جامعـة دمشـــق

كليـة الطـب البشـري

قسم النسج والتشريح والجنين

العلاقة بين معدل تعبير مستقبل عامل النمو الظهاري

و خطورة أورام الثدي

The correlation between the rate of epidermal growth

Factor receptor expression anddanger

Of breast tumors

بحث علمي أعد لنيل شهادة الماجستير في النسج

إعداد

الدكتورة رشا غسان السيد

إشراف

المشرف المشارك

أ.الدكتور محمد علي السطلة

المشرف

أ.الدكتور علي حسن

٢٠١٤

المقدمة:

إن الورم الخبيث هو تجمعللخلايا السرطانية التي يمكن أن تغزو النسج المجاورة أو تعطي انتقالات لمناطق بعيدة من الجسم.

إن وجود كتلة في الثدي يبعث على التوتر والقلق لدى المريضة مع العلم أنه ليس كل الكتل في الثدي سرطانية، إلا أن ما يثير مخاوف المريضة على الأكثر هو احتمالأن تكون سرطانا، وتأتي أهمية هذا الموضوع من كون أورام الثدي واسعة الانتشار.

يعد سرطان الثدي ورم خبيث ينشأ على حساب أنسجة الثدي الأكثر شيوعاً لدى الإناث،لكن قد يصيب الرجال أيضا، ويأتي بعد سرطان الرئة من حيث الوفيات، لكنه يأتي بالدرجة الأولى كسبب مسؤول عن وفيات السرطان بعمر ٤٠-٤٤ عاماً، حيث أنه مسؤول عن ١٩% من وفيات السرطان في هذه الفئة العمرية، و كل امرأة لديها احتمال ٨/١ أن تصاب بسرطان الثدي في مرحلة ما من حياتها.

البنية النسيجية الطبيعية للثدي :

يتكون الثدي عند المرأة من5- 10 فصا غديا تنفصل عن بعضها بنسيج ضام كثيف محاط بنسيج شحمي غزير، تتوضع الفصوص الغدية في الأقسام العميقة من الثدي وتشكل مع الأقنية هرما ذروته الحلمة يفرغ كل فص في قناة فصية واحدة تمتد لقرب الحلمة تسمى القناة الناقلة للحليب تتسع تحت اللعوة لتشكل الجيب الحليبي ثم تمتد عمودية مخترقة الحلمة لتفتح بالثقبة الحليبية ،تستر الأقنية المفرغة للحليب والجيب الحليبي بشرة مطبقة رصفية غير متقرنة

يقسم كل فص إلى 40-20 فصيص تحاط بنسيج ضام شحمي يتمادى مع النسيج بين الفصوص . يحتوي كل فصيص على ١٠-١٠٠ أنبوب سنخي (حويصل غدي إفرازي) تبطنها مع الأقنية الفصيصية بشرة مكعبة بسيطة تحيط بها ألياف عضلية بشروية ترتكز بدورها على غشاء قاعدي يفصلها عن نسيج ضام رخو. يحتوي الثدي على شبكة لمفية تصب بالعقد اللمفية للعنق و تحت الابط، يشكل الجهاز اللمفي في الثدي سبيلاً مهماً لانتشار الخلايا السرطانية، حيثأن انتقال الخلايا السرطانية إلى العقد اللمفية يرفع فرصة الانتقال إلىالدوران الجهازي وبالتالي يساعد فيانتشار الورم إلى أجزاء أخرى بعيدة من الجسم.

تعد الكتلة النسيجية في الثدي العرض الأكثر شيوعاًللورم، علماً إن معظم كتل الثدي سليمة وليست سرطانية، وهي تنتج غالباً عن تغيرات كيسية ليفية غير مهددة للحياة ولا تعطي انتقالات، إلا أنها يمكن أن تؤدي إلى التورم والألم وخروج مفرزات عابرة من الحلمة،وتكون المرأة المصابة بها أكثر عرضة للإصابة بسرطان الثدي.

- سرطانات الثدي

يعد سرطان الثدي الثاني شيوعاً في العالم بعد سرطان الرئة، وتبلغ نسبته نحو ٢٢%من مجمل حالات السرطان في كلا الجنسين، كما يأخذ المرتبةالخامسةمن حيثالتسبب بالوفاة بمرض السرطان، وإن معدل البقاء للمصابين يختلف بشكل كبير بين الأفراد، وهذايعتمد على عدة عوامل منها المعالجة الجيدة.

-تصنيف أورام الثدي :

يرتكز تصنيف أورام الثدي على مظهر الخلايا السرطانية بالمقارنة مع مظهر النسيج الطبيعي للثدي، فالخلايا الطبيعية تكون متمايزة، أي أنها تأخذ أشكال نوعية تعكس وظيفتها كجزء من العضو أما الخلايا السرطانية فتكون عديمةالتمايز (٥٥) و (٥٨)

تصبح الخلايا الطبيعية التي تبطن أقنية الحليبفي الحالة الورمية غير منتظمة، ويصبح الانقسام الخلوي غير مضبوط، وتبدو نوى الخلايا أقل انتظاماً، واستناداً إلى ذلك صنفت سرطانات الثدي إلى ما يلي:

١-سرطانات غير غازية (noninvasive carcinoma) وتضم :

*الكارسينوما القنوية في المكان(tubal carcinoma in situ) وهو النمط الأكثر شيوعاًفي سرطانات الثدي غير الغازية، وفيه تكون الخلايا السرطانية موجودة داخل القناة الناقلة للحليب ولم تنتشر بعد خارج جدر الأقنيةأو إلىالنسج المحيطة، وفي هذا النمط هناك حالةمن أصل ٥ حالات تكون الكارسينوما قنوية في المكان، وإن كشفاً مبكراً للمرض في هذه المرحلة يمكن أن يؤدي إلى الشفاء الكامل.

*الكارسينوما الفصيصية في المكان (lobular carcinoma in situ) وتشكل نحو ١٣%من مجموع سرطانات الثدي، وهذا النمط لا يصنف سرطان حقيقي في العديد من المراجع بل يسمى حالة ما قبل سرطانية.

٢-سرطانات غازية (invasive carcinoma) :

*الكارسينوما القنوية الغازية (invasive tubular carcinoma) وهوالنموذج الأكثر شيوعا لسرطان الثدي، إذ يشكل نحو ٥٥%، يبدأ في القناة الناقلة للحليب،ثم يغزو جدار القناة ليصل إلى النسيج الشحمي للثدي حيث ينمو بداخله، وفي هذه المرحلة قد يؤدي إلى انتقالات إلى اجزاء أخرى من الجسم عبر الجهاز اللمفي أو الدوران الدموي الجهازي.

* الكارسينوما الفصيصية الغازية (invasive lobular carcinoma)وتشكل نحو ٥% من مجموع سرطانات الثدي،وفي هذا النموذجيبدأ الورم في الأنيبات الانتهائية للغدد المنتجة للحليب وقد ينتشر إلى أماكن أخرى في الجسم.

٣- سرطان الثدي الالتهابي وهو نواع أخر من أورام الثدي نادر الحدوث.

٤- أورام خبيثة تنشأ على حساب النسج الضامة في الثدي وتشكل أقل من ٥% من مجمل أورام الثدي.

-تحديد درجة الورم

تحدد درجة الورم بالاعتماد على درجة التشابه المجهري للخلايا السرطانية مع خلايا الثدي، ويعد تصنيف نوتنهام Nottingham classification الذي يسمى أحيانا تصنيف Scarff-Bloom-Richardson التصنيف الأشهر والمعتمد في أهم مراكز البحث العلمي، وتبعاً لهذا التصنيف، يتمإعطاء علامات لتشكل القنيات ومعدل الانقسام وانتظام النواة بين ١-٣ نقاط،ثم تجمع هذه العلامات مع بعضها لتعطي العلامة النهائية التي ستشير إلى الدرجة الموافقة (٢٢)و(٢٣) كمايلي:

١- تشكل القنيات:

يقيم هذا المقياسالنسبة المئوية للسرطان التي تشكل بنية قنوية طبيعية حيث تنكسرفي السرطان الآلية التي تلتصق بها الخلايا ببعضها البعض حتى تشكل نسجكالقنيات لذا فإن بنى النسيج تكون ذات ترتيب أقل وإن المظهر الكلي للورم يقيم كالتالي:

تشكل القنيات أكثر من ٧٥% من الورم يعطى نقطة واحدة

تشكل القنيات بين ١٠-٧٥% من الورم يعطى نقطتين

تشكل القنيات أقل من ١٠% من الورم يعطى ثلاث نقط

٢- تغير شكل النواة :

يقيم هذا المقياس إذا كانت نواة الخلية منتظمة كما في الخلايا الطبيعية لظهارة الثدي أو تكون أكبر وأغمق أو غير منتظمة حيث تنكسر في السرطان الآلية التي تضبط الجينات والكروموزومات في النواة وتظهر النواة غير منتظمة مما يؤدي لإنتاج خلايا شاذة وإن الخلايا التي تملك أعلى نسبة من الشذوذات الخلوية تقيم كالتالي:

نواة بتبدل أقل في الحجم والشكل تعطى نقطة واحدة

نواة بتبدل متوسط في الحجم والشكل يعطى نقطتين

نواة بتبدل ملحوظ في الحجم والشكل يعطى ثلاث نقط

٣- معدل الانقسام:

يقيم هذا المقياس المشاهدات الانقسامية في ١٠ حقول مجهرية وكلما زاد عدد انقسام الخلايا كان الإنذار أسوأ وتحصى المشاهدات الانقسامية في محيط السرطان فقط

من الصفر إلى تسع انقسامات في ١٠ حقول مجهرية يعطى نقطة واحدة

من ١٠-١٩ انقسام في ١٠ حقول مجهرية يعطى نقطتين

أكثر من ٢٠ انقسام في ١٠ حقول مجهرية يعطى ثلاث نقط

تحدد الدرجة الكلية كمايلي:

١-إذا كان مجموع النقط بين ٣-٥ فهوورم جيد التمايز(G1)، وهذا يشير إلى ورم منخفض الدرجة (low grade)

٢- إذا كان مجموع النقط بين ٦-٧ فهو ورم متوسط التمايز(G2) :(mediate grade)

٣- إذا كان مجموع النقط بين ٨-٩ فهو ورم قليل التمايز، وهذا يشير إلى ورم عالي الدرجة(high grade)

- تشخيص سرطان الثدي:

١- يعد وجود الكتلة (Mass)العرض الأكثر شيوعاً، وتمتاز الكتلة عادةبأنها غير مؤلمة، وقاسية وذات حواف غير منتظمة.

٢-التورم الكامل أو الجزئيللثدي

٣-تجعد الجلد والاحمرار والتقشر

٤-انقلاب الحلمة

وفي مراحل متقدمة تظهر مجموعة أعراض كالألم في العظاموفي الصدر، وظهور تقرحات فيالجلد، وتورم أحد الذراعين، وفقدان الوزن.

-الآلية الإمراضية (عوامل الخطورة)

تشير الدراسات إلى أن الألية الامراضية لسرطان الثدي غير واضحة بشكل كامل حتى الأن، إلا أن هناك عوامل خطورة عديدة تزيد من فرصة الإصابةبه، أهمها الهرمونات التي تلعبدوراً كبيراً في مراحل عدة من تطور سرطان الثدي،كماأن التغيرات الجينية (الطفرات في الـ DNA)تلعب هي الأخرى دوراً هاماً في حدوث سرطان الثدي وخاصةتلك الطفرات التي تصيب المورثاتالمولدة للورمoncogeneوالتي يزداد عملها بفعل تلك الطفرات، كذلك حدوث طفرات في مستوى عمل المورثات الكابحة للورم والتي تنظمعمليات النمو والانقسام والموت الخلوي، ترفع أيضاً معدل حدوث أورام الثدي، فقد أشار(٥٩) و(٦٢) إلى أن حدوث طفرة فيمورثتيbrca1 وbrca2 الكابحتين للورم يودي إلى زيادة احتمالية الإصابة بالورم.

* عوامل خطورة لا يمكن تغييرها أو التحكم بها وتضم:

١-جنس المريض:إن سرطان الثدي أكثر شيوعا ب١٠٠ مرة عند النساء منه عند الرجال وهذا يعود للهرمونات الأنثوية (الأستروجين والبروجسترون)التي قد تحرض على نمو سرطان الثدي (٦٠).

٢-العمر: يزداد خطر الإصابة مع التقدم بالعمر(٦٠).

٣-عوامل خطر وراثية: اشير إلى أن ٥-١٠%من سرطانات الثدي قد تنتقل بالوراثة (٦١).

٤-القصة العائلية: أشارت الدراسات غلى تزداد خطورة الإصابة بسرطان الثدي مرات عدة في حالوجود أقارب من الدرجة الأولى مصابين بهذا المرض (٦١).

٥-نسيج الثدي الكثيف : تكونبعض النساء التي تملك نسيج ظهاري غدي غذير ونسيجشحمي قليل أكثر عرضة للإصابة بسرطان الثدي، كما تكون إمكانية الكشف المبكر عنه أصعب.

