

Өндгөвчийн гадаргуугийн хучуур эсийн хавдрын үед HER2-ын илэрхийллийг дархангистохимээр тодорхойлсон дүн

Одонзул Ц.¹, Галцог Л.², Авирмэд Д.³, Эрдэнэцогт Д.⁴

^{1,2} "Ач" Анагаах ухааны их сургууль, ³Хавдар судлалын үндэсний төв,

⁴Анагаахын шинжлэх ухааны үндэсний их сургууль

e-mail: Odonzul@ach.edu.mn

Abstract

Results of immunohistochemistry status of HER2 expression surface epithelial ovarian cancer

Odonzul Ts.¹, Galtsog L.², Avirmed D.³, Erdenetsogt D.⁴

^{1,2}"Ach" Medical University, ³National Cancer Center,

⁴Mongolian National University of Medical Science

Introduction

The HER2 (Human epidermal receptor 2) proto-oncogene encodes a transmembrane receptor protein involved in the development and progression of the majority of cancers. Prior studies have shown that HER2 oncogene is overexpressed in approximately 15–30% of ovarian carcinomas. However findings regarding the overexpression and prognosis are still conflicting.

Goal

To determine the histomorphological structure of ovarian tumor and perform immunohistochemical analysis of HER2 in tumor tissues

Materials and Methods

A total of epithelial ovarian cancer paraffin-embedded tissue blocks 11 collected. The hematoxylin and eosin stained histopathology slides of each of the cases were reviewed to confirm the original diagnosis, and to assess the histological grade of the neoplasm. Our study was performed on 11 ovarian epithelial cancer tissues obtained at the time of first surgery. The staining procedure for HER2 overexpression was performed using a monoclonal antibody.

Results

The positive expression rate of HER2 in this study was 81.8%. Significant association was not found between HER2 expression International Federation of Gynecologists and Obstetrics (FIGO) stage p-values of 0.196, grading 0.642 and histological subtypes. However, there were more cases of advanced-stage disease (III/IV) with HER-2 expression than early-stage EOC (I/II). HER2 positive tumor were grades 1, 2 and 3 respectively. A higher proportion of serous ovarian neoplasm and adenocarcinoma NOS was also observed to be HER2 positive.

Conclusion:

HER2 expression was observed to increase with advanced stages of cancer and was more commonly seen in serous rather than in adenocarcinoma NOS.

Keywords: EOC, epithelial ovarian cancer, HER2, IHC, Immunohistochemistry

Pp. 9-15, Tables-6, Figure 1, References-26

Үндэслэл

Өндгөвчийн гадаргуугийн хучуур эсийн хавдар EOC (Epithelial ovarian cancer) нь ихэнхдээ хожуу үедээ болон үсэрхийлэл өгсний дараа оношлогддог [1, 2]. Өвчнийг эрт үе шатанд илрүүлэх үр дүнтэй шинжилгээний аргууд дутагдалтай байгаа нь хавдрын өвчлөлийн тохиолдлыг ихэсдэг байна [3, 4].

Өндгөвчийн хорт хавдрын үед хүний эпидермийн (хучуур эдийн) ургалтын хүчин зүйлийн рецептор уураг HER2 (Human epidermal receptor 2) фосфоржин, эсийн митоген болон хавдрын эсэд хувирах хувиралд нөлөөлдөг [5]. HER2 нь өндгөвчийн хорт хавдрын бүх эмгэг бүтэц дээр илэрхийлэгдэхээс гадна өндгөвчийн гадаргуугийн хучуур эсийн хавдрууд дээр илүү илэрхийлэгддэг [6-8]. Өндгөвчийн хавдрын үед HER2 уургийн илэрхийллийг харуулсан олон судалгаа байдаг бөгөөд EOC-ийн үед 30-40% нь илэрхийлэгддэг байна. HER2 уургийн илэрхийлэл өндөр байх тусам өвчтөний тавилан муутайг тодорхойлно [9, 10]. HER2 уураг EOC-д эерэг илэрхийлэгдэх нь энэ хавдрыг HER2 моноклон эсрэгбиеэр бай эмчилгээ хийх өвчний эрт үед үр дүнтэй байна гэж олон судлаачид үздэг [11]. Иймээс эмчилгээг эхлэхээс өмнө HER2 уургийн илэрхийллийг EOC-ийн үе шатуудад үзэх шаардлагатай юм гэжээ [12-14]. EOC-ийн үед HER2 уургийн илэрхийллийг дархангистохимийн аргаар хөгжингүй орны эрдэмтэн судлаачид судалж, анагаах ухааны практикт нэвтрүүлсээр байна [11, 12, 15].

