

ВНУТРИОПУХОЛЕВАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ АМПЛИФИКАЦИИ В HER2/neu-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПОДТИПАХ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Лариса Николаевна ВАЩЕНКО¹, Лариса Эдуардовна ЗАВАЛИШИНА²,
Ирина Аркадьевна ПАВЛЕНКО³, Патриция Едмундовна ПОВИЛАЙТИТЕ³

¹ Ростовский научно-исследовательский онкологический институт Минздрава России
344037, г. Ростов-на-Дону, ул. 14-я линия, 63

² Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования
Минздрава России
125993, г. Москва, ул. Баррикадная, 2/1, стр. 1

³ Патолого-анатомическое бюро
344015, г. Ростов-на-Дону, ул. Благодатная, 170а

Люминальный В HER2/neu-положительный и HER2/neu-положительный (не люминальный) подтипы рака молочной железы (РМЖ) характеризуются амплификацией гена *HER2/neu* и гиперэкспрессией соответствующего белка на мембране опухолевых клеток. Для лечения пациентов с HER2/neu-положительным РМЖ разработаны и применяются в различном режиме и комбинациях несколько таргетных препаратов, однако их использование существенно ограничено первичной или приобретенной резистентностью, в основе которой лежит множество факторов, в том числе и генетическая гетерогенность опухоли. Целью нашей работы было оценить гетерогенность амплификации HER2/neu в HER2/neu-положительных подтипах РМЖ – люминальном В HER2/neu-положительном и HER2/neu-положительном (не люминальном). **Материал и методы.** В исследование вошли 210 пациентов с неопределенной (2+) иммуногистохимической оценкой экспрессии HER2/neu, которым в рамках первичной диагностики РМЖ выполняли FISH-исследование с двойной флуоресцентной меткой для оценки статуса гена *HER2/neu*. **Результаты и их обсуждение.** В ходе исследования было выявлено, что ген *HER2/neu*, экспрессия которого имеет основополагающее значение в патогенезе люминального В HER2/neu-положительного и HER2/neu-положительного (не люминального) РМЖ, характеризуется выраженным гетерогенным характером амплификации в 31 % случаев. При этом как гетерогенные мы интерпретировали опухоли, содержащие клетки с соотношением HER2/CEP17 < 2 и количеством копий гена $4 \leq HER2/neu < 6$, т.е. клетки с отсутствием амплификации гена *HER2/neu*. Группы люминальных В и HER2/neu-положительных опухолей статистически значимо не различались по количеству гетерогенных по амплификации *HER2/neu*. В ходе ROC-анализа была установлена диагностическая значимость показателя HER2/CEP17 для выявления гетерогенности опухоли: пороговое значение показателя, при котором достигалась диагностическая эффективность 95 %, составило 2,6. **Заключение.** Гетерогенность амплификации *HER2/neu* обнаруживается при FISH-анализе в 31 % случаев РМЖ и не зависит от принадлежности опухоли к люминальному В HER2/neu-положительному или HER2/neu-положительному (не люминальному) подтипу. Если в образце опухоли с положительным HER2/neu-статусом соотношение HER2/CEP17 $\leq 2,6$, такой образец с вероятностью 95 % будет содержать минорные субклоны без амплификации *HER2/neu*. Феномен гетерогенности амплификации *HER2/neu* в HER2/neu-положительных опухолях может иметь важное значение при прогнозировании исхода заболевания и выбора тактики лечения РМЖ.

Ключевые слова: рак молочной железы, внутриопухолевая гетерогенность, амплификация гена *HER2*, флуоресцентная гибридизация *in situ*, таргетная терапия.

Конфликт интересов. Все авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

Автор для переписки: Павленко И.А., e-mail pavlenko.ir@gmail.com

Для цитирования: Ващенко Л.Н., Завалишина Л.Э., Павленко И.А., Повилайтите П.Е. Внутриопухолевая гетерогенность амплификации в HER2/neu-положительных молекулярно-генетических подтипах рака молочной железы. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2019; 39 (5): 134–140. doi: 10.15372/SSMJ20190516.

