



الجمهورية العربية السورية

جامعة دمشق

كلية طب الأسنان

قسم النسيج والتشريح المرضي

تحري تعبيرية بعض بروتينات الغزو في النقايل العقدية
ومقارنتها بورمها الأولي في السرطان شائك الخلايا للرأس
والعنق

(دراسة سريرية كيميائية مناعية)

**Investigation some invasion proteins
expression in invasive nodes and compare with
their primary tumor in head and neck
squamous cell carcinoma**

(clinical immunohistochemistry study)

بحث أعل لنيل درجة الدكتوراه في قسم النسيج والتشريح المرضي الفموي

إعداد الدكتورة

مايا الجوخدار

إشراف الأستاذ الدكتور

أحمد المنديلي

دكتوراه

١٤٣٨م-٢٠١٧

قرار لجنة الحكم

تصريح

لا يوجد أي جزء من هذه الأطروحة تم اقتباسه بالكامل من عمل علمي آخر أو أنجز للحصول على شهادة أخرى في جامعة دمشق أو أية جامعة أخرى أو أي معهد تعليمي داخل أو خارج القطر

بسم الله الرحمن الرحيم

(ذلك الفضل من الله وكفى بالله عليما)

صدق الله العظيم

سورة النساء الآية ٧٠

الإهداء Dedication

هي كلمات كتبها على عجل إلا أن صدقها جعلها تنساب على الورق وكأنّها تنتظر مني أن أمسك قلماً وورقةً .. إلا أنّي ومهما حاولت أن أبدع في وصف من أهديهم فلن تقارب كلماتي أحاسيس رائعة تركتها نفوسهم الغالية .. أهدي عملي المتواضع:

- للكبيرين ، للمضحيين ، للباذلين .. أمّي وأبي .. رغم المشقّة التي صاحبت عملي كنتم الملجأ بلا منافس .. هذا جهدي الفكري والجسماني وسهر لياليّ أقدمه لكما .. علّني أوفّي القليل من حقّكما ..
- لصديقتيّ أختيّ ديمًا وميسا ... تحلو الحياة بمشاركتها معكما بكلّ تفاصيلها حلوها وممرّها .. تعبها وراحتها .. وهذه إحدى المحطات التي ما كانت لولاكما.
- للقلب الذي فاض إيماناً .. بذل وأعطى حباً وتضحيةً بالغالي والنفيس .. لأم زوجي.
- لأطفالي عبد الرحمن وهيا .. قلبين نقيّين كالثلج .. روحين تواقّتين للعلا .. القدوة لهما لا يمكنها الراحة .. وهي فكرة أتعبتني على قدر مسؤوليّتها .. حاولت أن أشعل شعلهً مضيئةً علّها تنير حياتكما.
- إلى غائبي الحاضر .. كلماتي تنحني أمامك وجهدي أستصغره بذكرك .. كنت ولازلت الحياة بمعناها المشرق .. طبت دوماً .. زوجي عمر

كلمة شكر

Acknowledgment

بداية أحمد الله عزوجل على توفيقه في إتمام هذا البحث ، ومن ثم أتقدم بالشكر الجزيل لأستاذي الدكتور أحمد المنديلي على ما قدمه لي من خبرة ودعم أعانني في إتمام هذا البحث فكان الأب والأستاذ والقوة فله مني كل الاحترام.

كما أشكر لجنة التحكيم

الأستاذة الدكتورة رائدة الخاني رئيس قسم التشريح المرضي في كلية الطب البشري والأستاذ المساعد الدكتور نبيل قوشجي عميد كلية طب الأسنان جامعة الشام الخاصة والأستاذ المساعد الدكتور شريف بركت رئيس قسم التشريح المرضي في كلية طب الأسنان جامعة دمشق

والمدرس الدكتور عمر حمادة نائب عميد معهد الليزر في كلية طب الأسنان

لتفضلهم بإغناء البحث بملاحظاتهم القيمة ولتكرمهم بقبول تحكيم هذا البحث ولمساعداتهم الجلية التي أخذت بيدي لإكمال هذا العمل.

والشكر لإدارة كلية طب الأسنان جامعة دمشق ممثلة بالأستاذ الدكتور محمد سالم ركب عميد كلية طب الأسنان والأستاذ الدكتور محمد إياد الحفار وكيل الكلية للشؤون الإدارية.

ولا أنسى جهود الكادر الإداري في كلية طب الأسنان على تسهيل ومتابعة الأمور الادارية بصدر رحب ومحبة أخوية فكل فرد منهم خالص الشكر والتقدير والاحترام.

كما أتقدم بعميق شكري واحترامي لأستاذة القسم الدكتور ممدوح محارب و الدكتورة هيام جابر والدكتورة سوسن الدارس

وشكري ومحيتي الكبير لأخوتي في القسم الدكتور رانية عثمان والدكتور علاء
الشيخ والدكتور خالد زيد والدكتورة علا الفقير والدكتورة أميرة النور فهم خير
الصاحب والمعين.

ولا أنسى عميق شكري للسيد ناصر كتابي (أبو جمال) و لكادر مشفى المواساة مخبر
التشريح المرضي والسيد طلال قاسم على مساعدتهم في تحضير عينة البحث ،
والدكتور أحمد عبد الله والسيد ضياء الدين شعبان لمساعدتهما في انجاز الدراسة
الاحصائية .

ولا أنسى جهود الكادر الإداري في كلية طب الأسنان على تسهيل ومتابعة الأمور
الادارية بصدر رحب ومحبة أخوية فكل فرد منهم خالص الشكر والتقدير والاحترام.
أخيراً أوجه شكري ومحيتي لزملائي طلاب الدراسات العليا وأصدقائي جميعاً لما قدموه
من نقاش و دعم و تشجيع ، كما أشكر الحضور الكريم على تخصيصه جزءاً من وقته
في إغناء هذه الرسالة وأتمنى أن تكون على قدر هذه المسؤولية .

المحتويات

المقدمة.....	١٩
الهدف من البحث.....	٢١
الباب الأول المراجعة النظرية Literature review.....	٢٢
١- الورم والسرطان - الغزو والانتقالات Tumor and Cancer- Invasion and Metastasis:.....	٢٣
١-١ تعريف الورم Tumor:.....	٢٣
٢-١ تعريف السرطان Cancer:.....	٢٣
٣-١ تعريف الغزو Invasion:.....	٢٣
٤-١ تعريف الانتقالات Metastasis:.....	٢٣
٥-١ نظريتا الانتقالات Metastasis theories:.....	٢٤
١-٥-١ التربة الملائمة Congenial soils:.....	٢٤
٢-٥-١ النظرية الداروينية Darwinian concepts:.....	٢٥
٦-١ الآليات الجزيئية التي تعتمد عليها الخلايا السرطانية لتغزو وتستعمر The Molecular Basis of Cancer to Invade and Metastasize:.....	٢٦
٧-١ البيئة المحيطة بالسرطان Cancer environment:.....	٢٨
١-٧-١ المكونات اللحمية للسرطان Cancer stromal components:.....	٢٨
٨-١ تهرب الخلايا السرطانية من المناعة Cancer Immunoediting:.....	٣١
٢- السرطان شائك الخلايا للرأس والعنق head and neck squamous cell carcinoma:.....	٣٥
١-٢ تعريف Define:.....	٣٥
٢-٢ الأسباب المؤهبة Etiology:.....	٣٦

٣٦.....	٣-٢ Clinical Features المظاهر السريرية
٣٨.....	٤-٢ Classification : التصنيف
٣٨.....	١-٤-٢ Localization Classification التصنيف حسب المكان
٤١.....	٢-٤-٢ Stage Classification التصنيف حسب الدرجة السريرية
٤٣.....	٣-٤-٢ Grade Classification التصنيف حسب الدرجة النسيجية
٤٧.....	٥-٢ Histopathologic Features الأشكال النسيجية للسرطان شائك الخلايا
٤٧.....	١-٥-٢ Verrucous Carcinoma السرطان البشري الثؤلولي
٤٧.....	٢-٥-٢ Basaloid Squamous Cell Carcinoma السرطان شائك الخلايا المشبه بالقاعدي
٤٨.....	٣-٥-٢ Papillary Squamous Cell Carcinom : السرطان شائك الخلايا الحليمي
٤٨.....	٤-٥-٢ Spindle cell Squamous Cell Carcinoma السرطان شائك الخلايا ذو الخلايا المغزلية
٥٠.....	٣ - العقد اللمفية Lymph Nodes
٥١.....	١-٣ Cortex Region منطقة القشر
٥٢.....	٢-٣ Paracortex Region منطقة تحت القشر
٥٣.....	٣-٣ Medulla Region منطقة اللب
٥٤.....	٤-٣ Vascularization of the Lymph Node توعية العقدة اللمفية
٥٤.....	٥-٣ Histophysiology of Lymph Nodes وظيفة العقد
٥٨.....	٤ - الكيموكينات ومستقبلات الكيموكين Chemokines and Chemokine Receptors
٥٨.....	١-٤ Chemokines الكيموكينات
٥٨.....	١-١-٤ Chemokines Structure بنية الكيموكينات
٦١.....	٢-١-٤ Chemokines Functions وظائف الكيموكينات
٦٢.....	٢-٤ Chemokine Receptors مستقبلات الكيموكين

٦٣.....	١-٢-٤ : Activation of the Chemokine Receptor	مستقبل الكيموكين
٦٤.....	٣-٤ :Chemokine Receptor CXCR4/CXCR4	المستقبل الكيموكيني
٦٦.....	١-٣-٤ :CXCR4-SDF1mediated signaling	الإشارات المتوسطة بالارتباط CXCR4-SDF1
٦٧.....	٤-٤ : Chemokine Receptor CXCR5/CXCR5	المستقبل الكيموكيني
٦٩.....	٥-٤ :Chemokine Receptor CCR7 /CCR7	المستقبل الكيموكيني
٧٣.....	٦-٤ : Chemokines and Chemokine Receptors on Cancer Cells	الكيموكينات ومستقبلاتها والسرطان
	٧-٤ :Chemokine receptor-specific	المعالجات السرطانية المناعية المعتمدة على أضداد مستقبلات الكيموكينات
٧٩.....	antibodies in cancer immunotherapy	
٨٢	Materials and Methodshg	الباب الثاني مواد وطرق البحث
٨٣.....	١- المواد:	
٨٣.....	١-١ العينة:	
٨٣.....	١-١-١ تصميم الدراسة:	
٨٣.....	١-١-٢ حجم العينة:	
٨٤.....	١-١-٣ شروط انتقاء العينة:	
٨٤.....	١-٢ مواد البحث:	
٨٦.....	٣-١ الأجهزة والأدوات المستخدمة:	
٨٨.....	٢- الطرق:	
٨٨.....	١-٢ التلوين التقليدي:	
٨٩.....	٢-٢ دراسة السلايدات الهيماتوكسيلين أيوزين :	
٩٠.....	٣-٢ تلوين العينات بالكواشف المناعية	
٩٢.....	٤-٢ قياسات الدراسة النسيجية الكيميائية المناعية : Immunohistochemical Study Measurements	

٩٣	٥-٢ الدراسة الاحصائية :
٩٣	١-٥-٢ اختبار تحليل التباين (One-Way ANOVA) :
٩٤	٢-٥-٢ اختبار سيودنت لعينتين مستقلتين (Independent t – test) :
٩٥	٣-٥-٢ معامل ارتباط بيرسون (Pearson correlation coefficient) :
٩٦	٤-٥-٢ اختبارات المقارنات الثنائية LSD
٩٨	الباب الثالث النتائج Results.....
٩٩	١-توصيف للملاحظات النسيجية :
١٠١	١-١ المشاهدات النسيجية عند التلوين بـ CXCR4
١٠٩	٢-١ المشاهدات النسيجية عند التلوين بـ CCR7
١١٧	٣-١ المشاهدات النسيجية عند التلوين بـ CXCR5
١٢٢	٢- الدراسة الاحصائية :
١٢٢	١-٢ عينة البحث :
١٢٥	٢-٢ الدراسة الإحصائية التحليلية:
١٢٥	١-٢-٢ دراسة تعبيرية البروتينات CXCR5، CXCR4، CCR7 في الورم الأولي:
١٢٥	١-١-٢-٢ دراسة علاقة تعبيرية البروتينات CXCR5، CXCR4، CCR7 في الورم الأولي مع جنس المريض:.....
١٢٦	٢-١-٢-٢ دراسة علاقة تعبيرية البروتينات CXCR5، CXCR4، CCR7 في الورم الأولي مع حجم الورم الأولي:..
١٢٩	٣-١-٢-٢ دراسة علاقة تعبيرية البروتينات CXCR5، CXCR4، CCR7 في الورم الأولي مع عدد النُقلات العقدية :
١٣٢	٤-١-٢-٢ دراسة علاقة تعبيرية البروتينات CXCR5، CXCR4، CCR7 في الورم الأولي مع الدرجة السريرية:
١٣٥	٥-١-٢-٢ دراسة علاقة تعبيرية البروتينات CXCR5، CXCR4، CCR7 في الورم الأولي مع الدرجة النسيجية:
١٣٩	٢-٢-٢ مقارنة تعبيرية البروتينات CXCR5، CXCR4، CCR7 بين الورم الأولي والورم الثانوي(النُقلات العقدية) :
١٤٠	٣-٢-٢ مقارنة تعبيرية البروتينات CXCR5، CXCR4، CCR7 فيما بينها في الورم الأولي :

١٤٠	١-٣-٢-٢ مقارنة تعبيرية البروتينات CXCR5، CXCR4، CCR7 فيما بينها في الورم الأولي تبعاً للدرجة السريرية :
١٤٤	٢-٣-٢-٢ مقارنة تعبيرية البروتينات CXCR5، CXCR4، CCR7 فيما بينها في الورم الأولي تبعاً للدرجة النسيجية ..
١٤٦	٤-٢-٢ مقارنة تعبيرية البروتينات CXCR5، CXCR4، CCR7 فيما بينها في الورم الثانوي :
١٤٨	Discussion الباب الرابع المناقشة
١٥٠	١- دراسة تعبيرية البروتينات CXCR5، CXCR4، CCR7 في الورم الأولي :
١٥٠	١-١ دراسة علاقة تعبيرية البروتينات CXCR5، CXCR4، CCR7 في الورم الأولي مع جنس المريض:
١٥١	٢-١ دراسة علاقة تعبيرية البروتينات CXCR5، CXCR4، CCR7 في الورم الأولي مع حجم الورم الأولي:
١٥٣	٣-١ دراسة علاقة تعبيرية البروتينات CXCR5، CXCR4، CCR7 في الورم الأولي مع عدد النقائل العقدية :
١٥٥	٤-١ دراسة علاقة تعبيرية البروتينات CXCR5، CXCR4، CCR7 في الورم الأولي مع الدرجة السريرية:
١٥٨	٥-١ دراسة علاقة تعبيرية البروتينات CXCR5، CXCR4، CCR7 في الورم الأولي مع الدرجة النسيجية:
١٥٩	٢- مقارنة تعبيرية البروتينات CXCR5، CXCR4، CCR7 بين الورم الأولي والورم الثانوي(النقائل العقدية) :
١٦٢	٣- مقارنة تعبيرية البروتينات CXCR5، CXCR4، CCR7 فيما بينها في الورم الأولي :
١٦٢	١-٣ مقارنة تعبيرية البروتينات CXCR5، CXCR4، CCR7 فيما بينها في الورم الأولي تبعاً للدرجة السريرية :
١٦٣	٢-٣ مقارنة تعبيرية البروتينات CXCR5، CXCR4، CCR7 فيما بينها في الورم الأولي تبعاً للدرجة النسيجية :
١٦٤	٤- مقارنة تعبيرية البروتينات CXCR5، CXCR4، CCR7 فيما بينها في الورم الثانوي :
١٦٦	Conclusion الباب الخامس الاستنتاجات
١٦٧	الاستنتاجات:
١٦٨	Suggestion and recommendations الباب السادس المقترحات والتوصيات
١٦٩	المقترحات:
١٧٠	التوصيات:
١٧١	References الباب السابع المصادر

١٨٤.....	مراجع الأشكال والجداول الخارجية:
١٨٦.....	الملخص باللغة الانكليزية :
١٨٧.....	الملخص باللغة العربية:
١٨٨.....	الملاحق (موافقات النشر بالمجلات الداخلية والخارجية):

قائمة الجداول

جدول ١: رموز معطيات درجة الورم السريريّة.....	٤٢
جدول ٢: تصنيف سرطان شائك الخلايا حسب الدرجة السريريّة.....	٤٣
جدول ٣: المعايير الشكلية النسيجية والمعايير الشكلية حسب استجابة المضيف للدرجات النسيجية حسب تصنيف	
BORDERS.....	٤٦
جدول ٤: مثال عن المستقبلات الكيموكينيّة التي تظهرها بعض السرطانات.....	٧٥
جدول ٥: توزيع العينة.....	٨٤
جدول ٦: تفسير مجال معامل ارتباط بيرسون.....	٩٥
جدول ٧: مجموعات عينة البحث حسب الدرجة السريريّة.....	١٢٢
جدول ٨: مجموعات عينة البحث حسب الدرجة النسيجيّة.....	١٢٢
جدول ٩: توزيع العينة حسب جنس المريض.....	١٢٣
جدول ١٠: مجموعات عينة البحث حسب مكان الإصابة.....	١٢٣
جدول ١١: أهم الإحصاءات الوصفية المتعلقة بعمر المرضى وعدد العقد وحجم الورم.....	١٢٤
جدول ١٢: اختبار ستيودنت لدراسة علاقة تعبيرية البروتينات CCR7 في الورم الأولي مع جنس المريض.....	١٢٥
جدول ١٣: اختبار ستيودنت لدراسة علاقة تعبيرية البروتينات CXCR4 في الورم الأولي مع جنس المريض.....	١٢٥
جدول ١٤: اختبار ستيودنت لدراسة علاقة تعبيرية البروتينات CXCR5 في الورم الأولي مع جنس المريض.....	١٢٦
جدول ١٥: أهم الإحصاءات الوصفية المتعلقة بتعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 في الورم الأولي حسب	
درجة حجم الورم الأولي.....	١٢٧
جدول ١٦: اختبارات التناحية للمقارنة لدراسة علاقة تعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 في الورم الأولي مع	
حجم الورم الأولي.....	١٢٩
جدول ١٧: أهم الإحصاءات الوصفية المتعلقة بتعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 في الورم الأولي وعدد النّقل	
العقدية.....	١٣٠

