

Sudan University of Science & Technology
College of Graduate Studies

**The Association Between the Expression of ER, PR
Receptors, HER2/*neu*, P53 Markers and AgNORs in Breast
Tumors Among Yemeni Women.**

(Immunohistochemical Study)

العلاقه بين ظهور مستقبلات الاستروجين والبروجستيرون وموسمات الجين الورمي
والمورثه الكابتة للورم ومناطق الصبغه النوويه في أورام الثدي عند النساء اليمنيات.

Submitted By:

Mohammed Ali Al-Adhraei
B.Sc. Honour
U of K (2004)

Supervised By:

Dr. Hussain GadEl-Karim Ahmed
Associate Professor
University of Khartoum

Dr. Abdullah Kasim Al-Thobhani
Associate Professor
University of Sana'a

A thesis submitted in fulfillment of the degree of MSc in
Medical Laboratory Sciences
(Histopathology and Cytology)

2009

DEDICATION

To the victims of Breast Cancer

To the spirit of my father, Grandfather, Grandmother, may their souls rest in the paradise.

To my mother whose prayers and love inspired me to achieve my goals.

To my wife who gives me endless support and encouragement and to my brothers and all my family whose sense never let me feel alone in this life.

ACKNOWLEDGEMENTS

First, the foremost word that has to be written is Alhamdu-Lillah. Allah offered me countless gifts, those persons who assigned to give me the precious hand, granted me with all the facilities, and gave me the ability to undertake this study and the strength to complete it.

I am eternally indebted to my supervisor, Dr. Hussain Gad El-karim Ahmed, Head of Histopathology and Cytology Department in the Faculty of Medical Laboratory Sciences, U of K, for his kind treatment, generously and extraordinary effort in supervision and guidance. His great experience, never-ending ideas, and brilliant scientific thinking have been the cornerstones of my research.

A great debt of gratitude is to my Co-supervisor, Assoc. Prof. Dr. Abdulla Kassem Al-Thobhani, Head of Histopathology and cytology Department in the Faculty of Medicine, Sanaa University. I am greatly indebted to him for his always positive interest in my work during these years and for having practically always had time to guide me whenever I was in need of help, despite the numerous other projects he was handling.

I also feel extremely grateful to National Oncology Center staff, especially Assoc. Prof. Dr. Mansoor Al-Jaradi, Head of Histopathology Department for his help in sample collection and interpretation of the immunostaining to get the benefiting by the patients and Assoc. Prof Dr. Nadeem Mohamed Saeed, the Manger of center.

I am grateful to express my greatest gratitude to the Administration and staff of Al-Thobhani Medical Laboratory, my brother Ebraheem and my best friend Ali Almohaymiah for their help during the preparation of this work.

Finally, I would like to thank my beloved country Yemen, for financial support and for leading me in to this generous country (Sudan).

ABSTRACT

This is a prospective descriptive immunohistochemical (IHC) study carried out at National Oncology Center- Al-Jumhory Teaching Hospital, Sana'a, Yemen, during the period from August 2007 to August 2009. The study aimed to identify the incidence of ER, PR, HER-2/neu and P53 in Yemeni women with breast lesions and to assess the association between these markers and mean count of Argyrophilic Nuclear Organiser Regions (AgNORs) in benign and malignant breast lesions, as well as, to identify the association between these tumor markers and clinicopathological factors.

One hundred and fifty seven consecutive mastectomy or lumpectomy biopsies were obtained from female patients with breast lesions. Demographical and clinicopathological factors were obtained from patients' reports. For all patients, representative formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) tissues were selected, from mastectomy or lumpectomy biopsies, for ER, PR, HER2, p53 IHC study and AgNORs counting. Of the 157 patients, 137 were found with malignant changes and considered as cases; among whom 124(90.5%) were identified with invasive ductal carcinomas (IDC) and 13(9.5%) were with non-invasive ductal carcinomas (Non IDC). The remaining 20 specimens were benign tumors and ascertained as controls, among which 5 were diagnosed as mastitis, 5 were fibrocystic changes and 10 were fibroadenomas.

