ةةةةة ةةةةةةة

بسم الله الرحمن الرحيم

رَبِّ أَوْزِعْنِي أَنْ أَشْكُرَ نِعْمَتَكَ الَّتِي أَنْعَمْتَ عَلَيَّ
وَعَلَى وَالِدَيَّ وَأَنْ أَعْمَلَ صَالِحًا تَرْضَاهُ وَأَدْخِلْنِي
بِرَحْمَتِكَ فِي عِبَادِكَ الصَّالِحِينَ (النمل-19)

صدق الله العظيم

i

Dedication

To……

My father……who worked hardly for us.

To ……..

My mother…….who taught me how I could be human

To …….

My wife, daughters and son……..

To ……..

My beloved brothers and sisters

To……

The people, whom I love, respect and appreciate.

Acknowledgement

First of all, I have to thank God to whom be ascribed all perfection and majesty all the beans and for grating me strength and enabling me to complete this study successfully.

I like to express my greatest appreciation to my supervisors Dr. Ahmed Abdel badei Mohammed Suleiman, Dr. Hussain Gadelkarim Ahmed and Professor. Amel Omer Bakhiet for their valuable advices and guidance.

My special thanks extend to Mr. Moussa Hussain (National Cancer Institute - Cairo), Mr. Nagi Modawi (Soba Teaching Hospital) and Miss. Lamia Ahmed Elsheikh (National Health Center-Khartoum) for their help during samples collection and staining.

I wish to acknowledge all members of the medical lab. Science (SUST).

My in-depth thanks, greatest gratitude, and love to my mother and father, whose their continuous prayer and support, helped me in all the times of this study. Also, my grateful appreciation and love is to my wife, whose was extremely patient and supportive. I would like to thank my daughters and son for their sacrifice and patience. Also, I wish to express my thanks and love to my sisters and brothers, for their help and encouragement.

Last and never the least. I am greatly in debt to all those who stood by me and supported me during this long journey.

List of Contents

Title	Page NO
الاية الكريمة	i
Dedication	ii
Acknowledgment	iii
List of Contents	iv
List of Figures	ix
List of Tables	x
List of colored plates	xii
List of abbreviations	xiii
Abstract	xv
الخلاصة	xviii
Chapter One **Introduction**	
Introduction	1
Objectives	5
Chapter Two **Review of Literature**	
2.1 The urinary system	6
2.2 Histology of the urinary system	6
2.3 Anatomy and histology of the urinary bladder	7
2.4 Pathology of urinary bladder	10
2.4.1 Inflammatory changes	10
2.4.1.1 Bladder cystitis	10
2.4.1.1.1 Acute and chronic cystitis	11
2.4.1.1.2 Chemical cystitis	11
2.4.1.1.3 Tuberculous cystitis	12
2.4.1.1.4 Schistosomiasis (bilharziasis)	12
2.4.1.1.5 Radiation cystitis	14

2.4.1.1.6 Interstitial cystitis (Hunner ulcer)	14
2.4.2 Metaplastic lesions	15
2.4.2.1 Cystitis glandularis and cystitis cystica	15
2.4.2.2 Squamous metaplasia:	15
2.4.2.3 Nephrogenic Metaplasia (Nephrogenic Adenoma)	15
2.4.3 Bladder cancer	16
2.4.3.1 Epidemiology of bladder cancer	16
2.4.3.2 Risk factors for bladder cancer	16
2.4.3.2.1 Tobacco	16
2.4.3.2.2 Soy food	17
2.4.3.2.3 Coffee and Tea	17
2.4.3.2.4 Meat	17
2.4.3.2.5 Analgesic abuse	17
2.4.3.2.6 Chronic cystitis and other infections	18
2.4.3.2.7 Pelvic irradiation	21
2.4.3.2.8 Cyclophosphamide	22
2.4.3.3 Protective factors	22
2.4.3.3.1 Fluid intake	22
2.4.3.3.2 Fruits and vegetables	22
2.4.3.3.3 Carotenoids	23
2.4.3.4 Signs and symptoms of bladder cancer	23
2.4.3.5 Histological types of bladder cancer:	23
2.4.3.5.1 Urothelial (Transitional cell) carcinoma	23
2.4.3.5.2 Squamous cell carcinoma	24
2.4.3.5.2.1 Non-schistosoma-related SCC	24
2.4.3.5.2. 2 Schistosoma-related SCC	25
2.4.3.5. 3 Adenocarcinoma	25
2.4.3.5.4 Small cell carcinoma	26
2.4.3.5. 5 Bladder sarcoma	26
2.4.3.5.6 Carcinosarcoma and sarcomatoid	26

