Хөхний хорт хавдрын үеийн *HER2* генийн оношилгоо

Э.Цолмончимэг[1], Г.Болор-Эрдэнэ[2], Б.Энхжаргал[2], Ж.Сарантуяа[1], Б.Мөнхцэцэг[1]

[1]АШУҮИС
[2]ХСҮТ
Цахим хаяг: tsolmonchimeg8@gmail.com, Утас: 99993052

Түлхүүр үг:
Иммуногистохими, Байран эрлийзжүүлэг арга, оношилгоо

Товч утга:
Үндэслэл: Хөхний хавдартай эмэгтэйчүүдэд *HER2* генийн идэвхижлийг тодорхойлсноор өвчтний эмчилгээний төлөвлөгөөг боловсруулах цаашлаад өвчтний тавиланг сайжруулах ач холбогдолтой байдаг[1]. Учир нь *HER2* хэт идэвхижилтэй хөхний хавдартай өвчтөнүүдэд tanstuzumab, lapatinib, бай эмчилгээг сонгон, стандарт хими эмчилгээтэй хамт хавсран хэрэглэдэг байна[2,3]. Одоогоор манай орны хавдар судлалын практикт энэхүү генийн судалгаа цөөхөн байгаа нь бидний судалгааны ажлын үндэслэл болсон юм. **Зорилго:** Монгол улсад оношлогдсон хөхний хорт хавдартай эмэгтэйчүүдэд *HER2* оношилгооны алгоритмд хамаарагдах уураг (IHC) болон генийн идэвхжлийг (ISH) тогтоох. **Материал арга зүй:** Судалгааг Хавдар Судлалын Үндэсний Төвийн Эмгэг Судлалын тасгийн 2017-2018 онуудад хөхний хорт хавдраар оношлогдон хөх тайрах хагалгааны 30 архивын материалууд дээр ажилласан ба эмгэг судлалын үнэлгээг формалинд бэхжүүлсэн эдийн парафин цутгамаг дээр гемотоксилин-эозины будаг ашиглан иммуногистохими (IHC) шинжилгээ хийж гүйцэтгэсэн. Иммуногистохимийн урвалыг тооцохдоо ASCO/CAP-ийн үнэлгээний удирдамжийн дагуу үнэлгээг өгнө[4]. HER2 уураг эргэлзээтэй буюу хоёр нэмэх (2++) үр дүнтэй гарсан хоёр тохиолдолд, мөн IHC шинжилгээгээр эерэг гэж батлагдсан гурван нэмэх (3+++) нэг тохиолдолд хяналт болгон байран эрлийзжүүлгийн аргаар (ISH) генийн идэвхжлийг тогтоож үзлээ. **Үр дүн:** Судалгаанд хамрагдсан 30 архивын материалуудад HER2 рецептор үнэлэх иммуногистохимийн шинжилгээ хийхэд 9% нь эерэг (+++), 6.6% эргэлзээтэй (++), үлдсэн хувь нь сөрөг (+ ба -) ялгарал муу эсийн хавдрууд байлаа. Бид эргэлзээтэй 2 дээж болон эерэг нэг дээжинд IHC шинжилгээ хийж үзэхэд эргэлзээтэй (2++) нэг өвчтөн болон, эерэг хариу гарсан (3+++) өвчтөнд *HER2* генийн олшрол тодорхойлогдсон. Иймээс бидний судалгааны үр дүн нь нийт 30 дээжнээс 4 буюу 13.3% нь эерэг хариу гарсан байна. **Дүгнэлт:** Иммуногистохимийн шинжилгээгээр нийт 30 дээжний 13.3% нь эерэг байгаа нь Монгол оронд *HER2* эерэг бай эмчилгээ шаардлагатай тохиолдол харьцангуй их байгаа нь ажиглагдаж байна. Иммуногистохими болон эрлийзжүүлгийн шинжилгээний дүнгээс харахад хөхний хавдрын оношилгоонд иммуногисохими болон гибриджүүлэг, молекул генетик цогц оношилгооны алгоритм зайлшгүй шаардлагатайг харуулж байна.