INTRATUMORAL AMPLIFICATION HETEROGENEITY IN *HER2/neu*-POSITIVE BREAST CANCER MOLECULAR-GENETIC SUBTYPES

Larisa Nikolaevna VASHCHENKO¹, Larisa Eduardovna ZAVALISHINA²,
Irina Arkadyevna PAVLENKO³, Patritsiya Edmundovna POVILAITITE³

¹ Rostov Research Institute of Oncology of Minzdrav of Russia
344037, Rostov-on-Don, 14th Line, 63

² Russian Medical Academy of Continuous Professional Education of Minzdrav of Russia
125993, Moscow, Barrikadnaya, 2/1, bldg. 1

³ Rostov Regional Bureau of Pathology
344015, Rostov-on-Don, Blagodatnaya, 170a

The defining feature of *HER2/neu*-positive Luminal B and *HER2/neu*-positive (non-luminal) subtype breast cancer is *HER2/neu* gene amplification and protein overexpression on cancer cell membrane. The *HER2*-targeted therapy is nowadays available for patients with *HER2*-positive breast cancer. However, a significant fraction of *HER2*+ tumors acquire or possess intrinsic mechanisms of resistance, based on multiple factors, and genetic heterogeneity among them. The aim of our study was to quantify the heterogeneity of *HER2/neu* amplification in *HER2/neu*-positive Luminal B and *HER2/neu*-positive (non-luminal) subtypes of breast cancer. **Material and methods.** A retrospective analysis of 210 cases referred for dual probe fluorescence in situ hybridization (FISH) confirmation of an immunohistochemical equivocal 2+ result was performed. **Results.** Our results demonstrated a heterogeneous amplification pattern of *HER2/neu* gene, whose expression is a substantial cause of *HER2/neu*-positive Luminal B and *HER2/neu*-positive (non-luminal) subtypes of breast cancer, in 31 % of invasive breast cancer cases. As heterogeneous, we interpreted tumors containing cells with *HER2/CEP17* ratio < 2 and gene copies $4 \leq \text{HER2/neu} < 6$, that is, those without *HER2/neu* amplification. The amount of heterogeneous tumors between *HER2/neu*-positive Luminal B and *HER2/neu*-positive (non-luminal) subtypes was not statistically significant. ROC analyses identified optimal cutoff point for *HER2/CEP17* ratio as 2.6 for distinguishing heterogeneous tumors. **Conclusion.** The heterogeneity of *HER2/neu* amplification is determined by FISH in 31 % of cases and is independent of molecular breast cancer subtype. If a *HER2/neu*-positive breast cancer has *HER2/CEP17* ratio $\leq 2,6$, it contains minor subclones without *HER2/neu* amplification with a probability of 95 %. Our results demonstrated that *HER2/neu* amplification heterogeneity may be important for prognosis of survival and treatment decisions.

Key words: breast cancer, intratumoral heterogeneity, *HER2* gene amplification, fluorescence in situ hybridization (FISH), targeted therapy.

Conflict of interests. Authors declare lack of the possible conflicts of interests.

Correspondence author: Pavlenko I.A., e-mail pavlenko.ir@gmail.com

Citation: Vashchenko L.N., Zavalishina L.E., Pavlenko I.A., Povilaitite P.E. Intratumoral amplification heterogeneity in *HER2/neu*-positive breast cancer molecular-genetic subtypes. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2019; 39 (5): 134–140. [In Russian]. doi: 10.15372/SSMJ20190516.

Рак молочной железы (PMЖ) относится к одному из самых распространенных злокачественных новообразований: в структуре онкологической заболеваемости он занимает первое место по численности среди женщин [2]. Диагностика PMЖ, помимо верификации гистологического варианта опухоли, предполагает и обязательное установление ее молекулярного фенотипа. Изначально предложенная С. Perou в 2000 г., молекулярная классификация PMЖ претерпела значительные изменения и базируется в настоящее время не на анализе генной экспрессии, а на суррогатном иммуногистохимическом определении экспрессии рецепторов к эстрогенам (ER) и

прогестерону (PgR), белка *HER2/neu* и маркера пролиферации Ki-67. Различают несколько молекулярных подтипов PMЖ, характеризующихся особенностями течения и прогноза: люминальный А, люминальный В *HER2/neu* негативный, люминальный В *HER2/neu*-положительный, трижды-негативный, *HER2/neu*-положительный [22]. Два из них – люминальный В *HER2/neu*-положительный и *HER2/neu*-положительный (не люминальный) – отличаются от остальных подтипов PMЖ амплификацией гена *HER2/neu* и гиперэкспрессией соответствующего белка на мембране опухолевых клеток. Люминальные В *HER2/neu*-положительные случаи PMЖ состав-

ляют около 30 % всех люминальных В опухолей и характеризуются фенотипом ER+, PgR+/-, HER2/neu+ и высокой пролиферативной активностью (Ki-67 > 20 %) [24]. HER2/neu-положительные случаи РМЖ (не люминальные) – агрессивные опухоли, как правило, с высоким пролиферативным индексом и, как следствие, быстрым ростом и склонностью к отдаленному метастазированию (чаще всего в головной мозг) [24].