Most cases in our study were between 30 and 50 years old (54.7%) while those >50 years old were 33.6%.

ER, PR, HER2 and p53 were positive expressed in 53.3%, 40.1%, 25.5% and 48.2% of the cases respectively. In control group the positive expression was 70% for ER and PR while HER2 and p53 didn't show any expression. The mean of AgNORs

counts in cases and controls were 2.57 ± 0.78 and 1.26 ± 0.17 respectively with significant differences ($p < 0.0001$).

While PR expression offered significant differences between cases and controls ($p = 0.010$), the ER expression didn't show any significant differences ($p = 0.160$). Furthermore, when the immunostaining intensity was considered (according to the +1 to +3 scoring), the mean expression of PR was more in controls than in cases (controls = 2.60 *v.s* malignant = 1.81) with significant difference ($p = 0.005$), while ER expressed more in cases than controls but without significant difference (controls = 2.55 *v.s* malignant = 2.27; $p = 0.370$).

There is a tendency of decrease in HER2 and p53 expression with increase expression of ER and PR receptors with significant inverse association (ER *vs* HER2 $p < 0.0001$; ER *vs* p53 $p = 0.010$; PR *vs* HER2 $p = 0.003$; PR *vs* p53 $p = 0.023$). No statistically significant association between the HER2 over-expression and p53 expression ($p = 0.402$). The positive or negative expression of ER, PR, HER and p53 didn't show association with clinicopathological factors, except the positive significant association between ER and PR expression with lymph node involvement ($p = 0.004$, $p = 0.022$ respectively) while p53 was negatively associated with lymph nodes involvement ($p = 0.034$). P53 also associated positively to tumor size with borderline significant ($p = 0.066$). Like tumor markers; AgNORs mean counts didn't show any significant differences with clinicopathological factors except with tumor grade, where the mean of AgNORs counts increase with tumor grade (grade I = 2.66 *v.s* grade III = 3.41; $p = 0.001$). With the tumor markers, the mean of AgNORs counts were high in hormonal receptors negative (ER+ve = 2.45 *v.s* ER-ve = 2.71 and PR+ve = 2.36 *v.s* PR-ve = 2.71) and p53 positive cases (p53+ve = 2.81 *v.s* p53-ve = 2.36), while with HER2 did not show any significant differences (HER2+ve = 2.58 *v.s* HER2-ve = 2.57; $p = 0.997$).

According to this study, hormonal receptors in our population may be helpful in the treatment protocol for less than 50% of the patients and especially for those with lymph node involvement. On the other hand, p53 may play an important role as prognostic marker especially in those patients with negative lymph nodes.

Silver staining for AgNORs estimation can be used as additive technique to histopathology for benign and malignant differentiation, as well as, in the prognosis.

Although, the HER2 didn't revealed any association with clinicopathological factors, its analysis is important because it provides valuable prognostic and therapeutic information especially in patients with negative hormone receptors.

Follow up and Genetic studies are recommended to achieve a definite conclusion.

