

DEDICATION

To parents (Mansur and Fareeda) whose prayers, love and never ending support inspired me to achieve my goals.

To my brothers and sisters, they offer a limitless giving.

To the victims of Breast Cancer who are waiting for real help through research.

ACKNOWLEDGEMENTS

First and foremost, I raise my sincerest thanks to Allah (Subhanahu Wa Ta'ala) by saying: (Alhamdulillah) for all and everything.

Then,

This research work would not have been possible without the guidance and the help of several individuals who in one way or another contributed and extended their valuable assistance in the preparation and completion of this study.

Foremost, I offer my sincere gratitude to my supervisor, Prof. Hussain Gad Elkarim Ahmed, Professor of Histopathology and Cytology, who has supported me throughout this work with his patience, wisdom and extraordinary knowledge whilst allowing me a place to work in my own way. I attribute my advancement to his encouragement and effort and without him this thesis, too, would not have been completed or written. One simply could not wish for a better supervisor.

I also want to express my gratitude to my Co-supervisor, Prof. Amel Omer Bakhet, Professor of Pathology; she inspires me to be better in the way of study and research.

I must also acknowledge Mr. Basheer Abdulmalik Mohammed, for his cooperation in sample collection and cutting. Thanks also go to Mr. Ahmed Mohammed Khairy and Mr. Ibrahim Idris Ibrahim for their help in sample collection. I would like to thank Mr. Sharafeldeen Elradi, for his help in tissue processing.

ABSTRACT

This is a retrospective descriptive study conducted in Khartoum State to find out (if any) association between ER receptors and Carbohydrates or Connective tissue fibres in specimens obtained from 60 women presented with breast lesions (35 were with malignant lesions and 25 were benign lesions). All specimens were diagnosed at the histopathology department of Laboratory Administration in Khartoum State, Sudan. Malignant tumors include, DCI, IDC and ILC representing 2/35(5.7%), 23/35(65.7%) and 10/35 (28.6%), per capita. Benign tumors include, Fibroadenoma, Fibrocystic changes and others representing 18/25(72%), 4/25(16%) and 3/25(12%) respectively.

All specimens were then re-examined for ER status by immunohistochemistry, Carbohydrates by (Alcian blue, Alcian blue-methylation, PAS and PAS-diastase), Connective tissue fibres by (Vangieson, Masson Trichrome, Silver stain and Verhoeff) and Nucleolar Organizing regions by AgNOR.

Of the 60 breast lesions, 35/60 (58.3%) were with malignant tumors. The remaining 25 samples were with benign breast lesions. Of the 35 malignant samples immunohistochemical staining for ER revealed positive expression in 12/35(34.3%) and negative in 23/35(65.7%) specimens. Regarding benign samples there were 8/25(32%) ER positive and 17/25(68%) ER negative. Out of the total study subjects there were 20/60(33.3%) ER positive.

Regarding malignant samples, DCI, IDC and ILC ER positive expressions were identified among 1/2(50%), 7/23(30%) and 4/10(40%), respectively. Regarding benign samples, Fibroadenoma, Fibrocystic changes, and others

ER positive expression were detected among 6/18(33.3%), 1/4 (25%) and 1/3(33.3%), in this order.

To the best of our knowledge, there is no study investigated the association between ER, carbohydrate and connective tissue fibres. Thereafter, and according to present study there is a strong relationship between ER positivity and presence of acid mucin ($P = 0.000$), but not with sulphated mucin. Furthermore, a strong relationship was found between ER positivity status and PAS positive materials (P value = 0.000), but not with glycogen. Since, there is a significant correlation between ER and Carbohydrates, these positive PAS materials might be PAS positive acid mucin. Regarding connective tissue fibres there is a significant correlation between ER+ and presence of collagenic fibres (P value = 0.000). Furthermore, Elastic fibres were significantly associated with ER+ (P value = 0.039), as well as, Reticulin fibres (P value = 0.020). The mean number of AgNORs was relatively similar in malignant and benign breast lesions.

The significant positive association between ER expression and carbohydrate and also between ER expression and connective tissue fibres suggest that the ER expression could be predicted in histopathology laboratory using histochemical demonstration of carbohydrates and connective tissue fibres of female breast tissue. The histochemical prediction of ER receptor status may be helpful, cost effective and time saving more than that of more sophisticated investigations. Further studies with large sample size and more sophisticated techniques are required to strength the findings of this study.