٦-كتل الثدي السليمة

٧-التعرض السابق للأشعة

*عوامل الخطورة التي تتعلق بأسلوب الحياة وتضم:

١-الإنجاب بعد سن الثلاثين يزيد من خطر الإصابة بسرطان الثدي

٢-الرضاعة تخفض بشكل طفيف من الإصابة بسرطان الثدي

٣-تعاطي حبوب منع الحمل الفموية، وكذلك العلاج الهرموني بعد سن الضهي يزيد من خطر الإصابة بسرطان الثدي

٤-إن تناول الكحول والتدخين يزيدان من خطر الإصابة بسرطان الثدي

٥- السمنة قد تزيد من الإصابة بسرطان الثدي بعد سن الضهي لأن النسيج الشحمي ينتج الأستروجين (٦٠)

- الخصائص التشريحية النسيجية والفيزيولوجية الإمراضيةلسرطان الثدي:

يمتد الثدي بين الضلعين الثاني والسادس من الحافة القصية إلى حافة الإبط مقابل العضلة الصدرية من جدار الصدر، ويقسم الثدي إلى أربع أرباعلأغراض سريرية، وهي ربعانعلويان أنسي ووحشي، وربعان سفليان أنسي ووحشي، وإن معظم سرطانات الثدي تحدث في الربع العلويالوحشي.

إن أشيع نمط لسرطانات الثدي هو الكارسينوما التي تنشأ على حساب الخلايا الظهارية، وحوالي ٨٥% من كارسينومات الثدي تحدث على حساب الخلايا القنوية، و١٥%منها تبدأفي الخلاياالمبطنة للغدد المنتجة للحليب،كما يوجد أورام خبيثة تحدث على حساب النسج الضامة في الثدي لكنها نادرة الحدوث.

يتضمن الثدي أوعية دموية ولمفية، ومعظم الأوعية اللمفية تصب في العقد تحت الإبط التيتتصل بالعقد فوق الترقوة، والعقد تحت الترقوة، والعقد الصدرية الداخلية.

تتسلل الخلايا السرطانية إلى الأوعية اللمفية وتنتشر إلى العقد، وقد تتسلل إلى الأوعية الدموية لتعطي انتقالات إلى أجزاء أخرى في الجسم.

تنشأ العديد من سرطانات الثدي من دخول الخلايا الطبيعية للثدي في مراحل عدة تؤدي إلى تغيرها تدريجيا إلى خلاياشاذة تتكاثر بشكل غير مضبوط، يؤدي إلىزيادة في عدد الخلايا أو ما يسمى neoplasia،وحتى ظهور خلايا غير نموذجية، أو ما يسمى dysplasia، ثم تتبع بالكارسينوما في المكان carcinoma in situ،وأخيراً السرطان الغازي، وليس كل سرطانات الثديبالضرورة تمر بهذا النموذج، كما أن سرعة التقدم في هذه المراحل تختلف كثيراً من سرطان إلىآخر، وبعض السرطانات لا تتطور أبداً وتبقى في المكان فقط دون انتشار (٥٨).

عامل النمو الظهاريEGF

تعريف : هو عديد ببتيد بوزن جزيئي ٦٠ كيلو دالتون ومكون من ٥٣ حمض أميني ويوجد ضمن الجزيئة ٣ روابط ثنائية الكبريت تضمن استقرار الجزيئة (١)

عزل عامل النمو الظهاري لأول مرة من الغدة تحت الفك عندالفأر، لكنه اكتشف فيما بعد في معظم النسج البشرية باستخدام المعايرة المناعية الشعاعية حيث يوجد بكميات كبيرة في الكلية، والغدة النخامية، والدرقية، واللعابية، والثدي،، كما يوجد بشكل رئيسيفي الخلايا الظهارية للرئة، والمعدة، والعفج، والبنكرياس، والمبيض، والرحم، والمشيمة(١)، كما يوجد قليلاًفي الغدة الكظرية كما عثر عليه في الصفيحات الدموية و الخلايا البالعة وكذلك في اللعاب والبول والعرق والحليب المفرز من الغدة الثدية والبلازما والبول(٤٩)، وهوينتج بشكل مخالف للهرمونات الكلاسيكية في عدة أنواع من النسج، وتأثيره غير مرتبط بالنسيجالمفرز منه حيث يؤثر في الخلية نفسها المفرز منها أو في الخلايا المجاورة من النسج القريبة أوالبعيدة بآلية الافراز الذاتي والمجاور على التوالي حيث يعمل على تحريض الانقسام والتمايز لمعظم النماذج الخلوية (١).

يعمل الـ EGF من خلال مستقبلات نوعية موجودة على سطح الخلية هي مستقبلات عامل النمو الظهاري(EGFR)، التي تشكل عائلةمن المستقبلات الغشائية التي تضم الـEGFR1 وHER2 وHER3وHER4.

تتشابه تلك المستقبلات فيمابينها بالبنية، والوظيفة، وبامتلاكها لفعالية التيروزين كيناز، ورغم دراست تلكالنماذج في ألأورام البشرية، فقد أثبتأن الـEGFRوhER2 تلعب دوراً كبيراً في الأنماط النسيجية المختلفة لسرطان الثدي (٦)و(٢٠).

ـ لمحة تاريخية عن مستقبلات عامل النمو الظهاري

أكتشفت مستقبلات عامل النمو الظهاري لأول مرة في عام ١٩٦٢ من قبل ستانلي كوهين، وفي عام ١٩٧٨ تم تحديد وتعريف مستقبل عاملالنمو الظهاري(١)، وفي عام ١٩٨٣ تم استهدافه لأول مرة بأضداد وحيدة النسيلة فأرية لتثبيط الانقسامفي الخلايا السرطانية باستخدام الزراعة الخلوية، وفي عام ٢٠٠٤ تم ترخيص أول ضد كيميائيوحيد النسيلة لهذه المستقبلات في السرطان الكولونيالمستقيمي من قبل ( )، وفي عام ٢٠٠٦ تم ترخيص ضد وحيد النسيلة للـEGFRبشري بشكل كامل لانتقالات السرطان الكولونيالمستقيمي(١٣)و(٢١)

- مستقبلات عامل النمو الظهاريEGFR :

هي بروتينات سكرية موجودة على سطح العديد من الخلايا السليمة، والورمية، وزنهاالجزيئي ١٧٠ كيلو دالتون، وتشكل جزء من عائلة مستقبلات التيروزين كيناز الذي ينظم تكاثر الخلايا وتطورها، والتكون الشكلي، وإنتاج المواد خارج الخلايا،كما تحفز على التوازن الخلوي، والبقاء اعتماداً على آلية الإفراز الذاتي (autocrine) أو المجاور(Paracrine) (١).

- البنية الجزيئيةلمستقبلات عامل النمو الظهاري

تتألف جزيئة الـEGFR من ٣ مجالات:

١-مجال خارج خلوي(extracellular space) الذييتوضع خارج الخلية، ويتضمن الموقع الذي يربط عامل النمو الظهاري (٥٦)

٢-مجال عابر للغشاء،وهو يتوضع ضمن الغشاء الخلوي، ويلعب دور فيتثبيت المستقبل ضمن الغشاء (٥٦)

٣-مجال داخل خلوي (intracellular space)، يتوضعداخل الخلية،ويملك فعاليةالتيروزين كيناز، ويكون مسؤولاً عن تحويل الإشارة إلى بروتينات أخرى داخل الخلية(٥٦).

- آلية عمل مستقبلات عامل النمو الظهاري

يعمل المجال خارج الخلوي على ربط عامل النمو الظهاري، ويتكون هذا المجال من أربع أجزاء: جزئينكروبين يربطان الـEGF،وجزئين عصويين مكونين من الحمض الأميني السيستيئين Cysteine، وعندمايرتبط هذا الشكل المتعدد الأجزاء بعامل النمو الظهاري يتغير شكله فيحرر واحدة من الشعبالطويلة الغنية بالسيستيئين مما يسمح للمستقبل بأن يتكوثر، ثم يقومالجزء الداخل خلوي من المستقبل بتيغير شكل المستقبل، وعندها يقوم أنزيم التيروزين كاينيزبإضافة مجموعة فوسفات إلى بقايا التيروزين البلازمي، ثم تقوم هذه الأحماض الأمينية المفسفرة باطلاق شلال من التغيرات الحيوية

الكيميائية داخل الخلية فتؤدي إلى زيادة مستوى الكالسيوم داخل الخلية، وتزايد تحلل الغلوكوز وتركيب الدنا وبالتالي تصنيعالبروتينات الضرورية للنمو والتمايز الخلوي(١).

- توزع مستقبلات عامل النمو الظهاري

أشارت الدراسات المناعية النسيجية، والمعايرات المناعية الشعاعية، والدراسة في الزجاج على النسجالمختلفة من الأعضاء إلى وجود مستقبلات عامل النمو الظهاري في أغلب النسج الظهارية السليمة، والخبيثة، فقد كشف عنها في مستوى الغشاء الهيولي لظهارة الجلد الطبيعي، ويزداد تعبيرها في حالات فرط تصنع الجلد وفي حالات أورام الرأس، والعنق (٣١، ١٤)،وفي مستوى الخلايا المخاطية غيرالمتمايزة للطرق الهوائية، وفي أغشية خلايا ظهارات الرئة الطبيعية، والمجروحة وفي حالات التليف، وأورام الرئة(٢)، وفي أغشية الخلايا الظهارية للثدي السليم، وبعض أذياته وأورامه، وكشف عنها في الأجربة خاصة في مستوى أغشية الخلايا الحبيبية وخلايا الصندوق الباطن،وظاهرةالأجربة الثانوية، كما وجدت في بعض أورام المبيض (١٥)، وأشير إلى تعبير مستقبلات عامل النمو الظهاري أيضاً في ظهارة بطانة الرحم الطبيعي، وفي المشيمة والحبل السري، وأثبت وجودها في حالاتالكلية عديدة الكيسات وأورامها، وفي ظهارة الأنابيب المنوية، والخلايا الظهارية الغدية للبروستات، وفي الأورام الغدية، كماشوهدت في الخلايا الورمية لظهارة الفم والبلعوم والمري(١٢)، وشوهدت أيضاً في الخلايا الطبيعية للمعدة، كمايزداد تعبيرها في أورام المتقدمة للمعدة، وكذلك في ظهارة الأمعاء الطبيعية والورمية، والخلايا الكبدية.

أشار(٨,٢٤,٣٨) إلى وجود مستقبلات عامل النمو الظهاري في مستوى الخلايا الورمية دون الإشارة إلى أي مرحلة من مراحل تطور هذه الخلايا ومدى ارتباط وجودها مع درجة الورم ومعدل البقاء، وبالتالي إنذار الورم، كما أوضح (٢٥,٤٤,٥١) وجود مستقبلات الـEGFRبنسبة عالية ونوعية في كارسينومات الثدي البدئية، وأكدوا على وجود علاقة عكسية بين تعبير الـEGFRوالنتائج السريرية للمرض، فزيادة تعبير الـEGFRتترافق مع نتائج سريرية أسوأ، لكن تبقى القيمة الإنذارية لها مثيرة للجدل(٢٧)، بينما أكدت دراسات أخرى (١٩,٢٧,٣٢) أن لا قيمة إنذارية لزيادة تعبيرالـEGFR في كارسينومات الثدي، وبناء على هذا التناقض الجزئي

بين تلك الدراسات فقد توجهنا إلى دراسة العلاقة بين درجة تعبر مستقبلات الـ EGF ودرجة الورم في الثدي.

- المواد المستخدمة

. ٥٠ عينة عشوائية مشمعة بالبارافين لمراحل عدة من أورام الثدي

. أضدد أولية نوعية وحيدة النسيلة لمستقبلات عامل النمو الظهاري

. أضداد ثانوية نوعية للأضداد الأولى المعلمة بالفلوروسيئين

. مولد لوني الـDAB

. موقيات (TRIS,PBS)

. محلول موقي phosphate buffered saline (pbs)

تحضير المحلول الموقي على النحو التالي :

10*PBS (0.1M PBS ,PH 7,4)

NaHpo4(anhydrous)	10,9 g
NaH2po4(an hydrous)	3,2 g
Nacl	90g
Distilled water	1000 ml

يمزج الخليط حتى ينحل و يضبط الـph عند 7.4

يحفظ هذا المحلول في درجة حرارة الغرفة و يمدد بنسبة ١٠/١ بالماء المقطر قبل الاستعمال و يضبط ال PH عند الضرورة

. أنزيم التربسين ومصل خاروف

تحضير المولد اللوني :يحضر قبل الاستخدام مباشرة على النحو التالي :

يوضع ١ مل من المحلول الواقي للDAB مع ٥٠ ميكروليتر من محلول المولد اللوني لل DAB المركز في زجاجة المزج و يرج جيدا

.مثبط البيروكسيداز

طريقة العمل :

١-تم جمع ٥٠ عينة عشوائية لمراحل مختلفة من أورام الثدي والتي تم تصنيفها من قبل المشرح المرضي بالاعتماد على تصنيف نوتنهام وهي مشربة بالبارافين لذلك كانت الخطوة الأولى تقطيع العينات

. تقطع العينة إلى مقاطع بارافينية متسلسلة بسماكة ٥ ميكرون، ثم تحمل شرائط المقاطع البرافينيةوتوضع في محم مائي بدرجة حرارة ٤٥ درجة مئوية لتمديد الشرائح، ثم تحمل على صفائح زجاجية، وتسخن الصفائح كي يذوب البارافين.

