

CC chemokine receptor 7 (CCR7) gene expression in breast cancer

Dr. Zouheir Al-shehabi*
Kenan Aloss**

(Received 30 / 10 / 2017. Accepted 5 / 12 / 2017)

□ ABSTRACT □

Lymph node metastasis is considered an adverse prognostic factor in breast cancer. The molecular mechanisms controlling tumor metastasis are complex. However, there are many evidences supporting the direct involvement of chemokines and their receptors (CCR7) in this process. Therefore, the aim of this study is to assess CCR7 expression in both primary tumor and lymph nodes. RNA was isolated using Acidic Phenol method from 12 formalin fixed paraffin embedded breast cancer specimens (5 primary tumors, 7 lymph nodes), and then CCR7 expression was assessed by RT-PCR using specific primers for CCR7 receptor and the positive control GAPDH. The results have revealed no significant importance in the difference of CCR7 mRNA expression between positive and negative lymph nodes or between metastatic and non-metastatic primary tumors ($P>0.05$). However, with this small number of specimens, the results can not rule out the role of CCR7 expression in lymph node metastasis. Moreover, the current study should associate with the study of protein

Keywords: Breast cancer, lymph node metastasis, chemokines, CCR7

* Professor, Department of pathology, Faculty of medicine, Tishreen University, Lattakia, Syria.

**Postgraduate student, Department of Microbiology and Biochemistry, Faculty of pharmacy, Tishreen University, Lattakia, Syria.

دراسة التعبير الوراثي عن المستقبل CCR7 في سرطان الثدي

الدكتور زهير الشهابي*

كنان العص**

(تاريخ الإيداع 30 / 10 / 2017. قُبل للنشر في 5 / 12 / 2017)

□ ملخص □

تشكل النقاثل اللمفية عامل انذار سئ في سرطان الثدي، وعلى الرغم من أن الآلية الجزيئية للنقاثل اللمفية معقدة لكن هناك الكثير من الأدلة على دور للكيموكينات ومستقبلاتها (CCR7) في هذه العملية، لذلك يهدف البحث إلى دراسة التعبير عن المستقبل CCR7 في كل من الورم الأولي والعقد اللمفية من نفس المريضات. عزل RNA بطريقة الفينول الحمضي من 12 عينة نسيجية مثبتة بالفورمالين ومدمجة بشمع البارافين مأخوذة من 5 مريضات بسرطان الثدي (5 عينات ورم أولي و 7 عينات عقد لمفية)، وتمت دراسة التعبير عن المستقبل CCR7 في كل من الورم الأولي والعقد اللمفية باستخدام تقنية RT-PCR بوجود بوائى نوعية لكل من CCR7 و GAPDH المستخدم كشاهد ايجابي. أظهرت نتائج الدراسة عدم وجود فرق هام إحصائياً في التعبير عن CCR7 بين العقد اللمفية ايجابية وسلبية النقاثل وكذلك بين الورم الأولي النقاثل وغير النقاثل ($P>0.05$)، لكن ضمن هذا العدد القليل من العينات لايمكن نفي دور المستقبل CCR7 في حدوث النقاثل اللمفية، لذلك لابد من زيادة عدد العينات المدروسة و اقتران الدراسة الوراثية بدراسة على المستوى البروتيني.

الكلمات المفتاحية: سرطان الثدي، النقاثل اللمفية، الكيموكينات، المستقبل CCR7

أستاذ ، قسم التشريخ المرضي ، كلية الطب، جامعة تشرين، اللاذقية، سورية.*
** طالب دراسات عليا (ماجستير) ، التشخيص المخبري، قسم الأحياء الدقيقة والكيمياء الحيوية، كلية الصيدلة، جامعة تشرين، اللاذقية، سورية.

