



Российское общество патологоанатомов
The Russian Society of Pathologists

117418 Москва, ул. Цюрупы, д. 3, Тел./факс +7 499 120 80 65,
Tsourupa Str. 3, Moscow 117418, Russia, Tel./Fax +7 499 120 80 65
E-mail: levkaktur@mail.ru, www.patolog.ru

КОНСЕНСУС

СОВЕТА ЭКСПЕРТОВ ПО ДИАГНОСТИКЕ РМЖ

(11 октября 2015 года, Москва)

Целью Консенсуса является внедрение в практику здравоохранения рационально обоснованных высокотехнологичных современных методов морфологического исследования у пациенток с раком молочной железы (РМЖ), С этой целью сформирован координационный совет по диагностике HER2 статуса при РМЖ, с утверждением главного референсного центра и референсных лабораторий.

КОНСЕНСУС

1. Утвержден состав координационного совета по диагностике РМЖ на 2016 год.

- Франк Георгий Авраамович
- Гриневич Вячеслав Николаевич
- Кудайбергенова Асель Галимовна
- Сазонов Сергей Владимирович
- Петров Семен Венедиктович
- Виноградов Игорь Юрьевич
- Завалишина Лариса Эдуардовна
- Мационис Александр Эдуардович

Функции координационного совета

- Внедрение рекомендаций по определению молекулярных подтипов РМЖ и оценке полного морфологического регресса опухоли
- Определение и утверждение статуса референсных лабораторий
- Определение порядка контроля качества проводимых исследований (референсный анализ)
- Разработка плана обучения

2. Сохранено, ранее утвержденное структурное деление с выделением главного референсного центра и референсной лаборатории в каждом регионе в 2015-2016 гг.

Главным референсным центром является Кафедра патологической анатомии РМАПО под руководством Франка Георгия Авраамовича

Референсные лаборатории на территории РФ на основе принципа территориальной целесообразности

	Референсная лаборатория
Москва	г. Москва, ПАО МГОБ №62
Центр	г. Рязань, ПАО ОКОД
Северо-Запад	г. Санкт-Петербург, ПАО НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова
Волга	г. Казань, ПАО РКОД МЗ РТ
Юг	г. Ростов-на Дону, РО ПАБ
Урал	г. Екатеринбург, ПАО, Институт МКТ

Функциями референсной лаборатории являются:

- Обеспечение референсного контроля и мониторинга качества исследований
- Организация и проведение обучающих циклов (морфологи, лаборанты)

3. Стандарты определения и интерпретации результатов ИГХ исследований и *insitu* гибридизации HER2-статуса.

При раке молочной железы HER2-статус оценивается только в инвазивном компоненте опухоли. Рак *in situ* оценке не подлежит, поскольку подобные структуры часто отличаются резко выраженной положительной реакцией.

- Оценивают только окрашивание мембраны клеток, цитоплазматическое окрашивание оценке не подлежит.
- Проводят обязательное сравнение интенсивности окрашивания опухолевых и нормальных структур. При ярком окрашивании мембран нормальных структур необходимо изменение протокола ИГХ исследования с использованием контрольных препаратов.
- В каждом цикле проведения ИГХ-исследования необходимо использовать контрольные срезы.
- Артефакты, связанные с неадекватной подготовкой материала, могут приводить к ошибочной интерпретации результатов.

В настоящее время интерпретацию результатов проводят по рекомендациям ASCO/CAP 2013 г. Результаты ИГХ-реакции оценивают с помощью балльной шкалы оценки: 0, 1+, 2+, 3+.

Иммуногистохимические критерии оценки HER2 - статуса при раке молочной железы.

- Опухоли, после проведенного ИГХ-исследования, оцененные как ИГХ 0 или 1+, считают HER2-негативными.
- Результат ИГХ 3+ расценивается как HER2-положительный. В настоящее время в качестве пограничного значения для оценки ИГХ 3+ принято однородное выраженное мембранное окрашивание более **10%** клеток.
- Результат ИГХ 2+ является неопределенным и требует выявления амплификации гена *HER2* методами гибридизации *insitu* на материале с тех же парафиновых блоков.

Порядок контроля качества проведения исследований на HER2 - статус.

Направление материала на референсный анализ является обязательным для всех лабораторий-участниц эпидемиологической программы скрининга HER2-статуса у пациенток с РМЖ.

Каждые четыре месяца на референсный анализ направляются:

- Каждый 20-й случай ИГХ из данной лаборатории.
- Каждый 10-й случай ИГХ из лаборатории с низким уровнем определения рецептора HER2 (ИГХ 3+ менее 10%).
- Все случаи ИГХ и/или ISH в течение месяца после начала проведения исследований.