Оба HER2/neu-положительных подтипа РМЖ характеризуются высокой вероятностью негативного исхода заболевания и низкими показателями общей выживаемости [9, 24]. Связано данное обстоятельство с амплификацией гена *HER2/neu* и вызванной этим aberrантной экспрессией онкопротеина на мембране опухолевых клеток. Гиперэкспрессия белка HER2/neu, являющегося трансмембранным рецептором, вызывает конститутивную активацию множества сигнальных каскадов (PI3K/AKT, RAS/MAPK/ERK, JAK/STAT), участвующих в реализации таких механизмов онкогенеза, как увеличение времени жизни клетки, повышенная пролиферативная активность, приобретение способности к инвазивному росту и индукция ангиогенеза.

На сегодняшний день для лечения пациентов с HER2/neu-положительным РМЖ разработаны и применяются в различном режиме и комбинациях несколько таргетных препаратов – трастузумаб (Herceptin), лапатиниб (Tykerb), пертузумаб (Perjeta), трастузумаб эмтанзин (Kadcyla) [4]. Определение статуса *HER2/neu* в рамках первичной морфологической диагностики является рутинным методом оценки чувствительности к таргетной терапии [5]. На первом этапе HER2/neu-тестирования в баллах от 0 до 3+ оценивается экспрессия белка HER2/neu иммуногистохимическим (ИГХ) методом. Негативными по HER2/neu-статусу считаются опухоли с оценками 0 и 1+. HER2/neu-положительные опухоли характеризуются экспрессией HER2/neu на уровне 3+. Неопределенный результат 2+ не позволяет уверенно судить о статусе гена *HER2/neu*. В таких случаях обязательно должно проводиться исследование амплификации гена *HER2/neu* с помощью гибридизации *in situ* с использованием флуоресцентных меток (fluorescence *in situ* hybridization, FISH) или хромогенов (chromogenic *in situ* hybridization, CISH).

Четкий алгоритм проведения HER2/neu-тестирования и интерпретации результатов изложен в рекомендациях американского общества клинической онкологии и коллегии американских патологов (ASCO/CAP) [25]. Согласно этим рекомендациям, анти-HER2/neu таргетную терапию должны получать только те пациенты, которые

имеют HER2/neu статус 3+ или 2+ (FISH/CISH-положительные). В клинической практике применение таргетной терапии у пациентов с HER2/neu-позитивным РМЖ приводит к заметному улучшению результатов лечения [4, 9].

РМЖ демонстрирует значительную генетическую гетерогенность, в том числе гетерогенность амплификации *HER2/neu* [6, 16]. Многочисленные исследования указывают на то, что сосуществование в пределах одной опухоли клеток с различным HER2/neu-статусом во многом определяет ответ на таргетную терапию, а также объясняет феномен резистентности к проводимому лечению [6, 7, 23]. Показано, что опухоли с неопределенным результатом ИГХ-тестирования (2+) примерно в одной трети случаев являются гетерогенными по амплификации *HER2/neu* [17, 26].

Целью нашей работы было оценить гетерогенность амплификации *HER2/neu* в двух молекулярно-генетических HER2/neu-положительных подтипах РМЖ, люминальном В HER2/neu-положительном и HER2/neu-положительном (не люминальном) и объяснить ее с биологической точки зрения.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследование вошли 210 пациентов, которым в 2018 г. в рамках первичной диагностики РМЖ на базе Патолого-анатомического бюро (г. Ростов-на-Дону) проводили оценку уровня экспрессии белка HER2/neu и которые получили неопределенную оценку 2+ по результатам ИГХ-тестирования. ИГХ-исследование экспрессии HER2/neu осуществлялось на автостейнере «Ventana Benchmark GX» («Ventana», США) по стандартному протоколу с использованием моноклональных антител к HER2/neu (клон 4B5). Для FISH-исследования использовали набор «HER2 IQFISH pharmDx» («Agilent Technologies», Дания). Статус гена *HER2/neu* оценивали при FISH-исследовании с использованием двухцветных зондов на центромеры 17-й хромосомы (CEP17) и ген *HER2/neu* в соответствии с рекомендациями ASCO/CAP в редакции 2018 г. [25]. Межгрупповые сравнения проводили с помощью критерия Манна – Уитни, а в случае категориальных переменных использовали критерий χ^2 . Различия считали статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$. Диагностическую значимость зависимости гетерогенности амплификации HER2/neu в опухоли от показателя HER2/CEP17, а также оптимальное значение точки отсечения (cut-off value) по показателям чувствительности и специфичности оценивали с помощью