Үндэслэл: Хөхний хорт хавдар нь дэлхий дахинд эмэгтэйчүүдийн дунд тохиолдох хавдрын тохиолдлын нэгдүгээр байрыг эзэлж, жилд оношлогдож байгаа нийт хорт хавдрын 25%-ийг, нийт нас баралтын 15%-ийг эзэлдэг[3]. Манай оронд хөхний хорт хавдар нь нийт хорт хавдар дотор 6-р байранд, эмэгтэйчүүдийн хорт хавдрын тохиолдлын 4-р байрыг эзэлж, шинээр оношлогдсон хөхний хорт хавдартай өвчтөнүүдийн 10 хүрэхгүй хувь эрт үедээ, 50-аас илүү хувь хожуу үедээ оношлогдож байна. Хавдар нь удамшлын болон удамшлын бус гадны хүчин нөлөөгөөр үүсэж болох ба генетикийн болон эпигенетикийн хавсарсан болон дараалсан өөрчлөлтүүдээс үүссэн генийн бүрдэлтэй байдаг. Иймээс хавдрын шалтгаан, даамжралыг судалж

ойлгосноор хувь хүнд тохирсон оношилгоо эмчилгээг хөгжүүлэх нь чухал ач холбогдолтой[5]. The human epidermal growth factor 2 (*HER2*)-ийн хэт идэвхижил нь нийт хөхний хавдрын 15-20%-д тодорхойлогддог. *HER2* ген нь 17-р хромосомын q21 дээр байрладаг эпидермийн өсөлтийн хүчин зүйлийн рецептор (EGFR) ийн бүлэгт багтдаг. Энэхүү ген нь тирозин киназа идэвхит трансмембраны гликопротейнийг кодлодог бөгөөд энэ нь EGFR-тай нягт холбоотой ба эсийн ургалт, ялгаран хөгжилд чухал үүрэгтэй[6]. *HER2* генийн хэт идэвхижил нь хавдрын хэмжээ, лимфийн булчирхайн үсэрхийлэл, ануэплоид ба стеройд дааврын рецепторын тоо буурах зэрэгтэй шууд хамааралтай байгаа нь ажиглагдсан бөгөөд эдгээр хүчин зүйлүүд нь хавдрын эсийн ургалтын нэмэгдүүлэхэд нөлөөлдөг байна[7]. *HER2* ген идэвхижихэд судас үүсэлт (angiogenesis) ба судасны хучуур эсийн өсөлтийн хүчин зүйл (vascular epithelial growth factor, VEGF)-ийн нийлэгжилт нэмэгддэг болохыг олон судалгаагаар тогтоосон[8]. Хөхний хавдартай өвчтнүүдэд *HER2* генийн идэвхижлийг илрүүлэх ДНХ, мРНХ болон уургийн бүтээгдэхүүний түвшинг тодорхойлох хэд хэдэн аргууд хэрэглэдэг бөгөөд хөхний хавдартай өвчтнүүдэд *HER2* генийн идэвхижлийг тодорхойлсноор *HER2* генийн бүтээгдхүүнд чиглэсэн бай эмчилгээг (trastuzumab) төлөвлөх нь өвчтний эдгэрэл, тавиланг сайжруулдаг[9].

Гадны судлаачид генийн идэвхижлийг тодорхойлох үр дүнтэй бөгөөд өртөг багатай шинжилгээний аргыг эрж хайсаар байгаа бөгөөд одоогоор хамгийн түгээмэл хэрэглэгдэж буй арга нь иммуногистохими ба гибриджүүлгийн хосолсон арга юм[7]. Хөхний хавдартай эмэгтэйчүүдэд *HER2* генийн идэвхижлийг тодорхойлсноор өвчтний эмчилгээний төлөвлөгөөг боловсруулах цаашлаад өвчтний тавиланг сайжруулах ач холбогдолтой байдаг. Учир нь *HER2* хэт идэвхижилтэй хөхний хавдартай өвчтөнүүдэд tanstuzumab, lapatinib, бай эмчилгээг сонгон, стандарт хими эмчилгээтэй хамт хавсран хэрэглэдэг байна[5]. Одоогоор манай орны хавдар судлалын практикт энэхүү генийн судалгаа цөөхөн байгаа нь бидний судалгааны ажлын үндэслэл болсон юм.

Зорилго: Монголд оношлогдсон хөхний хорт хавдартай эмэгтэйчүүдэд *HER2* оношилгооны алгоритмд хамаарагдах уураг (IHC) болон генийн идэвхжлийг (ISH) тогтоох.