Сроки предоставления ответа: до 20 рабочих дней от момента получения образца.

Не менее 75% случаев ИГХ оцененных как **2+** отправляются на ISH.

Примечание: На референсный анализ принимаются образцы ткани ТОЛЬКО вместе с предоставлением готовых гистологических и ИГХ препаратов. Материал, направляемый на референсный анализ должен сопровождаться полной клинической информацией, необходимой для заполнения всех параграфов в базе данных. Неправильно оформленные случаи возвращаются без проведения исследования.

Предложено внести в официальный протокол исследования требование об обязательном участие всех лабораторий в референсном анализе.

Вне зависимости от региона, по решению исследователя, материал может быть направлен непосредственно в Главный референсный центр.

4. Стандарты определения и интерпретации результатов ИГХ исследования экспрессии гормональных рецепторов

При наличии в образце как инвазивной, так и протоковой карциномы *in situ* оценка экспрессии гормональных рецепторов имеет значение только в инвазивном компоненте опухоли. При наличии в образце только карциномы *in situ* оценка рецепторного статуса опухоли возможна, в отличии от оценки HER2-статуса.

Оценка экспрессии гормональных рецепторов может проводиться, если в лаборатории выполнен хотя бы один из следующих пунктов:

- перед началом использования данного протокола проведена его валидация и установлено, что уровень конкордантности (совпадение результатов) для положительных результатов составляет не менее 90 %, а для отрицательных результатов — не менее 95 % по сравнению с клинически валидизированными методиками оценки экспрессии ER и PgR (ER/PR pharmDx Kit);
- перед началом использования данного протокола была проведена отработка методики, включающая определенный режим демаскировки, рекомендуемый производителем антител; выполняются текущие внутренние процедуры контроля качества, включающие использование отдельных контрольных препаратов с разными уровнями экспрессии ER и PgR в каждой серии тестов; контролируется технология проведения исследования, а также уровень подготовки врачей-патологоанатомов и лаборантов;
- эффективно налажен внешний контроль качества в соответствии с международными рекомендациями.

Интерпретация результатов иммуногистохимического исследования ER и PgR, уровень значимости

Установлено пограничное значение между отрицательным и положительным результатом ИГХ-исследования экспрессии ER на уровне 1 % и более.

PgR-статус представляет дополнительную ценную клиническую информацию, не зависящую от ER-статуса, особенно у пациенток в постменопаузе. Для предиктивной ценности уровень экспрессии PgR, так же как и ER, составляет 1 % и более.

В заключение по иммуногистохимическому исследованию должны включаться три пункта.

1. Процент/долю опухолевых клеток, окрашенных положительно. Для подсчета используются все участки опухоли в гистологическом срезе. Подсчет может проводиться вручную или с использованием автоматизированных анализаторов изображения. Информация о доле PgR-позитивных опухолевых клеток крайне важна, поскольку она имеет существенное значение для определения молекулярного подтипа опухоли. Опухоли с экспрессией PgR более 20 % относят к люминальному А подтипу, а опухоли с экспрессией PgR менее 20 % — к люминальному В подтипу.

2. Следует указывать интенсивность окрашивания (слабая/умеренная/выраженная). Оценку проводят, исходя из средней интенсивности окраски ядер всех опухолевых клеток в препарате относительно интенсивности окрашивания в контрольных образцах, покрашенных одновременно. Интенсивность окрашивания дает важную информацию для оценки качества проведенной ИГХ-реакции.

3. Заключение о проведенном исследовании, которое формулируется на основании следующих критериев:

а) положительной (для ER или PgR) считается реакция, при которой наблюдается ядерное окрашивание 1 % опухолевых клеток или более. Использование термина «неопределенное» окрашивание не рекомендуется;

б) отрицательной считается ядерная реакция любой интенсивности в менее 1 % опухолевых клеток при наличии корректной реакции в положительном контроле (в т. ч. внутреннем). Любой образец, в котором отсутствует внутренний контроль (нормальный эпителий молочной железы), демонстрирующий отрицательную реакцию с ER и/или PgR, необходимо интерпретировать как «не подлежащий оценке», а не как «отрицательный». В этом случае реакцию необходимо повторить с использованием другого блока или материала повторной биопсии;

в) реакция не подлежит оценке. Образец не подлежит оценке в случае, если любой из этапов проведения теста (преаналитический, аналитический, постаналитический) не соответствует принятым рекомендациям. Например, если для фиксации гистологического или цитологического образца использован спирт или другие фиксаторы, кроме 10% нейтрального забуференного формалина, время фиксации составило менее 6 или более 72 ч, время от удаления образца до фиксации составило более 1 ч, проводилась декальцинация в сильных кислотах, а также если получена неадекватная реакция во внутреннем и внешнем контролях (включая участки нормальной ткани молочной железы в препарате). В случае, если реакция не подлежит оценке, необходимо указать в заключении причину, а также по возможности протестировать другой подходящий образец опухоли от этого пациента.