- جدول ١٨: تحليل التباين ONE-WAY ANOVA لدراسة الفروق في متوسط تعبيرية البروتينات CXCR5، CXCR4، CCR7 في الورم الأولي مع عدد النقايل العقدية ١٣١
- جدول ١٩: الاختبارات الثنائية للمقارنة لدراسة الفروق التفصيلية في متوسط تعبيرية البروتين CXCR4 في الورم الأولي مع عدد النقايل العقدية ١٣١
- جدول ٢٠: أهم الإحصاءات الوصفية المتعلقة بتعبيرية البروتينات CXCR5، CXCR4، CCR7 في الورم الأولي حسب الدرجة السريرية ١٣٣
- جدول ٢١: اختبار تحليل التباين ONE-WAY ANOVA لدراسة الفروق في تعبيرية البروتينات CXCR5، CXCR4، CCR7 في الورم الأولي حسب الدرجة السريرية ١٣٣
- جدول ٢٢: الاختبارات الثنائية للمقارنة لدراسة الفروق في متوسط تعبيرية البروتينات CXCR5، CXCR4، CCR7 في الورم الأولي بين الدرجات السريرية مع العينة الشاهدة ١٣٥
- جدول ٢٣: أهم الإحصاءات الوصفية المتعلقة بتعبيرية البروتينات CXCR5، CXCR4، CCR7 في الورم الأولي حسب الدرجة النسيجية ١٣٦
- جدول ٢٤: اختبار تحليل التباين ONE-WAY ANOVA لدراسة الفروق في متوسط تعبيرية البروتينات CXCR4، CCR7 في الورم الأولي بين الدرجات النسيجية ١٣٧
- جدول ٢٥: الاختبارات الثنائية للمقارنة لدراسة الفروق في متوسط تعبيرية البروتينات CXCR5، CXCR4، CCR7 في الورم الأولي بين الدرجات النسيجية مع العينة الشاهدة ١٣٨
- جدول ٢٦: تحليل معامل الارتباط الخطي (بيرسون) لدراسة الفروق في متوسط تعبيرية البروتينات CCR7 بين الورم الأولي والورم الثانوي ١٣٩
- جدول ٢٧: تحليل معامل الارتباط الخطي (بيرسون) لدراسة الفروق في متوسط تعبيرية البروتينات CXCR4 بين الورم الأولي والورم الثانوي ١٣٩
- جدول ٢٨: تحليل معامل الارتباط الخطي (بيرسون) لدراسة الفروق في متوسط تعبيرية البروتينات CXCR5 بين الورم الأولي والورم الثانوي ١٣٩

- جدول ٢٩: اختبار تحليل التباين ONE-WAY ANOVA لدراسة الفروق في متوسط تعبيرية البروتينات CXCR4,CCR7،
 CXCR5 فيما بينها في الورم الأولي تبعاً للدرجات السريرية ١٤٠
- جدول ٣٠: الاختبارات الثنائية للمقارنة لدراسة الفروق في متوسط تعبيرية البروتينات CXCR5,CXCR4,CCR7 فيما بينها في
 الورم الأولي تبعاً للدرجات السريرية ١٤١
- جدول ٣١: اختبار ANOVA لدراسة الفروق في متوسط تعبيرية البروتينات CXCR5,CXCR4,CCR7 فيما بينها في الورم
 الأولي في الدرجة السريرية الرابعة ١٤١
- جدول ٣٢: اختبارات المقارنات الثنائية لدراسة الفروق في متوسط تعبيرية البروتينات CXCR5,CXCR4,CCR7 فيما بينها في
 الورم الأولي في الدرجة السريرية الرابعة ١٤٢
- جدول ٣٣: اختبار ANOVA لدراسة الفروق في متوسط تعبيرية البروتينات CXCR5,CXCR4,CCR7 فيما بينها في الورم
 الأولي في الدرجة السريرية الثالثة ١٤٢
- جدول ٣٤: اختبارات المقارنات الثنائية لدراسة الفروق في متوسط تعبيرية البروتينات CXCR5,CXCR4,CCR7 فيما بينها في
 الورم الأولي في الدرجة السريرية الثالثة ١٤٢
- جدول ٣٥: اختبار ANOVA لدراسة الفروق في متوسط تعبيرية البروتينات CXCR5,CXCR4,CCR7 فيما بينها في الورم
 الأولي في الدرجة السريرية الثانية ١٤٢
- جدول ٣٦: اختبارات المقارنات الثنائية لدراسة الفروق في متوسط تعبيرية البروتينات CXCR5,CXCR4,CCR7 فيما بينها في
 الورم الأولي في الدرجة السريرية الثانية ١٤٣
- جدول ٣٧: اختبار ANOVA لدراسة الفروق في متوسط تعبيرية البروتينات CXCR5,CXCR4,CCR7 فيما بينها في الورم
 الأولي في الدرجة السريرية الأولى ١٤٣
- جدول ٣٨: اختبارات المقارنات الثنائية لدراسة الفروق في متوسط تعبيرية البروتينات CXCR5,CXCR4,CCR7 فيما بينها
 في الورم الأولي في الدرجة السريرية الأولى ١٤٣
- جدول ٣٩: اختبار ANOVA لدراسة الفروق في متوسط تعبيرية البروتينات CXCR5,CXCR4,CCR7 فيما بينها في الورم
 الأولي في الدرجة النسيجية الرابعة ١٤٤

- جدول ٤٠: اختبارات المقارنات الثنائية لدراسة الفروق في متوسط تعبيرية البروتينات CXCR5, CXCR4, CCR7 فيما بينها في الورم الأولي في الدرجة النسيجية الرابعة ١٤٤
- جدول ٤١: اختبار ANOVA لدراسة الفروق في متوسط تعبيرية البروتينات CXCR5, CXCR4, CCR7 فيما بينها في الورم الأولي في الدرجة النسيجية الثالثة ١٤٤
- جدول ٤٢: اختبارات المقارنات الثنائية لدراسة الفروق في متوسط تعبيرية البروتينات CXCR5, CXCR4, CCR7 فيما بينها في الورم الأولي في الدرجة النسيجية الثالثة ١٤٥
- جدول ٤٣: اختبار ANOVA لدراسة الفروق في متوسط تعبيرية البروتينات CXCR5, CXCR4, CCR7 فيما بينها في الورم الأولي في الدرجة النسيجية الثانية ١٤٥
- جدول ٤٤: اختبارات المقارنات الثنائية لدراسة الفروق في متوسط تعبيرية البروتينات CXCR5, CXCR4, CCR7 فيما بينها في الورم الأولي في الدرجة النسيجية الثانية ١٤٥
- جدول ٤٥: اختبار ANOVA لدراسة الفروق في متوسط تعبيرية البروتينات CXCR5, CXCR4, CCR7 فيما بينها في الورم الأولي في الدرجة النسيجية الأولى ١٤٥
- جدول ٤٦: اختبار تحليل التباين ONE-WAY ANOVA لدراسة الفروق في متوسط تعبيرية البروتينات CXCR4, CCR7 فيما بينها في الورم الثانوي تبعاً للدرجات السريرية ١٤٦
- جدول ٤٧: الاختبارات الثنائية للمقارنة لدراسة الفروق في متوسط تعبيرية البروتينات CXCR5, CXCR4, CCR7 فيما بينها في الورم الثانوي تبعاً للدرجات السريرية ١٤٧
- الجدول ٤٨: يلخص نتائج بحثنا و المعلومات المتعلقة بالمستقبلات الكيموكينية CXCR4 و CCR7 و CXCR5 ١٦٥

قائمة الأشكال

- الشكل ١: الأطوار الثلاثة للتحرير المناعي للسرطان ٣٤
- الشكل ٢: الأشكال السريرية للسرطان الشائع الخلايا ٣٧
- الشكل ٣: المناطق التشريحية لسرطانات الرأس والعنق ٤٠
- الشكل ٤: مواقع الإصابة في السرطان الشائع للخلايا للرأس والعنق ٤١
- الشكل ٥: درجات الإصابة النسيجية في السرطان الشائع الخلايا ٤٥
- الشكل ٦: الأشكال النسيجية لسرطان شائع الخلايا ٤٩
- الشكل ٧: رسم توضيحي للعقدة اللمفية يشرح أقسامها النسيجية ٥١
- الشكل ٨: رسم توضيحي يشرح طريق هجرة اللمفاويات التائية والبائية الساذجة NAïVE لمناطق مختلفة من العقدة ٥٣
- الشكل ٩: دوران الخلايا اللمفاوية LYMPHOCYTE RECIRCULATION ٥٧
- الشكل ١٠: الشكل الفراغي ثلاثي الأبعاد للكيموكين ٥٩
- الشكل ١١: يوضح الارتباط كيميوكين - مستقبل الكيموكين البشري ٦٠
- الشكل ١٢: شكل ترميمي لمستقبل الكيموكين ٦٢
- الشكل ١٣: الطرق المفعلة بالارتباط SDF1-CXCR4 ٦٦
- الشكل ١٤: مراحل هجرة الخلية اللمفية ٧٢
- الشكل ١٥: كيت التلوين المناعي المفرد وأقراص السائل الدائري TBS ٨٦
- الشكل ١٦: الأضداد الأولية ٨٦
- الشكل ١٧: قلم التحديد من DAKO ٨٦
- الشكل ١٨: الأجهزة المستخدمة في البحث ٨٧
- الشكل ١٩: الممص PIPET ٨٧
- الشكل ٢٠: العينة كاملة ملونة بالهيماتوكسيلين أيزون ومحدد الجزء النسيجي المراد تلوينه ٨٩

- الشكل ٢١: شريحتين نسيجيتين ملونتين بالـ H&E بعد دراستها وتحديد الجزء النسيجي المراد تلوينه أو العقد المصابة المراد تلوينها والجزء المتبقي يتم ازالته بشفرة حادة. ٨٩.....
- الشكل ٢٢: العينة كاملة ملونة بالملونات الثلاثة ٩٢.....
- الشكل ٢٣: مقطع نسيجي ملون بالهيماتوكسيلين أيزون للدرجة الأولى النسيجية (GRADE 1) جيدة التمايز (WELL) ٩٩..... (DIFFERENTIATED)
- الشكل ٢٤: مقطع نسيجي ملون بالهيماتوكسيلين أيزون للدرجة الثانية النسيجية (GRADE 2) متوسطة التمايز ٩٩..... (MODERATE DIFFERENTIATED)
- الشكل ٢٥: مقطع نسيجي ملون بالهيماتوكسيلين أيزون للدرجة الثالثة النسيجية (GRADE 3) ضعيفة التمايز (POOR) ١٠٠..... (DIFFERENTIATED)
- الشكل ٢٦: مقطع نسيجي ملون بالهيماتوكسيلين أيزون للدرجة الرابعة النسيجية (GRADE 4) غير متميزة ١٠٠..... (UNDIFFERENTIATED)
- الشكل ٢٧: مقطع نسيجي ملون بالهيماتوكسيلين أيزون للنقائل العقدية ١٠٠.....
- الشكل ٢٨: تكبير X10 تظهر تعبيرية الـ CXCR4 العالية في جزر وحبال سرطان شائك الخلايا ١٠٢.....
- الشكل ٢٩: تكبير X10 تظهر تعبيرية الـ CXCR4 العالية في جزر وحبال سرطان شائك الخلايا ١٠٢.....
- الشكل ٣٠: تكبير X40 تظهر التعبيرية العالية لـ CXCR4 للخلايا الحشوية (تعبيرية هيولية وغشائية) المركزية دون المحيطية في الجزر السرطانية لسرطان شائك الخلايا ١٠٣.....
- الشكل ٣١: تكبير X40 تظهر التعبيرية العالية لـ CXCR4 للخلايا الحشوية (تعبيرية هيولية وغشائية) المركزية دون المحيطية في الجزر السرطانية لسرطان شائك الخلايا ١٠٣.....
- الشكل ٣٢: تكبير X40 تظهر التعبيرية العالية لـ CXCR4 للخلايا الحشوية (تعبيرية هيولية وغشائية) المركزية دون المحيطية في الجزر السرطانية لسرطان شائك الخلايا ١٠٤.....
- الشكل ٣٣: تكبير X40 تظهر التعبيرية العالية لـ CXCR4 للخلايا الحشوية دون القاعدية في البشرة السرطانية ١٠٤.....
- الشكل ٣٤: تكبير X40 تظهر التعبيرية المتوسطة لـ CXCR4 للخلايا الحشوية السرطانية في سرطان شائك الخلايا ١٠٥..

- الشكل ٣٥: تكبير X40 تظهر التعبيرية المتوسطة لـ CXCR4 للخلايا الحشوية السرطانية في سرطان شائك الخلايا ... ١٠٥
- الشكل ٣٦: تكبير X40 تظهر التعبيرية المنخفضة لـ CXCR4 للخلايا الحشوية السرطانية في إحدى الجزر السرطانية
- ١٠٦ لسرطان شائك الخلايا
- الشكل ٣٧: تكبير X40 تظهر التعبيرية السلبية لـ CXCR4 للخلايا الحشوية السرطانية لإحدى عينات سرطان شائك الخلايا
- ١٠٦
- الشكل ٣٨: تكبير X40 تظهر التعبيرية السلبية لـ CXCR4 للخلايا الحشوية في العينة الشاهدة (البشرة السليمة) ١٠٧
- الشكل ٣٩: تكبير X40 تظهر التعبيرية الإيجابية لـ CXCR4 في الخلايا البطانية لإحدى الأوعية الدموية في لحمة إحدى
- ١٠٧ عينات سرطان شائك الخلايا
- الشكل ٤٠: تكبير X40 تظهر التعبيرية الإيجابية لـ CXCR4 في الخلايا البطانية للأوعية الدموية في لحمة إحدى عينات
- ١٠٨ سرطان شائك الخلايا
- الشكل ٤١: تكبير X10 تظهر تعبيرية الـ CCR7 العالية في جزر سرطان شائك الخلايا ١١٠
- الشكل ٤٢: تكبير X40 تظهر التعبيرية العالية لـ CCR7 للخلايا الحشوية (تعبيرية غشائية) في الحبال ١١٠
- الشكل ٤٣: تكبير X40 تظهر التعبيرية العالية لـ CCR7 للخلايا الحشوية (تعبيرية غشائية وهيولية) في الجزر السرطانية
- ١١١ لسرطان شائك الخلايا في إحدى العينات ذات الدرجة النسيجية عالية التمايز
- الشكل ٤٤: تكبير X40 تظهر التعبيرية العالية لـ CCR7 للخلايا الحشوية المحيطة دون المركزية (تعبيرية غشائية
- وهيولية) في الجزر السرطانية لسرطان شائك الخلايا في إحدى العينات ذات الدرجة النسيجية عالية التمايز ١١٢
- الشكل ٤٥: تكبير X40 تظهر التعبيرية العالية لـ CCR7 للخلايا الحشوية (تعبيرية غشائية) في البشرة السرطانية لسرطان
- ١١٢ شائك الخلايا وتأخذ فيها الخلايا الحشوية والقاعدية تعبيرية إيجابية
- الشكل ٤٦: تكبير X40 تظهر التعبيرية المتوسطة لـ CCR7 للخلايا الحشوية (تعبيرية غشائية) في الجزر السرطانية
- ١١٣ لسرطان شائك الخلايا في إحدى العينات ذات الدرجة النسيجية عالية التمايز
- الشكل ٤٧: تكبير X40 تظهر التعبيرية المنخفضة لـ CCR7 للخلايا الحشوية (تعبيرية غشائية) في الجزر السرطانية
- ١١٣ لسرطان شائك الخلايا في إحدى عينات النقيلة العقدية محاطة بخلايا لمفاوية ذات إيجابية عالية غشائية

- الشكل ٤٨: تكبير X40 تظهر التعبيرية المنخفضة لـ CCR7 للخلايا الحشوية (تعبيرية غشائية) في الجزر السرطانية
- ١١٤ سرطان شائك الخلايا في إحدى العينات ذات الدرجة النسيجية عالية التمايز
- الشكل ٤٩: تكبير X40 تظهر التعبيرية السلبية لـ CCR7 للخلايا الحشوية في العينة الشاهدة (البشرة السليمة)
- الشكل ٥٠: تكبير X40 تظهر التعبيرية الإيجابية لـ CCR7 في الخلايا البطانية لإحدى الأوعية الدموية في لحمة إحدى
- ١١٥ عينات سرطان شائك الخلايا
- الشكل ٥١: تكبير X40 تظهر التعبيرية الإيجابية لـ CCR7 في الخلايا البطانية لإحدى الأوعية الدموية في لحمة إحدى
- ١١٥ عينات سرطان شائك الخلايا
- الشكل ٥٢: تكبير X40 تظهر التعبيرية الإيجابية لـ CCR7 في إحدى الأعصاب في لحمة إحدى عينات سرطان شائك
- ١١٦ الخلايا
- الشكل ٥٣: تكبير X10 تظهر تعبيرية الـ CXCR5 العالية في جزر سرطان شائك الخلايا
- الشكل ٥٤: تكبير X40 تظهر تعبيرية الـ CXCR5 المتوسطة في إحدى جزر سرطان شائك الخلايا
- الشكل ٥٥: تكبير X40 تظهر تعبيرية الـ CXCR5 المتوسطة في إحدى جزر سرطان شائك الخلايا
- الشكل ٥٦: تكبير X40 تظهر تعبيرية الـ CXCR5 المنخفضة في إحدى جزر سرطان شائك الخلايا
- الشكل ٥٧: تكبير X40 تظهر التعبيرية السلبية لـ CXCR5 للخلايا الحشوية في إحدى عينات سرطان شائك الخلايا ..
- الشكل ٥٨: تكبير X40 تظهر التعبيرية السلبية لـ CXCR5 للخلايا الحشوية في العينة الشاهدة (البشرة السليمة)
- الشكل ٥٩: تقسيم عينة البحث حسب الدرجة السريرية
- الشكل ٦٠: تقسيم العينة حسب الدرجة النسيجية
- الشكل ٦١: تقسيم العينة حسب جنس المريض
- الشكل ٦٢: توزيع العينة حسب مكان الإصابة
- الشكل ٦٣: توزيع العينة تبعاً لحجم الورم
- الشكل ٦٤: النسبة المئوية للخلايا ايجابية التعبير وفق حجم الورم
- الشكل ٦٥: النسبة المئوية للخلايا ايجابية التعبير وفق عدد العقد

- الشكل ٦٦: النسبة المئوية للخلايا ايجابية التعبير وفق الدرجة السريرية..... ١٣٣
- الشكل ٦٧: النسبة المئوية للخلايا ايجابية التعبير وفق الدرجة النسيجية..... ١٣٦
- الشكل ٦٨: مقارنة تعبيرية البروتينات CXCR5، CXCR4، CCR7 بين الورم الأولي والورم الثانوي(النقائل العقدية)..... ١٤٠

قائمة الاختصارات

الاختصار	المعنى	الترجمة
ADCC	Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity	السمية الخلوية المعتمدة على الأضداد
ADP	Antibody-dependent Phagocytosis	البلعمة المعتمدة على الأضداد
AKT=PKB	Protein kinase B	البروتين كيناز ب
APC	antigen presenting cell	الخلية المقدمة للمستضد
BCL2	B-cell lymphoma 2	لمفوما بائية الخلايا ٢
BLC	B-lymphocyte chemoattractant	الجاذب الكيماوي للمفاويات البائية
BLR1	Burkitt lymphoma receptor 1	المستقبل لمفوما بوركت ١
CCL19,CCL21	Chemokine	كيموكين
CCR7	chemokine receptor	مستقبل كيموكين
CD4+	T helper cells	الخلايا التائية المساعدة
CD44	cell-surface glycoprotein involved in cell-cell interactions	بروتين سكري على سطح الخلية مسؤول عن التفاعلات بين الخلايا
CD45= PTPRC	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	مستضد شائع لكريات الدم البيضاء
CD8+=Tc	cytotoxic T cell	الخلايا التائية السامة
CD80	Cluster of differentiation 80	كتلة التمايز 80
CD83	Cluster of Differentiation 83	كتلة التمايز 83
CD86	Cluster of Differentiation 86	كتلة التمايز 86
CDC	complement-dependent cytotoxicity	السمية المعتمدة على المتممة
CEP55	Centrosomal protein of 55 kDa	بروتين المريكز ذو الوزن الجزيئي ٥٥ كيلودالتون
C-MeT	tyrosine-protein kinase	البروتين كيناز تيروزين
Cortactin	<i>cortical actin</i> binding protein	البروتين الرابط للأكتين القشري
Crk	CT10 Regulator of Kinase	منظم الكيناز CT10
CXCL12,CXCL13	Chemokine	كيموكين
CXCR4,CXCR5	chemokine receptors	مستقبلات كيموكين
DAB	Diaminobenzidine	بنزدين ثنائي الأمين
EB	Epstein-Barr	فيروس إبشتاين بار