.إزالة البارافين

١-كزيلول١ ١٠ دقائق

٢-كزيلول٢ ١٠ دقائق

٣-كحول مطلق ٥دقائق

٤-كحول ٧٠% ٥ دقائق

٥-كحول ٥٠% ٥ دقائق

٦-غسيل بالماء ٢ دقائق

طريقة الكيمياء النسيجية المناعية الأنزيمية غير المباشرة :

تطبق على العينات طريقة الكيمياء المناعية النسيجية غير المباشرة حيث أجريت عدة محاولات لتثبيت أفضل الشروط و كانت على النحو التالي:

١-توضع بحيرة من الفازلين حول الشرائح النسيجية

٢-يجرى ثلاث حمامات (PBS) كل حمام لمدة ٥ دقائق

٣-تعامل العينة المجراة على مقاطع بارافينية بالتربسين

٤-يوضع ٥٠ ميكرو ليتر من ال(anti piroxidase) لمدة ١٠ دقائق

٥-تغسل الصفائح بال (PBS)حمامين ٥ دقائق لكل منهما

٦-يضاف مصل خروف منزوع المتممة (أزيلت منه فعالية المتممة) بوضعه في محم ٥٦ درجة مئوية بتركيز ١/٢٠ لمدة نصف ساعة

٧-تغسل الصفائح بالPBS حمامين ٥ دقائق لكل منهما

٨-تضاف الأضداد الأولية بتركيز ١/١٧٥ ويحضن لمدة ٦٠ دقيقة

٩-تغسل الصفائح بالPBSثلاث حمامات ٥ دقائق لكل منها

١٠-تضاف الأضداد الثانوية المعلمة بالبيروكسيداز بتركيز ١/١٠٠٠٠ وتحضن لمدة ٣٠ دقيقة

١١-تغسل الصفائح بال PBS ٣ حمامات ٥ دقائق لكل منها

١٢-يضاف المولد اللوني ال DAB ويحضن لمدة ٥ دقائق مع الهز في الظلمة

١٣-نغسل الصفائح بالPBS

تلوين بعض المقاطع بالهيماتوكسيلين

-هيماتوكسيلين ٤-٥ دقائق

١-غسيل بالماء

٢- كحول ٥٠% ٥ دقائق

٣- كحول ٧٠% ٥ دقائق

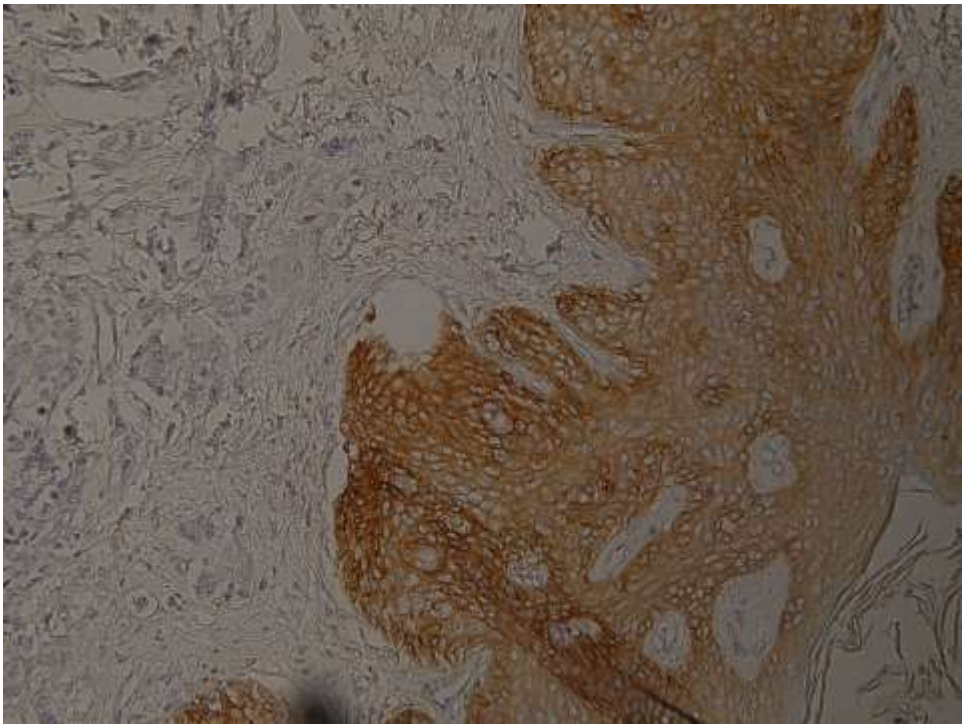
٤- كحول مطلق ٥دقائق

٥- كزيلول

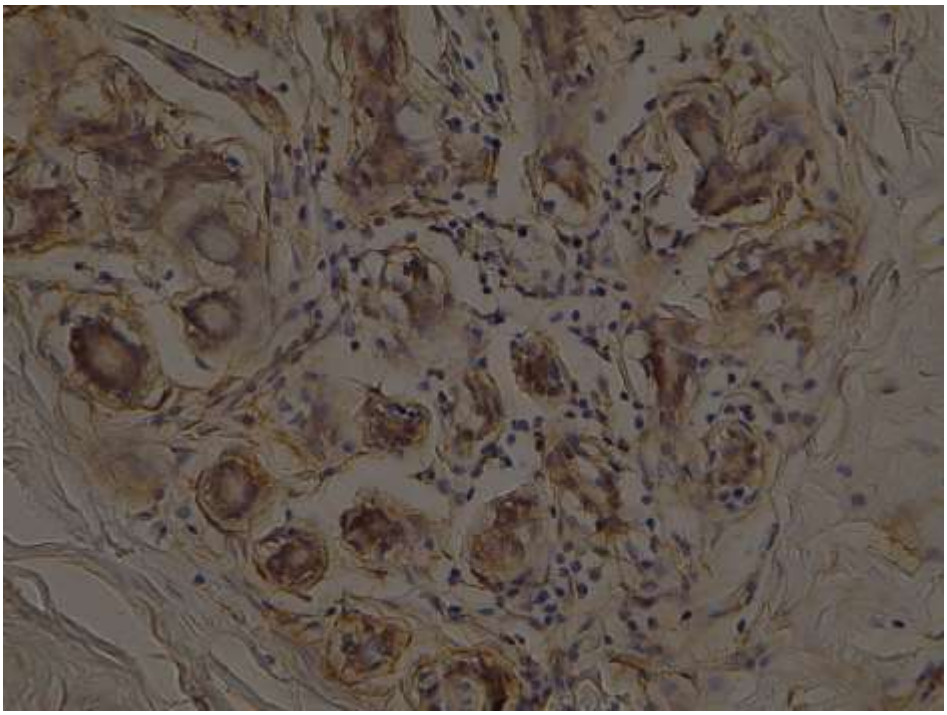
١٤- مونتاج، ويتم بوضع بلسم كندا وتستر الشرائح، ثم تحفظ إلى حين فحصها بالمجهر.

النتائج:

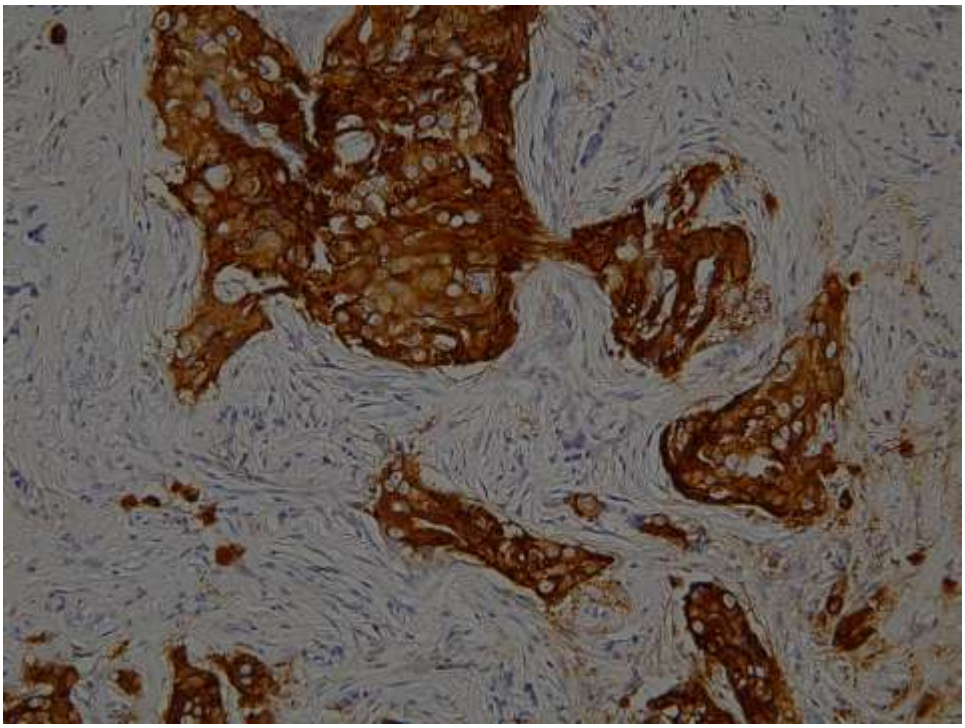
بعد تطبيق الكيمياء المناعية الأنزيمية غير المباشرة على عينات أورام الثدي ظهر التفاعل الإيجابي بلون بني دالا على وجود مستقبلات عامل النمو الظهاري في مستوى الغشاء الخلوي وهيولى الخلايا حيث تم التحقق من التفاعل المناعي الإيجابي بالكشف عن المستقبلات في مستوى الخلاياالورمية ثم دراسة العينات وتصويرها بمجهر مزود بكاميرا حيث صورت العديد من الساحات و حصلنا على النتائج التالية :



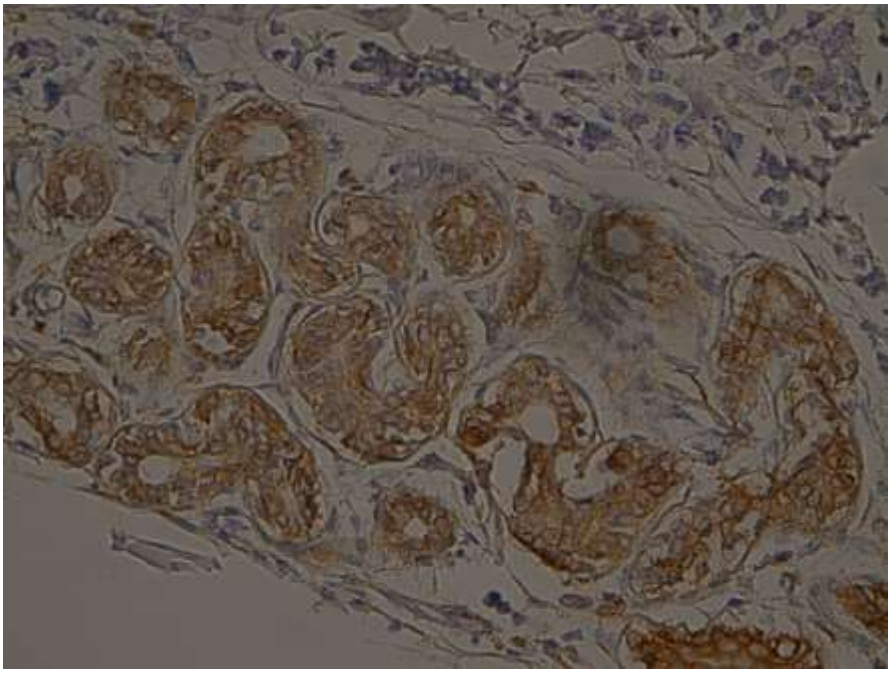
١- شاهد إيجابي يظهر تفاعل كيميائي مناعي خلويإيجابي يشير إلى وجود مستقبلات EGFفي مستوى الأغشية الخلوية والهيولى لخلايا بشرة الجلد تكبير(١٠x٢٠)



٢- تفاعل كيميائي مناعي خلوي إيجابي(++) يشيرإلى وجود مستقبلات EGF على مستوى الغشاء الخلوي والهيولى للخلايا المبطنة للأنيبيبات الغدية للثدي(G1)
تكبير(١٠x٤٠)

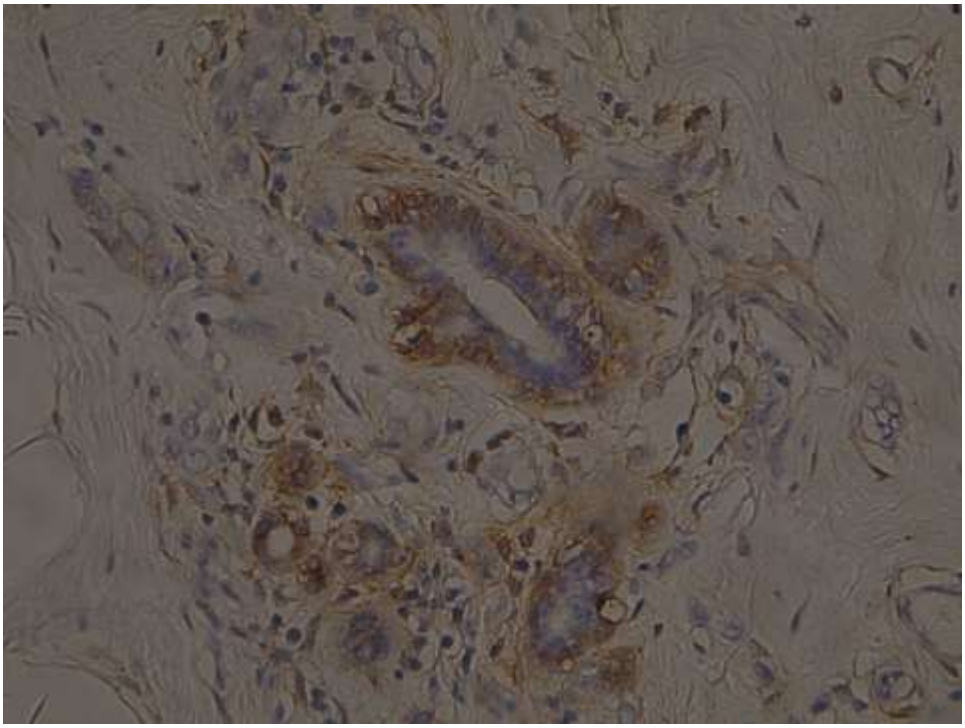


٣- تفاعل كيميائي مناعي خلوي إيجابي (+++) يشير إلى وجود مستقبلات EGFعلى مستوى الغشاء الخلوي والهيولى للخلايا الغدية داخل الأقنية (G1)
تكبير(١٠x ٢٠)