مقدمة:

سرطان الثدي هو ثاني أكثر السرطانات شيوعاً في العالم وأكثرها مابين النساء ، حيث يعتبر المسبب الخامس للوفيات مابين كل السرطانات، و المسبب الثاني لوفيات السرطان بين النساء في البلدان المتقدمة بعد سرطان الرئة مع اكثر من مليون حالة وأكثر من 373 الف وفاة سنوياً [1، 2]. تعتبر النقائل أحد المشاكل الرئيسية في التدبير العلاجي لمرضى السرطان، حيث أن أغلب وفيات مرضى السرطان عائدة للانتشار النقائلي نحو الأعضاء الأخرى أكثر من كونها عائدة للورم الأولي [3]. وتشكل الجملة الوعائية اللمفية طريق هام للانتشار النقائل نحو العقد اللمفية، حيث أن انتشار خلايا الورم نحو العقد اللمفية هو حدث مبكر وشائع خلال تطور الورم، كما تعتبر عامل إنذاري سيء في معظم السرطانات، ويعتمد عليها سريراً لتحديد مرحلة الورم. إن الخلايا الورمية المنفصلة من منطقة الورم البدئي تدخل العقدة اللمفية عبر أوعية لمفية موجودة مسبقاً بجوار منطقة الورم الأولي، فهي تدخل بسهولة إلى الوعاء اللمفي وذلك بسبب الجدران الرقيقة لتلك الأوعية وغشائها القاعدي غير المكتمل والذي لن يشكل عائق أمام دخول الخلايا الورمية [4]. اقترحت العديد من الآليات التي تتوسط عملية انتقال الخلايا الورمية عبر الأوعية اللمفية مثل تشكيل أوعية لمفية جديدة Lymphangiogenesis [5]، زيادة التعبير عن مستقبلات الالتصاق مثل CLEVER-1 على الأوعية اللمفية [6]، بالإضافة لدور الكيموكينات و مستقبلاتها [7].

الكيموكينات هي سيتوكينات النهائية ذات تأثير جاذب كيميائي، وهي تلعب مع مستقبلاتها دوراً هاماً في العديد من العمليات الحيوية في الجسم مثل تنظيم هجرة الكريات البيض نحو مواقع الالتهاب والأعضاء اللمفية الثانوية، شفاء الجروح، استجابة الخلايا التائية المساعدة TH1/TH2، نضج الخلايا التغصنية، تطوّر الأعضاء اللمفية الثانوية، بالإضافة لدورها الهام في الأورام الخبيثة سواء المحفز أو المضاد للورم [8]. حيث تعبّر العديد من الأورام الصلبة عن مجموعة من الكيموكينات ومستقبلاتها، والتي يساهم في التعبير عنها كل من الخلايا الورمية وخلايا البيئة المكروية المحيطة بها. فالخلايا الظهارية الورمية تنتج مستويات أعلى من الكيموكينات مقارنة بالخلايا الظهارية الطبيعية كما تعبّر على سطحها عن سلسلة من مستقبلات الكيموكينات [9]. تعتبر الكيموكينات ومستقبلاتها أحد الآليات الرئيسية المقترحة لتفسير نقائل العقد اللمفية، حيث يوجد مجموعة من الكيموكينات المفروزة في العقد اللمفية والتي يمكن أن تجذب الخلايا الورمية الحاملة لمستقبلاتها الموافقة بشكل مشابه لدورها في جذب الخلايا المناعية بأنواعها إلى العقد اللمفية وأهمها المستقبل CCR7 [7].

المستقبل 7 C-C chemokine receptor هو مستقبل من عائلة مستقبلات الكيموكينات CC من نمط المستقبلات المرتبطة بالبروتين. تعتبر الكيموكينات (CCL19/ECL) و (CCL21/SLC/6-Ckine) المفروزة في العقد اللمفية رباطات نوعية لهذا المستقبل [10]. يضبط مستقبل الCCR7 مع رباطه هجرة الخلايا المناعية بمافيهما اللمفاويات التائية والبائية والخلايا التغصنية إلى العقد اللمفية [11]. انطلاقاً من ذلك أشارت الدراسات السابقة إلى أن الخلايا الورمية المعبرة عن المستقبل CCR7 يمكن أن تستخدم الآلية السابقة التي تستخدمها الخلايا المناعية لتهاجر نحو الأوعية اللمفية وتصل إلى العقد اللمفية الحاوية على رباطات هذا المستقبل CCL19, CCL21 [7]. لذلك اتهم المستقبل CCR7 بتوسط نقائل العقد اللمفية في العديد من السرطانات حيث ترافقت زيادة التعبير عن المستقبل CCR7 مع حدوث نقائل العقد اللمفية في العديد من الاورام الصلبة مثل سرطان المعدة [12]، سرطان المري [13]، و سرطان الرئة [14]. بدوره أظهر الباحث Wiley و زملاؤه أن تثبيط الكيموكين CCL21 بواسطة أضداد معدلة أدى إلى خفض نقائل العقد اللمفية لدى الفئران المظعمة بخلايا سرطان الجلد المعبرة عن CCR7 (CCR7-B16 cells)