ROC-анализа в программе easyROC (<http://www.biosoft.hacettepe.edu.tr/easyROC/>). Проведение исследования одобрено локальным Комитетом по биомедицинской этике и соответствовало этическим нормам Хельсинкской декларации 2000 г.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Из 210 образцов опухолевой ткани с неопределенным уровнем экспрессии *HER2/neu* (ИГХ 2+) амплификация гена *HER2/neu* при FISH-исследовании выявлена в 36 случаях, на основе которых формировалась итоговая анализируемая выборка. Следует отметить, что обнаруженная нами доля *HER2/neu*-положительных случаев РМЖ в опухолях с неопределенным уровнем экспрессии *HER2/neu* (17,1 %) сопоставима с данными L. Yang et al. (17,8 %) [27] и С. Murray et al. (17,4 %) [15], чьи исследования были выполнены на гораздо более многочисленном материале, что свидетельствует о репрезентативности нашей выборки. Итоговую анализируемую выборку составили 29 образцов, поскольку в семи случаях амплификация *HER2/neu* визуализировалась при FISH-исследовании в виде кластеров, количественный учет которых произвести было невозможно. 22 образца принадлежали к люминальному В подтипу РМЖ, остальные семь были *HER2/neu*-положительными (не люминальными). Известно, что распределение молекулярно-биологических подтипов меняется в зависимости от стадии опухоли, но независимо от конкретных цифр процентное соотношение количества случаев *HER2/neu*-положительного и люминального В с амплификацией *HER2/neu* РМЖ примерно одинаково [3]. В группе же РМЖ с неопределенным по ИГХ *HER2/neu*-статусом наблюдается диаметрально противоположная картина – большинство опухолей с ИГХ-экспрессией *HER2/neu* на уровне 2+ являются люминальными В. Этот факт отмечался в различных исследованиях и раньше, хотя причины такой диспропорциональности остаются неизученными [10, 20].

Отличий по количеству копий гена *HER2/neu* в двух исследуемых группах не было: критерий Манна – Уитни $U_{(7,22)} = 76,5$, $p > 0,05$. При анализе характера амплификации *HER2/neu* обращал на себя внимание размах значений числа копий *HER2/neu*, свидетельствующий о высокой вариабельности данного показателя. Существенные отличия копийности гена *HER2/neu* между клетками одной и той же опухоли отмечены многими исследователями [7, 12, 18]. В основе такой гетерогенности лежит сам механизм интрахромосомной амплификации генов – повторяющиеся циклы VFB (Breakage-Fusion-Bridge). Каждый

VFB-цикл начинается с двуцепочечного разрыва (breakage) ДНК с последующим «слипанием» (fusion) концов сестринских хроматид и образованием «мостика» (bridge). В результате образуется нестабильная дицентрическая хромосома, в которой во время анафазы митоза происходит следующий двуцепочечный разрыв и VFB-цикл повторяется [1]. Поскольку количество двуцепочечных разрывов и, соответственно, VFB-циклов в каждой клетке абсолютно случайно, это и приводит к вариабельности амплификации, визуально определяющейся методом FISH.

Подсчет соотношения *HER2/CEP17* в каждой учтенной опухолевой клетке каждого образца и соотнесение его с количеством копий *HER2/neu* позволил обнаружить, что в 31 % случаев РМЖ присутствуют клетки с соотношением *HER2/CEP17* < 2 и количеством копий гена *HER2/neu* $4 \leq HER2/neu < 6$. Рекомендации ASCO/CAP в редакции 2018 г. относят такие опухоли (с некоторыми допущениями, как то: пересмотр ИГХ и трактовка на основе данных ИГХ и FISH в совокупности, повторный подсчет FISH-сигналов) к *HER2/neu*-негативным [25]. Поэтому мы интерпретировали клетки с соотношением *HER2/CEP17* < 2 и количеством копий гена $4 \leq HER2/neu < 6$, как клетки с отсутствием амплификации гена *HER2/neu*, а опухоли, их содержащие, – как гетерогенные. Количество гетерогенных по амплификации *HER2/neu* опухолей не различалось в исследуемых нами группах: 31,8 % при люминальном В *HER2/neu*-позитивном и 28,5 % при *HER2/neu*-положительном ($\sigma^2 = 0,094$; $p = 0,759$).