الخلاصة

هذه الدراسة هي دراسة وصفية ارجاعية أجريت في ولاية الخرطوم لمعرفة الارتباط (إن كان هناك أي ارتباط) بين مستقبلات الإستروجين (ER) والكريوهيدرات أو ألياف النسيج الضام في العينات التي تم الحصول عليها من 60 امرأة حضرت وهي مصابة بآفات الثدي (35 آفات خبيثة ، و 25 آفات حميدة). تم تشخيص جميع العينات في قسم التشريح المرضي في إدارة المعامل ولاية الخرطوم، السودان. الأورام الخبيثة تشمل (DCI) و (IDC) و (ILC) و تمثل 2/35 (5.7%)، و 23/35 (65.7%) و 10/35 (28.6%)، على التوالي. أما الأورام الحميدة تشمل ، الورم الغدي الليفي، والتغيرات الليفية التكيسية، وحالات أخرى وتمثل 18/25 (72%)، 4/25 (16%) و 3/25 (12%) على التوالي.

ثم أعيد فحص جميع العينات لحالة (ER) بواسطة الكيميائية المนาوعة للأنسجة، وتم فحص الكريوهيدرات بواسطة (زرقة الألسيان، وزرقة الألسيان-الميثيلية، وطريقة (PAS)، وطريقة (PAS) دياستان)، وتم فحص ألياف النسيج الضام بواسطة طريقة (Silver) وطريقة ثلاثي الألوان ماسون، وطريقة (Verhoeff)، وطريقة (Vangieson)، وتم فحص مناطق التنظيم النويي (stain).

من عينات آفات الثدي الـ 60 هذه، كان 35/60 (58.3%) أورام خبيثة. وكان ما تبقى وهو 25 عينة من آفات الثدي الحميدة. من العينات الـ 35 الخبيثة والتي تم صبغها بالطريقة الكيميائية المนาوعة النسيجية لمستقبلات الإستروجين (ER) كان هناك 12/35 (34.3%) أظهرت التعبير الإيجابي و 23/35 (65.7%) كانت سلبية. فيما يتعلق بالعينات الحميدة كان هناك 8/25 (32%) (ER) إيجابي و 17/25 (68%) (ER) سلبي. من مجموع الخاضعين للدراسة هناك 20/60 (33.3%) (ER) إيجابي.

فيما يتعلق بالعينات الخبيثة (DCI)، (IDC)، (ILC) وجد أن التعبير الإيجابي لمستقبلات الإستروجين (ER) هو 1/2 (50%)، 7/23 (30%) و 4/10 (40%) على التوالي. فيما يتعلق بالعينات الحميدة، الورم الغدي الليفي، والتغيرات الليفية التكيسية، والحالات الأخرى وجد أن التعبير الإيجابي لمستقبلات الإستروجين (ER) هو 6/18 (33.3%)، 1/4 (25%) و 1/3 (33.3%)، بهذا الترتيب.

إلى حد علمنا، ليس هناك أية دراسة قامت بالتحقيق في العلاقة بين مستقبلات الإستروجين (ER)، والكريبوهيدرات وألياف النسيج الصام. بعد ذلك، ووفقاً لهذه الدراسة تم إيجاد علاقة قوية بين الحالة الإيجابية لـ(ER) وحامض الميوسين ($P = 0.000$)، ولكن ليس مع الميوسين المكبرت. وعلاوة على ذلك، تم العثور على علاقة قوية بين الحالة الإيجابية لـ(ER) والمواد الإيجابية بطريقة ($P = 0.000$)، ولكن ليس مع الجليكوجين. لأن هناك ارتباط كبير بين (ER)، والكريبوهيدرات، فإن هذه المواد الإيجابية بطريقة (PAS) قد تكون هي حامض الميوسين الإيجابي بطريقة (PAS). فيما يتعلق بألياف النسيج الصام هناك علاقة كبيرة بين (ER) ووجود الألياف الكولاجينية ($P = 0.000$). وعلاوة على ذلك، الألياف المرنة ترتبط بشكل كبير مع (ER) ($P = 0.039$)، وكذلك بالألياف الشبكية ($P = 0.020$). وكان متوسط عدد مناطق التنظيم النووي متساوٍ نسبياً في كل من الآفات الخبيثة والآفات الحميدة في الثدي.