2.4.3.5.7 Paraganglioma	27
2.4.3.5.8 Inflammatory pseudo tumors	28
2.4.3.5.9 Melanoma	28
2.4.3.5.10 Lymphoma	29
2.4.3.6 Staging and grading of bladder cancer	29
2.4.3.6.1 Staging of bladder cancer	29
2.4.3.6.2 Grading of bladder cancer	30
2.4.3.7 Diagnosis of bladder cancer	31
2.4.3.7.1 Physical examination	31
2.4.3.7.2 Imaging methods	32
2.4.3.7.2.1 Intravenous urography and computed tomography scan	32
2.4.3.7.2.2 Ultrasonography	32
2.4.3.7.3 Cystoscopy	32
2.4.3.7.4 Cytological and histochemical methods	33
2.4.3.7.5 Immunohistochemistry	36
2.4.3.7.5.1 Tumor markers	37
2.4.3.7.5.1.1 Ki-67	38
2.4.3.7.5.1.2 Cyclooxygenase genes and enzymes	39
2.4.3.7.5.1.2.1 Cellular localization of COX isozymes	40
2.4.3.7.5.1.2.2 Regulation and tissue expression of COX isozymes	42
2.4.3.7.5.1.2.2.1 Tissue expression	42
2.4.3.7.5.1.2.2.2 Regulation of COX expression	43
2.4.3.7.5.1.2.2.3 COX-2 and Cancer	43
2.4.3.7.5.1.2.2.4 COX-2 and bladder cancer	44
2.4.3.7.5.1.3 Inducible nitric oxide synthase (iNOS)	47
Chapter Three **Material and Methods**	
3. 1 Study design	50
3.2 Materials	50
3.3 Sample size	50

3.4 Samples preparation	50
3.5 Staining procedures	51
3.5.1 Silver nitrate method for Ag NOR	51
3.5.2 Ki67 immunohistochemical staining procedure	51
3.5.3 Cyclooxygenase immunohistochemistry staining procedure	51
3.5.4 Nitric oxide immunohistochemistry staining procedure	52
3.6 Strategies for immunostaining evaluation	53
3.7 Statistical analysis	53
3.8 Ethical consideration	53
Chapter Four **Results**	
4 Results	54
Chapter Five **Discussion**	
5 Discussion	79
Conclusions and Recommendations	
Conclusions	87
Recommendations	88
References	
References	89

List of Figures

Figure NO	Title	Page
Figure (1)	The description of the study population by residence and pathology	59
Figure (2)	The description of the study population by gender and pathology	60

List of Tables

Table NO	Title	Page
Table (1)	The distribution of study population by age and gender	61
Table(2)	The mean ± STD of AgNORs dots among different pathological conditions	62
Table (3)	The mean differences of AgNORs dots among the different bladder pathology	63
Table (4)	The immunohistochmical staining of the Ki67marker among bladder pathological conditions	64
Table (5)	The immunohistochmical staining of the COX2 marker among bladder pathological conditions	65
Table (6)	The immunohistochmical staining of the iNOS marker among bladder pathological conditions	66
Table (7)	The mean percentage of cells stained positive for tumor markers among different bladder pathological conditions	67
Table (8)	The immune-staining intensity of the ki67 marker among different bladder pathological conditions	68
Table (9)	The immune-staining intensity of the COX2 marker among different bladder pathological conditions	69
Table (10)	The immune-staining intensity of the iNOS marker among different bladder pathological conditions	70
Table (11)	Co expression of COX2 and iNOS among the pathological conditions	71
Table (12)	The relationship between COX2 immunostaining and	72

	Schistosomal ova positivity in different bladder pathology	
Table (13)	The relationship between iNOS immunostaining and Schistosomal ova positivity in different bladder pathology	73