مقارنة مع مجموعة الشاهد، لكن اقتصر على هذه الدراسة على الفئران ولم يتم دعمها بدراسة التعبير عن CCR7 في مقاطع نسيجية [15]. وباستخدام مقاييس الغزو والجذب الكيميائي في الزجاج على خلايا سرطانية لسرطان المعدة تبين أن الخلايا ذات التعبير الإيجابي عن CCR7 أظهرت قدرة أعلى على الغزو والانتقال نحو الكيموكينات CCL21 و CCL19 [12]. كما إن التعبير العالي عن المستقبل CCR7 قد ترافق مع إنذار سيء لدى مرضى سرطان الثدي حيث كان معدل البقاء الكلية لدى هؤلاء المرضى أقل مقارنة بالمرضى ذوي التعبير المنخفض عن CCR7 [16]. لكن ركزت أغلب الدراسات السابقة على دراسة التعبير عن CCR7 في منطقة الورم الأولي فقط وقلّة من الدراسات درست التعبير عن CCR7 في العقد اللمفية [17] لذلك هدفت الدراسة الحالية إلى دراسة التعبير عن المستقبل CCR7 في كل من الورم الأولي والعقد اللمفية.

أهمية البحث و أهدافه:

أهمية البحث:

تأتي أهمية الدراسة المقدمة كونها يمكن أن تقدم معلومات جديدة حول إحدى الآليات المقترحة لحدوث النقائل اللمفية عبر المستقبل CCR7، بالإضافة إلى إمكانية التنبؤ المبكر بحدوث نقائل العقد اللمفية في سرطان الثدي

أهداف البحث:

يهدف البحث المقدم إلى دراسة التعبير الوراثي عن المستقبل CCR7 في كل من الورم الأولي والورم المنتقل إلى العقد اللمفية من نفس المريضات باستخدام تفاعل البوليميراز المتسلسل العكوس Reverse transcription polymerase chain reaction، بالإضافة إلى مقارنة التعبير عن المستقبل CCR7 ما بين العقد اللمفية إيجابية وسلبية النقائل

طرائق البحث و موادّه:

1- عينة الدراسة:

جمعت عينة الدراسة من قسم التشريح المرضي في مشفىي الأسد وتشرين الجامعيين في مدينة اللاذقية، و شملت عينة الدراسة 12 عينة نسيجية مثبتة بالفورمالين ومدمجة بشمع البارافين Formalin-fixed paraffin embedded مأخوذة من 5 مريضات بسرطان الثدي لعام 2016 واللواتي خضعن لاستئصال جراحي للثدي mastectomy، منها 5 عينات ورم أولي مع 5 عينات عقد لمفية، حيث كانت 3 من المريضات إيجابية النقائل للعقد اللمفية ومريضتين بدون نقائل للعقد اللمفية. وبالنسبة للمريضات مع نقائل للعقد اللمفية فقد أخذ من كل مريضة عينة عقد إيجابية النقائل وعينة عقد سلبية النقائل (في حال توفرها) بهدف مقارنة التعبير عن CCR7 بين العقد اللمفية من نفس المريضة و ليصبح عدد العقد اللمفية المدروسة 7 عقد لمفية، و تم استبعاد مريضات سرطان الثدي غير المناسبين للدراسة وهم المريضات اللواتي لم تتوفر لهم كل من عينة الورم الأولي مع عينة العقد اللمفية لنفس المريضة مع البيانات الخاصة بالمريضة. وتم الاعتماد على تقارير التشريح المرضي للحصول على معلومات تشريحية مرضية شملت حجم الورم، درجة الورم، وجود أو غياب النقائل إلى العقد اللمفية، حالة مستقبلات هرمونات البروجسترون والاستروجين و Her2/neu، بالإضافة إلى البيانات الخاصة بالعمر (جدول 1)