الارتباط الإيجابي الكبير بين التعبير عن (ER) والكريبوهيدرات، وكذلك بين (ER) وألياف النسيج الصام تشير إلى أنه من الممكن توقع التعبير عن (ER) في مختبر أمراض الأنسجة باستخدام الدراسة الكيميائية النسيجية للكريبوهيدرات وألياف النسيج الصام من نسيج الثدي للإناث. التنبؤ الكيميائي النسيجي لحالة مستقبلات الإستروجين (ER) قد يكون مفيداً، ذو تكلفة فعالة، وموفرًا للوقت أكثر من تلك الفحوصات الأكثر تطوراً. يلزم إجراء المزيد من الدراسات بحجم عينة أكبر وتقنيات أكثر تطوراً من أجل تقوية نتائج هذه الدراسة.

List of contents

Contents	Page No.
Dedication	vii
Acknowledgement	vii
Abstract (English)	vii
الخلاصة	vii
List of Contents	vii
List of Tables	vii
List of Photomicrographs	vii
List of Figures	vii
Chapter One	
Introduction	1
Study Objectives	10
Chapter Two	
Review of Literature	11
Scientific background	11
Normal histology of the breast	11
Inflammatory conditions of the breast	12
Non inflammatory conditions of the breast	12
Benign non-neoplastic lesions of the breast	13
Benign neoplastic breast lesions	14
Breast cancer	14
Epidemiology of breast cancer	16
Aetiology of breast cancer	18
Diagnosis of breast cancer	26
Breast self examination	27
Clinical Breast Examination	27
Imaging techniques	28
Conventional histopathology	30
Fine needle aspiration cytology	30
Core needle biopsy	31
Open excision biopsy	32
Sub-typing of breast carcinoma	32

<i>In Situ</i> carcinomas	32
Invasive carcinoma	33
Special histologic type of invasive carcinoma	35
Tumor characteristics	35
Staging of invasive breast cancer	35
Immunohistochemistry	37
General aspects of immunohistochemistry	37
Immunohistochemistry in breast cancer	41
Estrogen Hormone	42
Estrogen Receptor	43
Triple negative (TN) breast cancer	45
Clinical importance for evaluation of ER in breast cancer	45
Argyrophilic nucleolar organizer regions	46
Molecular diagnosis and prognosis of breast cancer	50
Chapter Three	
Materials and methods	52
Chapter Four	
Results	58
Chapter Five	
Discussion	90
Conclusion and Recommendations	95
References	96
Appendices	137

LIST OF TABLES

Contents	Page No.
Table.1. Distribution of the study population by Age	64
Table.2. Distribution of study population by Pathology	65
Table.3. Distribution of ER status by Tumor type	66
Table.4. Distribution of ER status by Carbohydrates	68
Table.5. Distribution of ER status by Connective Tissue Fibres	69
Table.6. Distribution of Carbohydrate (Alcian Blue) by Tumor type	71
Table.7. Distribution of Sulphated Mucin (Alcian Blue Methylation) by Tumor type	72
Table.8. Distribution of PAS +ve Carbohydrates by Tumor type	73
Table.9. Distribution of Glycogen (PAS Diastase) by Tumor type	74
Table.10. Distribution of Collagen (Vangieson) by Tumor type	75
Table.11. Distribution of Collagen (Masson) by Tumor type	76
Table.12. Distribution of Elastic fibres (Verhoeff stain) by Tumor type	77
Table.13. Distribution of Reticulin (Silver stain) by Tumor type	78

LIST OF Photomicrographs

Contents		Page No.
Photo.1.	H&E as a stain for general picture. ×10.	79
Photo.2.	Alcian Blue for Acid mucin (blue colour areas). ×10.	80
Photo.3.	Alcian Blue Methylation for sulphated acid mucin (blue colour areas). ×10.	81
Photo.4	PAS for carbohydrates and other PAS+ structures (magenta colour). ×20.	82
Photo.5:	PAS Diastase PAS for carbohydrates and other PAS+ structures other than glycogen (magenta colour). ×20.	83
Photo.6.	Van Gieson for collagen fibres (red colour). ×10.	84
Photo.7.	Masson trichrome for collagen fibres (blue colour). ×10.	85
Photo.8.	Verhoeff for elastic fibres (black colour). ×10.	86
Photo.9.	Silver Stain for reticulin fibres (black colour). ×10.	87
Photo.10.	ER +ve sample by Immunohistochemistry. ×20.	88
Photo.11.	ER -ve sample by Immunohistochemistry. ×20.	89

LIST OF Figures

Contents		Page No.
Figure.1.	Description of ER + by Pathology	67
Figure.2.	Description of ER+ status by Histochemical Identification of carbohydrates and fibres	69