Материал арга зүй: Судалгааг нэг агшингийн судалгааны загварыг ашиглан Хавдар Судлалын Үндэсний Төвийн Эмгэг Судлалын тасгийн 2017-2018 онуудад хөхний хорт хавдраар оношлогдон хөх тайрах хагалгааны 30 архивын материалууд дээр ажилласан.

Иммуногистохимийн шинжилгээний арга: Парафин цутгамагийг 5-7 μМ-ийн зузаантай микротомоор зүсэж 400С усан баннанд тавиур шилэн дээр нааж тасалгааны хэмд шөнийн турш хатаасан. Иммуногистохими хийхийн өмнө эдийг парафингүйжүүлэх болон усгүйжүүлэх дамжлагаар дамжуулсан. *HER2* эсрэг биеийг 1:50-аар шинэгэрүүлж эд дээрээ дусааж 30 мин инкубацласан ба илүүдлийг трис буфер уусмалаар угаасан. Хоёрдогч эсрэг бие үйлдвэрлэгчээс ирүүлсэн зааврын дагуу шингэрүүлэлтийг хийж эд дээрээ дусааж заасан хугацаа болон нөхцөлд урвал явуулна. Илүүдэл урвалжийг трис буфер уусмалаар угаасан. Дараа нь 1 мл DAB-аар 1-3 минут тасалгааны температурт байлгаж, 3-Амино-9-этилкарбозолын илрүүлгийн систем ашиглан урвал явагдсан эсэхийг илрүүлсэн. Гематоскилины будгаар будаж усгүйжүүлэх дамжлагаар дамжуулж, ксилолоор будгийн илүүдлийг цэвэрлэж бүрхүүл шилээ нааж гэрлийн микроскопоор үнэлнэ. Иммуногистохимийн урвалыг тооцохдоо ASCO/CAP-ийн үнэлгээний удирдамжийн дагуу үнэлгээг өгнө[4].

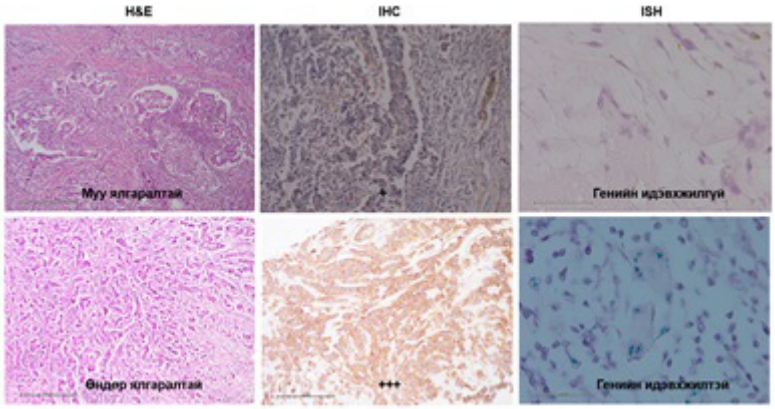
Байран буюу In situ эрлийзжүүлгийн (ISH) арга: Парафинд цутгасан эдийг 4-5 микроны зузаантай зүснэ. Зүсмэгийг поли Л лизинээр бүрсэн тавиур шилэнд нааж 56^{0}С 12-18 цагийн турш хатаана. Эдийн зүсмэгийг парафингүйжүүлэх (ксилолын уусмал) болон усгүйжүүлэх (спиртийн уусмал) дамжлагаар дамжуулна. Өвөрмөц бус холбогдлыг 3%-ийн H_2O_2-оор блоклох ба урьдчилан халаасан 95^{0}С-ийн ЭДТА уусмалд эдийг 15 мин буцалгана. 1 мл пепсинийг эд дээрээ дусааж 37^{0}С-д чийгтэй орчинд 10 мин инкубацлаж этилийн спиртээр усгүйжүүлэн агаарт хатаана. Пробыг эд дээрээ дусааж бүрхүүл шилээр бүрнэ. Бүрхүүл шилийг тойруулан тусгай бэхжүүлэгчээр бэхэлнэ. Темпратурын тохируулгатай гибриджүүлгийн төхөөрөмжинд 80^{0}С 5 мин денатурацид оруулсны дараа 37^{0}С 12-18 цагийн турш урвалжийг явуулна. Бэхжүүлэгчийг ховхолж цэвэрлэн бүрхүүл шилийг салгаж эдийг 800С температурт SSC-ийн уусмалд угаана. Эдийг нэрмэл усанд булхаад трисийн буффер уусмалаар угааж anti-DIG/DNP холимогийг дусааж 37^{0}С-д чийгтэй орчинд урвал явуулах ба илүүдэл урвалжийг трисийн буффер уусмалаар угаана. AP-Red уусмалын холимогийг үйлдвэрлэгчээс заасан харьцаагаар найруулан эд дээр дусааж тасалгааны хэмд байлгана. HRP-green уусмалын холимогийг үйлдвэрлэгчээс заасан харьцаагаар найруулан эд дээр дусааж тасалгааны хэмд байлгана. Гематоксилинээр эсийн бөөмийг будаж эдийг этилийн спирт ксилолын уусмалд усгүйжүүлэн цэвэрлэж бүрхүүл шилийг нааж микроскопиор үр дүнг үнэлнэ.