ECM	Extra cellular matrix	الغالب خارج الخلو
ERK	Extracellular signal-regulated kinases	من عائلة MAP كيناز
FDC	follicular dentritic cell	الخلايا المتغصنة الجرابية
GTP	Guanosine triphosphate	غوانوزين ثلاثي الفوسفات
H&E	Hematoxylin and eosin	هيماتوكسيلين و أيزون (ملون)
HEV	High endothelial venules	الوريدات البطانية الدقيقة
Hif1	Hypoxia-inducible factor	العامل المحرض بالجوع الاوكسجيني
HNSCC	Head and Neck Squamous cell carcinoma	السرطان شائك الخلايا للرأس والعنق
HPV	Human papillomavirus	فيروس الورم الحليمي البشري
HRP	Horseradish peroxidase	أنزيم مستعمل في التلوين المناعي
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule	جزء الالتصاق بين الخلو
ICD-O	International Classification of Diseases for Oncology	التصنيف العالمي للأورام
IL	Interleukin	انترلوكين
IFN δ	Interferon	انترفيرون
JAK	Janus kinase	من عائلة تيروزين كيناز
LN	Lymph Node	العقد اللمفية
LPS	Lipopolysaccharides	جزيئات ضخمة توجد في الغشاء الخارجي للبكتيريا سلبية الغرام
LSD	Protected Least Significant Difference	أقل فرق معنوي محمي
mAbs	monoclonal antibody	أضداد وحيدة النسيلة
MAPK	mitogen-activated protein kinase	البروتين كيناز المفعّل للانقسام
MEK=MAP3K	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase	البروتين ثلاثي الكيناز المفعّل للانقسام
MHC	Major histocompatibility complex	معقد التوافق النسيجي الكبير
MMP	matrix metaloproteinase	الأنزيم الحال للغالب
MOLT		اسم لنسيلة خلايا ورمية تجريبية في المختبر
m RNA	Messenger RNA	الـ RNA المرسل
MSC	mesenchymal stem cells	الخلايا الجذعية الضامة
NBS1	Nibrin	من بروتينات اصلاح الـ DNA
NFKB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells	العامل النووي للسلسلة الخفيفة كابا المشجع على تفعيل الخلايا البائية

NK	natural killer	القتلة الطبيعيون
P130Cas= BCAR1	breast cancer anti-estrogen resistance 1	البروتين المقاوم لمضد الاستروجين في سرطان الثدي ١
p42 MAP Kinase=Erk2	Extracellular signal-regulated kinase 2	الكيناز المنظم للإشارة خارج الخلية ٢
PBS	Phosphate Buffer Solution	حبيبات السائل الداري
PCNA	proliferating cell nuclear antigen	مستضد تكاثر الخلية النووي
PI3K	phosphoinositide 3-kinase	نفس الاسم لا ترجمة له
PNAD	peripheral-node addressins	أدرسين العقد المحيطية
PYK2	Protein tyrosine kinase 2 beta	نفس الاسم لا ترجمة له
RSK2	ribosomal s6 kinase	نفس الاسم لا ترجمة له
SCC	Squamous cell carcinoma	السرطان شائك الخلايا
SDF1	stromal-derived factor-1	العامل المندرج من اللحمية ١
SHIP=INPP5D	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase 1	نفس الاسم لا ترجمة له
Sig	Significant	مستوى الدلالة
STAT	Signal transducer and activator of transcription	الإشارة المحولة والمفعلة للنسخ
Survivin=BIRC5	baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5	كابح الاستماتة ٥ للحمة الراشحة العصوية
TCM	central memory T lymphocyte	الخلية اللمفية التائية الذاكرة المركزية
TCR	T-cell receptor	المستقبل التابع للخلية التائية
Th	T helper cell	الخلية اللمفية التائية المساعدة
TNF	tumor necrosis factor	عامل التخر الورمي
TNM	tumour size-nodes-metastasis	حجم الورم-نقائل عقدية-انتقالات
T _{REG}	T Regulator cell	الخلية اللمفية التائية المنظمة
VCAM	Vascular cell adhesion molecule	جزء الالتصاق الخاص بالخلايا الوعائية
VEGF	vascular endothelial growth factor	عامل النمو الخاص بالخلايا البطانية الوعائية
VEGF-C	vascular endothelial growth factor-c	عامل النمو الخاص بالخلايا البطانية الوعائية-س
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor	مستقبل عامل النمو الخاص بالخلايا البطانية الوعائية
WHO	world health organization	منظمة الصحة العالمية

المقدمة

يعتبر السرطان مرض العصر المقلق لازدياد عدد المصابين به سنوياً حيث بلغ معدل الإصابة به سنة ٢٠٠٨ ١٢,٧ مليون إصابة عالمياً (Ahmedin Jemal et al., 2011)، وللعجز العلاجي المترافق مع السرطان والذي يفقد الأطباء القدرة على التحكم بنتائجه التي قد تصل للوفاة في الحالات المتقدمة والتي بلغت سنة ٢٠٠٨ أيضاً ٧,٦ مليون حالة وفاة من السرطان عالمياً.

تعد الانتقالات السرطانية المسؤول الأساسي (أكثر من الورم الأولي) عن حدوث ٩٠% من وفيات السرطان (Sporn, 1996). ولتجنب هذه الوفيات اهتمت الدراسات الحديثة (ومنها دراستنا) بالتحري عن آلية حدوث النقائل السرطانية وتطوير آليات علاجية بناءً عليها لتفادي حدوث هذه النقائل.

يتحكم في إمكانية وصول الخلايا السرطانية لأماكن مختلفة عن مكان ظهورها الأولي (النقائل السرطانية) عوامل عديدة قد تكون هذه العوامل:

عوامل ميكانيكية كحجم الأوعية الدموية /اللمفية، وحجم الخلايا السرطانية وطريق الدوران ونوع الدوران، والتدفق الدموي، أو أن تكون عوامل كيميائية كالتفاعل بين الخلايا السرطانية والعضو الجديد والذي يحدث جزء منه عبر الجذب الكيماوي (chemo taxis) بتواسط الكيموكينات chemokines ومستقبلاتها chemokine–receptors، بالتالي تلعب هذه العوامل دوراً حاسماً في الغزو والانتقالات.

أكدت الدراسات أن الخلايا السرطانية عموماً تظهر مستقبل الكيموكين على غشائها الهيولي، وتجري دراسات حول ربط نوع الخلية السرطانية مع نوع مستقبل الكيموكين التي تظهره، وتتجه الدراسات الحديثة لربط سرطانات الرأس والعنق وخاصة السرطان شائك الخلايا مع مستقبلات الكيموكين CXCR4, CXCR5, CCR7 (Vela et al., 2015).

إلا أن الأبحاث التي تحررت عن العلاقة بين خلايا الورم الأولي والخلايا الورمية في النقائل العقدية ما تزال قليلة على الرغم من أهمية وجدوى هذا التحري في تطوير علاجات تؤدي إلى

إعاقة نمو الخلايا السرطانية في المواقع الثانوية مما يلعب دوراً مهماً في علاج السرطان
شائك الخلايا في الرأس والعنق (CHAMBERS, 2002).

الهدف من البحث

١. دراسة تعبيرية كل من مستقبلات الكيموكين CXCR4, CXCR5, CCR7 في العينات الشاهدة من أغشية مخاطية فموية سليمة.
٢. دراسة تعبيرية كل من مستقبلات الكيموكين CXCR4, CXCR5, CCR7 في الورم الأولي للسرطان شائك الخلايا للرأس والعنق في الدرجات السريرية كافة.
٣. دراسة تعبيرية كل من مستقبلات الكيموكين CXCR4, CXCR5, CCR7 في الورم الأولي للسرطان شائك الخلايا للرأس والعنق للدرجات النسيجية.
٤. دراسة مقارنة تعبيرية كل من مستقبلات الكيموكين CXCR4, CXCR5, CCR7 في النقائل العقدية وورمها الأولي للسرطان شائك الخلايا للرأس والعنق في الدرجات السريرية عالية الخباثة والمترافقة مع نقائل.
٥. دراسة مقارنة تعبيرية مستقبلات الكيموكين CXCR4, CXCR5, CCR7 مع بعضها البعض في الورم الأولي للسرطان شائك الخلايا للرأس والعنق للدرجات النسيجية والدرجات السريرية.
٦. دراسة مقارنة تعبيرية مستقبلات الكيموكين CXCR4, CXCR5, CCR7 مع بعضها البعض في النقائل العقدية للسرطان شائك الخلايا للرأس والعنق.

الباب الأول المراجعة النظرية

Literature review

١- الورم والسرطان - الغزو والانتقالات Tumor and Cancer-

:Invasion and Metastasis

١- ١ تعريف الورم Tumor:

يعرّف الورم على أنّه كتلة نسيجية ذات تكاثر خلوي غير وظيفي ، تستمر في النمو حتى بعد زوال العامل المُسبّب، ويعرف الورم على المستوى الجُزيئي على أنه كتلة خلوية تحرّرت من الآليات الطبيعية المنظمة والمُحدّدة لنمو الخلايا في العضوية الحية (Barsevick et al., 2002).

١- ٢ تعريف السرطان Cancer:

ويعرف باسم الورم الخبيث، وهو نمو خلوي ناتج عن انقسام خلوي غير طبيعي قادر أن ينتشر إلى مكان آخر في الجسم عبر الدّوران الدّموي أو اللمفي، أما جُزيئياً فالسرطان هو إنتاج شاذّ لخلايا طافرة بسبب تراكم الطّفرات المُورثية المتعاقبة. وقد سُمّي السرطان بهذا الاسم لأنّ كتل الخلايا الورميّة ذات امتدادات متغلغلة في النّسج بشكل يشبه أذرع حيوان سرطان البحر (Blanchard et al., 2001). تختلف الأورام الخبيثة عن السليمة بقدرتها على الغزو والانتقالات ومعدّل نموّها السّريع ونقص تمايزها (Kumar et al., 2013).

١- ٣ تعريف الغزو Invasion:

يعرّف الغزو بنفوذ الخلايا الورميّة للنّسج المحيطة.

١- ٤ تعريف الانتقالات Metastasis:

تعرّف الانتقالات بأنها عمليّة مترقّية (progressive) تبلغ ذروتها في انتشار الخلايا الورميّة متجاوزة الحواجز الوظيفية الصّارمة لتتفصل عن بيئتها الأصليّة وقدرها التّطوري مشكّلة أوراماً ثانويّة بعيدة عن ورمها الأولي (البؤرة الأوليّة) (Nguyen and Massague, 2007).

تتجسّد خطورة الانتقالات في كونها حدث حيوي خفي داخل الجسم من الصّعب تحرّيها (CHAMBERS, 2002)، ولفهمها لابدّ من الإحاطة بمايلي: التغيّرات البنيويّة التي تكتسبها الخلايا السرطانيّة (بغض النظر عن نوعها سواء ظهاريّة أو ضامة أو غيرها) بما يمكنها من الانتقالات، وعلاقة الخلايا السرطانيّة الانتقاليّة بمنشأ ورمها الأصلي، وأساسيات الانتقالات، وعوامل الاستعداد الانتقالي والمورثات الوسيطة لتقدّم سير الانتقالات.

١-٥ نظريتا الانتقالات Metastasis theories:

١-٥-١ التربة الملائمة Congenial soils:

تعتمد بشكل أساسي على نظريّة باجيت "التربة والبذرة" Seed and Soil (Paget, 1889) فالبذرور seeds : وهي الخلايا السرطانيّة طالما نجت من البيئة المقيدة لها في الورم الأولي ووصلت للدوران (Kim et al., Mehlen and Puisieux, 2006), 2002, MacDonald et al., 2004) فإنها تحتاج لتربة soil مناسبة: وهي البيئة الجديدة أو العضو الهدف، قد تنتشر البذور في تربات عديدة لكن لا تحصل الانتقالات والانتاش إلا في عضوٍ واحدٍ أو بضع أعضاء خاصة (Hüsemann et al., 2008)، ويشكّل هجوع الخلايا السرطانيّة في بيئات لا تبدي انتقالات واضحةً خطورةً هائلةً لبقاء هذا الهجوع سنواتٍ عديدةٍ قبل أن ينشط من جديد (Cameron et al., 2000, Engel et al., 2003).

أضاف Ewing لهذه النظريّة أن للدوران دوراً هاماً في حركيّة الخلايا السرطانيّة (Ewing, 1928) وذلك من حيث إمكانيّة دخول وخروج الخلايا السرطانيّة من وإلى الدوران، وإمكانيّة التصاقها بالخلايا البطانيّة، وتكيّفها في البيئة الجديدة ومقاومة رفض العضو الجديد لها، ونجاتها في الدوران بمقاومتها للخلايا الدفاعيّة الجوّالة في الأوعية وذلك من خلال تجمعها مع بعضها البعض لتشكل صمّة embolism قد تتسبّب في سدّ الأوعية وقطع الوارد الدموي أو اللّمفي عن بعض الأعضاء في كثير من الأحيان.

١-٥-٢ النظرية الداروينية Darwinian concepts :

أو ما يسمى بالانتقاء الطبيعي فخلايا النسيلة الأكثر عدوانية من أخواتها في السرطان الأولي نفسه هي التي تتجو من القيود وهي التي تقوم بالانتقالات (Nowell, 1976, Crespi and Summers, 2005)، بالتالي الانتقالات تتطلب اكتساب نساءل نادرة من المجمع الخلوي الورمي لتغيرات مورثية إضافية تجعلها لمزاياها انتقائية للانتقالات (Fidler and Kripke, 1977).

اعتماداً على هاتين النظريتين أضاف عدد من ٣ عوامل انتقائية بنيت عليها ٣ نظريات فرعية للآلية التي يحدث فيها الانتقالات:

نظرية عوامل النمو: وفيها يعتقد أن الخلايا السرطانية يمكنها الانتقال لكل الأعضاء لكن الانتقالات تعتمد على عوامل نمو يحققها العضو الذي تحدث فيه الانتقالات (النقائل) (Chambers et al., 2001)

نظرية عوامل الالتصاق: وفيها يعتقد أن الخلايا السرطانية تحتاج لجزيئات التصاق خاصة لا تظهرها إلا الخلايا البطانية للأوعية اللمفية للعضو الذي يحدث فيه الانتقالات (النقائل) (Qian et al., 2001)

نظرية الانجذاب الكيماوي: وفيها يعتقد أن الخلايا السرطانية تنجذب لممال محدد من الكيموكينات، وبالتالي احتمالية غزو العضو من قبل الخلايا السرطانية تعتمد على قدرته على الانتاج الذاتي للجاذب الكيماوي (Müller et al., 2001, Liotta, 2001), (Homey et al., 2002)

٦-١ الآليات الجزيئية التي تعتمد عليها الخلايا السرطانية لتغزو وتستعمر The

: Molecular Basis of Cancer to Invade and Metastasize

تكسر الخلايا السرطانية الظهارية عدّة حواجز لتغزو وتستعمر صنفت بمراحل أساسية هي اختراق الغشاء القاعدي- والعبور ضمن النسيج الضام- ودخول الدوران (Kumar et al., 2013)، والتي صنفت بعدّة مراحل هي (Underwood.J.C.E., ;2004) :

- فقدان الاتصال Detachment بين الخلايا السرطانية وجيرانها أو ما يدعى بالتخلخل loosening والتي يلعب فيها الـ E-cadherins والـ β -catenin دوراً هاماً.
- غزو النسيج الضام المحيط Invasion لتصل للأوعية الدموية واللمفية ويتم ذلك بآلية معقدة تغيّر فيها الخلية السرطانية من شكلها وبنية الهيولى الهيكلية بما يتناسب وحركتها ضمن القالب خارج الخلوي فتتغيّر قطبيتها وتبدي أرجلاً كاذبةً تنتوّع طبيعتها حسب الخلية السرطانية والبيئة المحيطة، يعتبر تقلص الخلية العامل الأهم لفتح حركية الخلية سواء الطبيعية أو السرطانية والذي يحفّز عشوائياً أو بواسطة عوامل نمو وكيموكينات (Chambers et al., 2002)، كما تقوم الخلايا السرطانية بإفراز أو تحريض بعض خلايا اللحمية (السدّي) (مثل مصوّرات الليف والخلايا الالتهابية) على إفراز مواد تقوم بحلّ القالب خارج الخلوي ECM من أهمّها عائلة MMPs والـ cathepsinD والـ urokinase plasminogen activator ممّا يجعلها تشقّ طريقها بسهولة بإعادة قولبة القالب خارج الخلوي وتحرير عوامل نمو تقوم بتحبيده نوعاً ما. إنّ التوازن بين هذه الأنزيمات وكوابحها هو ما يحدّد طبيعة الورم والسرطان وبالتالي إنذاره.
- تغيّر طبيعة ارتباط الخلايا السرطانية ببروتينات القالب خارج الخلوي، وذلك فيما يتعلّق بالانتغرينات التي تربط الخلايا القاعدية بالغشاء القاعدي والتي يسبب فقدانها استماتة apoptosis في الخلية الظهارية الطبيعية.

- الانسلاخ Intravasation ضمن جدار الوعاء لتصل للمعته ضمن مراحل: فتقوم الخلايا السرطانية بالبداية بحلّ جدار الوعاء الدموي لتصل للخلايا البطانية ثم الارتباط بالخلايا البطانية والدوران عليها لتصل لداخل الوعاء والسير ضمن الدوران.

قد تشكل الخلايا السرطانية ضمن اللّمة صمّة emboli بارتباطها على الصفائح ممّا يقيها من العوامل الكابحة للورم.

- مهاجمة Evasion الآليات الدفاعية الطبيعية مثل خلايا القتل الطبيعيون NK.
- الالتصاق Adhesion بالخلايا البطانية للأوعية في منطقة الخروج من الوعاء.
- العبور Extravasation عبر الخلايا البطانية للأوعية لتصل للنسيج المحيط.

قد تجد الخلايا السرطانية في هذا الموقع الجديد بيئة مناسبة تحميها من الاستماتة (apoptosis) وتمكّنها من الامتداد لتشكّل أوراماً جديدةً انتقاليةً تصبح فيما بعد ذات توعية مستقلة (Kucia et al., 2004).

بالتالي تتواسط هذه المراحل عدّة بروتينات ربطتها الدراسات بالغزو والانتقالات، هذه البروتينات تتبع لعدة عائلات حسب وظيفتها (Elyse et al., 2011):

- بروتينات تتدخل في تنظيم دورة حياة الخلية وانقسامها واستماتتها: *c-Met* ، *RSK2* ، *Survivin* ، *NBS1* ، *CEP55 (FLJ10540)*
- بروتينات تتدخل في حركة الخلية والتصاقها وإعادة قولبة القلب خارج الخلية: *Matrix Metalloproteinases* ، *CD44* ، *Cortactin*
- بروتينات تتدخل في بيئة الورم وتوليد الأوعية: *Chemokines/R* (والتي هي مجال دراستنا)، *VEGF/R* .
- بروتينات تتدخل في عوامل النسخ: *Hif-1α* ، *Regulators of EMT* ، *NF-κB* .