Ограничения в оценке результатов исследования ER и PgR

Исследование проводится на адекватном объеме гистологического материала. При исследовании биопсийного материала столбики ткани должны содержать достаточное количество опухолевой ткани, позволяющее оценить гистологический тип и степень дифференцировки рака.

Образец нельзя использовать для проведения теста и следует заменить, если:

- получена неожиданная реакция в контрольных образцах (значительные вариации показателей в контроле в течение дня);
- артефакты окрашивания затрагивают большую часть площади образца;
- отсутствует положительная реакция в клетках нормального эпителия молочной железы и/или нормальном положительном контроле на том же стекле;
- образец подвергнулся декальцинации в сильных кислотах;
- образец демонстрирует отсутствие ER и наличие PgR;
- образец длительное время находился в состоянии холодной ишемии или время фиксации составило менее 6 ч либо более 72 ч.

5. ИГХ исследование экспрессии маркера пролиферации Ki-67

Исследование экспрессии Ki-67 следует обязательно проводить по операционному материалу, даже если перед началом лечения было выполнено ИГХ-исследование биопсийного материала. Результаты исследования могут значительно отличаться в биопсийном и операционном материале, особенно в случаях гетерогенного окрашивания опухоли, с чем могут быть связаны неудовлетворительные результаты неоадъювантной терапии.

Пороговое значение экспрессии Ki67 установлено на уровне 20%.

Для оценки индекса Ki-67 необходимо учитывать только ядерное окрашивание, но без учета его интенсивности, а также типа экспрессии маркера (перинуклеолярный, нуклеоплазменный, перихромосомный). Подсчет должен включать в себя не менее 500 опухолевых клеток (лучше не менее 1000), если протоколом не

установлены показания к подсчету меньшего количества клеток. Обычно подсчет проводят не менее чем в 3 полях зрения при увеличении 400×. В случае гетерогенности опухоли необходимо выбирать участки опухоли с наибольшей митотической активностью.

6. Оценка полного морфологического регресса опухоли

Морфологический регресс – это основной показатель чувствительности опухоли к проведенному лечению, а также важнейший фактор при планировании адъювантной терапии. Оценка степени морфологического регресса опухоли является на настоящий момент единственным доказательным способом, позволяющим предсказать ответ опухоли на лечение. Для определения эффективности терапии патологоанатом должен оценить остаточную опухоль и ложе удаленной опухоли.

Поскольку распространенность резидуального инвазивного рака, наряду со статусом лимфатических узлов, служит важным прогностическим фактором, при оценке степени морфологического регресса необходимо:

- установить и указать макроскопический размер (в двух измерениях, учитывая возможную асимметрию) остаточной опухоли, а также расстояние от края резекции;
- оценить клеточность остаточной опухоли;
- при микроскопическом исследовании следует отмечать дистрофические изменения опухолевых клеток, очаги некроза, фиброз и пролиферацию фибробластов, наличие лимфогистиоцитарной инфильтрации, ксантомных клеток и многоядерных макрофагов типа «лечебных гигантов», ангиоматоз.

В последнее время достигнут заметный успех в неоадъювантной терапии HER2-позитивного РМЖ, продолжается разработка и оценка эффективности новых препаратов и терапевтических схем. Хотя неоадъювантная терапия не равнозначна по своему эффекту хирургическому лечению, ответ на нее считается мощным прогностическим фактором. Помимо этого, она дает возможность проводить органосохраняющее лечение у пациенток с крупными опухолями.

Определение полного морфологического регресса (pCR – pathologic Complete Response) рака молочной железы после неoadьювантной терапии дает возможность предсказать вероятность благоприятного исхода лечения пациентки в долговременной перспективе и является суррогатным маркером эффективности неoadьювантного лечения ранних стадий агрессивных подтипов РМЖ для ускоренной оценки эффективности новых терапевтических схем. Во многих клинических исследованиях показано, что более высокий уровень pCR связан с более продолжительной общей и безрецидивной выживаемостью. Люминальные подтипы РМЖ являются исключением, так как, несмотря на низкую частоту pCR, характеризуются более высоким уровнем выживаемости. С этой закономерностью связана низкая корреляция pCR и выживаемости при люминальном раке. Наиболее хорошо эта корреляция обнаруживается для агрессивных молекулярно-биологических подтипов (HER2-позитивный, трижды негативный).