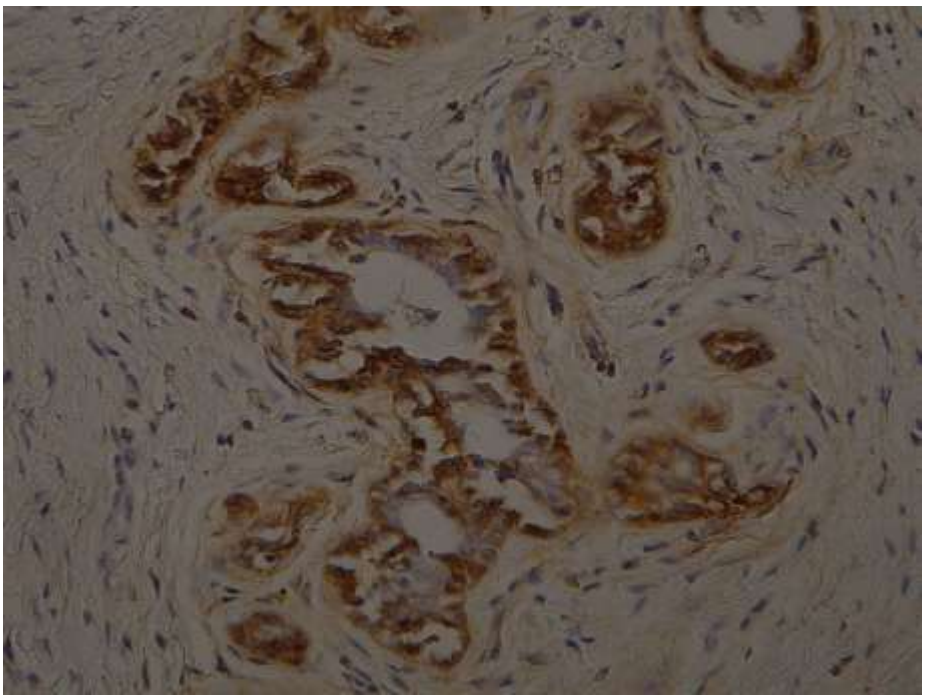


٤-تفاعل كيميائي مناعي خلوي إيجابي (++) يشير إلى وجود مستقبلات EGF على مستوى الغشاء الخلوي والهيولى للخلايا المبطنة للأقنية الغدية(G1)

تكبير(٤٠x١٠)



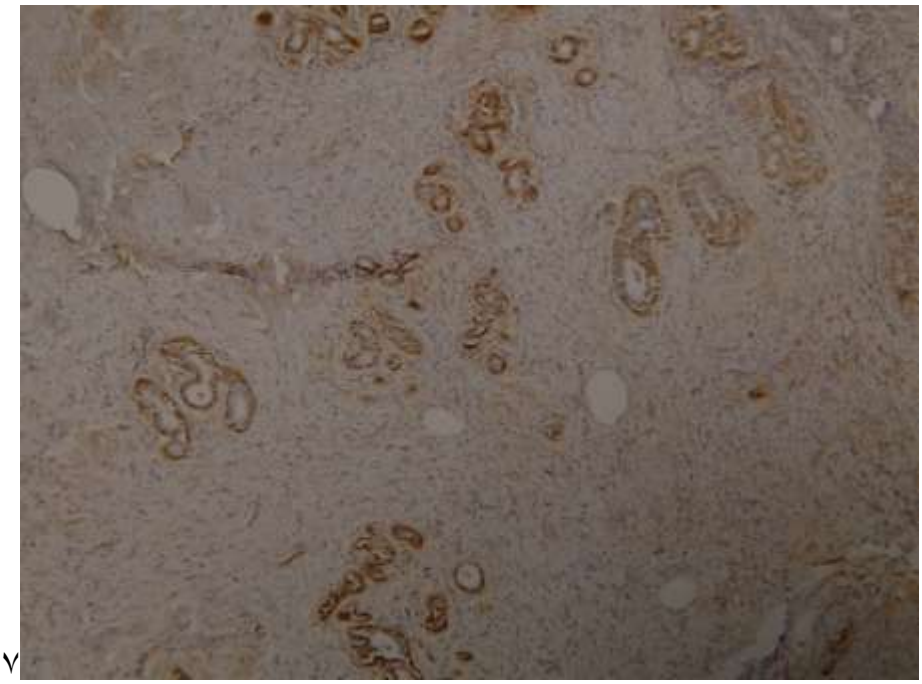
٥-تفاعل كيميائي مناعي خلوي إيجابي (+) يشير إلى وجود مستقبلات EGF على مستوى الغشاء الخلوي والهيولى للخلايا المبطنة للأنابيب الغدية(G1)
تكبير(١٠x٤٠)



٦
- ٦-تفاعل كيميائي

مناعي خلوي إيجابي يشير إلى وجود مستقبلات EGF على مستوى الغشاء الخلوي والهيولىللخلايا المبطنة للأنيبيبات الغدية للثدي(G1)

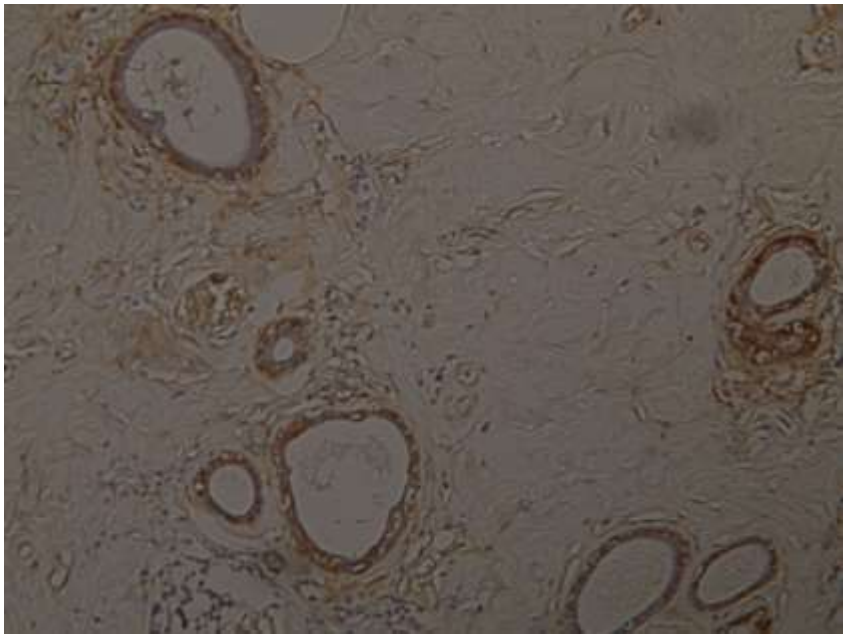
تكبير(١٠x٤٠)



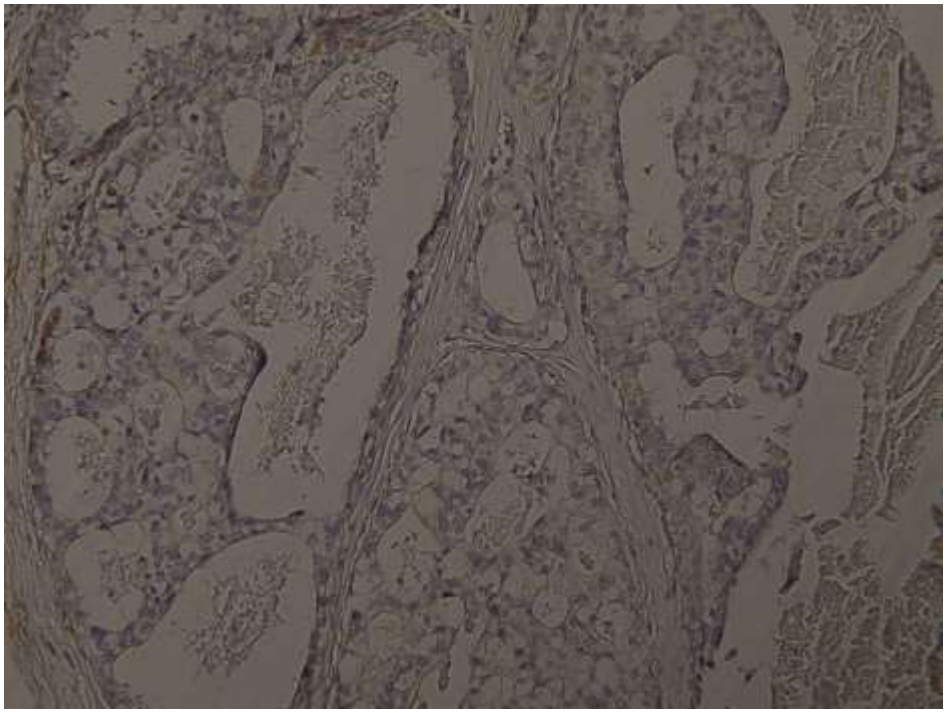
٧-تفاعل كيميائي

مناعي خلوي إيجابي يشير إلى وجود مستقبلات EGF على مستوى الغشاء الخلوي والهيولى للخلايا المبطنة للأنيبيبات الغدية (G1)

تكبير(١٠x١٠)

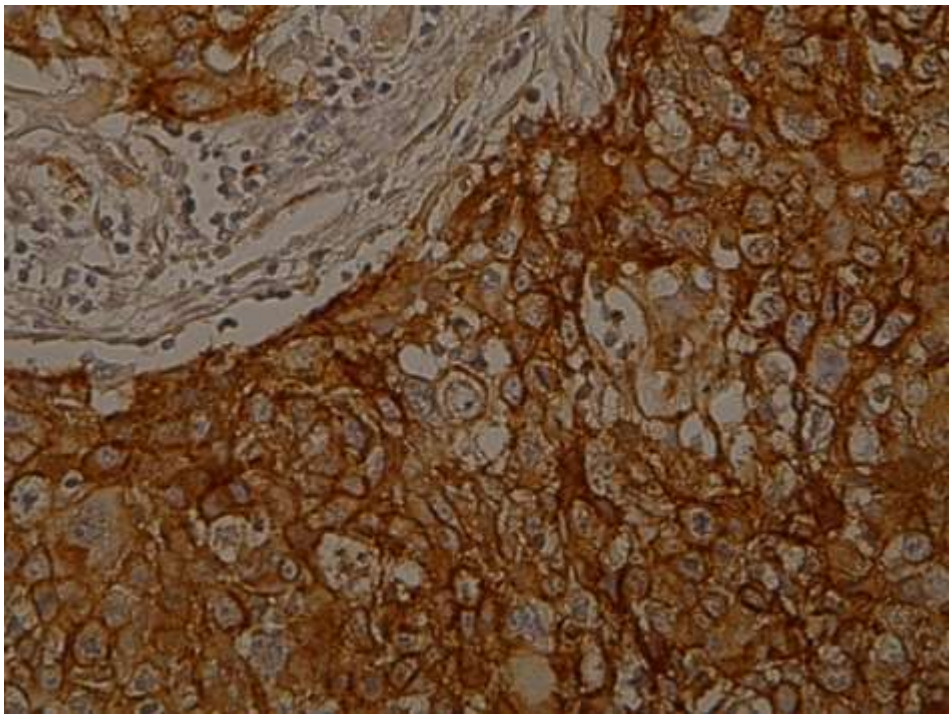


٨- تفاعل كيميائي مناعي خلوي إيجابي (+) يشير إلى وجود مستقبلات EGF على مستوى الغشاء الخلوي والهيولى للخلايا المبطنة للأنيبيبات الغدية(G2) تكبير(١٠x٢٠)