Манай улсын эмгэг судлалын эд, эсийн оношлогоонд орчин үеийн дархангистохимийн шинжилгээний арга одоог хүртэл эрүүл мэндийн салбарын бодлогын хүрээнд нэвтрээгүй байгаа нь энэ төрлийн хорт хавдрын эрт оношлогоо болон ялган оношлогоо, түүнээс гарах тавилан урьдчилан сэргийлэх асуудлыг орхигдуулж байна. Мөн өндгөвчийн хорт хавдрын үед уг шинжилгээний аргыг манай оронд ашиглан явуулсан эрдэм шинжилгээ, судалгааны ажил ховор байгаа бөгөөд цаашид дархангистохимийн шинжилгээний аргыг оношлогооны түвшинд ашиглах нь чухал байгаа нь бидний судалгааны ажил хийх үндэслэл болсон юм.

Зорилго

Өндгөвчийн хорт хавдрын эмгэг судлалын онцлогийг тодорхойлж, хавдрын эдэд HER2 дархангистохимийн шинжилгээ хийх

Зорилт:

Өндгөвчийн хорт хавдрын эдийн бүтцийн гистологийн хэлбэрийг суурь будгийн аргаар тодорхойлох

Өндгөвчийн хорт хавдрын эдэд дархангистохимийн аргаар HER2-уургийн илэрхийлэл байгааг тогтоох

Материал, арга зүй

Эмгэг судлалын үндэсний төв (ЭСҮТ)-д хадгалагдаж байсан (2014 оны 1 сараас 2016 оны 12 сарын хооронд ХСҮТ-д өндгөвчийн хорт хавдар оношоор мэс заслын эмчилгээнд орсон 32-76 насны 11 өвчтөн) парафин эдэд шинжилгээ хийсэн. Уг судалгааг “Ач” АУИС-ийн дэргэдэх Судалгааны Ёс зүйн хорооны 2017 оны 05 сарын 19-ны хурлын судалгааны ажил хийх ёс зүйн зөвшөөрөл (протокол №2017/08) дор хийж гүйцэтгэсэн. Өвчтөний хувийн мэдээллийг нууцлах үүднээс тусгай кодоор нэр өгч, анагаах ухааны ёс зүйн хэм хэмжээний дагуу судалгааг явуулсан.

Гематоксилин-эозин (H&E) суурь будгаар будсан патогистологийн слайдуудыг ашиглан, хавдрын онош болон ялгаралыг үнэлсэн бөгөөд Shimizu-Silverberg нарын хавдрын эмгэг бүтцийн гистологийн гурван ялгаралын системийг ашиглан бөөмийн полморфизм болон митозын идэвхжил, бүтцийн эмгэг шинжээр нь ялгасан [16]. Өндгөвчийн гадаргуугийн хучуур эсийн хавдар (EOC)-ыг 2013 онд ДЭМБ-ын шинэчилсэн эмгэг гистологийн бүтцээр нь ангилав [17]. Өвчтөний өвчний түүхээс хавдрын үе шатыг Олон Улсын эмэгтэйчүүдийн эмч-эх баригч нарын холбооноос батласан (FIGO) үе шатын ангилалаар ангилсан.

