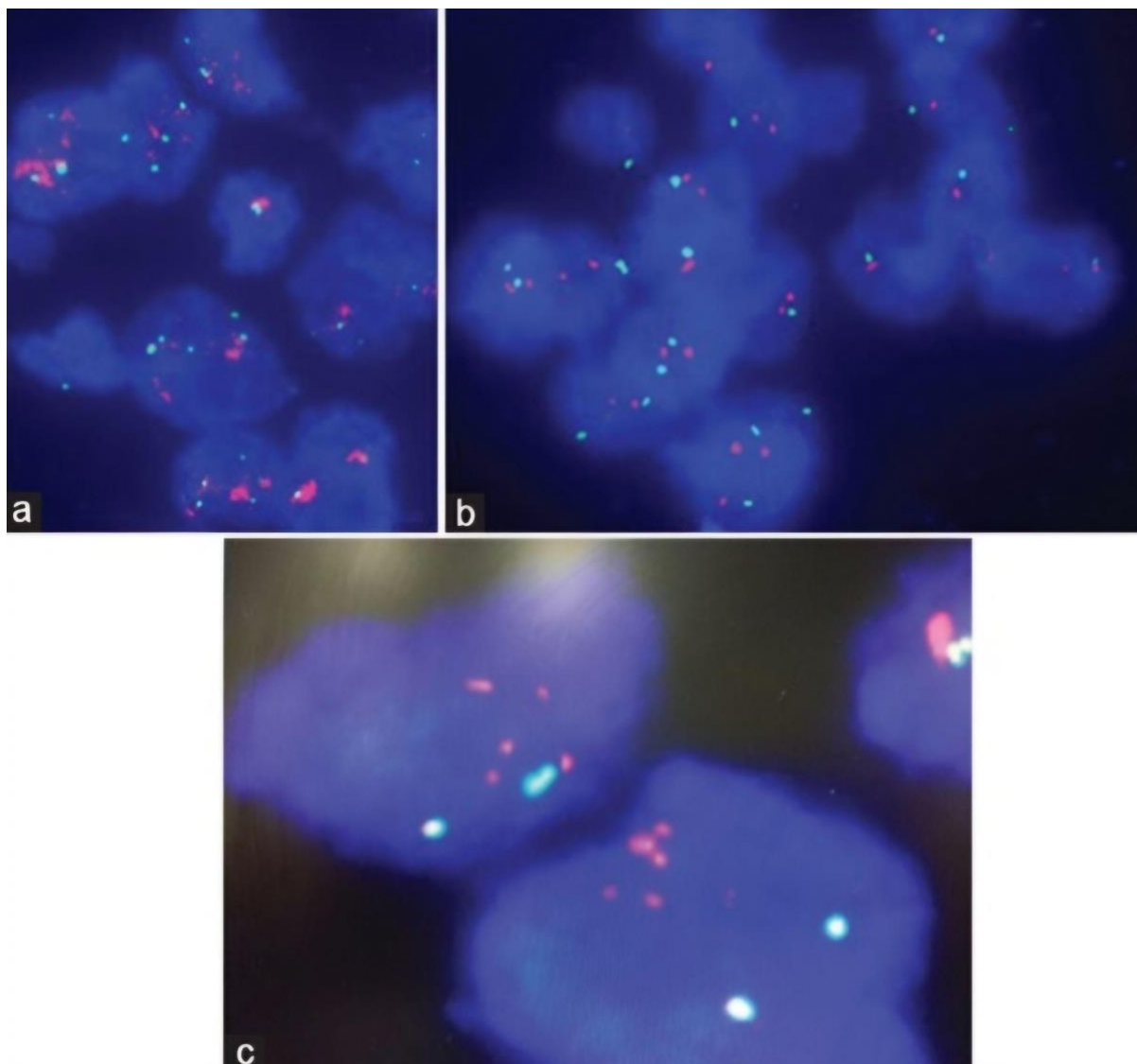
- 1) При FISH анализе активности гена HER2/neu использовать сразу два зонда: HER2 и CEP17. Зонд HER2 комплементарен последовательности гена HER2/neu, обычно имеет красный цвет. Зонд CEP17 является центромерным датчиком для определения хромосомы 17, обычно имеет зеленый цвет. Рекомендованный тип

- зонда CEP17: Path Vysion HER2 DNA Probe kit, Abbott Molecular (на русском: “Набор ДНК-зондов PathVysion HER2, Abbott Molecular”);
- 2) Расположить срезы опухолевой ткани толщиной 4-5 микрон на покрытых парафином предметных стеклах;
 - 3) Запекать в течение ночи при температуре 56°C;
 - 4) Предметные стекла депарафинизировать в ксилоле, обезвожить в 100% этаноле и высушить на воздухе;
 - 5) Препараты поместить в раствор для предварительной обработки (тиоцианит натрия);
 - 6) Предметные стекла поместить в раствор протеазы и оставить на водяной бане при температуре 37 °C на 25 минут;
 - 7) Обезвожить препараты с использованием 80%, 96% и 100% этанола в последовательные этапы по одной минуте каждый;
 - 8) Отметить целевой участок (метафазную пластинку с хромосомой 17);
 - 9) Применить зонды HER2 и CEP17 (HER2 для поиска гена HER2/neu, CEP17 — специфичный к хромосоме 17);
 - 10) Предметные стекла покрыть покровными и запечатать герметиком;
 - 11) Предметные стекла поместить в гибридизатор с заранее установленной программой;
 - 12) Произвести постгибризационные промывки буфером при комнатной температуре в течение 5 минут;
 - 13) Снять покровные стекла;
 - 14) Предметные стекла снова поместить в буфер на водяную баню при температуре 70 °C в течение пяти минут для промывки после гибридизации;
 - 15) Предметные стекла извлечь из водяной бани, промыть дистиллированной водой три раза;