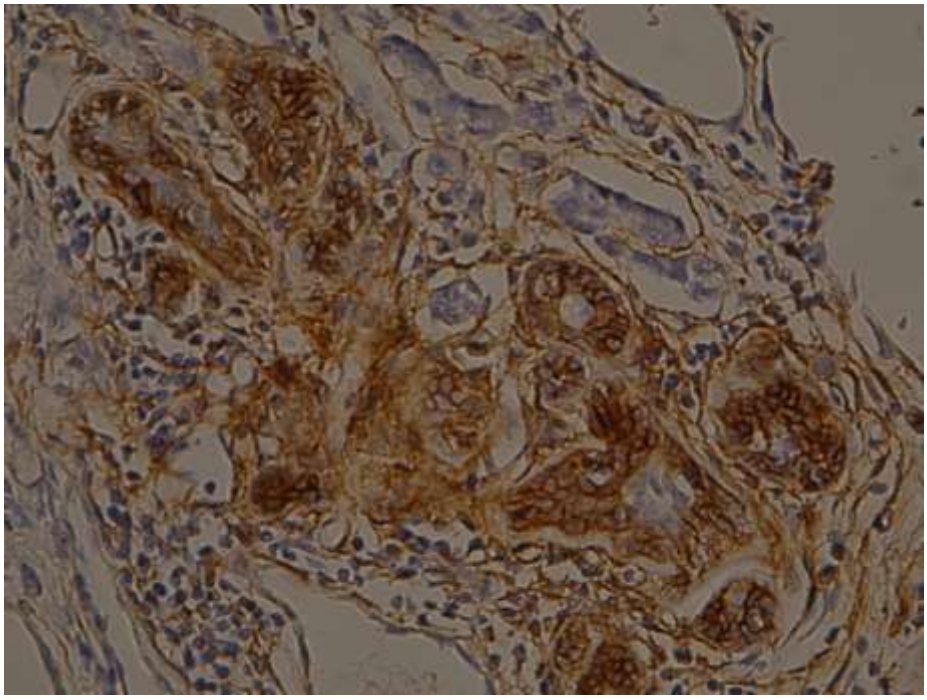
٩-تفاعل كيميائي مناعي خلوي إيجابي(+) يشير إلى وجود مستقبلات EGF على مستوى الغشاء الخلوي والهيولى للخلايا المبطنة للأقنية(G2)

تكبير(١٠x٢٠)



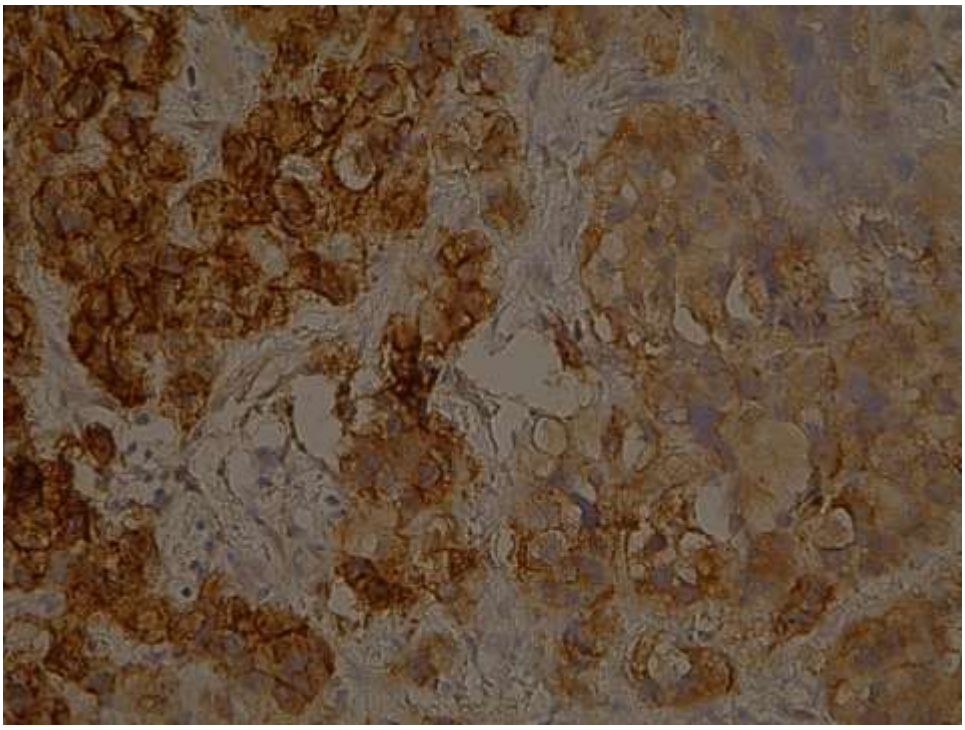
١٠- تفاعل كيميائي مناعي خلوي إيجابي شديد (+++) يشير إلى وجود مستقبلات EGF على مستوى الغشاء الخلوي والهيولى للخلايا الورمية داخل الأقنية(G2)

تكبير(١٠x٤٠)



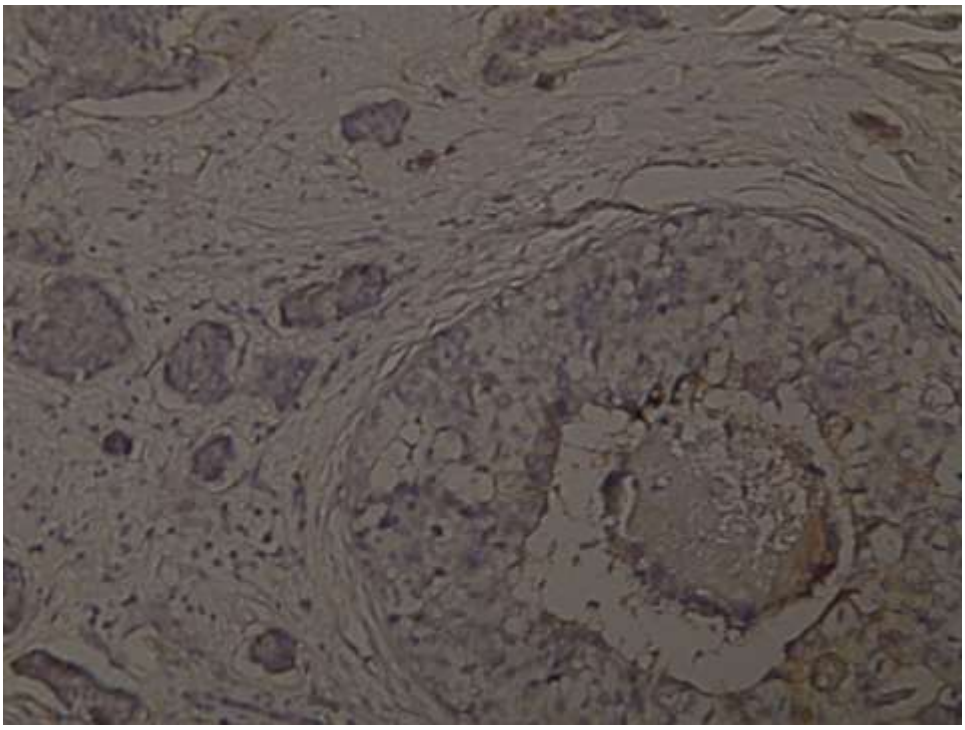
١١-تفاعل كيميائي مناعي خلوي إيجابي يشيرإلى وجود مستقبلات EGF على مستوى الغشاء الخلوي والهيولى للخلايا المبطنة للأقنية(G2)

تكبير(١٠x٤٠)



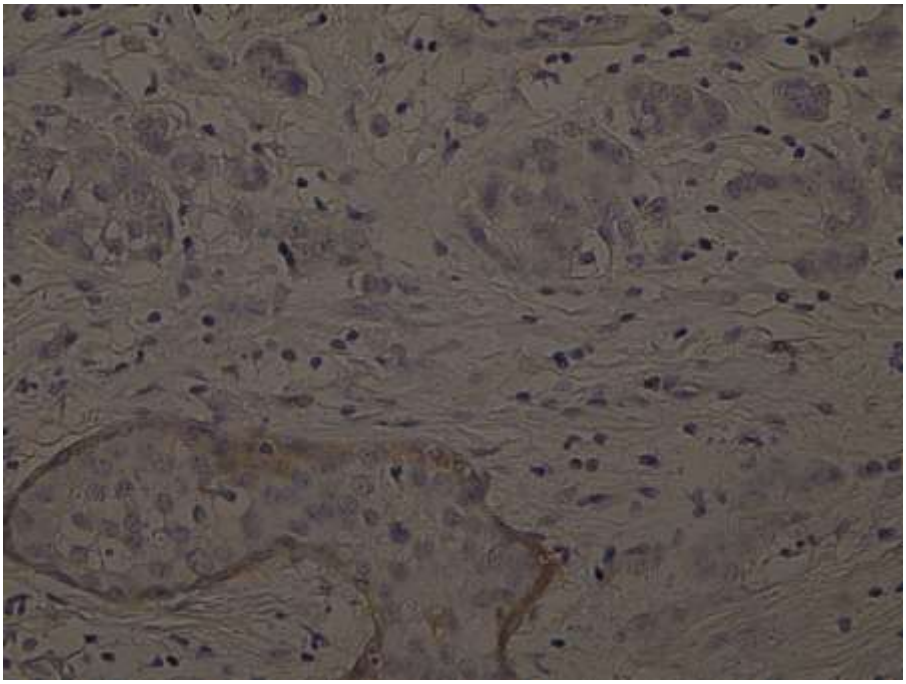
١٢-تفاعل كيميائي مناعي خلوي إيجابي (++)يشير إلى وجود مستقبلات EGF على مستوى الغشاء الخلوي والهيولى للخلايا خارج الأقنية(G2)

تكبير(١٠x٤٠)



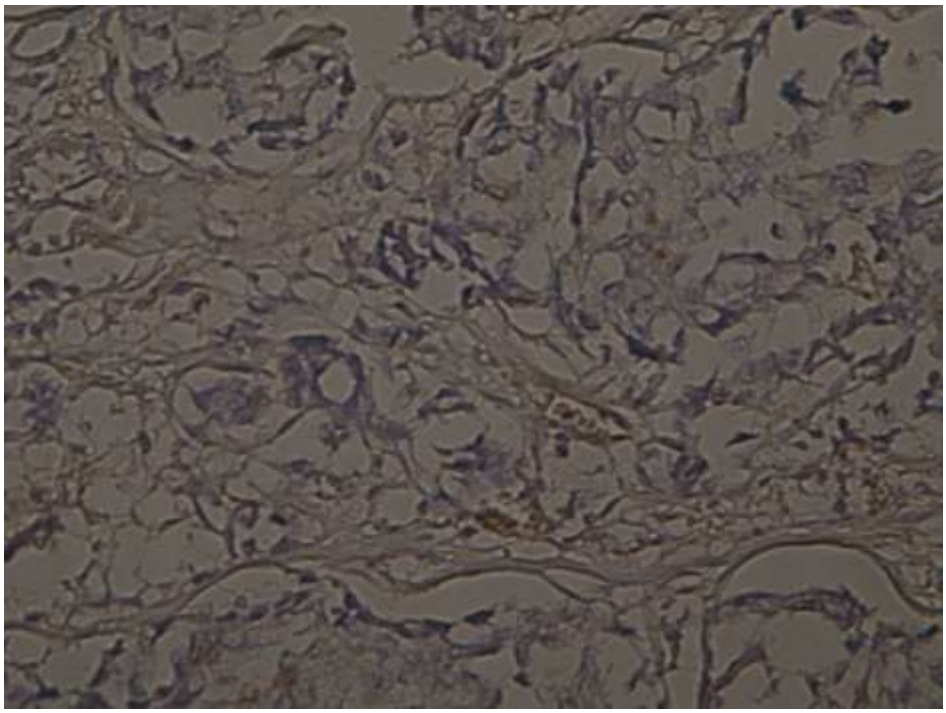
١٣-تفاعل كيميائي مناعي خلوي ضعيف يشير إلى وجود مستقبلات EGF على مستوى أغشية وهيولى بعض الخلايا المبطنة للقناة(G2)

تكبير(١٠x٢٠)



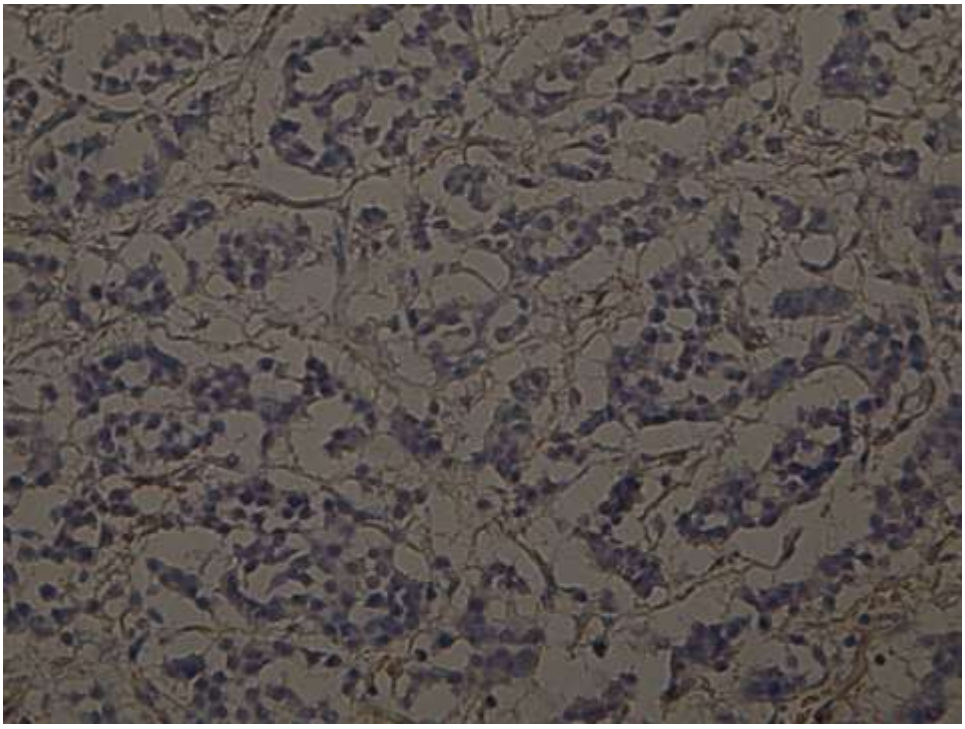
١٤- تفاعل كيميائي مناعي خلوي إيجابي(+) يشير إلى وجود مستقبلات EGF على مستوى الغشاء الخلوي والهيولى للخلايا الورمية خارج القناة(G2)