Поделив анализируемую выборку, без привязки к молекулярно-генетическим подтипам, на две группы – имеющих и не имеющих опухолевые клетки без амплификации, мы обнаружили статистически значимые их различия. В группе с гетерогенной амплификацией значения *HER2/CEP17* были меньше, чем в группе, в которой все учтенные клетки характеризовались наличием амплификации *HER2/neu*: соответственно 2,50 (95%-й доверительный интервал (95 % ДИ) 2,06–2,60) и 4,56 (95 % ДИ 3,57–5,94), $U_{(9,20)} = 8,5$; $p < 0,0001$. Данные группы различались и по количеству копий гена *HER2/neu* на ядро, $U_{(9,20)} = 17$; $p = 0,0002$. Количество копий гена *HER2/neu* в группе опухолей с гетерогенной амплификацией составило 6,35 (95 % ДИ 4,75–6,6), в группе без таковой – 9,08 (95 % ДИ 7,55–11,35).

Для оценки диагностической значимости наличия в опухоли клеток без амплификации от показателей копийности гена *HER2/neu* и среднего значения *HER2/CEP17* был применен метод ROC-анализа. Показатель, который интересовал

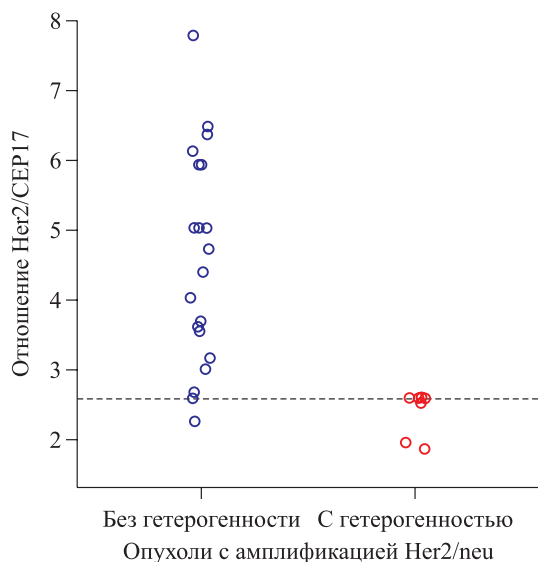


Рис. 1. Диаграмма распределения образцов опухолей относительно оптимального порогового значения показателя *HER2/CEP17* 2,6

Fig. 1. Diagram of distribution of tumor patterns as relating to optimal threshold level of *HER2/CEP17* 2,6

нас в первую очередь – площадь под ROC-кривой (area under curve, AUC). AUC для *HER2/neu* составил 0,905, а для *HER2/CEP17* – 0,952. Поскольку AUC для *HER2/CEP17* приближается к 1, целесообразно рассматривать этот показатель в качестве диагностически оптимального. Значение *HER2/CEP17*, при использовании которого в качестве порогового достигается максимальная диагностическая эффективность (95 %) – 2,6 (рис. 1). Чувствительность оценки гетерогенности опухоли по показателю *HER2/CEP17* составляет 1,0 (95 % ДИ от 0,664 до 1); специфичность – 0,9 (95 % ДИ от 0,683 до 0,988). Эти значения, соответствующие показателю порогового значения *HER2/CEP17*, наглядно видны на ROC-кривой (рис. 2).

Существование генетической гетерогенности – пространственной и временной – отличительная черта РМЖ, что отмечается во многих исследованиях [8, 13, 23]. Вероятно, появление нескольких субклонов в пределах одной опухоли является одним из способов изменения ее злокачественного потенциала [14]. В нескольких ретроспективных исследованиях показано, что случаи гетерогенного РМЖ ассоциированы с плохим прогнозом [11, 21]. Авторы объясняют прогрессию заболевания существованием резистентных к терапии субклонов опухоли, получающих конкурентное преимущество на фоне проводимого лечения. Поэтому определение и характеристика таких клонов имеют не только научный

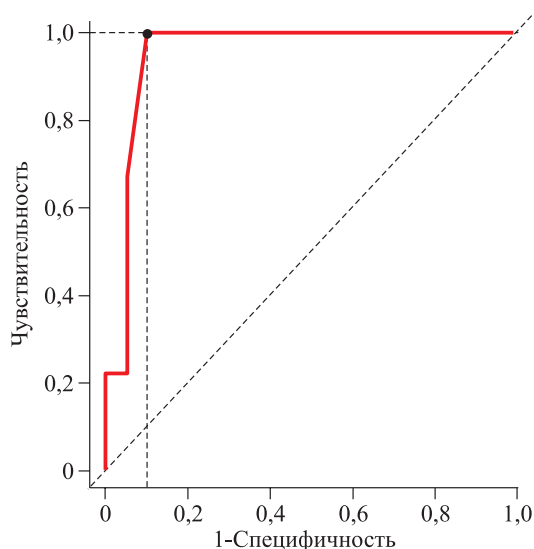


Рис. 2. ROC-кривая предиктора гетерогенности амплификации *HER2/neu* – показателя *HER2/CEP17*. Отмечены показатели чувствительности и специфичности (в долях) для порогового значения показателя *HER2/CEP17* 2,6