Наилучшим образом корреляция между полным морфологическим регрессом pCR и выживаемостью выявляется при определении pCR как отсутствие опухоли в молочной железе и лимфоузлах. Наличие карциномы *in situ* (DCIS – Ductal carcinoma *in situ*) в молочной железе практически не влияет на прогноз. Однако, патологоанатому следует отмечать наличие карциномы *in situ* для возможного последующего анализа течения заболевания у данной конкретной пациентки, особенно если очаги расположены вне основного опухолевого узла, тем более, в крае резекции.

В настоящее время для оценки pCR наиболее объективной признана система RCB (Residual Cancer Burden – «ложе остаточной опухоли»), которая подразумевают использование расчетного индекса, по величине которого судят о прогнозе, при этом полному морфологическому регрессу соответствует нулевое значение индекса и отсутствие региональных метастазов.

Для расчета индекса «RCB»используется 4 параметра:

- Размер ложа опухоли в 2-х измерениях (d1 и d2)
- Клеточность остаточной опухоли (f)
- Число лимфоузлов с метастазами (LN)

- Наибольший диаметр метастаза (d met)
Кроме того, учитывается компонент карциномы in situ.
- Четыре степени:
- **RCB – 0** (pCR) – значение индекса 0;
- **RCB – I** (min остаточная опухоль) <1,36;
- **RCB - II** (умеренная остаточная опухоль) - 1,36-3,28;
- **RCB – III** (выраженная остаточная опухоль) >3,28.

Для подсчета следует использовать онлайн-калькулятор (www.mdanderson.org/breastcancer_RCB), который позволяет определить риск отдаленного метастазирования для данной пациентки.

Для адекватного морфологического заключения и оценки регресса РМЖ патологоанатом должен иметь полную информацию о первичной опухоли, ее локализации и размерах по данным физических методов и пальпации. Это связано с тем, что неточность в идентификации ложа опухоли может привести к ошибочному заключению о наличии pCR. Под воздействием терапии структура опухоли изменяется и границы становятся нечеткими. Если узел невозможно определить визуально, зона, указанная в направлении, исследуется тотально. Только в этом случае можно достоверно подтвердить полную резорбцию опухоли. Если в первичном очаге обнаруживаются микрокальцинаты, можно использовать рентгенографию для облегчения поиска остаточной опухоли. Рекомендуемый алгоритм действий для определения морфологического регресса РМЖ после неoadьювантной терапии приведен в таблице 1.

Таблица 1.

Алгоритм определения морфологического регресса РМЖ

Диагностический этап		
Определение размера опухоли перед началом лечения по результатам физикальной и лучевой диагностики	Толстоигольная биопсия первичной опухоли под контролем УЗИ. Количество фрагментов, адекватное размеру узла.	Толстоигольная биопсия лимфатических узлов при наличии данных об их поражении.
Постановка металлической метки при биопсии		

<p>Морфологическое заключение по результатам биопсии:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Наличие инвазии • Гистологический тип опухоли • Молекулярно-биологический тип опухоли • Степень дифференцировки 	
Лечебный этап	
<p>Удаление первичной опухоли и лимфоузлов Направление на гистологию:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Дозы и сроки неoadъювантной терапии • Сведения о признаках клинического регресса опухоли • Размеры и локализация первичной опухоли по данным пальпации и лучевых методов исследования до начала и после лечения 	
Морфологическое заключение по операционному материалу	
<p>Маркировка краев резекции краской Контроль условий преаналитического этапа (быстрое помещение ткани в формалин, условия фиксации и проводки, температура парафина при заливке)</p>	
<p>Макроскопическое исследование</p> <ul style="list-style-type: none"> • Оценка полноты резекции • Описание обнаруженных изменений в зоне локализации первичного очага • Тщательное измерение остаточной опухоли 	<p>Вырезка материала</p> <ul style="list-style-type: none"> • Взятие для микроскопического исследования адекватного размеру опухоли числа фрагментов • Тотальное исследование зоны опухоли, указанной в направлении, если узел невозможно определить визуально • Определение ложа опухоли и присутствия его в крае резекции
<p style="text-align: center;">Микроскопическое исследование</p> <ul style="list-style-type: none"> • Определение размера наибольшей области, содержащей очаги резидуальной опухоли в двух измерениях • Определение протяженности наибольшего очага инвазивной опухоли • Определение средней клеточности в наибольшем срезе опухоли • Определение гистологического типа и степени злокачественности рака 	
<p style="text-align: center;">Оценка статуса лимфатических узлов</p> <ul style="list-style-type: none"> • Указать размер наибольшего метастаза • Измерить максимальное расстояние между очагами опухоли, включая области с фиброзом • Отметить наличие лечебного эффекта и число лимфатических узлов, в которых был выявлен эффект от лечения • Провести ИГХ-исследование лимфатических узлов (при необходимости) 	
<p>Определение полного морфологического регресса Отсутствие инвазивной карциномы в ложе опухоли Отсутствие опухолевых клеток в лимфатических узлах Отсутствие ложа опухоли в крае резекции</p>	