خلاصة الأطروحة

أجريت هذه الدراسة وهي دراسة وصفية استطلاعية تتبعية في المستشفى الجمهوري التعليمي- المركز الوطني لعلاج الأورام بمدينة صنعاء- اليمن- من الفترة من آب / أغسطس 2007م إلى أغسطس 2009م. هدفت هذه الدراسة إلى تحديد معدل الحدوث الايجابي للمستقبلات الهرمونية الاستروجين (ER) والبروجسترون (PR) والجين الورمي (HER2/neu) والمورثة الكابتة للورم (P53) في النساء اليمنيات المصابات بأورام في الثدي اللَّائِي حضرن إلى المركز لغرض العلاج، وذلك باستخدام تقنيه كيميائية الأصباغ المناعية في العينات النسيجية المحضرة لدراسة النسيج، بالإضافة إلى تقييم العلاقة بين موسومات الورم (tumor markers) المذكورة سابقا والـ AgNOR (مناطق الصبغة النووية) في أورام الثدي الحميدة والخبيثة من جهة وتقييم العلاقة بين موسومات الاورام تحت الدراسه وبين العوامل المرضية الاكلينيكية (clinicopathological factors) من جهة اخرى. مائه وسبعة وخمسون خزعه نسيجية، إما باستئصال جزئي للورم او استئصال كلي للثدي تم الحصول عليها من المريضات المصابات بأورام في الثدي، منهن 137 حاله كن يعانين من أورام سرطانية خبيثة وهذه المجموعة اعتبرت حالات الدراسة. هذه المجموعة كان منهن 124 حاله لديهن ورم غازي قنوي و 13 حاله ورم غازي غير قنوي. 20 حاله كانت بقيه الحالات تم اختيارها كمجموعه أورام حميدة منها 5 حالات التهاب الثدي و 5 حالات تكيس ليفي أما الـ 10 الحالات الأخرى كانت ورم غدي ليفي. مجموعته الأورام الحميدة هذه اعتبرت مجموعته ضابطه.

تفاصيل العمر والعوامل المرضية للمرضى تم الحصول عليها من تقارير المرضى. معظم الحالات السرطانية كانت أعمارهن بين 30 والـ 50 سنة (54.7%) بينما أولئك الذين تعدوا الـ 50 سنة كانوا 33.6% لكل مريض، تم اختيار نموذج من النسيج المثبت في الفورمالين والمطمور في شمع البارافين من عينات استئصال الورم أو استئصال الكلي للثدي، لدراسة مستوى المستقبلات الهرمونية والجين الورمي والمورثة الكابتة للورم و عدد مناطق الصبغة النووية. لم يكن هناك أي علاقة بين ظهور موسومات الاورام وأعمار المرضى عند التشخيص. العلاقة بين كل من موسومات الاورام المذكورة سابقا و أعداد مناطق الصبغة النووية في مجموعتي الأورام الحميدة والخبيثة تم تحليلها إحصائيا.

كان معدل ظهور المستقبلات الهرمونية الاستروجين (53.3%) ، البروجسترون (40.1%)، الجين الورمي 25.5% والمورثة الكابتة للورم (48.2%) في مجموعته الأورام الخبيثة بينما في المجموعة الضابطه كان معدل

ظهور المستقبلات الهرمونية هو 70% لكل منها ولم يسجل أي ظهور للجين الورمي أو المورثة الكابتة للورم في هذه المجموعة.

كان متوسط عدد مناطق الصبغة النووية في حالات الدراسة والمنظمة هو 2.5 ± 0.78 و 1.26 ± 0.17 على التوالي مع وجود فروق ذات دلالة احصائية، بينما كانت هناك فروق ذات دلالة احصائية ($p = 0.010$) في ظهور مستقبلات البروجستيرون في كل من حالات الدراسة و الحالات الضابطة، و لم تكن هذه الفروق موجودة بالنسبة لمستقبلات الاستروجين ($p=0.160$).

كان هناك نقص في ظهور الجين الورمي و المورثة الكابتة للورم مع زيادة ظهور المستقبلات الهرمونية الاستروجين والبروجستيرون في حالات الدراسة مع وجود دلالة احصائية ذات علاقة عكسية، بينما لم تكن هناك أي دلالة احصائية تربط بين ظهور الجين الورمي و المورثة الكابتة للورم ($p = 0.402$).

من جهة أخرى لم تكن هناك أي علاقة بين ظهور أو غياب المستقبلات الهرمونية أو الجين الورمي أو المورثة الكابتة للورم والعوامل المرضية الاكلينيكية فيما عدا وجود علاقة ايجابية ذات دلالة احصائية بين كل من ظهور المستقبلات الهرمونية مع الانبثاث إلى العقد اللمفاوية. ظهور المورثة الكابتة للورم كان له علاقة عكسية مع الانبثاث للعقد اللمفاوي ($p=0.034$) و علاقته شبه ايجابية مع زيادة حجم الورم لكن هذه العلاقة الاخير لم تكن ذات دلالة احصائية قوية ($p = 0.066$).