الجدول 1: خصائص عينة الدراسة

عمر المريضات	< 45.4 سنة: 4 عينات
(25-55) سنة	≥ 45.4 سنة : 1 عينة
حجم الورم	< 2 سم : 2 عينة
(1-4) سم	≥ 2 سم : 3 عينات
درجة الورم	I : 1 عينة
	II: 3 عينات
	III: 1 عينة
حالة مستقبلات الإستروجين	إيجابي: 1
	سليبي: 4
حالة مستقبلات البروجسترون	إيجابي: 1
	سليبي: 4
حالة مستقبلات HER2	إيجابي: 2
	سليبي: 3

2- المواد و الطرائق المستخدمة:

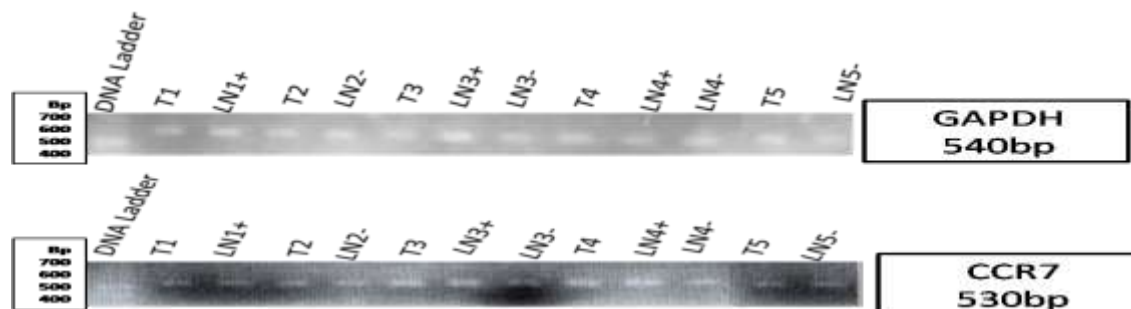
جرى تقطيع العينات النسيجية المثبتة بالفورمالين والمدمجة بشمع البارافين إلى مقاطع نسيجية بسماكة $5\mu\text{m}$ باستخدام جهاز الميكروتوم في مشفى تشرين الجامعي، و تمت إذابة شمع البارافين عن المقاطع النسيجية عبر معاملتها بالكزاليين ومن ثم بالإيثانول، ثم عزل الحمض النووي RNA من المقاطع النسيجية باستخدام طريقة الفينول الحمضي [18]، وجرى اصطناع سلسلة cDNA باستخدام العتيدة التجارية العائدة لشركة Vivantise[®]، ثم جرى تضخيم سلسلة cDNA في تفاعل البوليميراز المتسلسل العكوس PCR باستخدام العتيدة التجارية العائدة لشركة Thermo scientific[®] وبوجود بواقي نوعية لكل من المستقبل المدروس CCR7 (تسلسل البادئ الأمامي 5'-TCCTTCTCATCAGCAAGCTGT-3' في حين كان تسلسل البادئ العكسي 5'-GAGGCAGCCCAGGTCCTTGAAG-3' وبادئ لل GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) المستخدم كشاهد إيجابي وهو من الجينات المسماة housekeeping genes (تسلسل البادئ الأمامي 5'-TTAGCACCCCTGGCCAAG-3' وتسلسل البادئ العكسي 5'-CTTACTCCTTGGAGGCCATG-3')، حيث صممت البواقي من قبل هيئة الطاقة الذرية في دمشق، وكان برنامج تفاعل PCR المطبق كالتالي: جرت مرحلة تمسيخ الروابط المضاعفة denaturation في حرارة 94°C لمدة دقيقة، ثم مرحلة الالتحام annealing ضمن مجال درجات ($55-57^{\circ}\text{C}$) لمدة دقيقة، ومرحلة الإطالة extention في حرارة 72°C لمدة 30 ثانية وكُرِّر هذا البرنامج على 35 دورة، رَحَّل ال DNA المضخَّم بتفاعل ال PCR على جل الأغاروز بتركيز 1.5%، ثم قرئت نتائج الرحلان باستخدام جهاز الأشعة فوق البنفسجية العائد لشركة Biosystems[®]. حيث أجريت هذه التجارب في مركز التقانة الحيوية في كلية الزراعة ومخبر البحث العلمي في كلية الصيدلة.