List of Colored plates

Colored plate No	Title	Page
1	Intranuclei AgNORs dots in :(A) Chronic cystitis, (B) TCC, (C) SCC (x1000).	73
2	Ki67 immunohistochemical staining (peroxidase/DAB (brown), counterstained with haematoxylin in: (A) SCC (SBT), (B) TCC (NSBT), (C) bladder cystitis (x400).	74
3	COX2 immunohistochemical staining peroxidase/DAB (brown), counterstained with haematoxylin in: (A) SCC (SBT), (B) TCC (NSBT), (C) bladder cystitis (x400).	75
4	iNOS immunohistochemical staining peroxidase/DAB(brown), counterstained with haematoxylin in: (A) SCC (SBT), (B) TCC (NSBT), (C) bladder cystitis (x400).	76

List of Abbreviations

Abbreviation	Full name
TCC	Transitional Cell Carcinoma
SCC	Squamous Cell Carcinoma
AgNORs	Argyrophilic Nucleolar Organizer Regions
COX2	Cyclooxygenase-2
RICK	Radioisotope Center Khartoum
UTI	Urinary Tract Infections
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbant Assay
DNA	Deoxyribonucleic acid
BC	Bladder cancer
SCI	Spinal Cord Injured
MIBG	Meta Iodine Benzyl Guanidine
PET	Positron Emission Tomography
MALT	Mucosa Associated Lymphoid Tissue
NMIBC	Non Muscle Invasive Bladder Cancer
TNM	Tumor Node Metastases
WHO	World Health Organization
PUNLMP	Papillary Urothelial Neoplasms of Low malignant Potential
TUR	Trans Urothelial Resection
IVU	Intra Venous Urography
CT	Computed Tomography
US	Ultra Sonography
CIS	Carcinoma -in -situ
RNA	Ribonucleic Acid
NCI	National Cancer Institute
ASCO	American Society of Clinical Oncology
ACS	American Cancer Society
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
IHC	Immunohistochemistry
RCC	Renal Cell Carcinoma
PGS	Prostaglandin Synthase
PGHS	Prostaglandin –H-Synthase
ER	Endoplasmic Reticulum
IPRH	Illinois Program for Research in the Humanities

NFAT	Nuclear Factor of Activated T- cell
PEA3	Polyoma Virus Enhancer Activator-3
VEGF	Vascular endothelial growth factor
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
BFGF	Basic fibroblast growth factor
TGFβ	Transforming growth factor beta
NHL	National Health Laboratory
DPX	Dextrin plasticizer xylene

Abstract

This is a descriptive retrospective study carried out in Khartoum state-Sudan during the period between November 2008 to May 2011.The study aimed at histological and immunohistochemical assessment of the bladder cancers and its association with urinary *schistosomiasis* among Sudanese patients. Samples from 194 patients were included (87 with SCC, 68 with TCC and 39 with benign bladder cystitis). Their ages ranging from 34 to 91years with the mean ages of 58.06 for SCC, 69.49, 75.26 for TCC and cystitis respectively. The male female ratio was 1.6:1. The great majority of patients were from Central Sudan constituting 101 of whom 49 bladder SCCs, 31 TCCs and 21 with bladder cystitis.

For each specimen 4 histopathological procedures were performed; AgNORs (histochemical), ki67, COX2 and iNOS (immunohistochemical).

COX2 and iNOS were significantly higher in SCC and TCC compared to cystitis group (p.value = 0.000), 82/87 (94.3%) of bladder SCC were stained positive for COX2, and 39/68(57.4%) of TCC similarly stained positive, while 18/39(46.2%) of bladder cystitis expressed COX2 but all with low intensity.

74/87(85.1%) of SCC stained positive for iNOS; the marker was expressed among 22/68 (32.2%) of TCC, and for cystitis group only 17/39(43.6%) were positive but all with low intensity (P. value was 0.000).