Fig. 2. ROC-curve of amplification heterogeneity predictor *HER2/neu* – indicator of *HER2/CEP17*. Marked the sensitivity and specificity indicators (in fractions) for the *HER2/CEP17* 2,6 indicator threshold level

интерес, но и непосредственное отношение к прогнозу течения и выбору тактики лечения заболевания. Так, например, показано, что случаи РМЖ с высокой вариабельностью количества копий гена *HER2/neu* и присутствием клеток без амплификации на фоне доминантной *HER2/neu*-положительной опухоли имеют более высокий риск прогрессии и развития отдаленных метастазов по сравнению с гомогенными по амплификации *HER2/neu*-положительными опухолями, а также с опухолями с отрицательным *HER2/neu*-статусом [19].

Амплификация *HER2/neu*, вероятно, вносит значительный вклад в появление опухолевых клонов *de novo*, генетическое и клональное разнообразие РМЖ. Таргетная анти-*HER2/neu* терапия, действуя на чувствительные к ней *HER2/neu*-позитивные клетки, тем самым может способствовать селективному отбору минорных субклонов с отрицательным *HER2/neu*-статусом и прогрессии заболевания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Паттерн амплификации *HER2/neu* идентичен в случаях люминального В и *HER2/neu*-положительного РМЖ и характеризуется большой внутриопухолевой вариабельностью. Присутствие в