Бид судалгаандаа эдийн бэлдмэлийн 2 мкм зузаантай зүсмэг бэлтгэж тусгай зориулалтын бүрхүүл шилэнд бэхлэж, Dako фирмийн иж бүрдлийг ашиглан будалтыг явуулав. Слайдыг дахин парафингүйжүүлж усгүйжүүлсний дараа эндоген пероксидаза ферментийн идэвхигүйжүүлэлтийг 0.3% hydrogen peroxide уусмал ашиглан 10 минутын турш явуулав. Эдийн антиген сэргээх ажиллагааг богино долгионы зуух (900 W) дотор 103 kPa/15 psi, цитратын буфер орчинд (0.01-mol/L concentration, pH 6.0) 15-20 минутын турш хийж дархангистохимийн (IHC) аргаар явуулав.

Эдийн иммуноантиген урвалыг Dako фирмийн эсрэгбиеийн бэлдмэлийн (mouse monoclon antibody HER2) цомгийг ашиглан явууллаа.

- Парафин цутгамагийг 2 мкм зузаантай зүсэж, тусгай зориулалтын тавиур шилэнд наав
- Тосгүйжүүлэх буюу парафингүйжүүлэх зорилгоор ксилолын уусмалыг ашигласан
- Усгүйжүүлэх зорилгоор 100%, 90%, 70% -ийн этанол уусмалыг хэрэглэв
- Эдийн доторх пероксидаза ферментийг идэвхигүйжүүлэх зорилгоор 3%-ийн пероксидазын уусмалыг ашиглав
- Эсрэгтөрөгчийг сэргээхийн тулд цитратын буферт бичил долгионы зуухыг ашиглан буцалгасан
- Судалгаанд Dako фирмийн mouse monoclon antibody HER2 ашиглав
- Эсрэгбиеийн илэрхийллийг DAB chromogen-ээр илрүүлсэн
- Маейрын гематоксилинээр бөөмийг илрүүлсэн
- Этанолын уусмалаар усгүйжүүлсэн
- Тунгалагжуулахаар ацетон болон ксилолыг ашигласан
- Наалдуулагч буюу бальзам дусаан бүрхүүл шилээ наан бичил бэлдмэлийг бэлтгэсэн

Бичил бэлдмэл: Бэлдэцийг дижитал гэрлийн микроскоп Olympus BX51-ын тусламжтай харж HER2 уургийн илэрхийллийг тодорхойлсон.

Статистик анализыг SPSS-23 программын тусламжтай HER2 уургийн илэрхийллийг хавдрын үе шат, ялгарал, гистологийн дэд хэв шинжүүдийн холбоог үнэлсэн. Хувьсууруудыг t-тестээр тодорхойлж, хувьсуур хоорондын ялгааг Персоны Хи2 тестийн аргаар тооцож, P утгыг <0.05 бага тохиолдолд ач холбогдолтой гэж үзсэн.

Үр дүн

Гематоксилин-эозин суурь будгаар будсан патогистологийн слайдуудыг үнэлэхэд өндгөвчийн гадаргуугийн хучуур эсийн хавдрын эмгэг бүтцээс шар уст хорт хавдар (serous neoplasm) 3(27.3%), салсархаг хорт хавдар (mucinous neoplasm) 1(9.2%), аденокарцинома 7(63.6%)(Table 1), хавдрын эсийн ялгарал (grade) сайн ялгаралтай (1-well differentiated) 2(18.2%), дунд ялгаралтай (2-moderate differentiated) 6(54.5%), муу ялгаралтай (3-poorly differentiated) 3(27.3%) байсан бөгөөд байран өмөн (local) 3(27.3%), бүсчилсэн хавдар (regional) 4(46.4%), хожуу хавдар (advanced) 4(46.4%) байлаа (Table 2).

HER2 уургийн эерэг илэрхийлэл өндгөвчийн гадаргуугийн хучуур эсийн хавдрын эмгэг бүтцэд 2(18%) нь сөрөг /-, 4(36%) нь сул эерэг/1+, 3(28%) нь дунд эерэг /2+, 2(18%) нь хүчтэй эерэг/3+ илэрхийлэгдсэн (Figure 1).