Significant increase in mean of cells stained positive for the COX2 and iNOS markers from cystitis group to TCC to SCC was observed (p.value = 0.000)

With regard to COX2 and iNOS immunoreactivity in schistosomal and non schistosomal associated bladder pathology; significant effect of schistosomal ova presence to both markers was observed as all schistosomiasis associated SCC (28 out of 28) samples were immunopositive for COX2, five out of 59 of non schistosomal associated SCCs were negative for COX2. Nine out of ten of

schistosomal associated TCC expressed COX2, compared to 30 out of 58 non schistosomal TCC positive for the marker. Ten out of 12 of schistosomal associated cystitis were positive for COX2 while only eight out of 27 of non schistosomal cystitis were positive for COX2 marker.

iNOS was expressed in all schistosomal associated SCCs but only in 46 out of 59 of non schistosomal type. For TCC; six out of ten of schistosomal type was positive compared to only 14 out of 58 of non schistosomal samples. Similar effect was observed in cystitis group; all schistosomal type has expressed the marker but only seven out of 29 of non schistosomal were positive for iNOS.

COX2 and iNOS markers were co expressed in 83.9% of SCC, 22.1% TCC and in 28.2% of cystitis samples.

Significant decline in means of AgNORs dots from SCC to TCC to bladder cystitis was observed, the study revealed significant difference between means of AgNORs among different bladder pathology (mean difference between SCC and TCC was 1.001, p.value = 0.000), between SCC and cystitis mean difference was 2.224, p.value = 0.000) and between TCC and cystitis was 1.223, p.value = 0.001). The means of AgNORs dots increase from cystitis to TCC to SCC samples.

Significant difference in Ki67 proliferative marker expression was observed between bladder tumors and cystitis group; 155/155 (100%) of bladder tumors were positive with different intensity compared to 31/39(79.5%) of benign bladder cystitis were stained positive and all cystitis samples stained with low intensity.

The role of AgNORs and ki-67 in differentiating between schistosomal related bladder tumor and non schistosomal related bladder tumor is still controversial.

Both COX2 and iNOS biomarkers are strongly associated with urinary schistosomal bladder cancer; therefore it might be useful as indicators and discriminatory markers for bladder cancer in general and schistosomal associated one in particular.

On the basis of these findings it is concluded that; all four investigated indicators play significant roles in bladder carcinogenesis, therefore we recommend the consideration of these procedures in the assessment of individuals at risk.

الخلاصة

أجريت هذه الدراسة الوصفية الاسترجاعية بولاية الخرطوم – السودان فى الفترة بين نوفمبر 2008 وحتى مايو 2011 م ، هدفت الدراسة الى التقييم الكيميائى النسيجى والكيميائى المناعى النسيجى لأورام المثانة البولية وعلاقتها بالبلهارسيا البولية عند المرضى السودانيين

مائة وأربعة وتسعون عينة من المرضى ضمنت فى هذا البحث (سبع وثمانون من سرطان الخلايا الطلائية المفلطحة ، ثمانية وستون من سرطان الخلايا المتحولة للمثانة البولية وتسع وثلاثون من التهابات المثانة البولية)

تراوحت أعمارهم بين أربع وثلاثون الى واحد وتسعون سنة بمتوسط عمر 58.06 للأس سي سي، 69.49, 75.26 للتى سي سي و سيستايتس على التوالى

الذكور للاناث بنسبة 1.6:1،أغلب المرضى من منتصف السودان يمثلون 101 منهم 49 اس سي سي ،31 تى سي سي و 21 سيستايتس

لكل عينة، أربع طرق نسيجية مرضية طبقت، أي جى أن أو ار(كيميائى نسيجى) ،كى اى ، سايكلوأوكسجينيز و النايترك أوكسيد (كيميائى مناعى نسيجى)

السايكلوأوكسجينيز و النايترك أوكسيد معنويا أعلى فى الاس سي سي والتى سي سي مقارنة بمجموعة السيستايتس (مستوي المعنوية = 0.000)، 82/87 (94.3%) من الاس سي سي كانت موجبة الصبغ للسايكلوأوكسجينيز و 39/68 (57.4%) كانت مثلها موجبة الصبغ و ذ 18/39 من السيستايتس أظهرت السا **يكلوأوكسجينيز** ولكن جميعها بكثافة ضعيفة

74/87 ((85.1% من الاس سي سي صبغت ايجابيا **للنايترك أوكسيد ، الواسم أظهر فى** 22/68 (32.2%) من التى سي سي وبالنسبة لمجموعة للسيستايتس ف قط 17/39 صبغت ولكن جميعها بكثافة ضعيفة (مستوى المعنوية = 0.000)

