

**University of Baghdad
College of Medicine
Department of pathology**

**MOLECULAR STUDY IN LUNG CANCER
FOR DETECTION OF RB TUMOR
SUPPRESSOR GENE mRNA AND C-MYC,
HER2-NEU, K-RAS ONCOGENES**

**A Thesis
Submitted to the Council of College of Medicine
University of Baghdad
In Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Doctor of Philosophy In Pathology (Molecular Pathology)**

**By
Ahmed Asmer Mankhi Al-sudani
(M.B.Ch.B., DC .Path.)**

Summary

Background :

Lung cancer is a common neoplasm widely affecting both sexes and is the leading cause of cancer-related death worldwide. Various molecular markers have been implicated in the pathogenesis of lung cancer. Their importance in follow up and prognosis as well as their being therapeutic targets are highly appreciated. Planning a marker study on cancer cases needs to fulfill many aims, of these whether this marker can differentiate a benign from a malignant neoplasm, is the signal score or intensity affected by the grade or

stage of the tumor or morphological types of malignant neoplasm. Among the common molecular markers applied in lung cancer are Rb tumor suppressor gene and c-myc ,Her2-neu and K-ras oncogenes.

Aims of the Study:

1-Exploiting in situ hybridization technique(ISH) to differentiate between lung cancer cases and non malignant chronic pulmonary diseases regarding the mRNA signaling of Rb and c-myc genes on paraffin tissue blocks.

2-Utilizing the most sensitive of these two markers to be applied on sputum samples by the same technique.

3-Differentiation between lung cancer cases and non-malignant pulmonary conditions based on the level of Her2-neu amplification by fluorescent in-situ hybridization technique (FISH).

4-Application of conventional polymerase chain reaction in the detection of K-ras gene mutation in sputum samples of cancer and non-cancerous patients.

Material and Methods :

This is a case-control study consist of two parts, which covered the period from February 2009 to March 2010 .It involved two parts.

Part one: A retrospective study, whereby the paraffin embedded tissue blocks of 30 cases of lung cancer together with tissue blocks of 30 benign resected lung lesions were randomly selected from the archives of the histopathology section of the Specialized Surgeries Hospital Laboratories in the Medical City, the department of histopathology of the Central Public Laboratories and one of the private laboratories. Demographic information was recorded from the submitted laboratory request forms. They were sectioned on charged slides and submitted for in situ hybridization for detection of Rb, c-myc and Her2-neu markers.

Part two: A prospective study , whereby sputum samples of 25 patients having lung cancer and seen at Radiotherapy and Nuclear Medicine Hospital were collected as well as sputum samples of 25 patients having a chronic

pulmonary illness were collected from the Lung and Respiratory Diseases Center in Medical City in Baghdad. Histopathological data concerning the diagnosis and grades of lung cancer patients who gave sputum samples were recorded from pathological reports. For the purpose of conducting in situ hybridization procedure to detect the molecular markers (Rb mRNAs) smear was made on positively charged slide. The remaining of the sputum samples were stored in deep freeze and subjected to PCR procedure to detect the mutation of molecular marker K-ras.

Results:

Rb mRNA signal positivity was detected in (27/30, 90 %) of malignant cases; (28 /30, 93%) of non neoplastic lung lesions. The test was (90%) sensitive using negative score as a cutoff point and(7%)specific. Rb mRNA signal score was high in 12 (40.0 %) cases of the malignant tumors and 8(26.7%) cases of chronic lung diseases. Rb mRNA signal intensity was high in 12 (40.0 %) cases of the malignant tumors and 6(20.0 %) cases of chronic lung diseases.

The difference of Rb mRNA signal score between different morphological types of lung cancer was statistically significant and also between squamous cell carcinoma and adenocarcinoma and also the difference between small cell lung cancer and non small cell lung cancer was statistically significant. The difference of Rb mRNA signal intensity between different morphological types of lung cancer was statistically significant. A significant difference between tumor grades and signal percentage score of Rb studied marker.

C-myc mRNA signal was detected in (20/30, 66.7%) cases of malignant tumors and (28 /30, 93.3%) cases of chronic lung diseases. The predominant score was score1, seen in 10 (33.3%) cases from the malignant group and 15 (50 %) cases of chronic lung diseases. The test was sensitive in (67 %) and specific in (7%) on negative score a cutoff point.

C-myc mRNA signal intensity was high in 7 (23.3%) cases of the malignant group and in 8 (26.6%) cases of chronic lung diseases . The difference of c-myc mRNA signal score and intensity between malignant and chronic lung diseases was significant . There was a significant difference between tumor grades and signal percentage score of c-myc studied marker.