Үр дүн: Судалгаанд хамрагдсан 30 архивын материалуудад *HER2* рецептор үнэлэх иммуногистохимийн шинжилгээ хийхэд 9% нь эерэг (+++), 6.6% эргэлзээтэй (++), үлдсэн хувь нь сөрөг (+ ба -) ялгарал муу эсийн хавдрууд байлаа.

Иммуногистохимийн урвалыг тооцохдоо ASCO/CAP-ийн үнэлгээний удирдамжийн дагуу үнэлгээг өглөө (Хүснэгт 1). *HER2* генийн идэвхжлийг тодорхойлох байран эрлийзжүүлгийн шинжилгээ нь (in situ hybridization (ISH буюу FISH)) хавдрын эдэд генийн олшролыг хромосомын түвшинд илрүүлдэг арга юм. Бид эргэлзээтэй 2 дээж болон контрол болгон эерэг нэг дээжинд IHC шинжилгээ хийж үзэхэд эргэлзээтэй (2++) нэг өвчтөн болон, эерэг хариу гарсан (3+++) өвчтөнд *HER2* генийн олшрол тодорхойлогдсон. Иймээс бидний судалгааны үр дүн нь нийт 30 дээжнээс 4 буюу 13.3% нь эерэг хариу гарсан байна.

Хүснэгт 1. ASCO/CAP-ийн үнэлгээ

Үнэлгээ	Шалгуур
Сөрөг (Үнэлгээ 0)	Нэвчсэн хавдрын эсийн мембран будагдалт ороогүй байх эсвэл ≤10% нь мембраны хүрээ бүрэн бус ба маш сул (харагдах төдий) эрчимтэй будагдсан байх
Сөрөг(Үнэлгээ 1+)	Мембраны хүрээ бүрэн бус ба маш сул эрчимтэй будагдсан эсүүд >10% байх
Эерэг (Үнэлгээ 2+)	Мембраны хүрээ бүрэн бус ба/эсвэл сулаас дунд зэрэг эрчимтэй будагдсан эсүүд >10% байх эсвэл Мембраны хүрээ бүрэн ба тод будагдсан эсүүд ≤10% байх
Эерэг (Үнэлгээ 3+)	Мембраны хүрээ бүрэн ба тод будагдсан эсүүд >10% байх



Зураг 1. Хөхний хавдарын эдэд *HER2*-ийн илрэлийг иммуногистохими болон байран эрлийзжүүлгийн (ISH) аргаар тодорхойлсон дүн