- 16) Обезвожить препараты с использованием 70%, 86% и 96% этанола в последовательные этапы по одной минуте каждый;
- 17) Высушить препараты в темноте;
- 18) Нанести флуорохромные краситель DAPI;
- 19) Покрыть препараты покровными стеклами;
- 20) Провести контроль качества операции

Препараты просматривать под флуоресцентным микроскопом (например, “Olympus BX 51”, производитель: Япония) с использованием соответствующих фильтров (двух- и трехдиапазонные фильтры DAPI, FITC, TRITC). Цветовые сигналы должны быть обнаружены по крайней мере в 20 метафазных пластинках. Оценивать по зеленому и красному сигналам. Красные сигналы представляют копии гена HER2, а зеленые сигналы представляют копии гена CEP17. Найти среднее арифметическое каждого сигналов. Анализ строится по соотношению средних арифметических двух сигналов.

В то же время, даже в методе FISH возможны те или иные ошибки при приготовлении препарата. Недостоверны приблизительно 15% проб. Наиболее часто допускаемые ошибки: плохая фиксация, недостаточный объем опухоли, неправильное нанесение красителя на фрагменты биопсии, ошибки при транспортировке пробы опухоли в лабораторию (Zubaria Mukhtar et al., 2023; Correlation between HER2/neu protein overexpression on Immunohistochemistry and Fluorescent in Situ Hybridization (FISH) in breast carcinoma: Problems in developing countries; DOI: 10.12669/pjms.39.6.6704; <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37936749/>).



Изображение 1

- а — изображение флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH), показывающее положительные результаты амплификации гена HER2/neu: красные сигналы в кластерах по 8-10 и по 2 зеленых сигнала на ядро;
- б — изображение флуоресцентной гибридизации *in situ*, показывающее отрицательные результаты амплификации гена HER2/neu: 2-3 красных сигнала и 2 зеленых сигнала на ядро;
- в — изображение флуоресцентной гибридизации *in situ*, показывающее неоднозначные результаты амплификации гена HER2/neu: 2-5 красных сигналов и 2 зеленых сигнала на ядро

(Источник: Geeta et al., 2019; FISH and HER2/ neu equivocal immunohistochemistry in breast carcinoma, DOI: 10.4103/ijc.IJC_333_18, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31062729/>)



Изображение 2

Флуоресцентный микроскоп “Olympus BX 51”, производитель Япония
(Источник: <https://www.optimum-lab.ru/product/mikroskop-bx-51-prjamoj-issledovatelskij-olympus/>)

Заключение

Рак груди является широкораспространенным видом рака в современном мире. Определение HER2/neu статуса при раке груди является необходимым при построении стратегии лечения. HER2/neu статус можно

определить методами ИГХ (иммуногистохимия) и FISH (Fluorescent in Situ Hybridization — флуоресцентная гибридизация in situ). ИГХ анализ более простой и дешевый, но может давать ложноположительные результаты при промежуточных значениях, поэтому его рекомендуют использовать как массовый скрининговый метод. Метод FISH является более дорогим и сложным, содержит более 20 шагов при приготовлении препарата, а также требует дорогого высококлассного оборудования и высококвалифицированного специалиста-цитогенетика. В любом случае, обязательно нужно проводить контроль качества анализа во избежание ошибок при постановке диагноза и выборе стратегии лечения.

Источники

- 1) Состояние онкологической помощи населению России в 2018 году под ред. Каприна А.Д., Старинского В.В., Петровой Г.В./- М.: МНИОИ им. П.А. Герцена филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России; 2019
- 2) Ghoncheh M, Pournamdar Z, Salehiniya H. Incidence and mortality and epidemiology of breast cancer in the world. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2016; 17(S3):43–46. doi: 10.7314/apjcp.2016.17.s3.43. doi:10.7314/apjcp.2016.17.s3.43; <https://koreascience.or.kr/article/JAKO201608967044280.page>
- 3) Plasilova ML, Hayse B, Killelea BK, Horowitz NR, Chagpar AB, Lannin DR. Features of triple-negative breast cancer: analysis of 38,813 cases from the national cancer database. *Medicine (Baltimore)* 2016. ; 95 (35): e4614; doi: 10.1097/MD.0000000000004614; <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27583878/>
- 4) Ravi R, Haider G, Ahmed K, Zahoor S, Sami A, Lata R. Frequency of Hormone Receptors and Her-2/Neu Receptor Positivity In Different

- Histology In Breast Cancer Patients. J Ayub Med Coll Abbottabad. 2020;32(3):323–326; <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32829544/>
- 5) Ahmad A, Bano U, Gondal M, Khan A. Her-2/neu Gene Overexpression in Breast Carcinoma and its association with clinicopathological characteristics of the disease. J Col Physicians Surg Pak. 2009;19(5):297–299; <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19409162/>
 - 6) N M Diaz, 2001; Laboratory testing for HER2/neu in breast carcinoma: an evolving strategy to predict response to targeted therapy, DOI: 10.1177/107327480100800504, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11579337/>
 - 7) Geeta at al., 2019; FISH and HER2/ neu equivocal immunohistochemistry in breast carcinoma, DOI: 10.4103/ijc.IJC_333_18, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31062729/>
 - 8) Zubaria Mukhtar et al., 2023; Correlation between HER2/neu protein overexpression on Immunohistochemistry and Fluorescent in Situ Hybridization (FISH) in breast carcinoma: Problems in developing countries; DOI: 10.12669/pjms.39.6.6704; <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37936749/>