Her2-neu FISH signal was detected in (19/30, 63.3%) cases of the malignant tumors, and (7/30, 23.3%) cases of chronic lung diseases . Score 2 was the predominant represented in 10(33.3%) cases of malignant tumors and in 4(13.3%) cases of chronic lung diseases . Signal intensity was high in 8 (26.7 %) malignant cases and low intensity in 11 (36.7%) cases ,while in chronic lung diseases the signal intensity was high in 4(13.3%)cases and low in 3 (10%) cases. There was a significant association of Her2-neu positive signal regarding malignant and chronic lung diseases .

There was a highly significant statistical association or correlation between c-myc ISH positive signals and Her2neu FISH positive signals. ($P < 0.01$).

There was a highly significant statistical correlation between Rb mRNA ISH and c-myc mRNA ISH percentage scores. ($P < 0.01$). There was a highly significant statistical correlation between Rb mRNA intensity and c-myc mRNA intensity ($P < 0.01$).

Depending on mRNA ISH results for c-myc and Rb and for application of the second aim of the present study, by Utilizing the Rb mRNA to be applied on sputum samples taken from lung cancer patients and from patients with chronic lung diseases by the ISH technique. Rb mRNA signal was detected in the sputum samples in 7/25 (28%) cases of malignant tumors and in 16/25 (64%) cases in chronic lung diseases . There was a statistical significant association between malignant and chronic lung diseases regarding Rb mRNA ISH positive signal and a statistical significant association between malignant and chronic lung diseases regarding positive Rb-LOH .

K-ras Exon-1 mutation was detected in the sputum samples in 7/25(28%) cases of malignant tumors and in none 0/25 (0%) cases in chronic lung diseases with a statistical significant association .There was no significant association or correlation between Rb mRNA signal positivity and K-ras signal in sputum samples($P>0.05$).

Conclusions:

-Rb mRNA ISH signal score and intensity showed significant correlation with lung tumor mainly SCLC, differentiating it from NSCLC. A significant correlation was also noticed with adenocarcinoma differentiating it from squamous cell carcinoma.

- Her2-neu amplification in malignant lung tumors showed significance difference from non malignant lung tumors, using FISH technique.

-Results of this study remark that sputum is a suitable specimen for application of molecular techniques specially (ISH) & PCR .

- Significant PCR amplification could be achieved for mutation in K-ras exon-1 in malignant lung tumor.

-Significant correlations were noticed between signal positivity of c-myc and early histological grades of lung cancer confirming its early participation in lung carcinogenesis.

Supervised by
Assistant Professor
Dr.Ban A. Abudal-Majeed
Ph.D.(Molecular Path.)

الخلاصة

الخلفية :

سرطان الرئة من الاورام الاكثر شيوعا يصيب كلا الجنسين ويكون من اهم اسباب الوفيات المتعلقة بالسرطان حول العالم . تشترك عدة معلمات جزيئية في نشوء وتطور هذه الأورام وان فائدتها عالية التقدير في متابعة الورم وتكهنه وكذلك لأهدافه العلاجية. ان التخطيط لدراسة معلم على حالات السرطان تحتاج الى انجاز عدة اهداف ,منها هل يستطيع هذا المعلم تفريق الورم الحميد عن الخبيث , هل الحرزاو شدة الاشارة متأثرة بطور اودرجة الورم او انواع الورم السرطاني.من بين ال معلمات الجزيئية الشائعة التطبيق في سرطان الرئة الجين المثبط للسرطان Rb والجينات السرطانية c-myc و Her2-neu, K-ras .

الهدف من الدراسة:

1. لاستثمار تقنية التهجين الموضعي للتفريق بين حالات سرطان الرئة وامراض الرئة المزمنة اللاسرطانية فيما يتصل بالحامض النووي الرايبي الرسول المؤشر للجينات Rb,c-myc في النماذج النسيجية المرضية .
2. استخدام الاكثر حساسية من المعلمات الجزيئية الاثنين لغرض استخدامه على نماذج القشع بتطبيق نفس التقنية .
3. للتفريق بين حالات سرطان الرئة عن امراض الرئة المزمنة اللاسرطانية اعتمادا على مستوى التكبير الجيني للمعلم Her2-neu باستخدام تقنية التهجين الموضعي المشع.
- 4-تطبيق فحص سلسلة تفاعل البوليميريز المألوف لغرض التحري عن الطفرة في الجين K-ras في نماذج القشع المأخوذة من المرضى المصابين باورام الرئة السرطانية و المرضى المصابين بامراض الرئة المزمنة اللاسرطانية .