ткани опухоли клона с амплификацией *HER2/neu* не исключает наличия минорных субклонов с отрицательным *HER2/neu*-статусом, которым могут быть присущи другие генетические aberrации. В ходе ROC-анализа установлена диагностическая значимость показателя *HER2/CEP17* для выявления гетерогенности опухоли: пороговое значение, при котором достигалась максимальная диагностическая эффективность (95 %), составило 2,6. Таким образом, если при FISH-исследовании с двойной флуоресцентной меткой обнаружена амплификация гена *HER2/neu* и при этом соотношение $HER2/CEP17 \leq 2,6$, образец опухоли с вероятностью 95 % будет содержать минорные субклоны без амплификации *HER2/neu*. Феномен обнаруженной нами гетерогенности амплификации *HER2/neu* в части *HER2/neu*-положительных РМЖ может иметь важное значение при прогнозировании исхода заболевания и выбора тактики лечения РМЖ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Завалишина Л.Э., Данилова Н.В., Мационис А.Э., Павленко И.А. Особенности амплификации генов на длинном плече 17-й хромосомы в различных молекулярно-генетических подтипах рака молочной железы. *Арх. патологии.* 2014; 76 (2): 8–12.
2. Zavalishina L.E., Danilova N.V., Matsionis A.E., Pavlenko I.A. Specific features of gene amplification on the long arm of chromosome 17 in different molecular genetic subtypes of breast cancer. *Архив патологии = Archiv of Pathology.* 2014; 76 (2): 8–12. [In Russian].
3. Злокачественные новообразования в России в 2017 году (заболеваемость и смертность). Ред. А.Д. Каприн, В.В. Старинский, Г.В. Петрова. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2018. 250 с.
4. Malignant tumours in Russia in 2017 (morbidity and mortality). Eds. A.D. Kaprin, V.V. Starinsky, G.V. Petrova. Moscow, 2018. 250 p. [In Russian].
5. Колядина И.В., Поддубная И.В., Франк Г.А., Комов Д.В., Карселадзе А.И., Ермилова В.Д., Вишневецкая Я.В. Гетерогенность рака молочной железы I стадии: биологическое и прогностическое значение. *Злокачеств. опухоли.* 2015; 4 (1): 35–45. doi: 10.18027/2224-5057-2015-1-31-40.
6. Kolyadina I.V., Poddubnaya I.V., Frank G.A., Komov D.V., Karseladze A.I., Ermilova V.D., Vishnevskaya Ya.V. Heterogeneity of stage I breast cancer: biological and prognostic value. *Zlokachestvennye opukholi = Malignant Tumours.* 2015; 4 (1): 35–45. [In Russian]. doi: 10.18027/2224-5057-2015-1-31-40.
7. Стенина М.Б. *HER2* как мишень современной противоопухолевой терапии рака молочной железы. *Эффектив. фармакотерапия.* 2015; (10): 24–31.
8. Stenina M.B. *HER2* as a target for modern anti-tumor therapy of breast cancer. *Effektivnaya farmakoterapiya = Effective Pharmacotherapy.* 2015; (10): 24–31. [In Russian].
9. Рак молочной железы. Практическое руководство для врачей. Ред. Г.А. Франк, Л.Э. Завалишина, К.М. Пожарисский. М.: РМАПО, 2014. 168 с.
10. Breast cancer. Practical guide for doctors. Eds. G.A. Frank, L.E. Zavalishina, K.M. Pozharisky. Moscow, 2014. 168 p. [In Russian].
11. Beca F., Polyak K. Intratumor heterogeneity in breast cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2016; 882: 169–189. doi: 10.1007/978-3-319-22909-6_7.
12. Buckley N.E., Forde C., McArt D.G., Boyle D.P., Mullan P.B., James J.A., Maxwell P., McQuaid S., Salto-Tellez M. Quantification of *HER2* heterogeneity in breast cancer-implications for identification of subdominant clones for personalised treatment. *Sci. Rep.* 2016; 6: 23383. doi: 10.1038/srep23383.
13. Ellsworth R.E., Blackburn H.L., Shriver C.D., Soon-Shiong P., Ellsworth D.L. Molecular heterogeneity in breast cancer: State of the science and implications for patient care. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2017; 64: 65–72. doi: 10.1016/j.semcdb.2016.08.025.
14. Krishnamurti U., Silverman J.F. *HER2* in breast cancer: a review and update. *Adv. Anat. Pathol.* 2014; 21 (2): 100–107. doi: 10.1097/PAP.0000000000000015.
15. Landmann A., Farrugia D.J., Diego E., Bonaventura M., Soran A., Johnson R., Dabbs D.J., Clark B., Brufsky A., Davidson N.E., Lembersky B.C., Jankowitz R.C., Puhalla S., Ahrendt G.M., McAuliffe P.F., Bhargava R. *HER2* equivocal breast cancer and neoadjuvant therapy: Is response similar to *HER2*-positive or *HER2*-negative tumors? *J. Clin. Oncol.* 2016; 34 (Suppl. 15): 612. doi: 10.1200/JCO.2016.34.15_suppl.612.
16. Lipinski K.A., Barber L.J., Davies M.N., Ashenden M., Sottoriva A., Gerlinger M. Cancer Evolution and the Limits of Predictability in Precision Cancer Medicine. *Trends Cancer.* 2016; 2 (1): 49–63. doi: 10.1016/j.trecan.2015.11.003.
17. Marotta M., Onodera T., Johnson J. Budd G.T., Watanabe T., Cui X., Giuliano A.E., Niida A., Tanaka H. Palindromic amplification of the *ERBB2* oncogene in primary *HER2*-positive breast tumors. *Sci. Rep.* 2017; 7: 41921. doi: 10.1038/srep41921.
18. Martelotto L., Ng C.K., Piscuoglio S., Weigelt B., Reis-Filho J.S. Breast cancer intra-tumor heterogeneity. *Breast Cancer Res.* 2014; 16: 210. doi: 10.1186/bcr3658.
19. McGranahan N., Swanton C. Clonal heterogeneity and tumor evolution: past, present, and the future. *Cell.* 2017; 168 (4): 613–628. doi: 10.1016/j.cell.2017.01.018.
20. Murray C., D'Arcy C., Gullo G., Flanagan L., Quinn C.M. Human epidermal growth factor receptor 2 testing by fluorescent in situ hybridization: positive or negative? ASCO/College of American Pathologists