تم استخدام برنامج تحليل الصور Image J software بهدف تحليل عصابات DNA على جل الأغاروز وتحويلها إلى قيم رقمية، كما استخدم البرنامج الإحصائي SPSS النسخة 19.0 لمعالجة نتائج الدراسة، واعتمد اختبار ستودنت Student لمقارنة فروق التعبير عن CCR7 بين العقد اللمفية إيجابية وسلبية النقاثل ومابين الورم الأولي المنقل وغير المنقل، كما استخدم اختبار مان ويتني Mann-Whitney لدراسة العلاقة بين التعبير عن المستقبل CCR7 في الورم والعوامل الباثولوجية والإمراضية. واعتبرت الفروق هامة إحصائياً عند عتبة الدلالة ($P < 0.05$) في جميع الاختبارات المطبقة.

النتائج والمناقشة:

• النتائج:

1- نتائج التعبير الوراثي عن CCR7 في العينات النسيجية باستخدام تفاعل البوليميراز المتسلسل العكوس أظهرت قراءة نتائج الرحلان الكهربائي على جل الأغاروز 1.5% لمنتجات تضخيم CCR7 cDNA أن كل عينة الدراسة (100%) سواء نسيج الورم الأولي (5 نسيج ورمية) أو العقد اللمفية (3 عقد إيجابية النقاثل، 4 عقد سلبية النقاثل) أظهرت تعبير عن المستقبل CCR7 بنسب مختلفة، واختلفت كثافة عصابات DNA bands بين العينات تبعاً لنسبة التعبير عنه في كل عينة. حيث يظهر (الشكل 1) نتائج الرحلان الكهربائي لمنتجات تضخيم كل من CCR7 cDNA عند وزن جزيئي 530bp و GAPDH cDNA عند وزن جزيئي 540bp.



الشكل 1: نتائج الرحلان الكهربائي لمنتجات تضخيم CCR7cDNA عند وزن جزيئي 530bp و GAPDH cDNA عند وزن جزيئي 540bp، حيث T: هي اختصار للورم الأولي Tumor، LN+: هي اختصار للعقدة اللمفية إيجابية النقاثل positive lymph node، LN-: هي اختصار للعقدة اللمفية سلبية النقاثل negative lymph node.

2- نتائج تحليل عصابات DNA باستخدام برنامج Image J software:

استخدم برنامج Image J software من أجل قياس كثافة عصابات DNA لكل من GAPDH، CCR7 وتحويلها لقيم رقمية، حيث استخدم الـ GAPDH كشاهد داخلي Internal control ليتم مقارنة النتائج معه لأن التعبير الجيني عنه يبقى ثابت، حيث تم نسب التعبير عن CCR7 في كل عينة إلى التعبير عن GAPDH في هذه العينة (normalization). و استخدمت هذه النسبة في المقارنات الإحصائية اللاحقة. ويوضح (جدول 2) نتائج تحليل عصابات DNA ببرنامج Image J.

الجدول 2: نتائج التعبير عن CCR7 و GAPDH والنسبة بينهما بعد تحليل عصابات ال DNA باستخدام Image J software، حيث T+: ترمز للورم الأولي النقائلي، T-: ترمز للورم الأولي غير النقائلي، LN+: ترمز للعقد اللمفية إيجابية النقائل، LN-: ترمز للعقدة اللمفية سلبية النقائل.

العينة	التعبير عن CCR7	التعبير عن GAPDH	CCR7/GAPDH
T1+	4076.790	11479.527	0.355
LN1+	3880.184	12022.619	0.322
T2-	7382.598	9662.598	0.764
LN2-	12500.012	12547.426	0.996
T3+	14142.426	10922.598	1.294
LN3+	9761.597	13705.376	0.712
LN3-	4024.355	6669.184	0.603
T4+	13620.255	4910.355	2.773
LN4+	17608.376	8940.962	1.969
LN4-	10705.774	4823.184	2.219
T5-	11932.933	12358.669	0.965
LN5-	3352.284	6422.062	0.521