Table 1. Total cases included in the study and grade

Neoplasms (EOC)	Number of cases (n=11)
Serous ovarian neoplasm	3 (2 adenocarcinoma, 1 borderline)
Mucinous ovarian neoplasm	1
Adenocarcinoma /NOS/	7 (2 papillary, 5 adenocarcinoma)

NOS: not otherwise specified; EOC: epithelial ovarian cancer

Table 2. The staging and grading of epithelial ovarian cancer (EOC)

Staging	Grading (n,%)			Total (n,%)
	1	2	3	
Local	1(9.1)	0(0.0)	2(18.2)	3(27.3)
Regional	0(0.0)	4(36.4)	0(0.0)	4(36.4)
Advanced	1(9.1)	2(18.8)	1(9.1)	4(36.4)
Total	2(18.2)	6(54.5)	3(27.3)	11(100)

HER2 уургийн илэрхийлэл, хавдрын ялгаралуудыг хооронд нь харьцуулахад ялгаа ажиглагдсангүй (p0.642).

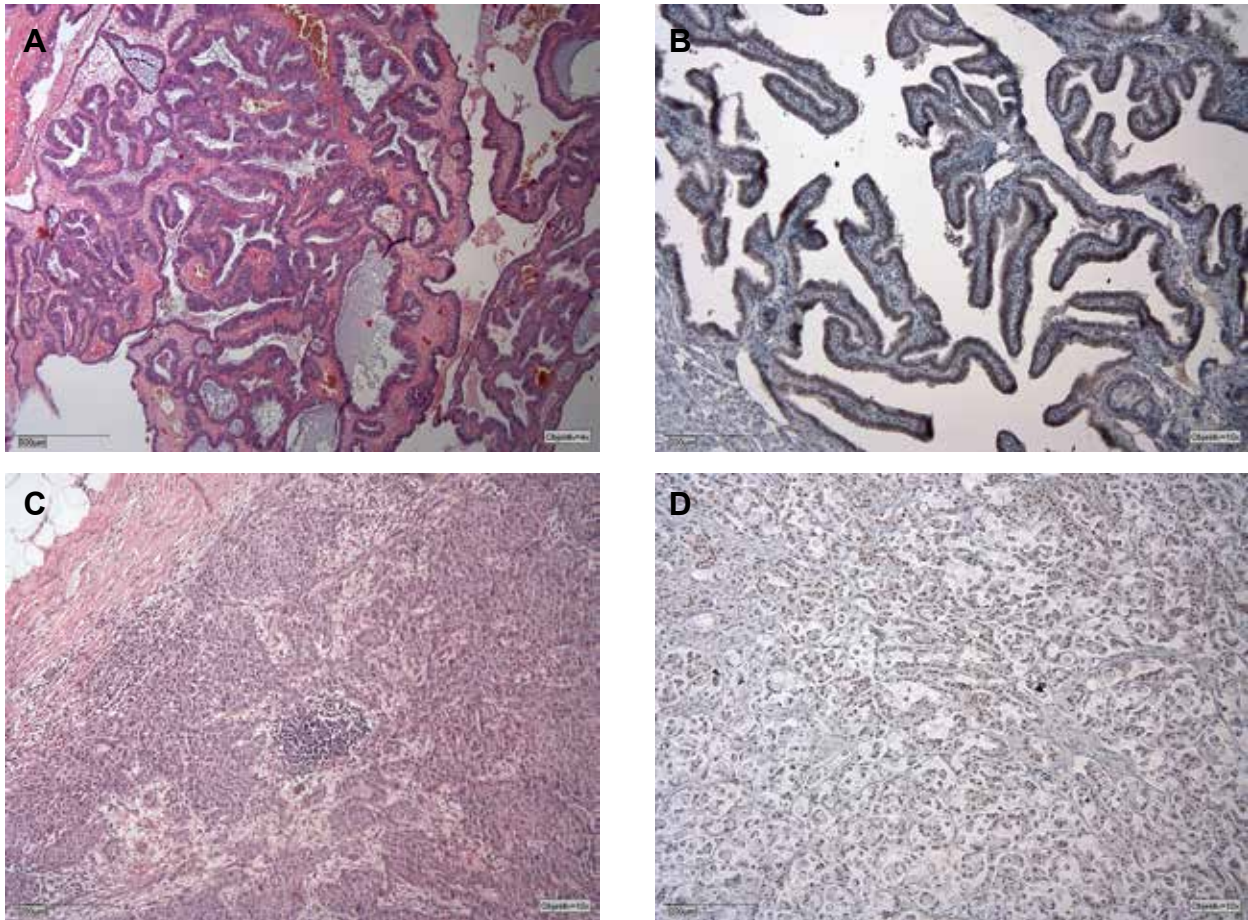


Figure 1. A. Photomicrograph well differentiated serous papillary adenocarcinoma H&E stain. B. HER2 overexpression in strong membrane immunostaining cells is seen 3+(x10). C. Poorly differentiated mucinous adenocarcinoma H&E. D. HER2 overexpression in nuclear staining cells is seen 3+(x10).

Table 3. Relationship between grading and human epidermal growth factor receptor 2 expression

Antibody	Histological grade(n,%)				Pearson Chi-Square
	1	2	3	Total	
HER2					
Negative	0(0.0)	0(0.0)	2(18.2)	2(18.2)	
Positive (1+,2+,3+)	2(18.2)	6(54.5)	1(9.1)	9(81.8)	
Total	2(18.2)	6(54.5)	3(27.3)	11(100)	0.642

HER2: human epidermal growth factor receptor

HER2 уураг нь байран өмөнтэй өвчтөнүүдэд 6(54.5%) илэрхийлэгдсэн боловч FIGO үе шатууд болон HER2 уургийн илэрхийлэл хоорондоо хамааралгүй байлаа ($p=0.196$) (Table 4).

Өндгөвчийн шар уст хавдар, аденокарциномын үед HER2 уураг эерэг илэрхийлэгдсэн ч мөн хоорондоо статистикийн ач холбогдолгүй байна ($p=5.238$) (Table 5).