تكبير(١٠x٤٠)



١٥-تفاعل كيميائي مناعي خلوي إيجابي يشير إلى وجود مستقبلات EGFعلى مستوى الغشاء الهيولي والهيولى للخلايا الورمية للنسيج الغدي للثدي(G3)

تكبير(١٠x٤٠)



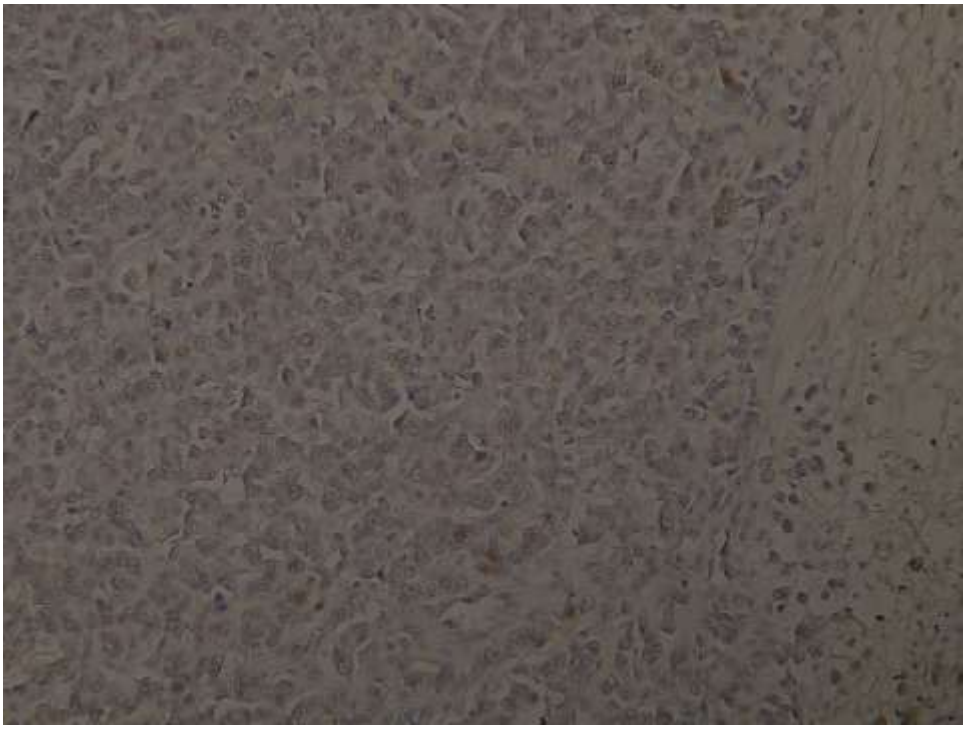
١٦-شاهد سلبي يظهرغياب التفاعل المناعي الخلوي الإيجابي بسبب غياب الأضداد الأولية المضادة لمستقبلات EGFعلى مستوى النسيج الورمي الغدي للثدي(G3)

تكبير(١٠x٤٠)



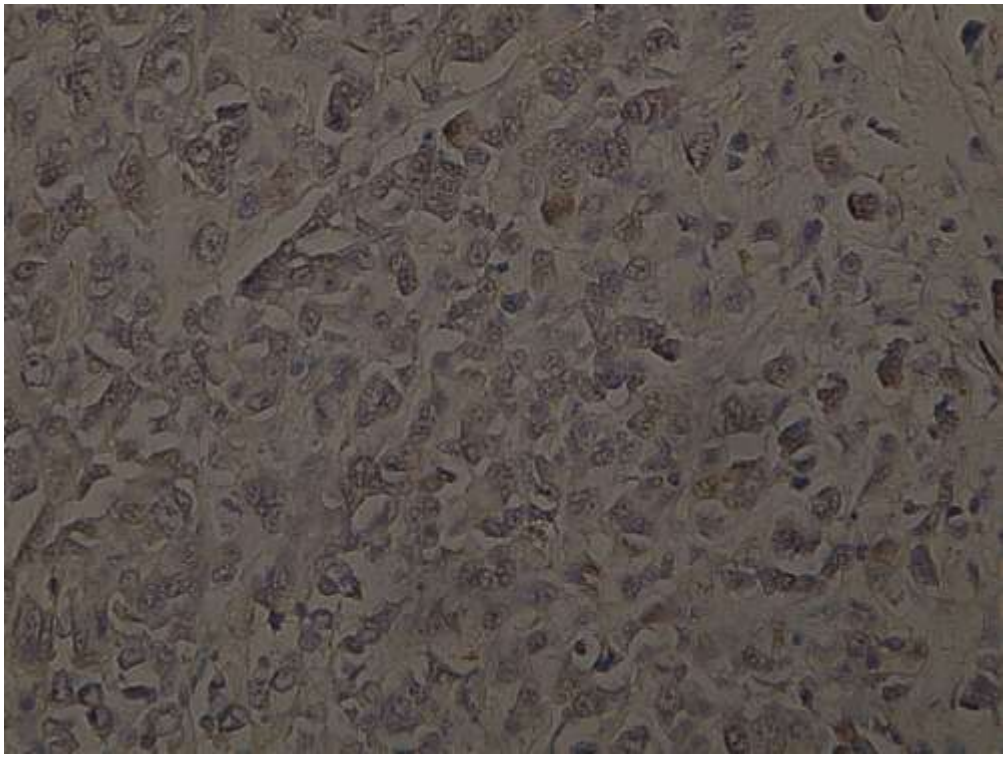
١٧-تفاعل كيميائي مناعي خلوي إيجابي يشير إلى وجود مستقبلات EGF على مستوى الغشاء الخلوي والهيولى للخلايا في النسيج الورمي خارج الأقنية(G3)

تكبير(١٠x٢٠)



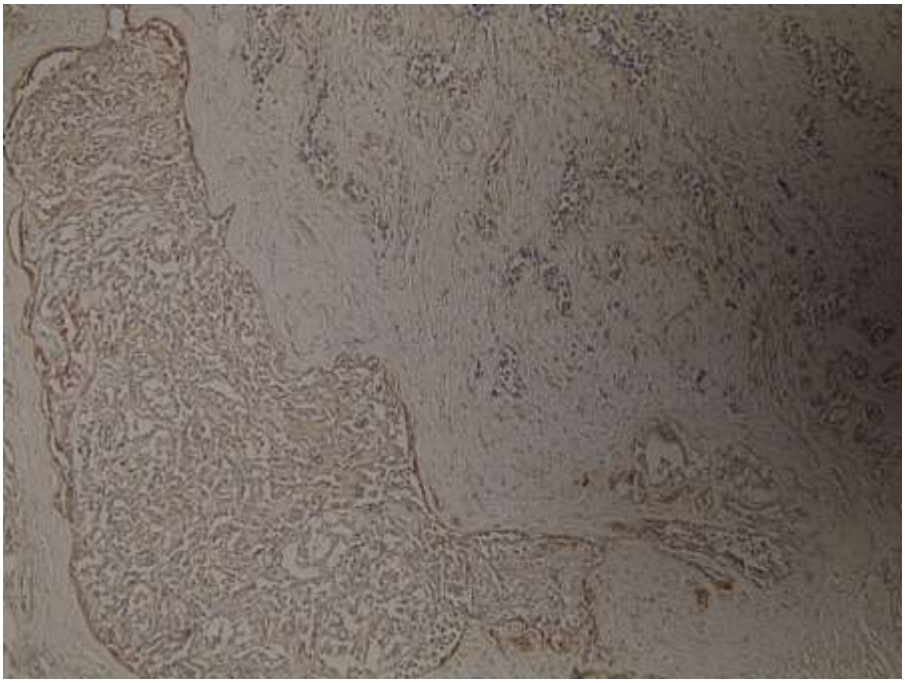
١٨- تفاعل كيميائي مناعي خلوي إيجابي ضعيف (+) يشير إلى وجود مستقبلات EGF على مستوى الغشاء الخلوي والهيولى للخلايا في النسج الورمي الغدي خارج القنوي(G3)

تكبير(١٠x٢٠)



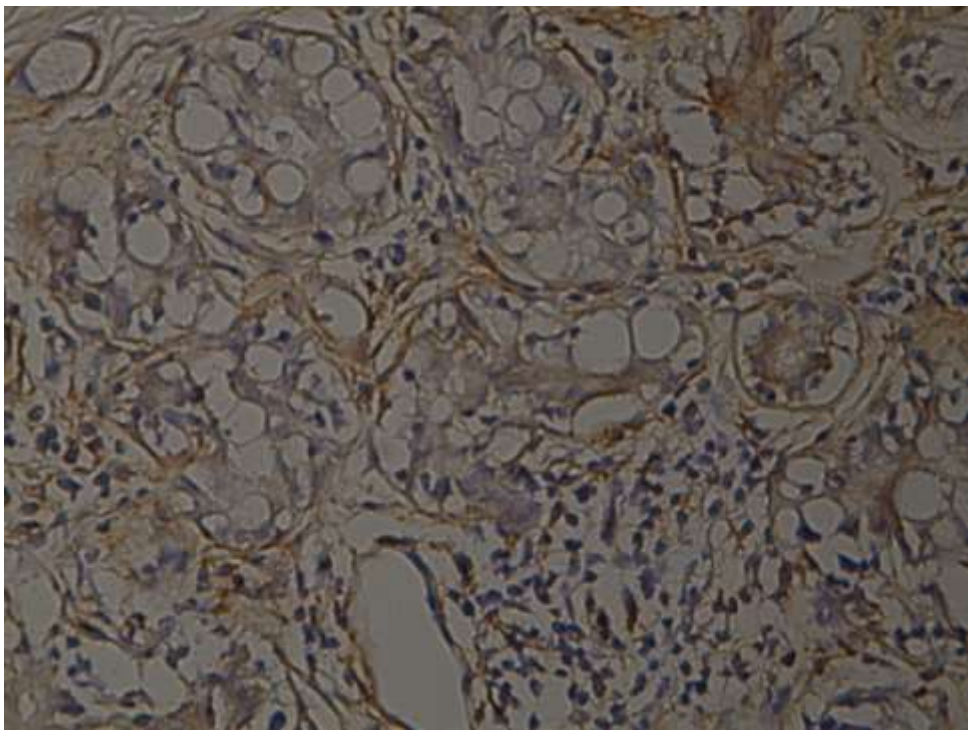
١٩- تفاعل كيميائي مناعي خلوي إيجابي يشير إلى وجود مستقبلات EGF على مستوى الغشاء الخلوي والهيولى للخلايا الورمية للنسيج الغدي خارج القنوي(G3)

تكبير(١٠x٤٠)



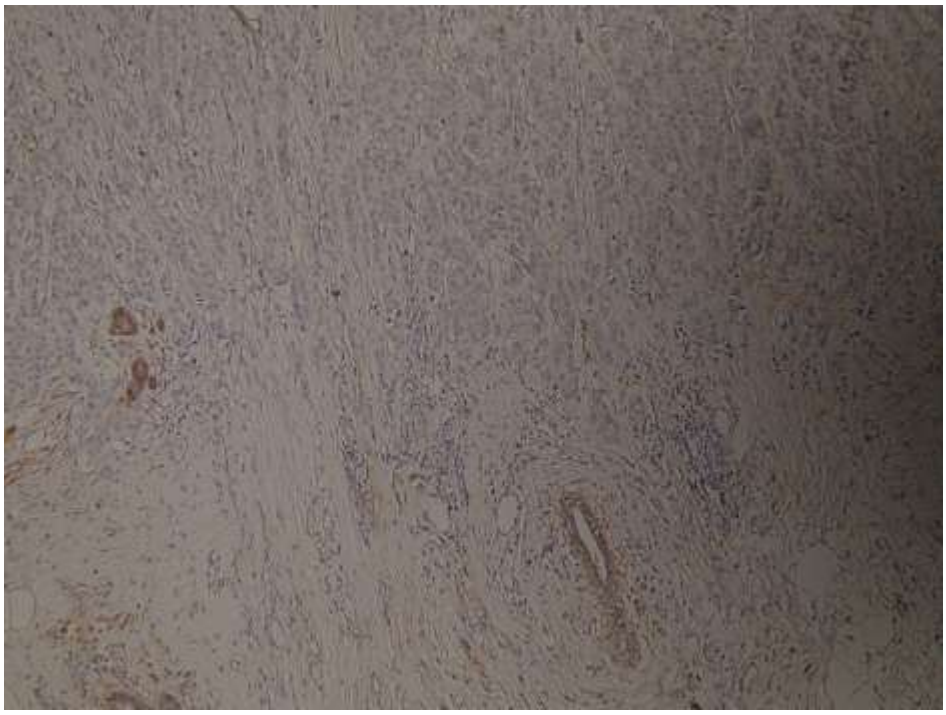
٢٠- تفاعل كيميائي مناعي خلوي إيجابي يشير إلى وجود مستقبلات EGF في مستوى الغشاء الخلوي والهيولى للخلايا الورمية خارج الأقنية(G3)