١-٧ البيئة المحيطة بالسرطان :Cancer environment

وُصِفَ السرطان كوجهة نظر حيوية على أنه بنية تحاكي الأعضاء، فهو يتألف من أنماط مختلفة من الخلايا ومن مادة أساسية بين خلوية، كما أنه ينشأ بآلية تشابه آلية تطور الأعضاء، لكن آثاره الجهازية تسبب نتائج هي المسؤولة بشكل أساسي في قتل المريض. قد تكون وجهة النظر هذه ذات أهمية خاصة في فهم الآلية الامراضية للورم وبالتالي السيطرة عليه.

١-٧-١ المكونات اللحمية للسرطان :Cancer stromal components

يتألف السرطان من خلايا تقوم بالوظائف الأساسية (كإفراز الهرمونات أو الأنزيمات) ومن لحمة ومن شبكة الدعم.

تقسم اللحمية (السدى) إلى : المادة الأساسية بين الخلوية التي تتألف من الحمض الهيالوريني والبروتيوغليكان ومن البروتينات الليفية (كالكولاجين والفيبرونكتين واللامينين)، ومن خلايا اللحمية (السدى) التي تتضمن الخلايا الميزانشيمية الداعمة وخلايا النظام الوعائي وخلايا النظام المناعي، ومن عوامل بيتيدية متنوعة (كعوامل النمو والكيموكينات والسيتوكينات والأضداد)، ومن نواتج استقلابية.

(Cunha, 2008; Puri and Hebrok, 2010; Wiseman and Werb, 2002)

تلعب مكونات لحمة الورم والتفاعلات التي تجري بينها دوراً مهماً في تطور الورم وتحديد انذاره (تحديد درجة بقاء المريض على قيد الحياة) (Egeblad et al., 2008; Lin et al., 2003) وهجرة خلاياه وتشكل الأوعية فيه (Balkwill et al., 2003).

تتألف خلايا اللحمية (السدى) من خلايا لحمية مسيطرة والتي هي البالعات الكبيرة والخلايا اللمفية والخلايا البطانية ومصورات الليف، ومن خلايا لحمية أخرى كالحبيبية والقتلة الطبيعيين (Coussens and Werb, 2002, Negus et Brigati et al., 2002).

al., 1997, Pollard, 2004)، بالتالي فإن العديد من هذه الخلايا اللحمية هي خلايا دموية وتشكل النفوذية الدموية. أما نمط هذه النفوذية فتحددها إنتاج الكيموكينات من الخلايا الورمية والخلايا اللحمية فالنمط CC من الكيموكينات مثلاً يقرر إحضار البالعات الكبيرة والمفاويات في سرطانات الثدي والرحم والمعتكلة والسرطانات الدبقية والضامة (Bottazzi et al., 1983Balkwill and Mantovani, 2001). في حين يتطلب وجود عائلتين من الكيموكينات CC, CXC في سرطانات المبيض الظهارية والتي تطلب إحضار البالعات الكبيرة و CD8+ (Negus et al., 1997).

أما بالنسبة للمستقبل الكيموكيني فتحدده عدة عوامل مما يجعل المستقبل الذي تظهره الخلايا السرطانية محدوداً فمثلاً تختلف تعبيرية المستقبلات الكيموكينية تبعاً لأكسجة الورم، كما تختلف تعبيرية المستقبلات الكيموكينية بين السرطان نفسه حسب طبيعته فيما إذا كان صلباً أم لا كما في سرطان المبيض البشري epithelial ovarian cancer فالنمط الصلب منه يظهر CCR1 فقط في حين تظهر الأنماط المنتجة لسائل ('ascitic 'liquid') - والتي تعتبر من المراحل المتقدمة - طيفاً واسعاً من المستقبلات الكيموكينية (Milliken et al., 2002). ويؤثر هذا التقييد في تعبيرية مستقبلات الكيموكين على نفوذية الخلايا الدموية إلى لحمية الورم سواء في حركيتها أو عددها وذلك لوجود ممالات متعددة للكيموكينات ضمنه. فيقوم السرطان مثلاً بجذب T_{H2} مما يشوِّش المناعة (Balkwill et al., 2001, Skinnider and Mak, 2002) ، ويقوّض المتغصنة التي لها دور هام في تمايز T_{H1} مما يشوِّش المناعة أيضاً، فمثلاً تظهر لحمية ورم المبيض الخلايا المتغصنة غير الناضجة التي تظهر CXCR4 مما يقيد التمايز وتبقى الخلية المتغصنة غير قادرة على تقديم المستضد (Zou et al., 2001). لذا وجدت الدراسات أنّ السرطانات التي تكثر فيها البالعات الكبيرة تكون مترافقة مع انتشار عالٍ وذلك لقدرة البالعات الكبيرة على إفراز حالات المادة الأساسية MMP، كما أنّ السرطانات التي تظهر CD4+ قادرة على

* 'ascitic 'liquid' زيادة تراكم السوائل في الصفاق بسبب السرطان، مما يزيد من تراكم السائل البريتوني ويمنع إعادة امتصاصه. في بعض أنواع السرطان، مثل سرطان المبيض، يحتوي السائل ascitic على أعداد متغيرة من الخلايا السرطانية و كريات بيضاء ، وكذلك مستويات ببيكية إلى نانوية لعدد من السيتوكينات و الكيموكينات.

جذب العدلات والبالعات الكبيرة وبالتالي إفراز الـ MMP وبالتالي تحقيق الانتشار السرطاني.

من جهة أخرى تقوم خلايا مصورات الليف العضلية myofibroblasts التابعة للحمية السرطان بتحريض نمو خلايا السرطان وتحريض الالتهاب وتوليد الأوعية والغزو بتواسط من عوامل نمو وكيموكينات تستطيع التفاعل مع الخلايا البطانية وخلايا البالعات الكبيرة والتي بدورها تفعل خلايا مصورات الليف غير المفعلة ضمن حلقة مفرغة (Orimo et al., 2005; Pietras et al., 2008). كما تستطيع التأثير على المادة الأساسية خارج الخلوية وإعادة قولبتها مما ينعكس على تقدّم الورم نتيجة التأثير على هندسته ونتيجة تفاعلات الإشارة فيه (Egeblad and Werb, 2002; Kalluri and Zeisberg, 2006; Kessenbrock et al., 2010).

كما أنّ التغيّرات التي تطرأ على بنية ليبفات الكولاجين الأول من الشكل الملف إلى الأكثر استقامة والذي يُؤيّر في محيط الأورام عالية الدرجة (Levental et al., 2009) (Provenzano et al., 2006) قد يسهّل غزو الخلايا السرطانية إما بالسّماح لها أن تتحرك عليها أو بتشجيع تواسط إشارات الانتغرين (Condeelis and Pollard, 2006) (Levental et al., 2009). كما ظهرت مكّونات قالب أساسي خارج خلوي جنينية ضمن السرطان كـ Tanascin-C وجيل خاص من الفيبرونكتين لها أهميّة في توليد الأوعية المصاحب للسرطان وتعدّ عاملاً اندازياً لإمكانية حدوث نكس (Avraamides et al., 2008) (reviewed in Jones, 2001).

كما أنّ اكتساب الخلايا السرطانية لصفات ميزانشيّة أو جنينية يساعدها على الغزو فتستطيع من خلالها الهروب من الورم الأولي، فمثلاً تقلّد الخلايا السرطانية الخلايا البيضاء أو الخلايا الجذعية بإظهار مستقبل الكيموكين والذي من خلاله تقلّد حركة تلك الخلايا في عودتها لنسج محددة، فالخلايا السرطانية التي تظهر مستقبل الكيموكين CXCR4 تستطيع العبور للرئة والكبد والدماغ ونقيّ العظم (Hermann et al., 2007; Zlotnik, 2004) في حين التي تظهر CCR7 تستطيع العبور للعقد اللمفية مقلّدة بذلك الخلايا المتغصنة

واللمفية التائية (Shields et al., 2007; Zlotnik, 2004)، كما تكتسب الخلايا السرطانية القدرة على بلعمة الخلايا المجاورة الحية (Lugini et al., 2006)، والقدرة على تشكيل بنى مشابهة للوعاء الدموي بما يسمى بالتقليد الوعائي "Vascular mimicry" (Hendrix et al., 2003) فبإمكان الخلايا السرطانية تبطين لمعة الأوعية الدموية الورمية بشكل مباشر (Chang et al., 2000; McDonald et al., 2000).

٨-١ تهرب الخلايا السرطانية من المناعة Cancer Immunoediting:

للخلايا الطبيعية آلية حماية ذاتية تقيها من التورط في التحول السرطاني تتلخص هذه الآلية بالمورثات الكابحة للورم التي تنظم الدورة الخلوية وتصلح العطل المورثي أو تدفع الخلية للاستماتة، لكن في حال نجت الخلية من هذه الآلية وشكلت خلية سرطانية بكافة صفاتها الشاذة من عدم استجابة للاستماتة والانفصال عن خلايا نسيجها الأصل ورفضها للإشارات الصادرة عنها وغيرها من الصفات فلا بد أن تلعب المناعة دورها الرقيب في منع تكاثرها ونموها.

وللمناعة ثلاثة طرق في تجنب حدوث الأورام (Vesely et al., 2011):

١- يمكنها حماية المضيف من الأورام المسببة بالحمات الراشحة (viruses) من خلال احتواء أو تثبيط الانتانات الحموية (الفيروسية).

٢- يمكنها بتحديد رد الفعل الالتهابي وحصر العامل الممرض ضمن فترة زمنية خاصة تجنب البيئة الالتهابية المولدة للورم.

٣- يمكن للجهاز المناعي التعرف والقضاء على الخلايا غير الطبيعية والخلايا الورمية بآلية خاصة تدعى بالمراقبة المناعية Immune Surveillance: كانت هذه الآلية فرضية في الخمسينيات من القرن الماضي لكنها بقيت غير مستندة على بحوث حتى تبنتها العديد من البحوث بعد ثلاثة عقود من اقتراحها.

ممّا هو مستغرب أنّ الجهاز المناعي يلعب دوراً مزدوجاً مع الأورام : فهو من جهة يتعرف ويقضي على الخلايا الورميّة، ومن جهة يحفز على تشكل الأورام عند هروبها منه ممّا يجعلها النّسيلة المنتقاة غير المسيطر عليها بالمناعة، فتتجو وتنمو وتظهر عياناً.

لذا ظهرت نظريّة جديدة تدعى بالتحرير المناعي Immunoediting (الشكل ١) والتي فرضت أفضل وصف لآلية هروب الخلايا الورمية من المناعة والتي لها ثلاثة أطوار تدعى بالثلاثيّة E (Mahmoudi, 2009):

- Elimination الإزالة: وهو الطّور الأوّل من التحرير المناعي كما يدعى بالمراقبة المناعيّة Immune Surveillance، وفيه يتعرّف الجهاز المناعي على الورم ويقضي عليه، وفيه تشارك كلّاً من المناعة الفاعلة والمنفعلة في إزالة الورم المنتشر ويكون للخلية اللمفية السّامة CD8+ الدور الرّئيسي فيه.

بداية تغلّف الخلايا المقدّمة للمستضد APCs الخلايا الورميّة أو مستضدّاتها، تتحطّم المستضدّات وتترافق مع معقّد التّوافق النّسيجي MHC I ويعرض على سطح الخلية المقدّمة للمستضد فتتعرّف عليه الخلية اللمفية التّائيّة الساذجة CD8+ (naïve) وترتبط مع المستضد الورمي على جزيء الـ MHC I، يعتبر هذا الارتباط بمثابة إشارة أولى لتفعيل الخلية اللمفية CD8+ الساذجة (naïve) وتأتي الإشارة التّانية من ارتباط المحفّز B7 costimulator مع المستقبل CD28، اشتراك الإشارتين يفعّل الخلية اللمفية CD8+ الساذجة (naïve) لتصبح فعّالة effector وبشكل خاص CD8+ سامّة والتي تكون قادرة على تدمير الخلايا الورميّة.

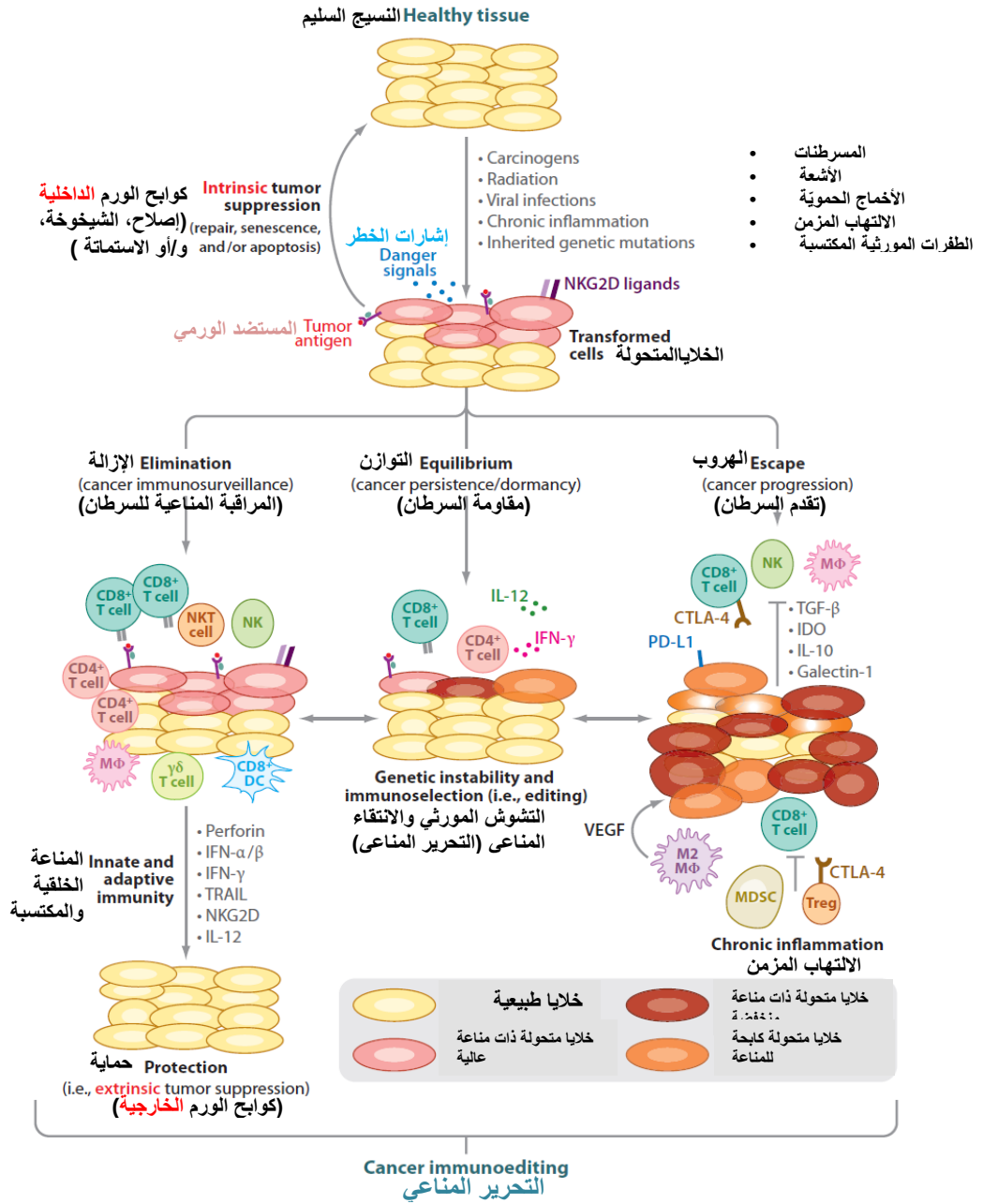
تستطيع الخلايا المقدّمة للمستضد أيضاً أن تظهر المستضد الورمي على الـ MHC II فيرتبط بهذا المعقّد جزيء الـ TCR على التّائيّة CD4+ ممّا يسفر عنه تحرير الأخيرة لعدّة سيتوكينات منها γ -IFN الذي يفعّل التّائيّة CD8+ الساذجة (naïve) لتصبح سامّة.

لأسباب عديدة كنقص في تعبيريّة الـ MHC I على الخلايا الورميّة قد لا تتعرّف التّائيّة السّامة على الخلايا الورميّة لكن لحسن الحظ تبقى القتلّة الطّبيعيون NK لها بالمرصاد وتدمرها.

• Equilibrium التوازن : وهو الطّور الثّاني من التّحرير المناعي وفيه تمنع المناعة الورم من النمو، لكن قد تكتسب بعض الأورام طفرات إضافية تمكّنها -على الرّغم من كلّ الجّهود التي تبذلها المناعة- من النّجاة إلّا أنّها تبقى هاجعة.

• Escape الهروب: وفيه تتوقف الخلايا الشاذة والخارجة عن السّيطرة عن الهجوع لسبب من الأسباب وتنمو وتتكاثر ممّا يسبب السرطان الواضح سريريّاً.

إنّ أساليب الخلايا السرطانيّة في التّهرب من الخلايا المناعيّة وطرقها عديدة ولا حصر لها، منها ما يعطلّ الخلايا المتخصّنة ويمنع تفعيلها وهجرتها للعقد لعرض المستضدّات الورميّة، ومنها ما يعطلّ الخلايا التائيّة، ومنها ما يحاكي الخلايا المناعيّة.



الشكل ١ الأطوار الثلاثة للتحرير المناعي للسرطان: ينتج التحرير المناعي عن ٣ تفاعلات تعمل مستقلة أو بترباط لتسيطر على تشكل السرطان. حالما تتحول الخلايا الطبيعية لخلايا ورمية بتضافر آليات المورثات الورمية المكتسبة وفشل المورثات الكابتة للورم الذاتية يقوم الجهاز المناعي بدور خارجي كابح للورم بتحديد أو كبح النمو الورمي. بطور الإزالة elimination phase تقوم كلتا المناعتين الفاعلة والمنفعلة مع جزيئات خاصة بالتعرف على الخلايا الورمية وتدميرها والعودة بالنسيج لوضعه السليم، في حال عجزت المناعة المضادة للورم من اتمام طور الإزالة فإن الخلايا الورمية الناجية تتقدم للمرحلة التالية طور التوازن equilibrium phase وفيه تكتسب الخلايا السرطانية طفرات مورثية تمكنها من الهروب من التعرف المناعي على الخلايا الورمية أو قتلها أو حتى السيطرة عليها مما يجعلها واضحة سريراً وينقلها لمرحلة الهروب escape phase. CTLA4 = تائية سامة مع بروتين ٤، Mφ = ماكروفاج، MDSC = تائية كابتة نقيوية، NK = قتل طبيعيون، NKG2D = قتل طبيعيون المجموعة الثانية، PDL1 = رابطة الاستماتة ١، T_{REG} = الخلية التائية المنظمة.

٢- السرطان شائك الخلايا للرأس والعنق head and neck squamous

cell carcinoma

٢-١ تعريف Define:

ورم خبيث ينشأ على حساب الخلايا الحشوية (الشائكة) الظهارية squamous cells (Neville, 2009). يرمز له حسب منظمة الصحة العالمية للأورام بـ ICD-O 8070/3 (Barnes, 2005)

قُدِّرَت نسبة الإصابة بسرطانات الرأس والعنق حول العالم بنصف مليون إصابة سنوياً ممّا يجعله السرطان السابع شيوعاً بين مجمل السرطانات، وتنبئ الإحصائيات بزيادة الإصابات لحوالي المليون إصابة، وازدياد الوفيات بهذا السرطان لحوالي نصف مليون حالة وفاة مع قدوم سنة 2020 (Manuela Marron, 2010).