كذلك متوسط عدد مناطق الصبغة النووية لم يكن له أي علاقة مع العوامل المرضية الاكلينيكية فيما عدا علاقته الايجابية ذات الدلالة الاحصائية مع درجة الروم (درجة I = 2.66 بينما درجة III = 3.41) ($p = 0.001$)، أما مع المستقبلات الهرمونية والجين الورمي و المورثة الكابتة للورم فان متوسط عدد مناطق الصبغة النووية كان مرتفع في حالات الدراسة التي لم يظهر فيها المستقبلات الهرمونية وتلك التي ظهرت فيها المورثة الكابتة للورم مع وجود دلالة احصائية في كلا الحالتين. بالاضافة الى ما تقدم لم يكن هناك أي دلالات احصائية بين متوسط عدد مناطق الصبغة النووية و الجين الورمي .

بناء على هذه الدراسة فان استخدام فحص المستقبلات الهرمونية بتقنية كيميائية الأصباغ المناعية في الانسجة ربما قد يكون من المفيد في بروتوكول العلاج لاقول من 50% من المرضى اللآئي شملتهن الدراسة وخاصة لأولئك الذين لديهم انبثاث إلى العقد الليمفاوية. من جهة اخرى العلاقة العكسية بين المورثة الكابتة للورم و الانبثاث العقدي اليمفاوي قد تجعل من الاول اشارته انذار على درجة خبث الورم وكيفية التعامل معه علاجيا على الرغم من ساليته الاخير.

صبغه الفضة (Silver stain) لتقدير متوسط عدد مناطق الصبغه النوويه يمكن ان تستخدم كتقنيه اضافيه لعلم الامراض لتمييز الأورام الحميدة من الخبيثة.

بالرغم من أن الجين الورمي لم يبدي أي علاقة مع العوامل المرضيه إلا انه يعطي تكهن وتنبؤ ثمين عن العلاج و خاصة للمرضى الذين تفتقد أورامهم للمستقبلات الهرمونية الـ استروجين والبروجستيرون.

List of Abbreviations

AgNORs	Argyrophilic Nuclear Organiser Regions
BRCA1	Breast Cancer Gene 1
BRCA2	Breast cancer gene 2
CNB	Core Needle Biopsy
DCIS	Ductal Carcinoma In-situ
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ER	Estrogen Receptor
EREs	Estrogen Responsive Elements
FFPE	Formalin- Fixed Paraffin Embedded
FISH	Fluorescent In-situ Hybridization
FNAC	Fine Needle Aspiration Cytology
H and E	Hematoxylin and Eosin
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
ICC	Immunocytochemistry
IDC	Invasive Ductal Carcinoma
IHC	Immunohistochemistry
LBAs	Biochemical Ligand-Binding Assays
P53	Tumor Suppressor Gene (protein 53)
PCR	Polymerase Chain Reaction
PR	Progesterone Receptor
rRNA	Ribosomal Ribo-Nucleic Acid
RT	Room Temperature
TDLU	Terminal Ductal Lobular Unit
TN	Triple Negative
TNM	Tumor, Nodes, Mmetastasis
US	United States

List of Contents

Contents	Page No
Dedication	II
Acknowledgement	III
Abstract (English)	IV
Abstract (Arabic)	VII
List of Abbreviations	X
List of Contents	XI
List of Tables	XIII
List of Figures	XIV
List of Photomicrographs	XV
Chapter One	
1. Introduction	1
Chapter Two	
2. Review of Literature	7
2.1 Scientific background	7
2.2 Inflammatory conditions of the breast	8
2.3 Non inflammatory conditions of the breast	8
2.4 Benign non-neoplastic lesions of the breast	9
2.5 Benign neoplastic breast lesions	9
2.6 Breast cancer	10
2.7 Epidemiology of breast cancer	12
2.8 Aetiology of breast cancer	13
2.9 Diagnosis of breast cancer	21
2.9.1 Breast self examination	21
2.9.2 Clinical Breast Examination	22
2.9.3 Imaging techniques	22
2.9.4 Conventional histopathology	24
2.9.5 Fine needle aspiration cytology	24
2.9.6 Core needle biopsy	25
2.9.7 Open excision biopsy	26