Хэлцэмж: *HER2* генийн нийлэгжлийг эмгэг судлалын оношилгооны дэвшилтэт технологи болох иммуногистохими болон байран эрлийзжүүлгийн аргыг ашиглан хөхний хорт хавдрын хагалгааны материалд тодорхойлох нь бай эмчилгээ хийх боломж олгож байна. Иммуногистохимийн шинжилгээгээр *HER2* уургийн илрэлийг үзэж, *HER2* ++ түүнээс бага эргэлзээтэй тохиолдлуудад байран эрлийзжүүлгийн (ISH) шинжилгээ хийх нь өвчтөний дараагийн эмчилгээний сонголтод эмгэг судлалын дэлгэрэнгүй дүгнэлтэнд маш чухал бөгөөд өвчтөний тавилан тодорхойлох хамгийн гол үзүүлэлт болж байна[10]. Хавдрын бай эмчилгээ нь тухайн хавдрын өсөлт хөгжил, нэвчилт, үсэрхийлэл, судасжилтанд оролцдог өвөрмөц уургийн үйл ажилллагаанд чиглэсэн моноклон эсрэг бие, жижиг молекулууд байдаг. Одоогоор эпидермийн өсөлтийн факторын рецептор тирозин киназ2 (*HER2/ErbB2*) болон судасны дотор талын өсөлтийн факторын рецептор (VEGFR) хэт идэвхижсэн хөхний хавдрын бай эмчилгээний эмүүдийг хэрэглэж эхэлсэн. Үсэрхийлэлттэй хөхний хорт хавдрын HER2 –ийн идэвхжлээс хамааач тирозин киназ саатуулагчид лапатиниб (lapatinib) ба нератиниб (neratinib) мөн анти HER2 моноклонийн эсрэг бие трастузумаб, пертузумаб, трастузумаб-DM1-ийг дангаар болон хавсарч эмчилгээнд хэрэглэдэг байна[11].

Хөхний хорт хавдрын үеийн *HER2* генийн илрэлийг тодорхойлох нь хавдрын үеийн бай эмчилгээг хийхэд ач холбогдолтой. Испанийн эмгэг судлалын нийгэмлэгийн чанарын албаны судалгаагаар *HER2*-ын ДНХ болон уургийн хэт нийлэгжил нь ихэвчлэн нэгэн зэрэг хамааралтайгаар тохиолддог учир эдгээрийн хэвийн бус байдлыг байран эрлийзжүүлгийн болон иммуногистохимийн аргуудын хавсран хэрэглэх нь тохиромжтой гэж үзсэн[12]. Хүний эпидермийн өсөлтийн факторын рецептор-2 нь 17-р хромосомын урт мөрөнд байрладаг ба *HER2* уураг тирозин киназын идэвхжил бүхий трансмембраны рецепторыг кодолдог. HER2 нь эпидермийн өсөлтийн факторын рецептор (EGFR)-ийн бүлд хамаарагддаг. Энэ бүлд *HER1,2,3,4* хамаарагдах ба эдгээр нь эс хоорондын болон эс-тулгуурын харилцаанд оролцдог. HER рецепторын сигнал нь олон төрлийн хавдрын үед илэрдэг. Эдгээр дотроо *HER2* нь илүү хавдрын үед илэрдэг. Хөхний хорт хавдрын 17-20%-д *HER2* хэт нийлэгждэг. Энэ уургийн хэт нийлэгжил нь хөхний хорт хавдартай өвчтөний тавилан муутайг илтгэдэг ба 1990 оны сүүлээс дээрх уургийн эсрэг чиглэсэн моноклон эсрэг биеийг судалснаар бай эмчилгээ хийх боломжтой болсон[11]. Оношлогооны эдгээр аргуудыг эмнэлзүйд нэвтрүүлснээр тавилан болон үр дүнг таамаглахад үр нөлөөтэй.

Дүгнэлт:

1. Иммуногистохимийн шинжилгээгээр нийт 30 дээжний 13.3% нь эерэг байгаа нь Монгол оронд *HER2* эерэг бай эмчилгээ шаардлагатай тохиолдол харьцангуй их байгаа нь ажиглагдаж байна.
2. Иммуногистохими болон байран эрлийзжүүлгийн шинжилгээний дүнгээс харахад хөхний хавдрын оношилгоонд иммуногисохими болон гибриджүүлэг, молекул генетик цогц оношилгооны алгоритм зайлшгүй шаардлагатайг харуулж байна.