Table 4. Relationship between International Federation of Gynecologists and Obstetrics staging and human epidermal growth factor receptor 2 expression

Antibody	FIGO stage (n,%)			Pearson Chi-Square
	I/II	III/IV	Total	
HER2				
Negative	1(9.1)	1(9.1)	2(18.2)	
Positive (1+,2+,3+)	3(27.3)	6(54.5)	9(81.8)	
Total	4(36.4)	7(63.6)	11(100)	0.196

FIGO: International Federation of Gynecologists and Obstetrics

Table 5. Relationship between histopathological subtypes and HER2 expression

Histological subtypes	Serous neoplasm, n (%)	Mucinous neoplasm, n(%)	Adenocarcinoma NOS, n (%)	Total	Pearson-Chi Square
HER2					
Positive (1+,2+,3+)	3(27.3)	0(0.0)	6(54.5)	9(81.8)	
Negative	0(0.0)	1(9.1)	1(9.1)	2(18.2)	
Total	3(27.3)	1(9.1)	7(63.6)	11(100)	5.238

Хэлцэмж:

Бид өндгөвчийн хавдрын парафин эдэд моноклон эсрэгбиеэр HER2 уургийн илэрхийллийг судалсан. Ийм төрлийн парафин эдэд дархангистохимийн аргаар судалсан адил арга болон зорилготой судлаачдын эрдэм шинжилгээний ажил олон байна (Table 6).

Tuefferd нар хөлдөөсөн эдийн дээжид мэдрэг флюоресценцийн in situ техникийг дархангистохимийн аргатай хослуулж судлахад дээрх мэдрэг аргаас харьцангуй бага ач

холбогдолтой байсан байна [18]. Гэсэн хэдий ч, HER2 уургийн илэрхийллийг төрөл бүрийн параметрээр, хавдрын үе шат, ялгарал, нас гэх мэт хувьсууртай харьцуулж уг уургийн өндөр илэрхийллийн утгыг баталж чадсан [19]. HER2 уургийн илэрхийлэл нь нь FIGO анилалын III/IV үе шатанд байгаа хожуу хавдар, I/II шатны байран өмөнгөөс илүү тодорхойлогдож байв. Үүний үр дүнг Seidman нарын эрдэмтэд хавдрын эхний шатанд 15%, хожуу шатанд 37% HER2 –ын илэрхийлэл байгааг судалжээ [20].