2.10 Sub-typing of breast carcinoma	26
2.11 Staging of invasive breast cancer	29
2.12 Immunohistochemistry	30
2.12.1 Estrogen Receptor	37
2.12.2 Progesterone Receptor	42
2.12.3 Human epidermal growth factor receptor 2	45
2.12.4 Tumor suppressor gene	53
2.12.5 Argrophilic nuclear organizer regions	56
2.12.6 Miscellaneous tumor markers in breast cancer	59
2.13 Molecular diagnosis and prognosis of Breast Cancer	62
Chapter Three	
Study Objectives	64
Chapter Four	
Materials and methods	65
Chapter Five	
Results	72
Chapter Six	
Discussion	102
Conclusion and Recommendations	111
References	112
Appendices	145

List of Tables

	Contents	Page No.
Table.1	Distribution of the study population by age.	77
Table.2	Distribution of study population by pathology	78
Table.3	Distribution of study population by pathology and age	79
Table.4	Distribution of ER, PR, HER2 and P53 positive immunostaining in cases and controls.	80
Table.5	Distribution of control group by hormonal receptors immunostaining intensity	81
Table.6	Distribution of cases group by clinicopathological features.	82
Table.7	Association between ER and the other variables	83
Table.8	Association between PR and the other variables	84
Table.9	Distribution of HER2 by age and P53	85
Table.10	Association between P53 and PR expression, type of tumor and age at diagnosis	86
Table.11A	The Association of ER and PR expression with clinicopathological factors of cases group.	87
Table.11B	The Association of HER2 and P53 expression with clinicopathological factors of cases group.	88
Table.12	Distribution of mean AgNORs counts in benign and malignant groups.	89
Table.13	Association between mean AgNORs counts and the other variables	90
Table.14	Frequency of ER/PR combined expression by HER2 status.	91
Table.15	Frequency of ER/PR combined expression by P53.	92

List of Figures

Contents		Page No.
Figure.1:	Occurrence of ER, PR, HER2 and P53 in Yemeni female with breast cancer	93
Figure.2:	Description of ER and PR expression by intensity in cases group	94

LIST of Photomicrographs

Contents		Page No.
Photo.1:	A case of 42 years old with IDC and grade I (A) H and E, (B) shows strong positive nuclear ER immunostaining (+3), (C) shows negative HER2 immunostaining (x40) and (D) shows internal positive control for ER.	95
Photo.2:	A case of 50 years old with ILC (A) stained with H and E; (B) shows moderate (6/8) or (+2) nuclear immunostaining for ER and PR; (C) shows very weak (+1) HER2 cell membrane immunostaining; (D) shows moderate nuclear immunostaining of p53 (+2) (x10).	96
Photo.3:	A case of 55 years old with IDC, grade II; (A) stained with H and E; (B) shows very weak staining for ER (2/8) (negative); (C) shows strong complete membranous staining for HER2 protein and (D) show high AgNORs counts.	97
Photo.4:	A case of 35 years old, with IDC and grade I; (A) stained by H and E; (B) shows strong nuclear immunostaining of ER (+3); (C) show negative staining for HER2 and (D) shows moderate nuclear p53 immunostaining (+2).	98
Photo.5:	A case with IDC and grade II (A) shows strong nuclear immunostaining of p53 (+3); and (B) shows high AgNORs nuclear dots counts (x40).	99
Photo.6:	A case of 55 years old with IDC grade III; (A) H and E; (B) shows high AgNORs counting (x50).	100
Photo.7:	A case of fibroadenoma with age 24 years, (A) staining with H and E; (B) shows nuclear immunostaining for ER receptor (+2); (C) shows low AgNORs nuclear dots (x40)	101