3- مقارنة التعبير الوراثي عن CCR7 بين العقد اللمفية إيجابية وسلبية النقائل:

أظهرت نتائج اختبار الفرق في التعبير الوراثي عن المستقبل CCR7 بين العقد اللمفية إيجابية وسلبية النقائل بين المريضات بشكل عام عدم وجود فرق هام إحصائياً ($P=0.9$)، فقد تقارب التعبير عن CCR7 في كل من العقد الإيجابية وسلبية النقائل بمتوسط وانحراف معياري (1.001 ± 0.86) للعقد إيجابية النقائل و (1.085 ± 0.78) للعقد سلبية النقائل. كذلك عند اختبار الفرق في التعبير عن المستقبل CCR7 بين العقد اللمفية الإيجابية والسلبية النقائل من نفس المريضة فقد كان الفرق غير هاماً إحصائياً ($P=0.761$) بمتوسط وانحراف معياري (1.34 ± 0.88) للتعبير عن CCR7 في العقد إيجابية النقائل و (1.441 ± 1.14) للعقد سلبية النقائل.

4- مقارنة التعبير الوراثي عن CCR7 بين الورم الأولي النقائلي وغير النقائلي:

عند مقارنة التعبير عن CCR7 ما بين عينات الورم النقائلي والورم غير النقائلي باستخدام اختبار ستودنت t، تبين عدم وجود دلالة إحصائية لهذا الفرق ($P=0.496$). حيث كان المتوسط والانحراف المعياري للتعبير عن CCR7 (1.457 ± 1.21) في الأورام النقائلية و (0.864 ± 0.14) في الأورام غير النقائلية.

5- دراسة العلاقة بين التعبير عن CCR7 في الورم و عوامل الخطورة:

أظهرت دراسة العلاقة بين التعبير عن المستقبل CCR7 في الورم مع عوامل الخطورة (العمر، حجم الورم، درجة الورم، وحالة مستقبلات الأستروجين والبروجسترون و HER2)، عدم وجود علاقة هامة إحصائياً بين التعبير عن CCR7 في الورم وكل من عمر المريضات ($P=0.62$)، حجم الورم ($P=0.321$)، درجة الورم ($P=0.31$)، وحالة مستقبلات الإستروجين ($P=0.709$) و البروجسترون ($P=0.361$) و HER2 ($P=0.361$).

• المناقشة:

هدفت الدراسة المقدمة إلى دراسة التعبير الوراثي عن المستقبل CCR7 في كل من الورم الأولي و العقد اللمفية المعزولة من مريضات سرطان الثدي، وبالتالي إمكانية مقارنة التعبير عن CCR7 ما بين العقد اللمفية إيجابية وسلبية

النقائل، لأن معظم الدراسات السابقة اقتصرت على دراسة دور المستقبل CCR7 في نقائل العقد اللمفية على مزارع خلوية في الزجاج أو ضمن نماذج فئران أو ضمن عينات نسيجية للورم الأولي، و فقط القليل من الدراسات من درست التعبير عن CCR7 في العقد اللمفية.

أظهرت نتائج الدراسة عند مقارنة التعبير عن المستقبل CCR7 ما بين العقد اللمفية إيجابية وسلبية النقائل سواء من نفس المريضة أو بين المريضات بشكل عام تقارب كبير في متوسط التعبير عن CCR7 ما بين العقد الإيجابية والسلبية النقائل مع عدم وجود أي أهمية إحصائية لهذا الفرق، يمكن تفسير ذلك بأنه يمكن أن تكون بعض هذه العقد سلبية النقائل في مرحلة ما قبل نقائلية، مما سبب ارتفاع مستويات التعبير عن المستقبل CCR7 ضمن هذه العقد وبالتالي ساهم في تقليل الفرق مع العقد إيجابية النقائل. وبالمقارنة مع دراسات سابقة فقد توافقت هذه النتيجة مع ماتوصلت إليه الباحثة Razmkhah وزملاؤها التي قارنت التعبير عن عدد من الكيموكينات ومستقبلاتها ومنها CCR7 ما بين العقد اللمفية إيجابية و سلبية النقائل على عدد أكبر من عينات العقد اللمفية (18 عينة)، فلم تلاحظ أيضاً فرقا هاماً إحصائياً في التعبير عن CCR7 ما بين العقد إيجابية وسلبية النقائل على الرغم من أن نتائج التدفق الخلوي flow cytometry في تلك الدراسة قد أظهرت زيادة هامة في التعبير عن مستقبلات أخرى مثل المستقبل