تكبير(١٠x٢٠)



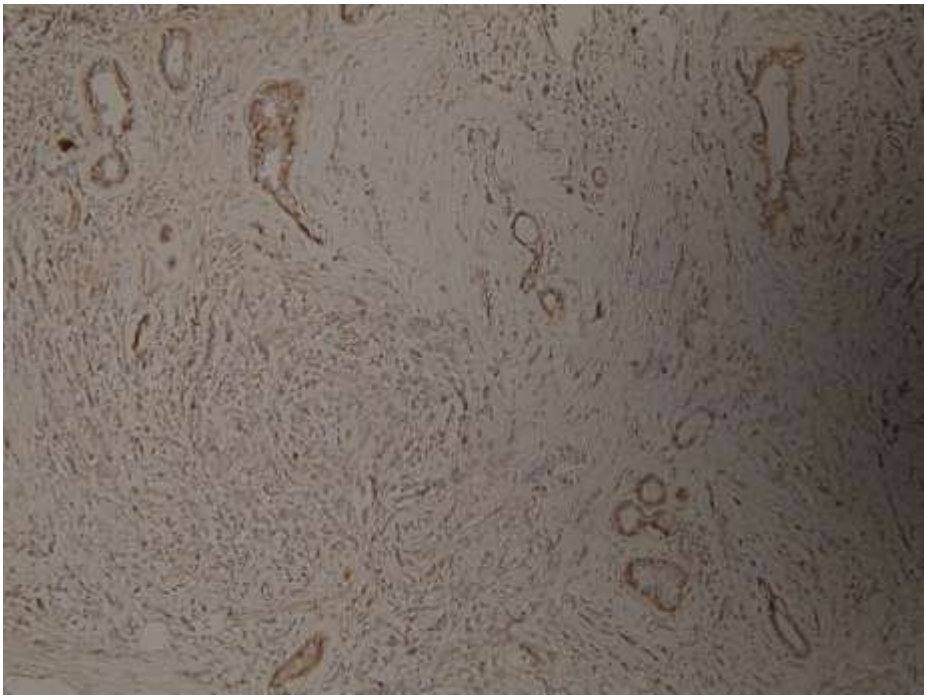
٢١-تفاعل كيميائي مناعي خلوي إيجابي (+) يشير إلى وجود مستقبلات EGF على مستوى الغشاء الخلوي والهيولى للخلايا الورمية داخل الأقنية(G3)

تكبير(١٠x٤٠)



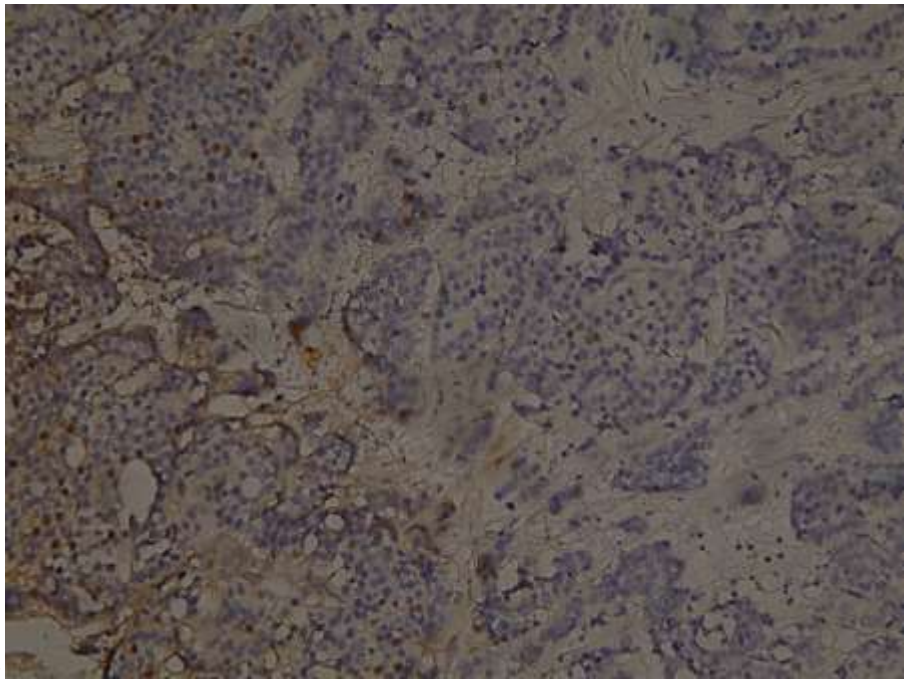
٢٢- تفاعل كيميائي مناعي خلوي إيجابي(+) يشير إلى وجود مستقبلات EGF على مستوى الغشاء الخلوي والهيولى للخلايا الغدية للأنبيبات الانتهائية(G3)

تكبير(١٠x١٠)



٢٣-تفاعل كيميائي مناعي خلوي إيجابي يشير إلى وجود مستقبلات EGF على مستوى الغشاء الخلوي والهيولى للخلايا المبطنة للأنيبيبات الغدية(G3)

تكبير(١٠x١٠)



٢٤-تفاعل كيميائي مناعي خلوي إيجابي يشير إلى وجود مستقبلات EGF على مستوى الغشاء الخلوي والهيولى للخلايا في النسيج الغدي داخل القنوي(G3)

تكبير(١٠x٢٠)

ـ المناقشة

لم يكن التصنيف النسيجي التقليدي لسرطان الثدي دقيق في تحديد القيمة الإنذارية لحالةالمريض، فمن الممكنللأورام المتماثلة مورفولوجيا أن تظهر نتائج سريرية مختلفة،وهذا ينسب بشكل كامل إلى الاختلافات في التراكيب الجزيئية الموجودة بين الأنماط النسيجية المتشابهة (٥٢)، وإن الحصول على معلومات دقيقة لتلك التراكيب، وتحديد هويتها الكيميائية النوعية،يمكن أن يؤدي إلى تطوير التشخيص.

أدىالتقدم في دراسة التعبير المورثي، والكيمياء المناعية النسيجية إلى إماطة اللثام عن أنواع جديدة من سرطان الثدي اعتماداً على البنى الجزيئية (٥٥)،وساعد ذلك في تصنيف أوسع للورم، وأكثر فعالية منالناحية الإنذارية والعلاجية (٨,١٧,٥٢)، كما

ساعدت تلك التقانات بتصنيف اورام الثدي إلى صنفين أساسيين(٣٣):أورام الثدي إيجابية مستقبلات الأستروجين +er و أورام الثدي سلبية مستقبلات الأستروجين-er، لكن استخدام تقانةالتهجين في المكان للحمض النووي أدى إلى تحديد مجموعتين جديدتين بالاعتماد على كشف الـHER2(عضو من عائلةمستقبلات عامل النمو الظهاري)،ولم تشر الدراسات إلى وجود علاقة بين زيادة تعبير هذه المستقبلات وخطورة الأعراض السريرية (٤,٦)، لكنها سمحت باعتمادها كمؤشر لقيمة إنذارية أكثر دقة(٣٢)، واستناداً غلى ذلك أكد (١٩,٢٧) إلى أن زيادة تعبير الـEGFR معنية بشدة في إنذارية العديد من أنماطا الكارسينوما، كما أشار (١٩,٥١) إلى أن زيادة تعبير الـEGFRيرتبط مع إنذار أسوأ في عدة أنواع من الأورام ذات المنشأ الظهاري، وقد أوضح (٢١,٢٧) أن تعبر الـEGFR في الورم يقدم قيمة إنذارية مهمة قد تفيد في تحديد المرضىذوي الإنذار الأسوأ، وبالتالي تحديد إمكانية إجراء العمل الجراحي أو عدمها.

تتطورت الدلائل التي تشير إلى دور عائلة مستقبلات عامل النمو الظهاري EGFRفي تطور وتقدم سرطان الثدي (٣,٤)، وأشار (٢٩) إلى أن زيادة تعبير الـEGFRتحدث في ١٦-٣٦% من حالات سرطان الثدي، وأكد (٣,٥) على إمكانية اعتماد التقصي عن مستقبلات عامل النمو الظهاري في تحديد درجات الورم وخطورته.

تطور اهتمام الباحثين بالمستقبلات التي تعتمد على فعالية التيروزين كيناز وخصوصاً الـEGFR والـHER2 بقصد استهدافهابعقاقير نوعية علاجية للورم (٣٩,٤١,٤٢)، وقد درست هذه المستقبلات في نماذج عدة من أورام الإنسان (٤٠)، وأثبت أنها تلعب دوراً كبيراً في الأنماط النسيجية المختلفة لسرطان الثدي وهذا شجع في استهدافها في علاج أورام الثدي و بنجاح (٣٧، ٥٠).

درست عائلة الـEGFR المعتمد على سبيل التيروزين كيناز لنقل الإشارة في سرطان الثدي، لكن دراسة زيادة تعبير هذا المستقبلات في كارسينومات الثدي لازالت محدودة مقارنة مع أهميتها فيالمقاربات العلاجية (١٧,٢٨,٣٠) فقد أشار (١٦,٢٦,٢٨,٣٤,٥١) إلى زيادة تعبر الـ EGFR في سرطان الثدي،وأكد (٢٩,٣٠) على أن تعبير الـEGFRفي الكارسينومات يشجع في استخدام العديد من الأضداد ضد المجال الرابط للـEGFR، كما لوحظ مقاربات أخرى تجلت باستخدام مثبطات لجزيئة التيروزين كيناز في معلاج الأورام الخبيثة كسرطان الرئة صغيرالخلايا والسرطان الكولوني المستقيمي (٢,١٣,٣٤,٥٣)، وسرطان الثدي وانتقالاتها (٣٦,٣٧). علماً أن

الاستجابة للأضداد تعتمد على المستوى الكلي لتعبير هذه المستقبلات وروابطها في الخلايا السرطانية (٣٥,٣٦).

رغم ما تقدم فإنه يوجد دراسات عدة متناقضة حول القيمة الإنذارية لزيادة تعبير الـEGFR ودرجة ارتباطه بخطورة أورام الثدي،لذلك ازداد تركيز الباحثين علىالقيمة الإنذارية لتعبير الـEGFR (٥٣,٦٣)، وفي هذا السياق أيضاً أشار(٢٥,٤٤,٥١) إلى وجود مستقبلات الـEGFRبنسبة عالية ونوعية في كارسينومات الثدي البدئية، وأكدوا على وجود علاقة عكسية بين تعبير الـEGFRوالنتائج السريرية للمرض، فزيادة تعبير الـEGFRتترافق مع نتائج سريرية أسوأ، لكن تبقى القيمة الإنذارية لها مثيرة للجدل(٢٧)، بينما أكدت دراسات أخرى (١٩,٢٧,٣٢) أن لا قيمة إنذارية لزيادة تعبيرالـEGFR في كارسينومات الثدي.

الاستنتاجات و المقترحات :

تشير نتائجنا إلى أن تعبر مستقبلات عامل النمو الظهاري في أورام الثدي من الدرجة الأولى يكون مرتفعا جدا و كذلك الحال في أورام الثدي من الدرجة الثانية أما في أورام الدرجة الثالثة فإن التعبير كان ضعيفا ووفقا للجدول فإن تعبير EGFR موجود في كل العينة و بدرجات متفاوتة حسب درجة الورم مما يعني أن هذه المستقبلات تلعب دورا أساسيا في عملية نضج و تمايز الخلايا الورمية و هذا يتوافق مع دراسات سابقة (٤٩) والتي أكدت الدور الأساسي لمستقبلات عامل النمو الظهاري في عملية نضج وتمايز الخلايا وبالتالي الأنسجة وتقلل من أهمية دورها كعامل مولد لانقسام الخلايا نستنتج مما سبق أن زيادة تعبر مستقبلات عامل النمو الظهاري في الخلايا الورمية يجعل من النسيج الورمي أكثر نضجا وبالتالي درجة الورم تكون أقل وخطورة الورم كذلك تكون أقل و خطورة الورم كذلك تكون أقل و بالتالي إنذار الورم يكون أفضل مما ينعكس على المقاربة العلاجية للمريض حيث أن استخدام أضداد مستقبلات عامل النمو الظهاري في علاج المرحلتين الأولى والثانية يكون فعالا وذو فائدة بينما لا ينصح به في علاج المرحلة الثالثة من الورم

المراجع:

1-cohen5,ushiroH,StoscheckC,et al, Anative 170,000-epidermal growth factor receptor-kinase complex from shed plasma membrane vesicles .J.Boil.Chem. ,1982 ;257 : 1523-31

2-Cerny T,BarnesDM,HasletonP,etal.Expressionof epidermal growthfactor(EGFRR)inhuman lungtumors.Br,J. Cance,1986;54:256-9.

3-Costa 5,5tamm H ,Almendral A et al.Predictive value of EGF receptor in breast cancer,lancet,1998;1:1258-64.