Table 6. A comparison of the present study with other studies

References	Location of study	Number of cases	Method	HER2 positive (%)
Tuefferd et al.[18]	France	320	Immunohistochemistry with FISH	6.6
Berchuck et al.[24]	USA	73	Immunohistochemistry	32.0
Singleton et al.[19]	USA	56	Immunohistochemistry	18.0
Slamon et al.[25]	Spain	106	Immunohistochemistry	21.7
Nielsen et al.[26]	Denmark	783	Immunohistochemistry	35.0

FISH: Fluorescence in situ hybridization

Kacinsky нарын судалгаанд HER2 уураг өндгөвчийн энэ төрлийн хавдрын эрт үед 5%, хожуу үед 17% байсан нь бидний судалгаатай тус тус дүйж байна [21]. Haldane нарын судалгаанд HER2 уургийн илэрхийллийг хавдрын үе шаттай хамааруулж судалсан. FIGO I/II гэж ангилсан 35

эмэгтэйн тав нь, III/IV гэж ангилсан 69 эмэгтэйн дөрөвт нь мөн эерэг илэрхийлэл гарсан байна [22].

Өндгөвчийн гадаргуугийн хучуур эсийн хавдрын үед HER2 уураг ялгарах нь өвчтөний тавилан мууг илтгэх бөгөөд хөхний хорт хавдрын

судалгаануудтай HER2 уургийн илэрхийлэл төстэй үр дүн үзүүлсэн мөн олон судалгаа бий [23-25]. Nielsen нарын судалгаагаар өндгөвчний гадаргуугийн хучуур эсийн хорт хавдрын дотор зааг бүсийн хавдарт HER2 илэрхийлэгдсэн бөгөөд Р утга 0.045 гарсан байна [26]. HER2 уургийн илэрхийлэл нь өндгөвчийн гадаргуугийн хучуур эсийн гистологийн шар уст болон аденокарцинома бүтэц дээр илэрдэг байна [24] гэж дүгнэжээ.

Дүгнэлт:

1. Судалгаанд EOC-ийн эмгэг бүтцийг суурь будгийн аргаар шинжлэхэд нэвчилтэт (invasive) ба зааг бүсийн хавдарт илэрсэн нь хавдрыг эрт шатанд нь дархангистохимийн аргаар оношлох боломжтойг харуулж байна.
2. HER2 уураг нь өндгөвчийн дунд, хожуу үе шатанд илэрхийлэгдэж, салсархаг хавдар болон аденокарциномийн үед хавдрын эсийн мембранд болон бөөмөнд жигд тархалттай хүчтэй эерэг (3+) илэрхийлэлтэй байна.

Ном зүй

1. Barrena Medel NI, Wright JD et al. Targeted therapies in epithelial ovarian cancer, *Journal of oncology* 2010, p.314-26
2. Cannistra SA: Cancer of the ovary, *The New England journal of medicine* 1993, (329) p.1550-9
3. Yap TA, Carden CP, Kaye SB. Beyond chemotherapy: targeted therapies in ovarian cancer, *Nature reviews Cancer* 2009, (9) p.167-81
4. Dinh P, Harnett P, Piccart-Gebhart MJ, Awada A: New therapies for ovarian cancer: cytotoxics and molecularly targeted agents, *Critical reviews in oncology/hematology* 2008, (67) p.103-12
5. Garrett TP, McKern NM, Lou M et al. The crystal structure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with other ErbB receptors, *Molecular cell* 2003, (11) p.495-505
6. Shuin T, Misaki H, Kubota Y et al. Differential expression of protooncogenes in human germ cell tumors of the testis, *Cancer* 1994, (73) p.1721-7
7. Higgins PA, Brady A, Dobbs SP et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR), HER2 and

insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) status in ovarian adult granulosa cell tumours, *Histopathology* 2014, (64) p.633-8