تختلف نسبة الإصابة بين الجنسين و نسبة الانتشار بين البلدان باختلاف مكان السرطان في سرطانات الرأس والعنق، إلّا أنّ معدل إصابة الذكور غالباً ما تكون أعلى فهي ١:١.٥ في سرطان شائك الخلايا في الحفرة الأنفية و ١:٢ في الرغامى وفي الحفرة الفموية، في حين أنّ نسبة الإصابة تتساوى بين الذكور والإناث في سرطانات البلعوم الأنفي (Barnes, 2005)

كما تختلف نسب الانتشار بين البلدان باختلاف مكان السرطان في سرطانات الرأس والعنق،

فسرطان شائك الخلايا في الحفرة الأنفية والبلعوم الأنفي أكثر انتشاراً في المنطقة الآسيوية

في حين تُعدّ كل من فرنسا والجزء الغربي لسويسرا وشمال إيطاليا وشرق أوروبا وجزء من أمريكا اللاتينية أكثر المناطق إصابة بالسرطان شائك الخلايا الفموي (Barnes, 2005).

٢-٢ الأسباب المؤهبة Etiology:

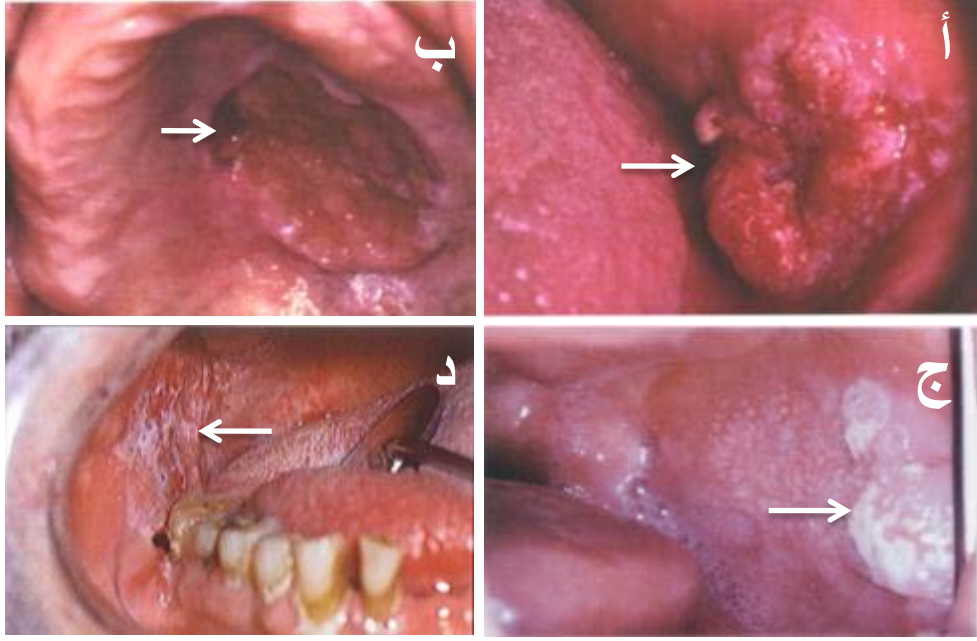
للسرطان شائك الخلايا في الرأس والعنق عدّة أسباب مؤهبة منها:

- استعمال التبغ بأشكاله المختلفة: المدخن - وغير المدخن - وجوزة التبغ: وهو العامل الأكثر أهمية من العوامل المسببة للآلية الامراضية.
- استعمال الكحول - الفينول : وخاصة عند اشتراكه مع عادة التدخين.
- الاصابة بنقص المعادن خاصة نقص الحديد - والاصابة بنقص الفيتامينات خاصة نقص فيتامين A.
- الإصابة بالمتعضيات الدقيقة : كفيروس EB وفيروس HPV والمبيضات البيض.
- الكبح المناعي عند المثبتين مناعياً ومرضى الايدز.
- الإصابة بالالتهابات المزمنة طويلة الأمد.
- التعرض للأشعة سواء كان التعرض للأشعة فوق البنفسجية أو نتيجة قصة سابقة لمعالجة شعاعية .
- كما يساهم الرض الميكانيكي المزمّن كتخريش الأجهزة الصناعية خاصة بحدوث السرطان إذا ترافقت مع صحّة فموية سيئة وعادات سيئة كالتدخين والكحول (Regezi et al., 2016).

٢-٣ المظاهر السريرية Clinical Features:

يتظاهر السرطان شائك الخلايا بأشكال سريرية عدّة (الشكل ٢) :

- فيبدو على شكل بروز خارجي exophytic ذات شكل حلبي أو ثلثي أو
- على شكل انغماد داخلي endophytic أو
- على شكل لويحات بيضاء مثل الطلاوة leukoplakia أو
- على شكل تنسج أحمر Erythroplakia أو
- على شكل طلاوة مبرقشة erythroleukoplakia.



الشكل ٢ الأشكال السريرية للسرطان الشانك الخلايا: أ- بروز خارجي، ب- انغماد داخلي، ج- لويحات بيضاء مثل الطلاوة، د- يشبه طلاوة مبرقشة.

أما بالنسبة لأعراضه فتتراوح ما بين الشديدة والخفيفة تبعاً لمكان الإصابة، وأهم الأعراض هي:

في الإصابات الأنفية : الشعور بانسداد أنفي، ورعاف، وسيلان أنفي، وألم، وخدر، وانتباج في الخد أو الحنك أو الأنف، وقرحة معنّدة على الشفاء، وجحوظ أو شفع أو دمع في الحالات المتقدّمة. يضاف على هذه الأعراض في إصابات البلعوم الأنفي اضطرابات في الكلام والبلع ونقص في الوزن وقد تصل الأعراض في الحالات المتقدمة إلى الصّم والتّهاب الجلد والعضلات Dermatomyositis. تترافق إصابات الحنجرة ولسان المزمار والرغامى مع بحّة في الصوت، واضطراب وظيفي في التصويت، وشعور بجسم أجنبي في الحلق، ونفث دم، وسعال، واضطراب تنفسي، ووزيز.

في الإصابات الفموية نشاهد تقرّح- وألم (قد يتشعّع للأذن)- ورائحة كريهة- وصعوبة في النطق وفي فتح الفم وفي المضغ وفي البلع مع أو بدون ألم - ونزف - ونقصان في الوزن - وانتباج رقبتي. ونادراً ما يظهر لدى المريض تضخم عقد رقبية من دون أعراض سابقة. تترافق سرطانات الفم بتمدّد للبنى المجاورة للسرطان كتمدّد عظمي وعضلي وجلدي، كما قد

يترافق باضطرابات إطباقية، ويسبب سرطان اللسان كبير الحجم اضطراباً في حركيته، وتسبب الحالات المتقدمة في سرطانات قاع الفم إلى سيلان لعابي drooling.

في حين تترافق إصابات الغدد اللعابية مع ازدياد حجمي واضح وضعف في العصب الوجهي، أما إصابات الأذن فتترافق مع ألم ونقص سمع وتقيح ونزف بالنسبة للأذن الخارجية وقد تترافق مع تصريف مصلي دموي في إصابات الأذن الوسطى ويعتبر النبض العصبي العَرَض الأهم لإصابتها (Barnes, 2005).

٢-٤ التصنيف Classification :

يصنّف السرطان شائك الخلايا في الرأس والعنق حسب المكان وحسب الدرجة السريرية وحسب الدرجة النسيجية (Barnes, 2005).

٢-٤-١ التصنيف حسب المكان Localization Classification :

يدخل في تصنيف السرطان شائك الخلايا للرأس والعنق السرطانات التالية حسب المناطق التشريحية (الشكل ٣، الشكل ٤) :

أ- السرطان شائك الخلايا في التجويف الأنفي و الجيوب الأنفية، وتشكل أقل من ١% من السرطانات عامة وحوالي ٣% من سرطانات الرأس والعنق، ويصنّف السرطان شائك الخلايا ضمنها إلى:

- سرطان الجيب الفكّي.
- سرطان الحفرة الأنفية.
- سرطان الجيب الغربالي.
- سرطان الجيب الوتدي.
- سرطان الجيوب الجبهية.

ب- السّرطان شائك الخلايا في البلعوم الأنفي، ويشكل نسبة ٠,٦% من السّرطانات عامة، وهو وهو الوحيد من بين السرطانات شائكة الخلايا للرأس والعنق الذي يرمز له حسب مُنظمة الصّحة العالميّة للأورام بـ ICD-O 8071/3 (Barnes, 2005)، ويصنّف السّرطان شائك الخلايا ضمنها إلى:

- سرطان الجدار الجانبي للبلعوم الأنفي.
- سرطان الجدار العلوي الخلفي للبلعوم الأنفي.

ت- السّرطان شائك الخلايا في الحنجرة والبلعوم الحنجري والرّغامى، ويصنّف السّرطان شائك الخلايا ضمنها إلى:

- سرطان الحنجرة : و ضمنها منطقة ما تحت المزمار ولسان المزمار.
- سرطان البلعوم الحنجري: وضمنها منطقة الجيب الكمثري والجدار البلعومي الخلفي ومنطقة ما خلف الغضروف الحلق.
- سرطان الرّغامى : وتقسّم إلى ثلاثة مناطق علوي ومتوسط وسفلي .

ث- السّرطان شائك الخلايا في التجويف الفموي والبلعوم الفموي، ويشكل ٥% من مجمل السرطانات عند الذكور و ٢% من مجمل السرطانات عند الإناث، ويصنّف السّرطان شائك الخلايا ضمنها إلى:

- سرطان الحاقّة القرميّة للشفة.
- السّرطان داخل الفموي.
- سرطان اللّسان.
- سرطان قاع الفم.
- السّرطانات اللّثويّة والسّنخيّة.
- السّرطان البلعومي الفموي ويتضمّن الثّلاث الخلفي من اللّسان، وأخدود اللّسان، واللّوزة والحفرة اللّوزيّة، والثّلم اللّساني اللّوزي، والحنك الرّخو واللّهاة.

ج- السّرطان شائك الخلايا في الغدد اللّعابية، ويصنّف السّرطان شائك الخلايا ضمنها إلى:

- سرطان الغدّة النّكفيّة.

• سرطان الغدة تحت الفك.

• سرطان الغدة تحت اللسان.

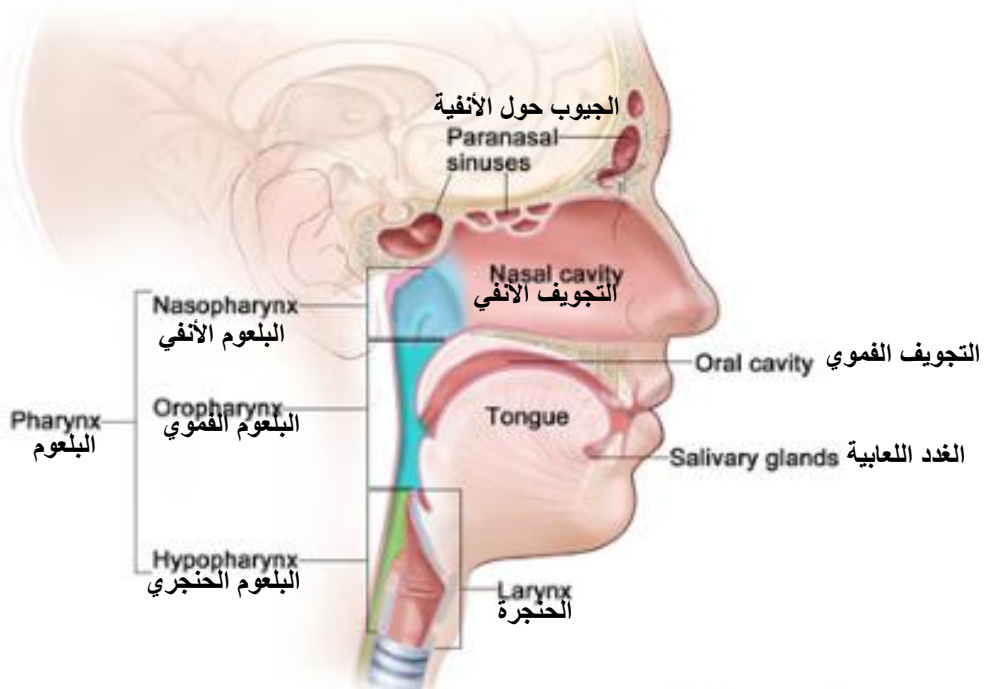
ح- السرطان شائع الخلايا في الأذن ، ويصنف السرطان شائع الخلايا ضمنها إلى:

• سرطان الأذن الخارجية.

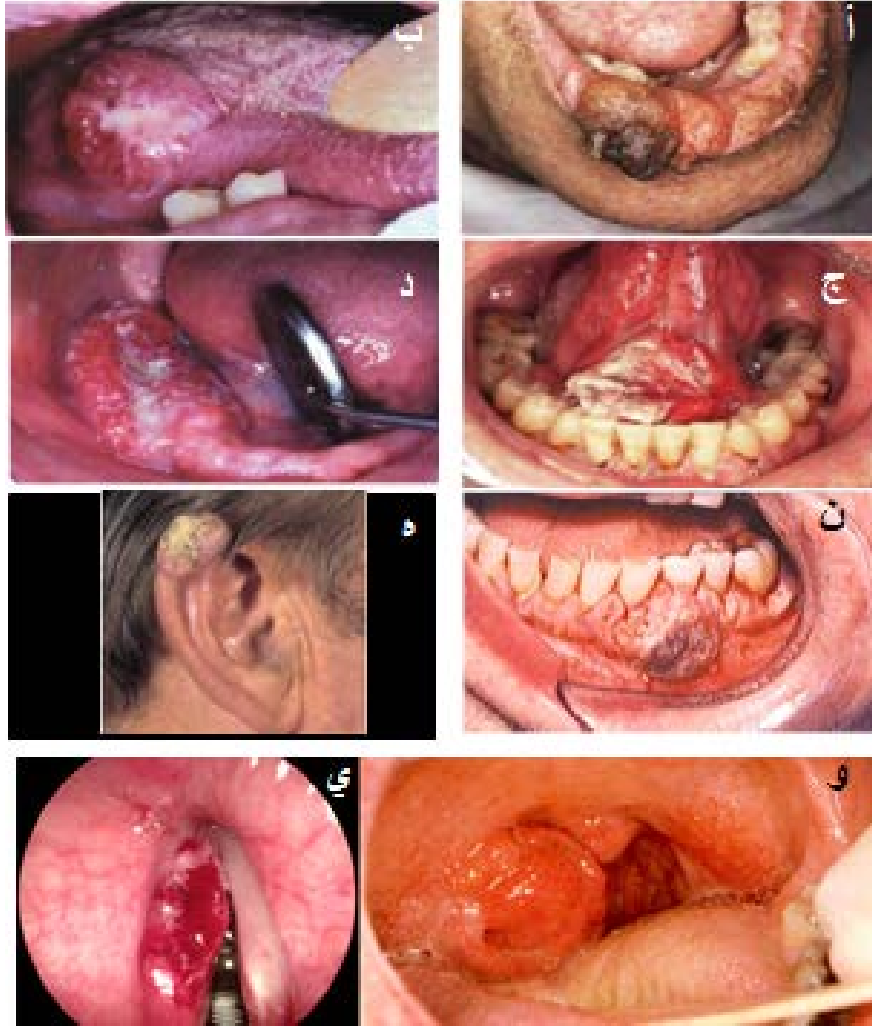
• سرطان الأذن الوسطى.

مع العلم أنّ أماكن الإصابة تعكس في كثير من الأحيان الأسباب المؤهبة لظهور السرطان، كما أنّ لحجم ولموقع السرطان أهمية عالية في التشخيص، ففي أورام الفم تعتبر أورام قاع الفم والسطح السفلي للسان والحنك الرخو من الأورام التي لها ميلاً عالياً في النكس ممّا يستدعي أخذ احتياطاتٍ أعلى في العلاج والمراقبة.

Head and Neck Cancer Regions



الشكل ٣ المناطق التشريحية لسرطانات الرأس والعنق



الشكل ٤: بعض من مواقع الإصابة في السرطان الشائك الخلايا للرأس والعنق: أ- الحافة القرمزية للشفة، ب- اللسان، ج- قاع الفم، د- السنخ، ن- اللثة، هـ- الأذن الخارجية، و- اللوزة اللسانية، ي- الحبل الصوتي (تنظير).

٢-٤-٢ التصنيف حسب الدرجة السريرية Stage Classification:

وتعتمد درجة الورم سريرياً على ثلاث معطيات :

T(tumor size) = حجم الورم والذي يختلف تقديره باختلاف مكان الإصابة.

N(lymph node involvement) = انتشاره للعقد اللمفية

M(metastases) = الانتقالات للمناطق البعيدة، والتي رمزت كما في (الجدول ١):

T حجم الورم	التصنيف	N انتشاره للعقد اللمفية	التصنيف	M الانتقالات	التصنيف
X	لم يحدد إن كان سرطان أولي	X	لم يحدد أو لم يستطع التأكد	X	يوجد ولم يحدد
0	ليس سرطان	0	لا يوجد انتشار عقدي	0	لا يوجد
Is	سرطان موضع أولي	1	انتشار لعقدة واحدة بجهة الإصابة الأولية بقطر أعظمي أقل من ٣سم	1	يوجد ومحدد
1	سرطان أولي قطره الأعظمي ٢سم أو أقل	2a	انتشار لعقدة واحدة بجهة الإصابة الأولية بقطر أعظمي بين ٣سم-٦سم		
2	سرطان أولي قطره الأعظمي بين ٢سم-٤سم	2b	انتشار لأكثر من عقدة واحدة بجهة الإصابة الأولية بقطر أعظمي لا يزيد عن ٦سم		
3	سرطان أولي قطره الأعظمي أكثر من ٤سم	2c	انتشار عقدي ثنائي الجانب أو معاكس لجهة الإصابة الأولية بقطر أعظمي لا يزيد عن ٦سم		
4a	سرطان أولي يغزو العظم القشري، والعصب السنخي الأمامي، وقاع الفم، أو جلد الوجه، أو عضلات اللسان العميقة أو الجيب الفكي	٣	انتشار لعقدة بقطر أعظمي يزيد عن ٦سم		
4b	يغزو المسافة الماضغة أو الصفحة الجناحية أو قاعدة الجمجمة أو يحيط بالشریان السباتي الأمامي				

جدول ١ رموز معطيات درجة الورم السريريّة في سرطان شائك الخلايا الفموي (Barnes, 2005).

بالتالي صنف السرطان شائك الخلايا حسب الدرجة السريرية clinical stage إلى أربع درجات موضحة كما في (الجدول ٢) :

الدرجة	T	N	M
I	1	٠	٠
II	2	0	0
III	3	0	0
	1/2/3	1	0
IV	4 a/b	0/1	0
	1/2/3/4a	2	0
	مهما تكن	3	0
	مهما تكن	مهما تكن	1

جدول ٢ تصنيف سرطان شائك الخلايا حسب الدرجة السريرية (Barnes, 2005)

لابد من الإشارة أن النّقاثل العقديّة تحدث في ٦٠% من مرضى سرطان شائك الخلايا في الرأس والعنق في حين أن الانتقالات البعيدة تحدث في ٢٥% من مرضى السرطان والتي غالبا ما تكون في الرئة والعظم والكبد (Kotwall et al., 1987)

٢-٤-٣ التصنيف حسب الدرجة النسيجية Grade Classification:

ينشأ السرطان شائك الخلايا SCC من سطح بشرة مصابة بسوء تصنع، ويميز نسيجياً بواسطة جزر وحبال الخلايا الحرشفية السرطانية الغازية، حيث يظهر الغزو على شكل امتداد غير نظامي لبشرة الآفة عبر الغشاء القاعدي وعبر النسيج الضام تحت البشري، بالتالي تظهر الخلايا الحرشفية سواء كانت مفردة أو ضمن جزر كوجود مستقل ضمن

النسيج الضام، كما يوجد غالباً استجابة خلوية التهابية أو مناعية ضد البشرة الغازية، كما قد تظهر مناطق تنخر بؤرية.