CCR5 ورببطته (MCP-1/CCL2) في العقد الإيجابية مقارنة بسلبية النقائل [17]

لم يلاحظ وجود فرقا هاماً إحصائياً في التعبير عن CCR7 ما بين الورم الأولي النقائلي والورم غير النقائلي، لكن وضمن هذا العدد القليل من العينات لا يمكن نفي دور المستقبل CCR7 في حدوث نقائل العقد اللمفية، حيث أشارت معظم الدراسات السابقة إلى دور هام لهذا المستقبل في النقائل اللمفية في العديد من الأورام الصلبة، فمثلاً توصل الباحث Mashino وزملاؤه لوجود ارتباط هام ما بين التعبير عن المستقبل CCR7 في نسيج الورم و ما بين وجود نقائل إلى العقد اللمفية في سرطان المعدة عبر دراسة التعبير عن CCR7 على المستوى الجيني باستخدام RT-PCR، وعلى المستوى البروتيني باستخدام التلوين المناعي النسيجي [12]. وأكد لاحقاً الباحث Cabioglu وزملاؤه هذه النتيجة في دراسة على عينات نسيجية لسرطان الثدي [19]، وكذلك الباحث Irino وزملاؤه في دراسة على سرطان المري [13]، و الباحث Takanami وزملاؤه في دراسة على سرطان الرئة [14].

أظهرت هذه الدراسة عدم وجود علاقة هامة إحصائياً ما بين التعبير عن CCR7 في الورم الأولي و عوامل الخطورة مثل عمر المريضات، حجم الورم، درجة الورم، و حالة مستقبلات الإستروجين والبروجسترون وال HER-2، ويمكن تفسير ذلك بأن العمر النصفى لبروتين المستقبل المدروس (CCR7) طويل جداً [20]. أي يمكن أن تكون كمية RNA التي تصطنعها الخلية لهذا البروتين قليلة، وبالتالي لا بد من اقتران الدراسة الوراثية بدراسة على المستوى البروتيني لتأكيد هذه النتيجة. وبالمقارنة مع بعض الدراسات السابقة فقد توصل Takanami و زملاؤه أيضاً لعدم وجود علاقة هامة إحصائياً بين التعبير عن CCR7 في الورم و كل من عمر المريضات و حجم الورم في دراسة على سرطان الرئة [14]. أما بالنسبة لدرجة الورم فقد أظهر Ding وزملاؤه في دراسة على سرطان المري وجود علاقة هامة إحصائياً ما بين التعبير عن CCR7 في الورم وما بين درجة الورم [21]، في حين لم تكن هذه العلاقة هامة إحصائياً في دراسة أخرى على سرطان العنق [22]. بدوره توصل الباحث Cabioglu و زملاؤه إلى عدم وجود علاقة هامة إحصائياً ما بين التعبير عن CCR7 في الورم وحالة مستقبلات الإستروجين والبروجسترون و HER-2 [19].

إن نتائج هذه الدراسة يمكن أن تفتح الباب لدراسات مستقبلية يتم فيها تلافي محدودية الدراسة الحالية والمتمثلة في قلة عدد عينات سرطان الثدي المدروسة، واقتصار دراسة التعبير عن المستقبل CCR7 على المستوى الوراثي فقط،

وبالتالي تأكيد أكبر لنتائج هذه الدراسة، نظراً لأهمية هذا المستقبل في نقائل العقد اللمفية كونه يمكن أن يشكل هدف علاجي مستقبلاً في علاج نقائل العقد اللمفية.

الاستنتاجات و التوصيات:

أظهرت هذه الدراسة عدم وجود فرق هام في التعبير عن المستقبل CCR7 ما بين العقد اللمفية إيجابية وسلبية النقايل، لذلك من المهم تأكيد هذه النتيجة مستقبلاً على عدد أكبر من مرضى سرطان الثدي، إضافةً إلى ترافق الدراسة الوراثية بدراسة المستقبل CCR7 على المستوى البروتيني أيضاً. لأن تأكيد هذه النتيجة يمكن أن يقدم إضافة جديدة حول أحد الأهداف العلاجية المستقبلية (CCR7) لعلاج نقائل العقد اللمفية.