- guidelines 2007, 2013, and 2018. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2019; 143 (4): 412–413. doi: 10.5858/arpa.2018-0905-LE.
16. Ng C.K., Martelotto L.G., Gauthier A., Wen H.C., Piscuoglio S., Lim R.S., Cowell C.F., Wilkerson P.M., Wai P., Rodrigues D.N., Arnould L., Geyer F.C., Bromberg S.E., Lacroix-Triki M., Penault-Llorca F., Giard S., Sastre-Garau X., Natrajan R., Norton L., Cottu P.H., Weigelt B., Vincent-Salomon A., Reis-Filho J.S. Intra-tumor genetic heterogeneity and alternative driver genetic alterations in breast cancers with heterogeneous HER2 gene amplification. *Genome Biol.* 2015; 16 (1): 107. doi: 10.1186/s13059-015-0657-6.
17. Nitta H., Kelly B.D., Allred C., Jewell S., Banks P., Dennis E., Grogan T.M. The assessment of HER2 status in breast cancer: the past, the present, and the future. *Pathology Int.* 2016; 66: 313–324 doi: 10.1111/pin.12407.
18. Pekar G., Kasselaki I., Pekar-Lukacs A., Dekany C., Hellberg D., Tot T. Equivocal (HER2 IHC 2+) breast carcinomas: gene-protein assay testing reveals association between genetic heterogeneity, individual cell amplification status and potential treatment benefits. *Histopathology.* 2019; 74 (2): 300–310. doi: 10.1111/his.13733.
19. Rye I.H., Trinh A., Saetersdal A.B., Nebdal D., Lingjaerde O.C., Almendro V., Polyak K., Børresen-Dale A.L., Helland Å., Markowitz F., Russnes H.G. Intratumor heterogeneity defines treatment-resistant HER2+ breast tumors. *Mol. Oncol.* 2018; 12 (11): 1838–1855. doi: 10.1002/1878-0261.12375.
20. Sapino A., Maletta F., Verdun di Cantogno L., Macri L., Botta C., Gugliotta P., Scalzo M.S., Annaratone L., Balmativola D., Pietribiasi F., Bernardi P., Arisio R., Viberti L., Guzzetti S., Orlassino R., Ercolani C., Mottolise M., Viale G., Marchio C. Gene status in HER2 equivocal breast carcinomas: impact of distinct recommendations and contribution of a polymerase chain reaction-based method. *Oncologist.* 2014; 19 (11): 1118–1126. doi: 10.1634/theoncologist.2014-0195.
21. Seol H., Lee H.J., Choi Y., Lee H.E., Kim Y.J., Kim J.H., Kang E., Kim S.W., Park S.Y. Intratumoral heterogeneity of HER2 gene amplification in breast cancer: its clinicopathological significance. *Mod. Pathol.* 2012; 25: 938–948.
22. Sorlie T. The impact of gene expression patterns in breast cancer. *Clin. Chem.* 2016; 62 (8): 1150–1151. doi: 10.1373/clinchem.2015.253229.
23. Turashvili G., Brogi E. Tumor heterogeneity in breast cancer. *Front. Med.* 2017; 4: 227. doi: 10.3389/fmed.2017.00227.
24. Velloso F.J., Bianco A.F., Farias J.O., Torres N.E., Ferruzo P.Y., Anschau V., Jesus-Ferreira H.C., Chang T., Sogayar M.C., Zerbini L.F., Correa R.G. The crossroads of breast cancer progression: insights into the modulation of major signaling pathways. *Onco Targets Ther.* 2017; 10: 5491–5524. doi: 10.2147/OTT.S142154.
25. Wolff A.C., Hammond M.E.H., Allison K.H., Harvey B.E., McShane L.M., Dowsett M. HER2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline focused update summary. *J. Oncol. Pract.* 2018; 4 (7): 437–441. doi: 10.1200/JOP.18.00206.
26. Wu Y., Wu K., Chen Z., Zheng W., Zhang L., Yu Y., Su D., Liu S., Sheng Y. Genetic heterogeneity of HER2/Neu in breast carcinoma: a meta analysis. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2017; 10 (2): 1900–1908.
27. Yang L., Zhang Z., Li J., Chen M., Yang J., Fu J., Bu H., Tang S., Liu Y., Li H., Li X., Xu F., Teng X., Yang Y., Ma Y., Guo S., Wang J., Guo D. A decision tree-based prediction model for fluorescence in situ hybridization HER2 gene status in HER2 immunohistochemistry-2+ breast cancers: a 2538-case multicenter study on consecutive surgical specimens. *J. Cancer.* 2018; 9 (13): 2327–2333. doi: 10.7150/jca.25586.

Сведения об авторах:

Ващенко Л.Н., д.м.н., проф., ORCID: 0000-0003-2267-3460, e-mail: rnioi@list.ru
Завалишина Л.Э., д.б.н., проф., ORCID: 0000-0002-0677-7991, e-mail: pat.rmapo@rmapo.ru
Павленко И.А., ORCID: 0000-0002-4578-8263, e-mail: ropab@aaanet.ru
Повилайтите П.Е., к.б.н., ORCID: 0000-0002-0934-0349, e-mail: ropab@aaanet.ru

Information about authors:

Vashchenko L.N., doctor of medical sciences, professor, ORCID: 0000-0003-2267-3460, e-mail: rnioi@list.ru
Zavalishina L.E., doctor of biological sciences, ORCID: 0000-0002-0677-7991, e-mail: pat.rmapo@rmapo.ru
Pavlenko I.A., ORCID: 0000-0002-4578-8263, e-mail: ropab@aaanet.ru
Povilaitite P.E., candidate of biological sciences, ORCID: 0000-0002-0934-0349, e-mail: ropab@aaanet.ru