أما خلوياً فتظهر علامات الكشم الخلوي أو عدم التصنع الخلوي (anaplsia) في الخلايا السرطانية والتي هي : اللانمطية الخلوية (cellular atypia) من زيادة حجم الخلايا والنوى والنويات، ومن زيادة نسبة حجم النواة للهيولى، ومن فرط تصبغ النوى، ومن خلل في التقرن، ومن زيادة الفعالية الانقسامية، بالإضافة للانمطية فتظهر علامات كشم أخرى من تعدد الأشكال الانقسامية، وفقدان قطبية الخلايا القاعدية، وفقدان الاتصالات بين الخلوية، ووجود التقرن المفرد للخلايا (Barnes, 2005).

يدعى التقدير النسيجي لمدى تشابه الورم مع النسيج الأصلي بالدرجة النسيجية histological grade (الشكل ٥) وتقيم درجة الآفات ب ٤ درجات حسب تصنيف Border (Border,.1921) و Border المعدل (Anneroth et al.,1984) الملخص ضمن (الجدول ٣) :

- **الدرجة IV متعددة الأشكال pleomorphic أو الكشمي anaplastic:** وفيها تبتعد الخلايا الورمية عن شكلها الأصلي الحرشفي فتقترب للشكل الحويصلي أو الرائق ويصعب تشخيص الحالة كسرطان شائك الخلايا، وفي حال لم يوجد بين الساحات ما يؤكد التشخيص فلا بد من التلوينات المناعية المشخصة (Border,.1921).
- **الدرجة III (high grade tumor) العالية الخباثة :**

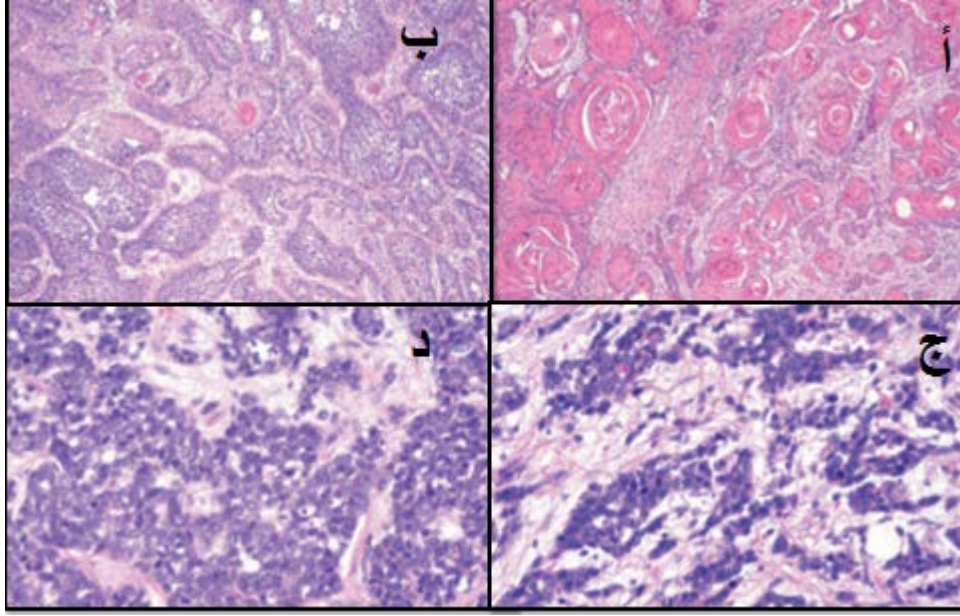
هي للأورام الأقل تمايزاً (poor differentiated) وفيها يكون الورم ذو خلايا متعددة الأشكال والأحجام لا تشبه الخلايا الحرشفية، تنتج كمية قليلة من القرنين أو لا تنتجه أبداً، بالتالي يصعب تحديد أصل النسيج (Border,.1921)، وهي غالباً ما تتكاثر بسرعة وتستعمر بشكل مبكر (Neville, 2009).

■ **الدرجة I (low grade tumor) المنخفضة الخباثة :**

للأورام جيدة التمايز (well differentiated) وفيها يماثل الورم النسيج الأصل (Border, 1921)، وغالباً ما تنمو ببطء وهدوء وتستعمر بشكل متأخر (Neville, 2009).

■ **الدرجة II وهي للأورام المعتدلة التمايز (moderately differentiated)**

وهي تتوسط الدرجتين السابقتين (Border, 1921).



الشكل ٥ درجات الإصابة النسيجية في السرطان الشائع الخلايا: أ- (درجة I) الجيدة التمايز، ب- (درجة II) المعتدلة التمايز، ج- (درجة III) المنخفضة التمايز، د- (درجة IV) اللانموني (متعدد الأشكال).

عادةً يدلّ التقرن على الدرجتين الجيدة والمتوسطة ولكن لا يمكن الاعتماد عليه بمفرده، وبعد ذا أهمية قليلة بتحديد الإنذار إذا ما قورن بنمط الغزو الذي يصنّف إلى تمديدي أو توسعي expansive وارتشاحي infiltrative وقد يظهران معاً، يتصف النمط التمديدي بجزر ورمية كبيرة ذات حواف محدّدة، تترافق بإنذار أفضل، أما النمط الارتشاحي فيتميز بحبال صغيرة مبعثرة غير نظامية، أو خلايا ورمية مفردة، وتكون حواف الارتشاح غير محدّدة، ويترافق مع نهج عدواني أكثر (Woolgar and Triantafyllou, 2009, Barnes, 2005).

الدرجة حسب تصنيف Borders				المعايير النسجية
٤	٣	٢	١	
لا يمكن تمييز الخلايا دون استخدام الواسمات ٧٥% من الخلايا غير متميزة	مجموعات صغيرة ٧٥% من الخلايا غير متميزة	شرائط أو حبال ٥٠% من الخلايا غير متميزة	جزر كبيرة متميزة ٢٥% من الخلايا غير متميزة	البنية الخلوية للخلايا الشائكة
لا يوجد تفرن	كميات قليلة جداً من القرنين	كميات متوسطة من القرنين	كرات التفرن بشكل كبير	درجة التفرن
تغيرات كثيرة مع ظهور العديد من علائم الكشم	تغيرات كثيرة مع ظهور بعض علائم الكشم	تغيرات متوسطة في النوى	قليلة جداً	التغيرات في نوى الخلايا الشائكة
انقسامات كثيرة جداً (أكثر من ٦)	انقسامات كثيرة (٥-٦)	انقسامات متوسطة (٣-٤)	انقسامات قليلة (٠-٢)	عدد الانقسامات في الساحة في الطبقة فوق القاعدية
الدرجة حسب تصنيف Borders				المعايير الشكلية حسب استجابة المضيف
٤	٣	٢	١	
الغشاء القاعدي غير واضح مع انتشار الغزو	الغشاء القاعدي غير واضح	الغشاء القاعدي أقل وضوحاً	الغشاء القاعدي جيد التحديد	نمط الغزو
الغزو يكون بشكل كبير و عميق جداً يصل لمناطق العضلات أو العظم	الغزو يشمل المناطق التي بعد الصفيحة الخاصة	الخلايا الورمية تغزو النسيج الضام و لا تتجاوز منطقة الصفيحة الخاصة	الخلايا الورمية تغزو بشكل بسيط جداً	درجة الغزو
لا يوجد استجابة التهابية	استجابة التهابية قليلة جداً	استجابة التهابية متوسطة	استجابة التهابية واضحة	الاستجابة الالتهابية
غزو واضح و كثير للأوعية الدموية	غزو قليل للأوعية الدموية	الخلايا الورمية تحيط بالأوعية دون أن تغزوها	لا يوجد غزو للأوعية الدموية	الغزو الوعائي

جدول ٣ المعايير الشكلية والنسجية والمعايير الشكلية حسب استجابة المضيف للدرجات النسيجية حسب تصنيف Borders و Borders المعدل

٢-٥ الأشكال النسيجية للسرطان شائك الخلايا Histopathologic

:Features

من الممكن تمييز عدّة أشكال نسيجية إضافة إلى الشكل التقليدي للسرطان شائك الخلايا:

٢-٥-١ السرطان البشري الثلوي Verrucous Carcinoma:

يرمز له حسب منظمة الصحة العالمية للأورام بـ ICD-O 8051/3

ينمو الشكل الثلوي ببطء ولا يستعمر، ويظهر غالباً لدى الذكور المتقدمين في العمر والمدخنين، وقد لوحظ وجود الحمّة الراشحة الحليمية البشرية HPV في أكثر من ٤٠% من الحالات.

يتظاهر سريريّاً بشكل آفة لاعرضيّة ذات حدود واضحة، ويرتبط لونها بشكل أساسي بسماكة الطبقة المتقرنة وكثافة الرّشاحة المناعيّة أسفل الورم، ولا يشاهد تقرّح السطح ولا النّزف إلا إذا وجدت بؤر السرطان شائك الخلايا التقليدي، تشمل المظاهر النسيجيّة وجود خلايا بشرويّة جيدة التمايز تبدي علائم فرط التصنع hyperplastic أكثر من علائم التّتشؤ الورمي neoplastic (الشكل ٦-أ). تكون هذه الآفة ذات حواف عريضة مندفعة - broad pushing margine حيث يتجه السرطان باتجاه النسيج الضام مفضلاً دفع الغشاء القاعدي على الارتشاح، ويحاط الجزء المندفع advancing front بالبالعات الكبيرة macrophage والمفاويّات والخلايا المصوريّة (Regezi et al., 2016) (Neville, 2009)

٢-٥-٢ السرطان شائك الخلايا المشبه بالقاعي Basaloid Squamous

:Cell Carcinoma

يرمز له حسب منظمة الصحة العالمية للأورام بـ ICD-O 8083/3

أكثر ما يصادف في البلعوم وتغلب مشاهدته عند الذكور بعمر ٦٠-٨٠ سنة ويعد التدخين والكحول من العوامل المؤهبة للإصابة. يتظاهر سريريّاً بشكل كتلة معنّقة مؤلمة ومتقرّحة في

المركز تشمل المظاهر النسيجية وجود مكّونين خلويين هما الخلايا الظهارية الشائكة والخلايا المشبهة بالقاعدية basaloid cells التي تتميز بصغر حجمها ونواتها مفرطة الاصطباغ وهيولاهما القليلة (الشكل ٦-ب).

يُتّصف هذا الورم بسلوكه العدوانى وسرعة نموه ويرتبط وجود هذا الشكل بوجود السرطان شائك الخلايا وبشكل أقل بوجود السرطان شائك الخلايا المغزلي (Fritsch and Lentsch, 2014)

٢-٥-٣ السرطان شائك الخلايا الحليمى Papillary Squamous Cell Carcinoma:

يرمز له حسب منظمة الصحة العالمية للأورام بـ ICD-O 8052/3

يتظاهر نسيجياً كامتدادات حلبيّة مدعومة بنسيج ليفى وعائى، ويلاحظ تعدّد في الأشكال الخلويّة، وقد يشاهد بؤر من التّموت والنّزف (الشكل ٦-ت)، وهو ذو إنذار أفضل من السرطان شائك الخلايا التقليدي، وبعد إنذاره أفضل كلما قل الارتشاح باتجاه النسيج الضام. يُعد الكحول والتبغ عوامل أساسيّة للإصابة بالإضافة إلى الحمّة الرّاشحة للورم الحليمى البشرى HPV ، ويأخذ الورم شكل حلبيّة طرية هشة خارجيّة النّمو، وتكثر مشاهدته في الجيب الفكي (Cawson and Odell, 2008).

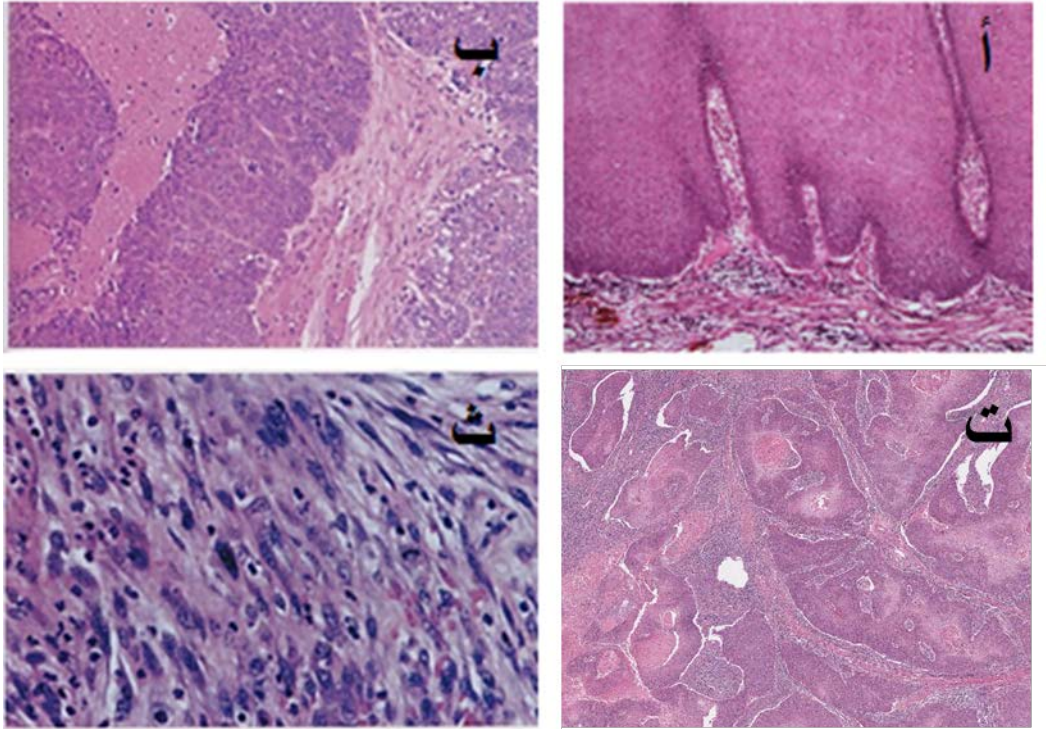
٢-٥-٤ السرطان شائك الخلايا ذو الخلايا المغزليّة Spindle cell Sarcoma:

Squamous Cell Carcinoma

يرمز له حسب منظمة الصحة العالمية للأورام بـ ICD-O 8074/3

نادراً ما يتظاهر السرطان شائك الخلايا القموي OSCC بشكل تكاثر لخلايا مغزليّة الشكل حيث يعتقد خطأً أنها أحد السرطانات الضامة sarcoma (الشكل ٦-ث). يعرف هذا النمط من الأورام باسم spindle cell carcinoma السرطان البشري مغزلي الخلايا، أو السرطان البشري المشبه بالسرطان الضام sarcomatoid carcinoma . ينشأ السرطان

البشري مغزلي الخلايا عادة من البشرة السطحية في الشفاه وأحياناً في اللسان.
(Barnes, 2005)، (Regezi et al., 2016)



الشكل ٦ الأشكال النسيجية لسرطان شائع الخلايا أ- السرطان البشري الثولولي : وجود خلايا بشرية جيدة التمايز تبدي علانم فرط التصنع يتجه السرطان باتجاه النسيج الضام مفضلاً دفع الغشاء القاعدي على الارتشاح - ب السرطان شائع الخلايا المشبه بالقاعدي: مكونين خلويين هما الخلايا الظهارية الشائكة والخلايا المشبهة بالقاعدية- ت السرطان شائع الخلايا الحليمي : امتدادات حلبيمة مدعومة بنسيج ليفي وعائي، ويلاحظ تعدد في الأشكال الخلوية، وقد يشاهد بؤر من التمثوت والنزف- ث السرطان شائع الخلايا ذو الخلايا المغزلية: نادراً ما يتظاهر السرطان شائع الخلايا الفموي OSCC بشكل تكاثر لخلايا مغزلية الشكل.

٣ - العقد اللمفية Lymph Nodes:

هي الأعضاء التي تحدث فيها الاستجابة المناعية المكتسبة وتخليق الأضداد (Abbas, 2005).

تتوضع العقد اللمفية في مناطق مختلفة من الجسم بشكل أساسي في العنق، وحول العمود الفقري، وبين النسيج الضام الرخو تحت الإبطين والمغبن، وعلى مسير الأوعية الدموية، وفي أجواف الجسم، يكون وجودها على شكل سلسلة عقدية على طول الأوعية اللمفية مما يسمح للمف بالتدفق من عقدة لأخرى والأوعية الصادرة من أحد العقد تشكل الواردة للأخرى مما يسمح للخلايا السرطانية أن تنتشر عبر سلسلة مناطقية من العقد.

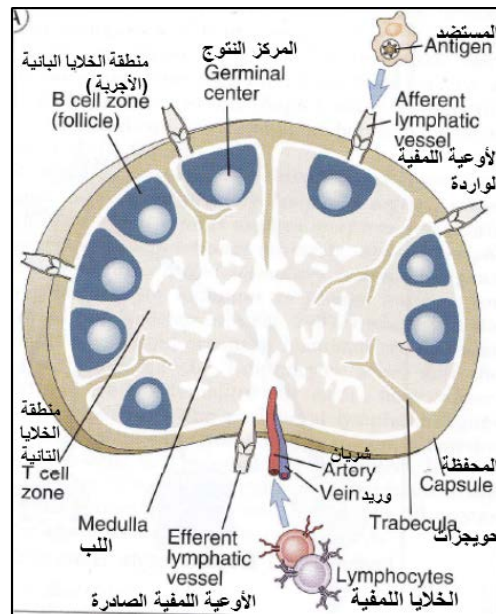
تتألف العقدة من تجمع الخلايا اللمفاوية التائية والبائية والمقدمة للمستضد والبالعات الكبيرة. توصف العقدة شكلياً بأنها كتلة صغيرة بعض الشيء سطحها أملس قطرها أقل من ٣ سم (بين ١-٢٥ ملم) لونها وردي، شكلها كلوي، لها سطح محدب تدخل عبره الأوعية اللمفية الواردة ذات الدسامات المانعة لعودة اللمف الوارد، و سطح مقعر فيه سرّة العقدة وهو مكان لخروج الأوعية اللمفية الصادرة ذات الدسامات المانعة لعودة اللمف الصادر للعقدة، كما أنها مكان لدخول وخروج الأوعية الدموية (شرايين وأوردة) المغذية للعقدة، لها محفظة ضامة ليفية وتكون محاطة عادة بنسيج شحمي، تحيط المحفظة بالعقدة من أطرافها جميعاً عدا منطقة السرة، قوامها ألياف كولاجينية وألياف مرنة وبعض الألياف الملساء، ويمتد من المحفظة امتدادات ضامة تسمى حويجزات trabeculæ تخترق لحمة العقدة فتقسمها إلى حجرات غير كاملة تتوقف بجوار السرة وتكون أسمك ما يكون عندها محيطية بالأوعية الدموية، وبذلك تميز في العقدة ٣ مناطق (الشكل ٧) :

القشر - وتحت القشر - واللب والتي تحتوى جميعها على أشباه جيوب وفراغات بين بطانية ينزح إليها اللمف، تنقب الأوعية اللمفاوية الواردة المحفظة في السطح المحدب وتفرغ لمفها في جيوب تابعة للمحفظة subcapsular sinus التي تستمر في جيوب تابعة للقشر cortical sinus توصل اللمف إلى جيوب تابعة للّب modularly sinus والتي تخرج

اللمف عبر الأوعية اللمفية الصادرة من منطقة السرة ويكون اللمف المصفى أكثر غنى بالمفاويات نظراً لوظيفة العقدة الهامة في تصنيعها، تتألف هذه الجيوب من شبكة من خلايا نجمية تتصل استطالاتها مع بعضها، ومن خلايا تشبه البشرة الرصفية البسيطة، وتتصل البالعات الكبيرة بخلايا الشبكة النجمية لبلعمة المواد الغريبة، وتستطيع الخلايا اللمفاوية البقاء والخروج من الجيوب بمرورها عبر الخلايا الرصفية المبطنة (Abbas, 2005).