8. Karaferic A, Jovanovic D, Jelic S. Expression of HER2/neu, estrogen and progesterone receptors, CA 125 and CA19-9 on cancer cell membrane in patients with serous and mucinous carcinoma of the ovary, *J BUON* 2009, (14) p.635-9
9. Cirisano FD, Karlan BY. The role of the HER-2/neu oncogene in gynecologic cancers, *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* 1996, (3) p.99-105
10. Hellstrom I, Goodman G, Pullman J et al. Overexpression of HER-2 in ovarian carcinomas, *Cancer research* 2001, (61) p.2420-3
11. Chay WY, Chew SH, Ong WS et al. HER2 amplification and clinicopathological characteristics in a large Asian cohort of rare mucinous ovarian cancer, *PloS one* 2013, 8:e61565
12. Scholl S, Beuzebec P, Pouillart P. Targeting HER2 in other tumor types, *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 2001, 12 Suppl (1) p.81-7
13. Hogdall EV, Christensen L, Kjaer SK, et al. Distribution of HER-2 overexpression in ovarian carcinoma tissue and its prognostic value in patients with ovarian carcinoma: from the Danish MALOVA Ovarian Cancer Study, *Cancer* 2003, (98) p.66-73
14. Li M, Li H, Liu et al. Characterization of ovarian clear cell carcinoma using target drug-based molecular biomarkers: implications for personalized cancer therapy, *Journal of ovarian research* 2017, (10) p.9
15. McCaughan H, Um I, Langdon SP, Harrison DJ, Faratian D. HER2 expression in ovarian carcinoma: caution and complexity in biomarker analysis, *Journal of clinical pathology* 2012, (65) p.670-1
16. Shimizu Y, Kamoi S, Amada S et al. Toward the development of a universal grading system for ovarian epithelial carcinoma. I. Prognostic significance of histopathologic features--problems involved in the architectural grading system, *Gynecologic oncology* 1998, (70) p.2-12

17. Chen VW, Ruiz B, Killeen JL et al. Pathology and classification of ovarian tumors, Cancer 2003, (97) p.2631-42
18. Tuefferd M, Couturier J, Penault-Llorca F et al. HER2 status in ovarian carcinomas: a multicenter GINECO study of 320 patients, PloS one 2007, 2:e1138
19. Singleton TP, Perrone T, Oakley G et al. Activation of c-erbB-2 and prognosis in ovarian carcinoma. Comparison with histologic type, grade, and stage, Cancer 1994, (73) p.1460-6
20. Seidman JD, Frisman DM, Norris HJ. Expression of the HER-2/neu proto-oncogene in serous ovarian neoplasms, Cancer 1992, (70) p.2857-60
21. Kacinski BM, Mayer AG, King BL et al. NEU protein overexpression in benign, borderline, and malignant ovarian neoplasms, Gynecologic oncology 1992, (44) p.245-53
22. Haldane JS, Hird V, Hughes CM, Gullick WJ. c-erbB-2 oncogene expression in ovarian cancer, The Journal of pathology 1990, (162) p.231-7
23. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene, Science 1987, (235) p.177-82
24. Berchuck A, Kamel A, Whitaker R et al. Overexpression of HER-2/neu is associated with poor survival in advanced epithelial ovarian cancer, Cancer research 1990, (50) p.4087-91
25. Verri E, Guglielmini P, Puntoni M et al. HER2/neu oncoprotein overexpression in epithelial ovarian cancer: evaluation of its prevalence and prognostic significance. Clinical study, Oncology 2005, (68) p.154-61
26. Nielsen JS, Jakobsen E, Holund B et al. Prognostic significance of p53, Her-2, and EGFR overexpression in borderline and epithelial ovarian cancer, International journal of gynecological cancer: official journal of the International Gynecological Cancer Society 2004, (14) p.1086-96

*Танилцаж, нийтлэх санал өгсөн:
Анагаах ухааны доктор Х.Батбаяр*