لوحظ أنه يوجد تزايد معنوي فى متوسط عدد الخلايا التى صبغت ايجابيا للسايكلوأوكسجينيز والنايترك أوكسيد من التهابات الى سرطان الخلايا المتحولة الى سرطان الخلايا المفلطحة للمثانة (مستوى المعنوية = 0.000)

بالنسبة للنشاط الكيميائى المناعى للسايكلوأوكسجينيز و النايترك أوكسيد فى أمراض المثانة المرتبطة بالبلهارسيا وغير المرتبطة بالبلهارسيا ، لوحظ أنه يوجد تأثير معنوى لوجود بيضة البلهارسيا على الواسمين حيث أنه كل عينات الاس سي سي المرتبطة بالبلهارسيا (28 من 28) كانت موجبة للكوكس-2، خمسة من 59 من الاس سي سي غير المرتبطة بالبلهارسيا كانت سالبة للكوكس-2 ، تسعة من عشرة من عينات التى سي سي المرتبطة بالبلهارسيا أظهرت الكوكس-2 مقارنة ب 30 من 58 من التى سي سى غير المرتبطة بالبلهارسيا وكانت موجبة للواسم، عشرة من 12 من السيستايتس المرتبطة بالبلهارسيا كانت موجبة للكوكس-2 بينما ثمانية من 27 من السيستايتس غير المرتبطة بالبلهارسيا كانت موجبة للواسم

الاي نوز ظهر فى كل الاس سي سي المرتبطة بالبلهارسيا وفقط فى 46 من 59 من النوع غير المرتبط للتى سي سي ، ستة من عشرة من المرتبطة بالبلهارسيا كانت موجبة بينما فقط 14 من 58 من غير المرتبطة بالبلهارسيا موجبة، تأثير مماثل أيضا لوحظ فى مجموعة السيستايتز، عشرة من عشرة من المرتبطة بالبلهارسيا أظهرت الواسم مقارنة بسبعة فقط من 28 من غير المرتبطة بالبلهارسيا كانت موجبة للأي نوز

الكوكس-2 والأي نوز ظهرا ارتباطيا فى 9 83. % من الاس سي سي، 22.1 % من التى سي سي وفى 28.2 % من مجموعة السيستايتس

لوحظ تناقصا معنويا فى متوسط عد الاي جى ان أو ار من الاس سي سي الى التى سي سي الي مجموعة السيستايتس ؛ الدراسة أوضحت أنه يوجد فرق معنوي بين متوسطات الاي جى ان أو ار بين أمراضيات المثانة المختلفة (الفرق فى المتوسط بين الاس سي سي و التى سي سي = 1.001 بقوي معنوية = 0.000) وبين الاس سي سي والسيستايتس كان 2.224 بقوي معنوية = 0.000 ، وبين التي سي سي والسيستايتس كان 1.223 بقوي معنوية = 0.001)

لوحظ أنه يوجد فرقا معنويا فى اظهار واسم الانقسام كى أي-67 لوحظ بين أورام المثانة ومجموعة السيستايتس 155/155 من أورام المثانة كان صبغها ايجابيا مقارنة ب 31/39 من مجموعة السيستايتس كانت موجبة ولكن جميعها بكثافة ضعيفة

دور الاي جى ان او ار والكى اى -67 فى التمييز بين أورام والتهابات المثانة المرتبطة بالبلهارسيا وغير المرتبطة مازال تحت البحث

كلا الواسمين الكوكس-2 والاي نوز لهما ارتباط قوي بسرطانات المثانة المرتبطة بالبلهارسيا البولية ، لذلك يمكن أن يكون لهما فائدة كمؤشرات وواسمات مميزة لسرطان المثانة عموما وللنوع المرتبط بالبلهارسيا خصوصا

استنادا على هذه الموجودات نستنتج أن: كل المؤشرات الاربع المدروسة تلعب دورا معنويا فى تسرطن المثانة ،لذلك نوصى بالنظر فى استخدام هذه الطرق لتقييم الأفراد المعرضين للخطر