Ном зүй:

1. *Albanell J, Andreu X, Calasanz MJ, et al. Guidelines for HER2 testing in breast cancer: a national consensus of the Spanish Society of Pathology (SEAP) and the Spanish Society of Medical Oncology (SEOM). Clinical & translational oncology : official*

publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico. 2009;11(6):363-375.
2. *Hicks DG, Kulkarni S. HER2+ breast cancer: review of biologic relevance and optimal use of diagnostic tools. American journal of clinical pathology. 2008;129(2):263-273.*
3. *Zoppoli G, Garuti A, Cirmena G, et al. Her2 assessment using quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction reliably identifies Her2 overexpression without amplification in breast cancer cases. Journal of translational medicine. 2017;15(1):91.*
4. *Varga Z, Noske A. Impact of Modified 2013 ASCO/CAP Guidelines on HER2 Testing in Breast Cancer. One Year Experience. PloS one. 2015;10(10):e0140652.*
5. *Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, 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. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2013;31(31):3997-4013.*
6. *Shah S, Chen B. Testing for HER2 in Breast Cancer: A Continuing Evolution. Pathology research international. 2010;2011:903202.*
7. *Hsu JL, Hung MC. The role of HER2, EGFR, and other receptor tyrosine kinases in breast cancer. Cancer metastasis reviews. 2016;35(4):575-588.*
8. *Willmore-Payne C, Holden JA, Layfield LJ. Detection of EGFR- and HER2-activating mutations in squamous cell carcinoma involving the head and neck. Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc. 2006;19(5):634-640.*
9. *Budiarto BR, Desriani. Detection of HER2 Gene Polymorphism in Breast Cancer: PCR Optimization Study. Scientia pharmaceutica. 2016;84(1):103-111.*
10. *Wuerstlein R, Harbeck N. Neoadjuvant Therapy for HER2-positive Breast Cancer. Reviews on recent clinical trials. 2017;12(2):81-92.*
11. *Waks AG, Winer EP. Breast Cancer Treatment: A Review. Jama. 2019;321(3):288-300.*
12. *Lopez-Vivanco G, Salvador J, Diez R, et al. Cost minimization analysis of treatment with intravenous or subcutaneous trastuzumab in patients with HER2-positive breast cancer in Spain. Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico. 2017;19(12):1454-1461.*

Diagnosis of the *HER2* gene in breast cancer

E.Tsolmonchimeg[1], G. Bolor-Erdene[2], B. Enkhjargal[2], J. Sarantuya[1], B.Munkhtsetseg[1]

[1]Mongolian National University of Medical Science
[2]National Cancer Center of Mongolia
Email:tsolmonchimeg8@gmail.com, Tel: 99993052

Introduction: *HER2* gene activity in women with breast cancer is important for developing patient treatment plans and improving patient prognosis. Because tanstuzumab, lapatinib, and targeted therapy are used in combination with standard chemotherapy in *HER2* overactive breast cancer patients. Currently, there are few studies of this gene in the oncological practice of our country, which forms the basis of our research.
Purpose: Our purpose is to determine the level of protein (IHC) and gene amplification (ISH) in the diagnostic algorithm *HER2* in women diagnosed with breast cancer in Mongolia.
Material and method: The study was conducted on the archives of 30 breast augmentation surgeons diagnosed with breast cancer by the pathology department of the National Cancer Center, registered in 2017-2018. Pathological assessment was performed by immunohistochemical analysis (IHC) using a hemotoxylin-eosin dye on tissue paraffin enriched with formalin. Immunohistochemical reactions should be assessed in accordance with ASCO / CAP assessment guidelines. In two cases where the *HER2* protein was in doubt, or two positive (2 ++) results, and in one case with three positive (3 +++) results confirmed by IHC testing, the genetic activity was determined using in vitro fertilization (ISH).
Results: Of the 30 archived materials studied, 9% were positive (+++), 6.6% were doubtful (++), and the rest were negative (+ and -) malignant neoplasms by immunohistochemistry of the *HER2* receptor. We ran the IHC test on two questionable samples and one positive sample and found an increase in the *HER2* gene in one patient who had doubts (2 ++) and one patient who tested positive (3 +++). Thus, 4 or 13.3% of the 30 samples were positive.
Conclusion: Immunohistochemistry showed that 13.3% of the 30 samples were positive, indicating that the number of cases requiring *HER2*-positive treatment in Mongolia was relatively high. The results of immunohistochemical and hybridization tests show that a complete diagnostic algorithm is required for the diagnosis of breast cancer, which is immunohistochemistry, hybridization and molecular genetics.

Key word: *HER2* gene, breast cancer, diagnosis