٣-١ - منطقة القشر Cortex Region:

تحتوي منطقة القشر الأجرية اللمفاوية الأولية والثانوية وتدعى منطقة البائيات. تختلف الأجرية الأولية عن الثانوية بنوع الخلايا الموجودة فيها ولذلك أهمية بالغة في الدور الوظيفي للعقدة. فالأجرية الأولية: هي تجمعات كروية تحتوي خلايا بائية (ذاكرة بائية و غضة naïve). في حال احتوى الجراب اللمفي مركزاً نتوجاً يدعى عندها بالجراب الثانوي وتحصل فقط في حال الاستجابة لمستضد معين ويعتقد أنها مركز لتوالد الخلايا البائية الذاكرة والمصورة.



الشكل ٧ رسم توضيحي للعقدة اللمفية يشرح أقسامها النسيجية : تغلف العقدة محفظة ضامة ترسل حجبها ضمنها فتقسمها لحجر غير مكتملة، يثقب المحفظة من الأعلى (وجهها المحدب) أوعية لمفية واردة للعقدة كما تثقب المحفظة من ناحية سرة العقدة (أو وجهها المقعر) أوعية لمفية صادرة من العقدة كما يدخلها شريان ووريد، منطقة القشر وتحتوي على الأجرية اللمفية الأولية والثانوية وتدعى بمنطقة البائيات، اللب في مركز العقدة، وبين القشر واللب منطقة تحت القشر أو منطقة التائيات. تشاهد المتغصنة وضمنها المستضد في الأعلى والمفاويات تائية وبائية في الأسفل (Abbas, 2005).

أما الأجرية الثانوية فتتألف من: المنطقة المحيطة من الجراب الثانوي وتدعى بالإكليل (الحجاب) mantle zone وهي تتألف من تجمع كثيف للخلايا اللمفاوية التائية $CD4^+$ وبالوعات الكبيرة والمتغصنة IDC Interdigitating dendritic cell المنتظمة حول أشباه الجيوب اللمفية والدموية، في حين يدعى المركز بالمركز النتوج germinal zone والذي يتألف من ٣ مناطق :

dark zone والذي يحتوي بشكل أساسي على centroblast.

basal light zone والذي يحتوي بشكل أساسي على centrocyte.

apical light zone والذي يحتوي على خلايا مصورية وخلايا ذاكرة بائية والقليل من البالعات الكبيرة والمتغصنة الجرابية Follicular dendritic cell FDC وخلايا القتل الطبيعيون Natural Killer NK .

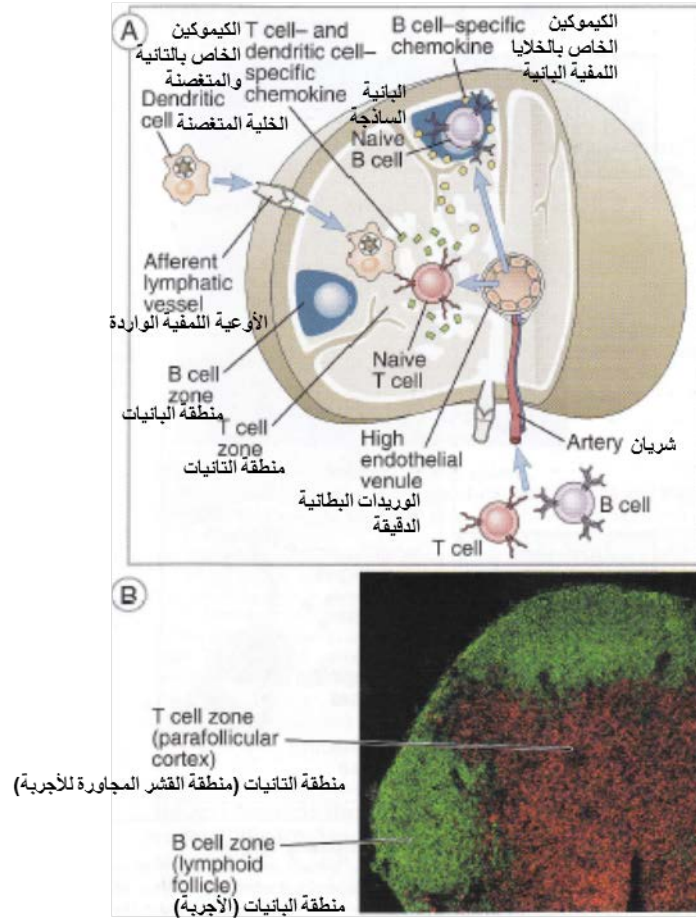
عندما تهاجر البائية الساذجة (naïve) للعقدة تتجذب لمنطقة البائيات وتبقى فيها بتأثير الممال الكيموكيني المفرز فيها والذي تسعى للارتباط به نتيجة وجود المستقبل الكيموكيني CXCR5 على سطحها.

تحرص العضوية على وجود الخلايا التائية والبائية بقرب الخلايا المقدمة للمستضد (فالتائية بالقرب من المتغصنة والبائية بالقرب من المتغصنة الجرابية FDCs)، لكن لا تشكّل معها أي اتصال خلوي مما يبقي للمفاوية حرية الحركة (Abbas, 2005).

٢-٣ منطقة تحت القشر Paracortex Region:

هي منطقة بين القشر واللّب، تحوي على الوريدات البطانية الدقيقة HEVs والتي تدخل وتخرج عبرها الخلايا اللمفاوية، كما تحوي على الخلايا التائية وتدعى بالمنطقة المعتمدة على التيموس أو منطقة التائيات وذلك لانجذاب التائيات الساذجة (naïve) الواردة للعقدة لهذه المنطقة وبقائها فيها بتأثير الانجذاب للممال الكيموكيني المفرز فيها والذي تسعى للارتباط

به نتيجة وجود المستقبل الكيموكيني CCR7 على سطحها. عند تفعيل التائيّات وتكاثرها يزداد عرض هذه المنطقة (الشكل ٨).



الشكل ٨ رسم توضيحي يشرح طريق هجرة اللمفاويّات التائيّة والبائيّة الساذجة (naïve) لمناطق مختلفة من العقدة. تدخل اللمفاويّات العقدة عبر الشريان وتصل للوريدات البطانيّة الدقيقة HEVs حيث تنزح اللمفاويّات الساذجة (naïve) لمناطق مختلفة من العقدة بتواسط من الكيموكينات التي تنتج في تلك المناطق وترتبط بشكل انتقائي لأنماط أخرى من الخلايا، كما يمكن مشاهدة سير هجرة المتغصّنة التي تلتقط المستضد من مواقع ظهوره وتدخل الأوردة اللمفيّة الواردة للعقدة وتهاجر للمناطق الغنيّة بالتائيّات في العقدة (Abbas, 2005).

٣-٣ منطقة اللب Medulla Region:

ويتألّف من جيوب لمفاويّة كبيرة تحيط بها الخلايا اللمفيّة وتشكل مع المصوريّة والبالعات الكبيرة تجمعات تدعى بالحبال اللبيّة، تدخل الخلايا من القشر لمنطقة اللب ثمّ لتخرج من العقدة عبر الأوعية الصّادرة (Abbas, 2005).

٣-٤ :Vascularization of the Lymph Node **توعية العقدة اللمفية**

تدخل الأوعية الدموية للعقدة عبر صرّتها، تبقى مجاورة للحجب في لب العقدة وتصبح صغيرة كلما تفرعت ومن ثمّ تفقد غمدها وتستمر في سيرها ضمن مادة العقدة لتشكل سريراً وعائياً لبياً يستمرّ ليصل للقشر فيشكل سريراً وعائياً شريانياً قشرياً ويصل لكلّ جيب لمفيّ، يتصل السرير الوعائي الشرياني بالسرير الوريدي القشري والذي يتّحد فيما بعد بالأوعية الشعرية الوريدية حتى تصبح وريداً كبيراً يغادر العقدة في السرة.

ويتمّ تعصيب العقدة اللمفاوية بواسطة أعصاب تسير مع الأوعية الدموية (Abbas, 2005).

٣-٥ : Histophysiology of Lymph Nodes **وظيفة العقد**

تقوم بتصفية اللمف الدّاخل وتقوم بدور المميّز للمستضدّات ولها وظيفة انتاجية للخلايا اللمفية والأجسام الضدية :

تحدث التصفية نتيجة نقص تدفق اللمف عند دخوله العقدة ممّا يعطي البالعات الكبيرة الموجودة فيها الوقت الكافي لبلعمة جميع الأجسام الغريبة من الجسم والآتية عن طريق اللمف وبهذه الطريقة تُزال ٩٩% من شوائب اللمف.

أما تمييز المستضدات فذلك يعتمد على آليتين :

١- الخلايا المقدمة للمستضد APC: هذه الخلايا المقدّمة للمستضد منتشرة في جميع أنحاء الجسم وهي خلايا مهاجرة تلتقط المستضدات الغريبة وتعرضها على معقد التوافق النسيجي الكبير MHCII الخاص بها ثمّ تهاجر إلى أقرب عقدة لمفية لتتعرّف عليه اللمفاويات.

٢- المستضدات الراشحة إلى العقدة اللمفية تحتجز عبر الخلايا المتغصّنة والبالعات الكبيرة في لحمة العقدة وتقوم الخلايا اللمفية في العقدة أو المهاجرة للعقدة بالتعرّف على المستضد.

يتمّ التعرّف على المستضد الوارد للعقدة سواء عبر الخلايا المقدّمة للمستضد (المتغصّنة) الواردة مع اللمف أو عبر الخلايا المتغصّنة النّاضجة في العقدة التي التقطت المستضد الجائل في اللمف الوارد والموجودة في منطقة التائيّات بتأثير المستقبل الكيموكيني الذي

تظهره CCR7 ممّا يحرض على تفعيل التائية الساذجة (naïve) القادمة عبر الدوران لمنطقة التائيات، تقوم للمفاوية التائية بمسح (scan) الخلايا المتغصنة إن كانت تحمل مستضداً أو لا، في حال تعرفت للمفاوية التائية الساذجة (naïve) على مستضد تحمله الخلية المتغصنة عندها تحصل جملة انقسامات وتمايزات لها لتعطي للمفاوية التائية الذاكرة memory T cell والفاعلة effector T cell ، في حال لم تتعرف للمفاوية التائية على مستضد فإنها تترك العقدة وتعود للدوران وتدخل إلى عقدة أخرى.

تبقى الخلايا للمفاويات التائية والبائية محتجزة في أماكنها في العقدة (منطقة التائيات ومنطقة البائيات) وذلك تبعاً لسيطرة الكيموكينات ومستقبلات هذه الكيموكينات على للمفاويات التائية والبائية، يستمر هذا الوضع حتى يأتي أوان الانجذاب وذلك بتحريض الأضداد، فتجذب للمفاويات التائية والبائية وتهاجر كل منهما باتجاه الأخرى وعند الالتقاء تتفاعل للمفاوية البائية. المرحلة التالية هي مصير كل من للمفاويات التائية والبائية حيث تهاجر الخلايا للمفاوية التائية الجديدة إلى الجيوب اللبية، ثم تخرج من العقدة إلى منطقة عرض المستضد (الانتان)، في حين تهاجر للمفاوية البائية المفعلة إلى الأجرة الأولية وتتكاثر مشكّلة مراكز نتوجة تعرف بالأجرة الثانوية. الخلايا للمفاوية البائية المتكونة حديثاً تتمايز إما إلى لمفاوية بائية ذاكرة أو إلى لمفاوية مصورية وتهاجر من القشر إلى اللب لتشكل الحجب اللبية، تبقى ١٠% من الخلايا للمفاوية المصورية المتكونة حديثاً في اللب وتحرر أضداداً ضمن جيوب اللب، في حين أن البقية تدخل الجيوب وتذهب لنقي العظم وتستمر في تصنيع الأضداد حتى تموت. تبقى بعض للمفاويات البائيات الذاكرة في الأجرة الأولية ولكن أغلبها يهاجر العقدة لتتجمع في الأعضاء اللمفية الثانوية الأخرى في الجسم بالتالي في حال حدث تعرض ثانٍ لنفس المستضد فإن عدداً كبيراً من الخلايا الذاكرة يكون متاحاً ويمنح الجسم الدفاع الثانوي (Abbas, 2005).

حركية الخلايا اللمفية الساذجة :naïve lymphocyte

تتجول الخلايا اللمفاوية بشكل دائم في الدم واللمف من النسيج اللمفية المحيطة إلى نسيج آخر من ثم إلى مواقع التهابية وهذا ما يسمى بدوران الخلايا اللمفاوية lymphocyte recirculation (الشكل ٩).

إن الآلية التي تدخل فيها زمرة من الخلايا اللمفاوية بشكل انتقائي إلى نسيج دون أخرى تدعى بعودة اللمفاوية للموطن lymphocyte homing (Abbas, 2005).

لدوران الخلايا اللمفاوية فوائد في المناعة المكتسبة هي:

- تسمح لعدد محدد من اللمفاويات المختصة بمستضد معين أن تبحث عنه ضمن الجسم.
- تضمن هذه الطريقة وصول زمرة من اللمفاويات لنسيج معينة حيث تكون مطلوبة للاستجابة المناعية المكتسبة ولا تضيع سدى.

تختلف طرق دوران اللمفاويات الساذجة (naïve) والموجودة في النسيج والأعضاء اللمفية المحيطة عن اللمفاويات الذاكرة والفعالة الموجودة في النسيج المحيطة المعرضة للخمج والالتهاب وهذه طرق أساسية لتطور الاستجابات المناعية.

هذا الدوران والهجرة للنسج متواسط بـ:

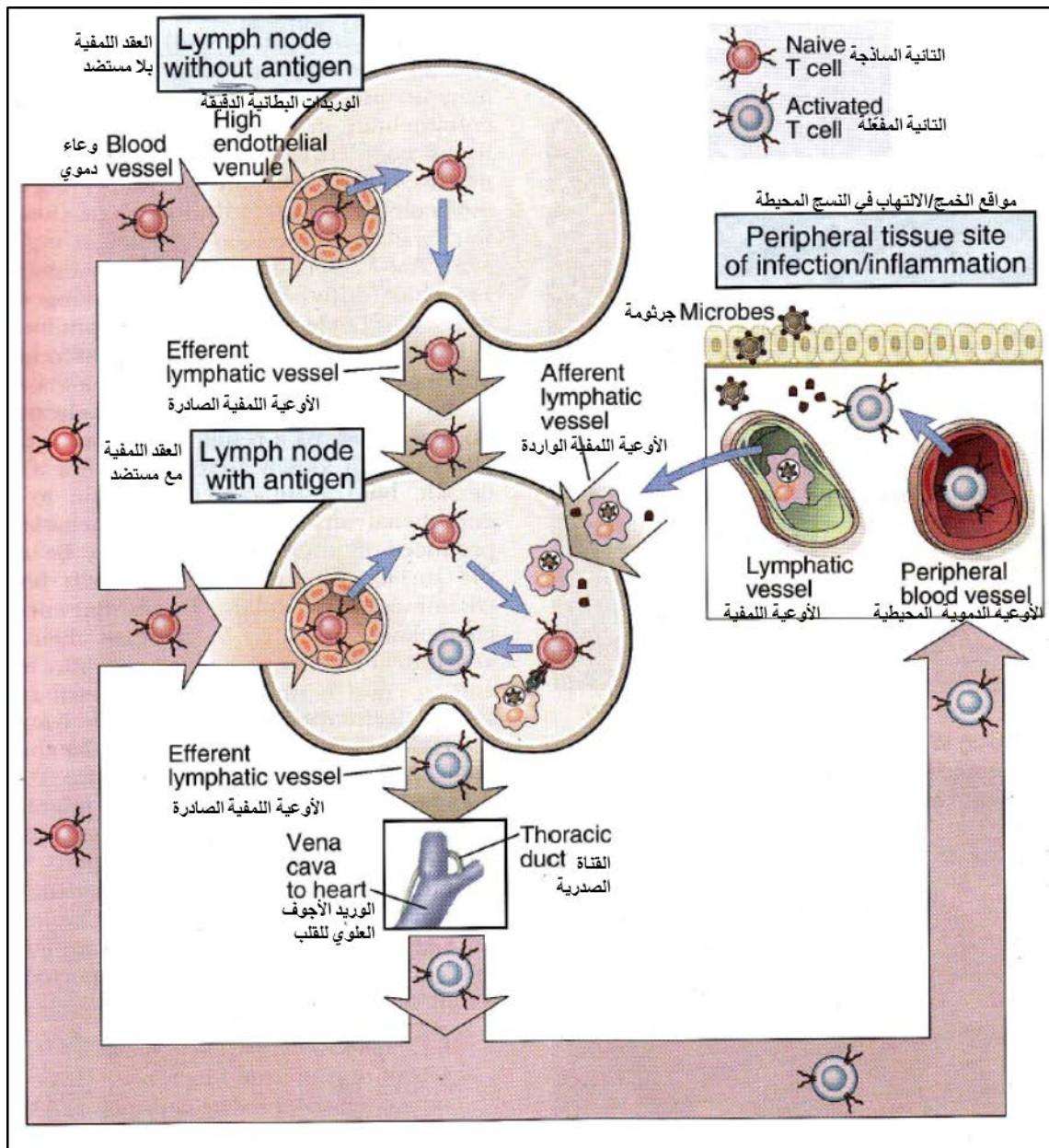
- جزيئات لصق adhesion molecule الموجودة على:

- اللمفاويات.

- الخلايا البطانية (هذا الالتصاق يقرر لأي نسيج ستهاجر اللمفاويات).

- القالب خارج الخلوي ECM (هذا الالتصاق يقرر زمن بقاء اللمفاويات بالنسج خارج الأوعية قبل عودتها إليها).

- كيموكينات chemokines: تنتج في الخلايا البطانية والنسج (Abbas, 2005).



الشكل ٩ دوران الخلايا اللمفاوية lymphocyte recirculation تترك التانيات الساذجة (naïve) الدم وتدخل العقدة اللمفية عبر ال HEVs، تحمل المتغصنة المستضد وتدخل العقدة عبر الأوردة اللمفية، إذا استطاعت التائية التعرف على المستضد فإنها تتفعل وتعود حينها للدوران عبر الأوردة الصادرة والقناة الصدرية والتي تفرغ محتواها في الوريد الأجوف العلوي ومنه للقلب وفي النهاية في الدوران الشرياني. تغادر التانيات الفاعلة والذاكرة الدم انتقائياً وتدخل النسيج المحيطة عبر الوريدات لمواقع الالتهاب (Abbas, 2005).