إعداد وطرائق العمل:

هذه الدراسة هي دراسة حالات مقارنة, والتي غطت الفترة من شباط 2009 الى اذار 2010 اشتملت على جزئين:

- 1- الجزء الاول: دراسة تراجعية,وبها بلوكات نسيج الورم المظومة بالشمع من 30 حاله من سرطان الرئة و30 حاله من امراض الرئة المزمنة اختيرت عشوائيا من ارشفة مختبر الفحص النسيجي/ مستشفى الجراحات التخصصية في مدينة الطب ومن مختبر الفحص النسيجي/ مختبرات الصحة المركزية و أحد المختبرات الاهلية.المعلومات الاحصائية سجلت من استمارة الطلاب المختبري . و قد عملت مقاطع نسيجية على شرائح زجاجية ذات شحنة موجبة لاجراء تقنية التهجين الموضعي للتحري عن المعلمات Rb , c-myc و Her2-neu .
- 2- الجزء الثاني:دراسة انية,وبها نماذج القشع من 25 مريض مصابين بسرطان الرئة من مستشفى الاشعاع والطب الذري/ساحة الاندلس و نماذج القشع المأخوذة من 25 مريض من امراض الرئة

المزمنة جمعت من مركز الامراض الصدرية والتنفسية/مدينة الطب . سجلت المعلومات الباثولوجية التي تتعلق بالتشخيص و طور الورم لمرضى سرطان الرئة الذين اعطوا نماذج القشع من التقارير الباثولوجية . عملت مسحات من القشع على شرائح زجاجية اعتيادية لاختبارها الى صبغة الباب ولتأدية تقنية التهجين الموضعي للتحري عن المعلم الجزيئي (الحامض النووي الرايبي الرسول ل Rb) عملت مسحات اخرى من القشع على شرائح زجاجية ذات شحنة موجبة , المتبقي من نماذج القشع تم حفظها في تجميد عالي و عرضت لطريقة سلسلة تفاعل البوليميرز للتحري عن الطفرة في المعلم الجزيئي(K-ras).

النتائج :

تم الكشف عن الاشارة الموجبة الحامض النووي الرايبي الرسول ل Rb في (30 /27 , 90%) من العدد الكلي لاورام الرئة الخبيثة, و (30 /28 , 93%) من العدد الكلي لامراض الرئة المزمنة . كان الفحص حساسا (90%) عند تطبيق نقطه القطع السليبه للحرز ونوعيا (7 %) . كان الحرز للحامض النووي الرايبي الرسول ل Rb عاليا في 12 (40%) من الحالات الموجبة للأورام السرطانية الخبيثة و (26,7 %) من حالات امراض الرئة المزمنة . كانت شدة الإشارة للحامض النووي الرايبي الرسول ل Rb عالية في 12 (40%) من الحالات الخبيثة و 6 (20%) من حالات امراض الرئة المزمنة .

هنالك علاقة إحصائية بين الحرز للحامض النووي الرايبي الرسول ل Rb وبين انواع سرطان الرئة وايضا هنالك علاقة بين سرطان الرئة الحرشفي وسرطان الرئة الغددي وايضا هنالك علاقة بين سرطان الرئة صغير الخلية وسرطان الرئة اللا صغير الخلية . هنالك علاقة إحصائية بين شدة الاشارة للحامض النووي الرايبي الرسول ل Rb وبين انواع سرطان الرئة . كانت هنالك علاقة إحصائية بين طور الورم ونسبة الحرز الموجب للمعلم Rb .

وجد المعلم الحامضي الرايبي الرسول ل c-myc في (30/20 , 66,7 %) من العدد الكلي في حالات الاورام الخبيثة و (30 /28 , 93,3 %) من العدد الكلي في حالات امراض الرئة المزمنة الحميدة. كان الحرز المرقم 1 هو الطاعي , حيث شوهد في 10 (33,3%) من الحالات الموجبة للأورام السرطانية الخبيثة و 15 (50%) في حالات امراض الرئة المزمنة . كان الفحص حساسا في (67 %) ونوعيا في (7%) عند تطبيق نقطه قطع الحرز السالب. كانت شدة الإشارة للمعلم الحامضي الرايبي الرسول ل c-myc عالية في 7 (23,3%) من الحالات الخبيثة و 8 (26,6%) في حالات امراض الرئة المزمنة . هنالك علاقة إحصائية بين الحرز وشدة الاشارة للحامض النووي الرايبي الرسول ل c-myc وبين الحالات الخبيثة و امراض الرئة المزمنة . كانت هنالك علاقة إحصائية بين طور الورم ونسبة الحرز الموجب للمعلم c-myc .