المراجع

1. FERLAY, J., et al., Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*, 136(5), 2015, p. 359-86.
2. SIEGEL, R.L., K.D. MILLER, and A. JEMAL, Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin*, 66 (1), 2016, p. 7-30.
3. FIDLER, I.J., Critical determinants of metastasis. *Semin Cancer Biol*, 12(2), 2002, p. 89-96.
4. ACHEN, M.G.S.S.A., Molecular Control of Lymphatic Metastasis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1131(01), 2008, p. 225-234.
5. MUMPRECHT, V. and M. DETMAR, Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13(8a), 2009, p. 1405-1416.
6. AMMAR, A., et al., Lymphatic expression of CLEVER-1 in breast cancer and its relationship with lymph node metastasis. *Analytical cellular pathology (Amsterdam)*, 34(1-2), 2011, p. 1-2.
7. MULLER A, H.B.S.H.G.N.C.D.B.M.E.M.T.M.E.Y.W.W.S.N.B.J.L., Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*, 410(6824), 2001, p. 50-6.
8. ROSSI, D. and A. ZLOTNIK, 'The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol*, 18, 2000, p. 217-42.
9. LAZENNEC, G. and A. RICHMOND, Chemokines and chemokine receptors: new insights into cancer-related inflammation. *Trends in molecular medicine*, 16(3), 2010, p. 133-144.
10. HIPKIN, W., CCR7 Chemokine Receptor, in *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, S.J. Enna and D.B. Bylund, Editors, Elsevier: New York. 2007, p. 1-10.
11. VON ANDRIAN, U.H. and T.R. MEMPEL, Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nat Rev Immunol*, 3(11), 2003, p. 867-878.
12. MASHINO K, S.N.Y.H.T.F.O.M.S.K.I.H.M.M., Expression of chemokine receptor CCR7 is associated with lymph node metastasis of gastric carcinoma. *Cancer research*, 62(10), 2002, p. 2937-41.
13. IRINO, T.T.H.M.S.S.Y.K.H.W.N.T.T.N.R.F.K.O.T.K.Y., CC-Chemokine receptor CCR7: a key molecule for lymph node metastasis in esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer BMC Cancer*, 14(1), 2014, p. 291.
14. TAKANAMI, I., Overexpression of CCR7 mRNA in nonsmall cell lung cancer : correlation with lymph node metastasis. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 105(2), 2003, p. 186-9.
15. WILEY, H.E., et al., Expression of CC chemokine receptor-7 and regional lymph node metastasis of B16 murine melanoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 93(21), 2001, p. 1638-43.

16. LIU, Y., et al., Correlation effect of EGFR and CXCR4 and CCR7 chemokine receptors in predicting breast cancer metastasis and prognosis. *J Exp Clin Cancer Res Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 29(1), 2010, p. 1-9.
17. RAZMAKH, M., et al., Chemokine and chemokine receptors: a comparative study between metastatic and nonmetastatic lymph nodes in breast cancer patients. *European cytokine network*, 2012, 23(3).
18. ZUMBO.P , et al., Phenol-chloroform Extraction.
19. CABIOGLU ،N., et al., CCR7 and CXCR4 as novel biomarkers predicting axillary lymph node metastasis in T1 breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 11(16), 2005, p. 5686-93.
20. OTERO, C., M. GROETTRUP, and D.F. LEGLER, Opposite fate of endocytosed CCR7 and its ligands: recycling versus degradation. *J Immunol*, 177(4), 2006, p. 2314-23.
21. DING Y, S.Y.M.M.K.A.K.J.K.I.H.Y.M.M.H.H.I.M., Association of CC chemokine receptor 7 with lymph node metastasis of esophageal squamous cell carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 9(9), 2003, p. 3406-12.
22. DAI, Y., et al., Association of CXCR4, CCR7, VEGF-C and VEGF-D expression with lymph node metastasis in patients with cervical cancer. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 214, 2017, p. 178-183.