Для удобства оценки pCR и проведения последующего статистического анализа рекомендуется заполнять учетную карточку (таблица 2.).

Таблица 2.

Учетная карточка пациента

Учетная карточка		
1.	ФИО	
2.	Дата рождения (возраст)	
3.	Менструальный статус	
4.	Гинекологический статус	
5.	Стадия сTNM	
6.	Сторона поражения	
		<i>До лечения</i>
		<i>После лечения</i>
7.	Возможность обнаружения опухолевого узла при пальпации	
8.	Размер опухолевого узла (пальпаторно)	
9.	Состояние регионарных л/узлов (пальпаторно)	
10.	Локализация опухоли в молочной железе по данным пальпации	
11.	Сопутствующие клинические факторы	
12.	Возможность обнаружения опухолевого узла при УЗИ	
13.	Локализация опухоли в молочной железе по данным УЗИ	
14.	Размер опухолевого узла в молочной железе по данным УЗИ	
15.	Возможность обнаружения опухолевого узла при ММГ	
16.	Локализация опухоли в молочной железе по данным ММГ	
17.	Размер опухолевого узла в молочной железе по данным ММГ	
18.	Возможность обнаружения опухолевого узла при МР-ММГ	
19.	Локализация опухоли в	

	молочной железе по данным МР-ММГ		
20.	Размер опухолевого узла в молочной железе по данным МР-ММГ		
21.	Множественность узлов при пальпации		
22.	Множественность узлов при УЗИ		
23.	Множественность узлов при ММГ		
24.	Множественность узлов при МР-ММГ		
25.	Данные УЗИ по состоянию регионарных л/узлов		
26.	Данные УЗИ по количеству пораженных л/узлов		
27.	Данные УЗИ по локализации пораженных л/узлов		
28.	ММГ (при попадании аксиллярных зон в снимок)		
29.	Данные ММГ по количеству пораженных л/узлов		
30.	МР-ММГ признаки пораженных л/узлов		
31.	Данные МР-ММГ по количеству пораженных л/узлов		
32.	Данные МР-ММГ по локализации пораженных л/узлов		
33.	Другие методы обнаружения очагов опухоли		
34.	Цитологическое заключение тонкоигольной (FNA) биопсии		
35.	Цитологическое заключение тонкоигольной (FNA) биопсии пораженного л/у		
36.	Гистологическое заключение core-биопсии первичного лимфоузла		
37.	Гистологическое заключение эксцизионной биопсии пораженного л/узла		

38.	Гистологические неблагоприятные факторы прогноза		
39.	Рецепторный статус по ER, PR в первичном материале		
40.	Ki 67 в первичном материале		
41.	Her2/neu в первичном материале		
42.	FISH в первичном материале		
43.	Мутации генов BRCA 1,2?		
44.	Запланированный первичный этап лечения		
45.	Режим неоадъювантной химиотерапии		
46.	Гистологически размер удаленного л/узла		
47.	Гистологические неблагоприятные факторы в п/о материале		
48.	Гистологически количество метастатических л/узлов		
49.	Степень морфологического регресса опухоли		
50.	Стадия урTNM		

7. Запланировано участие лабораторий в международной системе контроля качества NordiQC в 2016 году.

- Продолжение участия в протоколах
IHC: HER2, ER/PR, Ki67
ISH: HER2
- Координатор участия лабораторий в международной системе контроля качества NordiQC в 2015-2016 гг. - Кудайбергенова Асель Галимовна

8. Утвержден план обучения по каждому региону в 2016 году.

Утвержден план обучения морфологов в 2015-2016 гг.