وجدت الاشارة الموجبة للمعلم الحامضي النووي ل Her2-neu في (30/19 , 63,3 %) في حالات الاورام الخبيثة و(30 /7 , 23,3 %) في حالات امراض الرئة المزمنة الحميدة. كان الحرز المرقم 2 هو الغالب متمثلا في 10 (33,3 %) حالة من الأورام الخبيثة و 4 (13,3 %) في حالات امراض الرئة المزمنة. كانت شدة الإشارة عالية في 8 (26,7 %) و واطئة في 11 (36,7 %) من الحالات الخبيثة . كانت شدة الإشارة في حالات امراض الرئة المزمنة عالية في 4 (13,3 %) و واطئة في 3 (10 %) . توجد علاقة إحصائية بين الإشارة الموجبة للمعلم Her2-neu وبين الحالات الخبيثة و امراض الرئة المزمنة.

توجد علاقة إحصائية عالية بين الإشارة الموجبة للمعلم الحامضي الرايبي الرسول ل c-myc و الإشارة الموجبة المشعة للمعلم Her2-neu . توجد علاقة إحصائية عالية بين نسبة الحرز الموجب للمعلم الحامضي الرايبي الرسول ل Rb و c-myc .

توجد علاقة إحصائية عالية بين شدة الاشارة للمعلم الحامضي الرايبي الرسول ل Rb و c-myc . اعتمادا على نتائج التهجين الموضعي للمعلم الحامضي الرايبي الرسول c-myc و Rb ولغرض تطبيق الهدف الثالث من هذه الدراسة , بإستخدام المعلم الحامضي الرايبي الرسول Rb و بتطبيق تقنية التهجين الموضعي على نماذج القشع المأخوذة من المرضى المصابين باورام الرئة السرطانية و مرضى حالات امراض الرئة المزمنة الحميدة . وجد المعلم الحامضي الرايبي الرسول Rb (25/7) 28, % في عينات القشع المأخوذة من حالات الاورام الخبيثة و (16 / 25 , 64 %) في عينات القشع المأخوذة من حالات امراض الرئة المزمنة . توجد علاقة إحصائية بين الاورام الخبيثة و امراض الرئة المزمنة و الاشارة الموجبة للمعلم الحامضي الرايبي الرسول ل Rb . توجد علاقة إحصائية بين الاورام الخبيثة و امراض الرئة المزمنة و الاشارة الموجبة لفقدان التغاير الأليلي للمعلم Rb .

وجدت الطفرة الجينية للمعلم K-ras في (25/7 , 28 %) في حالات الاورام الخبيثة و(صفر / 25 , صفر %) في امراض الرئة المزمنة الحميدة . كانت هنالك علاقة إحصائية بين وجود الطفرة ل K-ras ونوع القشع الخبيث و الحميد. لا توجد علاقة إحصائية بين الاشارة الموجبة للمعلم الحامضي الرايبي الرسول ل Rb وبين الاشارة الموجبة للمعلم K-ras .

الاستنتاجات:

- توجد علاقة إحصائية بين شدة الاشارة و الحرز ل (Rb) مع اورام الرئة الصغيرة الخلية الخبيثة ولتفريقها عن الاورام اللا صغيرة الخلية الخبيثة , وايضا توجد علاقة إحصائية بين الحرز ل (Rb) مع سرطان الرئة الغددي ولتفريقه عن سرطان الرئة الحشفي.
- التكبير الجيني النووي للمعلم Her2-neu في الاورام الرئوية السرطانية اظهر فرق واضح عن الاورام الرئوية اللاسرطانية . بإستخدام تقنية التهجين الموضعي الوامض .

- نتائج هذه الدراسة اشرت الى ملائمة نماذج القشع لتطبيق الفحوص الجزيئية عليها وخاصة تقنية التهجين الموضعي و سلسلة تفاعل البوليميريز .
- التكبيرالجيني الهام لطفرة المعلم K-ras بسلسلة تفاعل البوليميريز يمكن بلوغها في الاورام الرئوية السرطانية .
- لوحظ وجود ارتباط هام بين ايجابيه الاشارة في حالة المعلم c-myc مع طور الورم السرطاني المبكر توثق دوره في المشاركة المبكرة في عملية نشوء سرطان الرئة .

جامعة بغداد
كلية الطب
قسم علم الأمراض

دراسة جزيئية في سرطان الرئة للكشف عن
الجين المثبط للورم **RB**
والجينات السرطانية **K-RAS,HER2-NEU ,C-MYC**

اطروحة مقدمة الى
كلية الطب - جامعة بغداد
كجزء من متطلبات نيل درجة الدكتوراه في علم الأمراض (علم الامراض الجزيئي)

من قبل
أحمد أسمر منخي السوداني
دبلوم عالي في علم الامراض

بإشراف

أ.م.د. بان عباس عبد المجيد
دكتوراه في علم الامراض الجزيئي

1432هـ

2011 م