4-Sainsbury JR, Frandon JR, Needham GK et al.Epidermal growth factor receptor status as predictorof early recurrence of and death from breast cancer.Lancet, 1987;1:1398-402.

5-Kltjn JGM.BcrnsPM.J,Schmitiz, The clinical significance of epidermal growth factor receptors (EGF-R) in human breast cancer : a review on 5232 patients. Endoer.Rev, 1992;13:3-17.

6-Pirinen R,LipponenP,SyrjanenK.Expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) in breast cancer as related to clinical ,prognostic and cytometric factors Anticancer Res.,1995;15:2835-40.

7- Ncwby JC, AHernRP,Leek RD.et al.Immunohistochemical assay for epidermal growth factor receptor on paraffin-embedded sections: validation against ligand-binding assay and clinical relevance in breast cancer .Br.J.Cancer,1995;71:1237-42.

8-DiGiovanna MP, Stern DF, Edgerton SM,etal:Relationshipof epidermal growth factor receptor expression to ErbB-2 siganalling activity and prognosis in breast cancer patients.JClinOncol 23:1152-1160 , 2005.

9-Bhargava R, Gerald WL, Li AR, Pan Q, Lal P, LadanyM, Chen B. EGFR gene amplification in breast cancer correlation with epidermal growth factor receptor mRNAand protein expression and HER-2 status and absenceof EGFR-activating mutations. Mod Pathol 2005;18:1027-1033.

10- Reis-Filho JS, Milanezi F, Steele D, Savage K, SimpsonPT,Nesland JM, Pereira EM, Lakhani SR, Schmitt FC. Metaplastic breast carcinomas are basal-like tumours. Histopathology 2006;49:10-21.

11- Reis-Filho JS, Milanezi F, Carvalho S, Simpson PT, SteeleD, Savage K, Lambros MB, Pereira EM, NeslandJM,Lakhani SR, Schmitt FC. Metaplastic breast carcinomasexhibit EGFR, but not HER2, gene amplification andoverexpression: immunohistochemical and chromogenicin situ hybridization analysis. Breast Cancer Res2005;7:R1028-1035.

12-Hanawa M, Suzuki S, Dobashi Y, Yamane T, Kono K, Enomoto N, Ooi A. EGFR protein overexpression and gene amplification in squamous cell carcinomas of the esophagus. Int J Cancer 2006;118:1173-1180.

13-Ooi A, Takehana T, Li X, Suzuki S, Kunitomo K, Iino H, Fujii H, Takeda Y, Dobashi Y. Protein overexpression and gene amplification of HER-2 and EGFR in colorectal cancers: an immunohistochemical and fluorescent in situ hybridization study. Mod Pathol 2004;17:895-904.

14 -Rogers SJ, Harrington KJ, Rhys-Evans P, O-Charoenrat P, EcclesSA: Biological significance of c-erbB family oncogenes inhead and neck cancer. Cancer Metastasis Rev 2005, 24:47-69.

15- Janinis J, Nakopoulou L, Panagos G, Davaris P: Immunohisto-chemical expression of EGF-R in malignant surface epithelialovarian neoplasms (SEON). Eur J GynaecolOncol 1994,15:19-23.

16- Bianco R, Gelardi T, Damiano V, Ciardello F, Tortora G: Rationalbases for the development of EGFR inhibitors for cancertreatment. Int J Biochem Cell Biol 2007, 39:1416-1431.

17- Mass RD: The HER receptor family: a rich target for therapeuticdevelopment. Int J RadiatOncolBiol Phys. 2004, 58:932-940.

18- Suo Z, Risberg B, Kalsson M, Willman K, Tierens A, SkovlundE,Nesland J: EGFR family expression in breast carcinomas. c-erb-B-2 and c-erbB-4 receptors have different effects onsurvival. J Pathol 2002, 196:17-25.

19- Gohring U-J, Ahr A, Scharl A, Weisner V, Neuhaus W, CrombachG, Holt JA: Immunohistochemical detection of epidermalgrowth factor receptor lacks prognostic significance for breastcarcinoma. J SocGynecol Invest 1995, 2:653-659.

20- Lewis S, Locker A, Todd JH, Bell JA, Nicholson RI, ElstonCW,Blamey RW, Ellis IO: Expression of epidermal growth factorreceptor in breast carcinoma. J ClinPathol 1990, 43:385-389.

21- Arteaga CL, Baselga J: Clinical trial design and end points forepidermal growth factor receptor-targeted therapies: implications for drug development and practice. Clin Cancer Res2003, 9:1579-1589.

22- Robins P, Pinder S, de Klerk N: Histological grading of breastcarcinomas: a study of interobserver agreement. HumanPathol 1995, 26:873-879.

23- American Joint Committee on Cancer: Breast. In AJCC Cancerstaging Manual 6th edition.Edited by: Greene FL. New York:Springer; 2002:171-180.

24- Putti TC, To KF, Hsu HC, Chan ATC, Lai GM, Tse G, Lee YS,Whang-Peng J, Millward M, Lin L, Lin X, Lee CS: Expression ofepidermal growth factor receptor in head and neck cancerscorrelates with clinical progression: a multicenter immunohistochemical study in the Asia-Pacific region. Histopathology2002, 41:144-151.

25- Rampaul RS, Pinder SE, Nicholson RI, Gullick WJ, Robertson JF,Ellis IO: Clinical value of epidermal growth factor receptorexpression in primary breast cancer. AdvAnatPathol 2005,12:271-273.

26- Nicholson RI, McCelland RA, Gee JM, Manning DL, Cannon P,Robertson JF, Ellis IO, Blamey RW: Epidermal growth factorreceptor expression in breast cancer: association withresponse to endocrine therapy. Breast Cancer Res 1994,29:117-125.

27- Rampaul RS, Pinder SE, Wencyk PM, Nicholson RI, Blamey RW,Robertson JF, Ellis IO: Epidermal growth factor receptor statusin operable invasive breast cancer: is it of any prognosticvalue? Clin Cancer Res 2004, 10:2578.

28- ArteagaCL.Overviewofepidermalgrowthfactorreceptorbiologyanditsroleasatherapeutictargetinhumanneoplasia.SeminOncol2002;29:3–9.

29- WittonCJ,ReevesJR,GoingJJ,etal.ExpressionoftheHER1–4familyofreceptortyrosinekinasesinbreastcancer.JPathol2003;200:290–7

30-WoodburnJR.Theepidermalgrowthfactorreceptoranditsinhibition incancertherapy.PharmacolTher1999;82:241–50.

31- KimJW,KimYT,KimDK,etal.Expressionofepidermalgrowthfactorreceptorincarcinomaofthecervix.GynecolOncol1996;60:283–7.

32- KersemaekersAM,FleurenGJ,KenterGG,etal.Oncogenealterationsincarcinomasoftheuterinecervix:overexpressionoftheepidermalgrowthfactorreceptorisassociatedwithpoorprognosis.ClinCancer Res1999;5:577–86.

33- COOKE, T., SHIELDS, R., GEORGE, D., MAYNARD, P. & GRIFFITHS,K. (1979). Oestrogen receptors and prognosis in early breastcancer.Lancet, i, 995.

34- BaselgaJ.The science of EGFR inhibition:a roadmap to improvedclinical outcomes? Signal.2004;5:4-8.

35-ArteagaC.Targeting HER 1/EGFR:a molecular approach to cancertherapy. Semin Oncol.2003;30(3 suppl 7):3-14.

36- Mass RD.The HER receptor family:a rich target for therapeuticdevelopment. Int J RadiatOncolBiol Phys.2004;58:932-940.

37- Mendelsohn J, Baselga J. Epidermal growth factor receptor targeting in cancer. SeminOncol 2006; 33:369-85.

38-Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. Embo J 2000; 19:3159-67.

39-Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE, Jr., Davidson NE, Tan-Chiu E, Martino S, Paik S, Kaufman PA, Swain SM, Pisansky TM, Fehrenbacher L, Kutteh LA, Vogel VG, Visscher DW, Yothers G, Jenkins RB, Brown AM, Dakhil SR, Mamounas EP, Lingle WL, Klein PM, Ingle JN, Wolmark N. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. N Engl J Med 2005; 353:1673-84

40-Grandis JR, Sok JC.Signaling through the epidermal growth factor receptor during the development of malignancy.PharmacolTher 2004; 102:37-46.

41- Mendelsohn J. Targeting the epidermal growth factor receptor for cancer therapy. J ClinOncol 2002; 20:1S-13S.

42-Baselga J, Arteaga CL. Critical update and emerging trends in epidermal growth factor receptor targeting in cancer. J ClinOncol 2005; 23:2445-5

43- Perez-Soler R, Saltz L. Cutaneous adverse effects with HER1/EGFR-targeted agents: is there a silver lining? J ClinOncol 2005; 23:5235-469

44-Corzo C, Tusquets I, Salido M, Corominas JM, Bellet M, Suarez M, Baro T, Fabregat X, Serrano S, Sole F. Characterization of HER1 (c-erbB1) status in locally advanced breast cancer using fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. TumourBiol 2005; 26:25-30.

45-Herbst RS, Shin DM. Monoclonal antibodies to target epidermal growth factor receptor-positive tumors: a new paradigm for cancer therapy. Cancer 2002; 94:1593-611.

46-Bhargava R, Gerald WL, Li AR, Pan Q, Lal P, Ladanyi M, Chen B. EGFR gene amplification in breast cancer: correlation with epidermal growth factor receptor mRNA and protein expression and HER-2 status and absence of EGFR-activating mutations. Mod Pathol 2005; 18:1027-33.

47-Siziopikou KP, Cobleigh M. The basal subtype of breast carcinomas may represent the group of breast tumors that could benefit from EGFR-targeted therapies. Breast 2006

48- Moy B, Goss PE. Lapatinib: current status and future directions in breast cancer. Oncologist 2006; 11:1047-57

49-Ali Hassan : Immunocytochemichal localization of epidermal growth factor and transforming growth factor receptors(egfr) in human lamphatic organs (lo)and bone marrow in the normal case and diseased one.

50-Leibl S, Moinfar F: Metaplastic breast carcinomas are negative for Her-2 but frequently express EGFR (Her-1): potential relevance to adjuvant treatment with EGFR tyrosine kinase inhibitors? J ClinPathol 2005, 58:700-704

51-Corzo C, Tusquets I, Salido M, Corominas JM, Bellet M, Suarez M, Baro T, Fabregat X, Serrano S, Sole F: Characterization of HER1 (c-erbB1) status in locally advanced breast cancer using fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. TumourBiol 2005, 26:25-30

52-Reis-Filho JS, Milanezi F, Simpson P, Fulford LG, Steele D, Nesland JM, Pereira EM, Lakhani SR, Schmitt FC: Are metaplastic breast carcinomas basal-like tumours? [abstract]. Mod Pathol 2005, 48A.

53-Ciardiello F, Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment. N Engl J Med. 2008;358:1160–1174. doi: 10.1056/NEJMra0707704. [PubMed] [Cross Ref]

54-Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thurlimann B, Senn HJ. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. Ann Oncol. pp. 1736–1747

55-Tamimi RM, Baer HJ, Marotti J, Galan M, Galaburda L, Fu Y, Deitz AC, Connolly JL, Schnitt SJ, Colditz GA, Collins LC. Comparison of molecular phenotypes of ductal carcinoma in situ and invasive breast cancer. Breast Cancer Res. 2008;10:R67. doi: 10.1186/bcr2128. [PMC free article] [PubMed] [Cross Ref]

56-Wilson, B. S., Pfeiffer, J. R., Raymond-Stintz, M., Lidke, D., Lidke, K., AndreZws, N. and Oliver, J. M. (2007). Electron microscopy methods to study membrane organization.In Methods in Molecular Biology Vol. 398 (ed. T. McIntosh). pp, 247-263, Humana Press

57-Pusztai L, Cristofanilli M, Paik S.New generation of molecular prognostic and predictive tests for breast cancer.SeminOncol. 2007;34(2 Suppl 3):S10–6. doi: 10.1053/j.seminoncol.2007.03.015. [PubMed] [Cross Ref]

58-Bhargava R, Striebel J, Beriwal S, Flickinger JC, Onisko A, Ahrendt G, Dabbs DJ. Prevalence, Morphologic Features and Proliferation Indices of Breast Carcinoma Molecular Classes Using Immunohistochemical Surrogate Markers. Int J clinExpPathol. 2009. pp. 444–455. [PMC free article] [PubMed

59-Atchley DP, Albarracin CT, Lopez A, Valero V, Amos CI, Gonzalez-Angulo AM, Hortobagyi GN, Arun BK. Clinical and pathologic characteristics of patients with BRCA-positive and BRCA-

60-Santoro, E., DeSoto, M., and Hong Lee, J (February 2009). "Hormone Therapy and Menopause".National Research Center for Women & Families. http://www.center4research.org/2010/03/hormone-therapy-and-menopause/.

61-Medew, Julia (30 September 2010). "Study finds big risk of cancer in the family". Sydney Morning Herald.

62-Friedenson B, “Preventing hereditary cancers associated with BRCA1 and BRCA2 gene mutations” 2012 Brockstein, M. Lacouture, M. Agulnik, and K. G. Robinson

63-The Role of Inhibitors of the Epidermal Growth Factor in Management of Head and Neck CancerJ NatlComprCancNetw, August 1, 2008; 6(7): 696 – 706