٤ - الكيموكينات ومستقبلات الكيموكين Chemokines and

:Chemokine Receptors

٤-١ الكيموكينات Chemokines:

اشتق اسم الـ (Chemokine) من اندماج كلمتين chemotactic cytokine أي السيتوكينات الجاذبة، بالتالي هي جزء من عائلة السيتوكينات الكبيرة المتشابهة بنيوياً، تتسبب في حركة الكريات البيضاء (الهجرة المباشرة) من الدم للنسج وتنظمها تحت تأثير ممال تركيزها (chemokine gradient)، تتدخل كلاً من السيتوكينات الالتهابية وعوامل النمو ومحرضات مرضية في التأثير على الكيموكينات (Rossi and Zlotnik, 2000, Murphy et al., 2000, Zlotnik and Yoshie, 2000).

تنتج بعض الكيموكينات من خلايا متعددة مما يساعد على استدعاء الكريات البيضاء كاستجابة للتحريض الالتهابي، كما تنتج بعض الكيموكينات في نسج متعددة مما يتسبب في استدعاء الكريات البيضاء (وخاصة اللمفاوية) للنسج حتى مع غياب الالتهاب (Abbas, 2005).

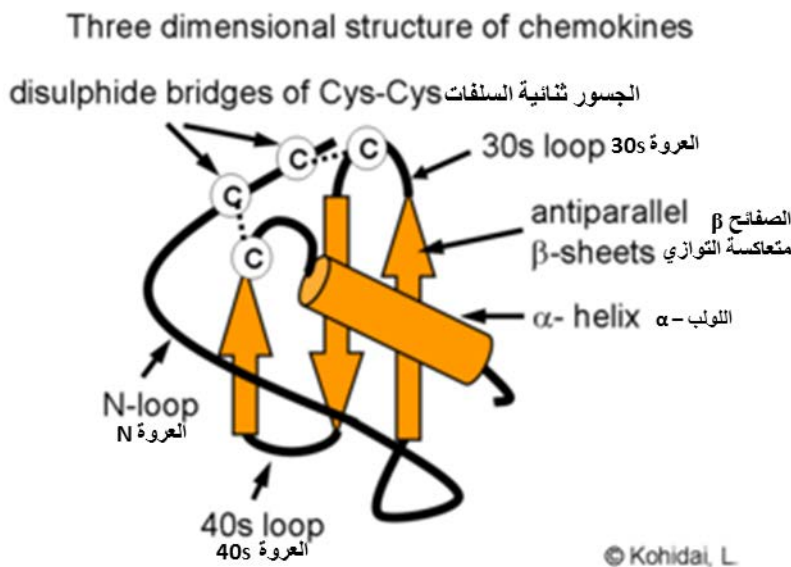
ترتبط الكيموكينات مع مستقبلات خاصة بها على خلايا خاصة سنأتي على ذكرها فيما بعد.

٤-١-١ بنية الكيموكينات Chemokines Structure:

تتألف كافة الكيموكينات من ببتيدات ذات كتلة جزيئية من ٨-١٢ كيلودالتون، يوصف شكلها الفراغي أنه يحتوي على عروة تشبه المفتاح الروماني و ٣ صفائح β ورابطتين ثنائية السلفات بين السيستئين (الشكل ١٠).

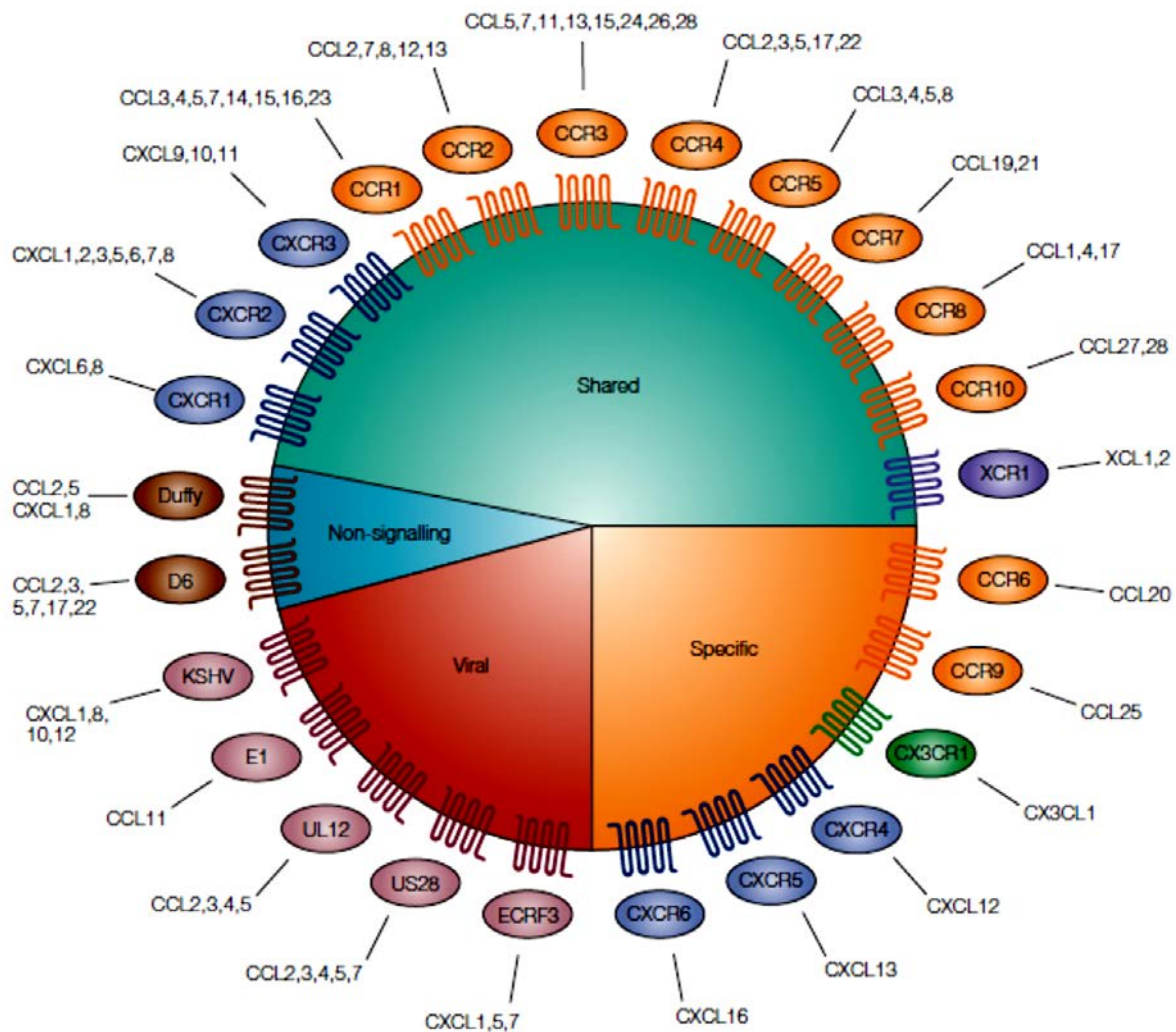
تصنف الكيموكينات في ٤ عائلات معتمدة على عدد وموضع ثمالات السيستئين في النهاية الأمينية. هذه العائلات هي :

CC، وCXC، وC، وCX3C (والـ x هو أي حمض أميني) (Balkwill, 2004)



الشكل ١٠ الشكل الفراغي-ثلاثي الأبعاد للكيموكين

تم اكتشاف أكثر من ٥٠ كيموكيناً بشرياً حتى الآن (الشكل ١١) وتتنوع في ارتباطها بمستقبلات الكيموكين chemokine receptors فإما أن يكون كيموكيناً واحداً مخصصاً لمستقبل واحد وهي (CCR6,CCR9,CX3CR1,CXCR4,CXCR5,CXCR6) أو أن يشترك أكثر من كيموكين بمستقبل واحد وهي (CXCR1 ,CXCR2 ,CXCR3 ,CCR1 (CCR2 ,CCR3 ,CCR4 ,CCR5 ,CCR7 ,CCR8 ,CCR10,XCR1) ويعتبر كلاً من (D6, Duffy) مستقبلات كيموكينية لا تحرض إشارة.



الشكل ١١ يوضح الارتباط كيموكين - مستقبل الكيموكين البشري، بعض مستقبلات الكيموكين تربط عدة كيموكينات (CXCR1, CXCR2, CXCR3, CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR7, CCR8, CCR10, XCR1) في حين مستقبلات أخرى تربط كيموكين واحد (CCR6, CCR9, CX3CR1, CXCR4, CXCR5, CXCR6)، يعتبر كلاً من (D6, Duffy) مستقبلات كيموكين لا تعرض إشارة.

٤-١-٢ وظائف الكيموكينات Chemokines Functions :

١- جذب خلايا المضيف الدفاعية لمواقع الانتان:

ارتبط اسم مجموعة من الكيموكينات بالالتهاب لذا تعرف بالكيموكينات الالتهابية Inflammatory Chemokines وهي تنتج تحت تأثير الالتهاب والمحرضات الالتهابية كالـ LPS, TNF-alpha, IL-1, أو الحمات الراشحة، و تشكل كلاً من الكيموكينات CXCL8, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL11, CXCL10 مثلاً عنها، حيث تلتصق الكيموكينات على البروتينوغليكان هيباران سلفات في الخلايا البطانية وبهذه الطريقة تصل للكريات البيضاء الجائلة فتزيد من ألفة الانتغرينات عليها وهي خطوة هامة لالتصاق قوي للكريات البيضاء على الخلايا البطانية ومنها لهجرتها نحو نسيج عالية التوعية في مواقع الالتهاب.

وتحفز الكيموكينات حركة الكريات البيضاء نحو ممال تركيزها الكيماوي وذلك عبر تعديلات تسببها الكيموكينات في ليبفات الكولاجين فتحولها من مبلمة إلى غير مبلمة.

تؤثر العديد من الكيموكينات بخلايا مختلفة مما يضبط الآلية الالتهابية فمنها ما يحضر الخلايا العدلة neutrophil ومنها ما يحضر الخلايا الحمضة eosinophil.

٢- تنظم حركة الخلايا اللمفاوية وغيرها من الكريات البيضاء إلى النسيج اللمفية المحيطة : حيث ارتبط اسم مجموعة من الكيموكينات بهجرة الخلايا الدموية البيضاء لذا دعيت باسم الكيموكينات الاستتبابية Homeostatic Chemokines، والتي تعتبر الكيموكينات CCL14, CCL19, CCL20, CCL21, CCL25, CCL27, CXCL12 and CXCL13 مثلاً عنها، وتعتمد انتقائية أنواع خلوية مختلفة لمواقع تشريحية مختلفة على البقاء الطويل للكيموكينات المنتجة في تلك المواقع وعلى نوع المستقبل التي تظهره تلك الخلايا.

٣- كما تتدخل الكيموكينات في عمليات تخلق وتطور للأعضاء والدم والتواصل العصبي بالخلايا الدبقية.

٤-٢ مستقبلات الكيموكين Chemokine Receptors:

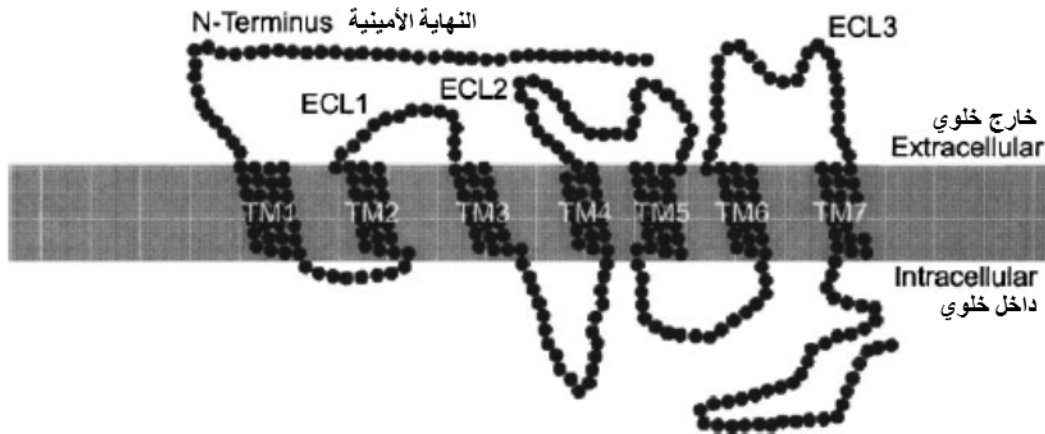
عائلة من المستقبلات المعتمدة على الغوانوزين ثلاثي الفوسفات GTP والرابطة للبروتينات غوانين Protein G، وتتبع هذه العائلة عائلة المستقبلات المرتبطة بالبروتين G (GPCRS).

يتألف مستقبل الكيموكين من ٣٤٠-٣٧٠ حمضاً أمينياً، ماتزال بنيته غامضة لكن العلماء شبّهوا جزأه عبر الغشائي بالـ rhodopsin* (Lomize et al., 1999) الذي له ٧ مجالات عبر غشائية (الشكل ١٢).

وصف ١٨ نوعاً بشرياً من مستقبلات الكيموكين والعديد منها رابط لأكثر من كيموكين أما المستقبلات الوحيدة الرابط لكيموكين واحد فهي :

CXCR4, CXCR5, CXCR6, CCR6, CCR9, CX3CR1 (Balkwill, 2004).

تتحدّد تعبيرية المستقبل في الخلايا بسلالة الخلية ومرحلة تمايزها والعوامل البيئية المحيطة مثل ممال تركيز الكيموكين ووجود السيتوكينات الالتهابية والجوع الأوكسجيني hypoxia (Balkwill, 2004)



الشكل ١٢ شكل ترسمي لمستقبل الكيموكين بمجالاته الـ ٧ عبر الغشائية والتي تظهر باللون الأسود وتأخذ الأسماء TM(1-7)

* rhodopsin: بروتين صباغي موجود في المخاريط الشبكية في العين شديد الحساسية للضوء بحيث يسمح بالرؤية في الضوء الخافت ، وهو مستقبل معتمد على البروتين G.

عادة ما يرتبط نمط تعبيرية كلاً من الكيموكين ومستقبله في النسيج بنوع وعدد الخلايا القادرة على النفوذ، فيمكن تحقيق الممال الكيموكيني المؤثر بنفاذية الخلايا من قبل تجمعات خلوية مختلفة منها كريات الدم البيضاء في النسيج والتي هي أغلب مصادر الكيموكين، ويرافقها في انتاجه الخلايا البطانية والخلايا الظهارية (النوعين السليم والسرطاني).

تبين أن الكريات البيضاء هي أكثر الخلايا اظهارةً لمستقبل الكيموكين كما أكدت الدراسات أن الخلايا البطانية وبعض الخلايا الظهارية (خاصة ذات التحول السرطاني) تظهر هذه المستقبلات أيضاً (Balkwill, 2004).

٤-٢-١ آلية تفعيل مستقبل الكيموكين Activation of the

:Chemokine Receptor

عند ارتباط المستقبل برابطته (ligand) يتحول للشكل الفعّال المفعّل لل البروتين G على الارتباط به والانفصال إلى تحت وحدتين إحداهما تحت الوحدة ألفا والثانية تحت الوحدة بيتا وغاماً، هذا الانفصال يولّد طاقة فتحل الغوانوزين ثلاثي الفوسفات GTP محل الغوانوزين ثنائي الفوسفات GDP المرتبطة بالبروتين G. إنّ كلاً من تحت الوحدتين تقدر شلالاً نسخياً من البروتينات الخلوية يصل بالخلية لمصير وطريق معين، تختلف هذه الطرق بين أنواع الخلايا ونوع المستقبل ونوع رابطته وآلية الارتباط.

ونظراً لكون مستقبلات الكيموكين ووظائفها عديدة وبطول الشرح فيها فقد اقتصرنا على ذكر المستقبلات الكيموكينية CXCR4 و CXCR5 و CCR7 المستخدمة كدراسة عملية في البحث.

٤-٣ المستقبل الكيموكيني CXCR4/CXCR4: Chemokine Receptor

مستقبل كيموكيني معتمد على البروتين G يُشفر على الصبغي ٢، يتألف - كباقي أفراد عائلته - من ٧ مجالات (أجزاء) عبر غشائية لولبية تربطها ٦ عرى خارج غشائية. يتفعل هذا المستقبل عند ارتباطه برابطته CXCL12 (SDF-1) مما يؤدي إلى:

- قدح شلال إشارة البروتين كيناز AKT/MAPK الذي ينتج عنه :

- تحريض على تعديلات تعبيرية المورثات التي تؤدي إلى بلمرة الأكتين وإعادة تنظيم الهيكل الخلوي وحركة الخلية.

- أحداث انجذابات كيميائية والتصاق.

- إفراز بروتينات حل القالب خارج الخلوي MMPs.

- إفراز عوامل حادة على تشكل الأوعية كعامل النمو البطاني الوعائي VEGF (Marquez-Curtis et al., 2001, Janowska-Wieczorek et al., 2000).

- تفعيل سلسلة إشارات من خلال تدفق الكالسيوم وفسفرة الـ MAPK p42/44 وتفعيل المحاور PI3K-AKT-NFκB (Chernock et al., Ganju et al., 1998, 2001).

- زيادة التصاق الخلايا الدموية لـ VCAM-1, ICAM-1 والفيبرونكتين والفيبرينوجين من خلال تحكمه بالعديد من الانتغرينات السطحية (Kijowski et al., 2001, Shen et al., 2001).

- أظهرت بعض المشاهدات معلومات متناقضة حول تدخل الـ SDF-1 المباشر بتكاثر ونجاة الخلايا عند دراستها على الخلايا النجمية الدبقية والسليفة النخاعية (Bagri et al., 2002, Bonavia et al., 2003)، وأظهرت إحدى الدراسات تدخل الـ

SDF-1 في كبح نمو وحث الخلايا للمفاوية التائية Jurkat^٣ على الاستماتة (Sanchez et al., 1997).

تسمح هذه الوظائف لهذا الكيموكين ومستقبله أن يتحكم بحركة الخلايا وتفاعلها مع البيئة المحيطة.

تظهر تعبيرية CXCR4 ضمن الحياة الجنينية على الخلايا المولدة (progenitor) مما يعطيها القدرة على الهجرة من مكانها الأولي إلى مكان تمايزها النهائي حيث تتمايز لتعطي العضو والنسيج المقرر لها.

حيث أثبت قديماً أنه ينظم حركة الخلايا الجذعية (المولدة) الدموية CD34+ وسليفة للمفاوية التائية والبائية (Ma et al., 1998) إلا أن الدراسات الحديثة لم تتوقف عند هذه الخلايا بل أجمعت أنه يوجد أيضاً على سطح العديد من الخلايا المولدة فلقد وجد على سطح الخلايا المنتشة البدئية primordial germ cell (Ara et al., 2003)، والخلايا العضلية الهيكلية النجمية المولدة (Pituch-Noworolska et al., 2002)، والخلايا العصبية الجذعية (Lazarini et al., 2003)، والخلايا الكبدية الجذعية (Hatch et al., 2002)، وخلايا الشبكية الصباغية الجذعية (Crane et al., 2000).

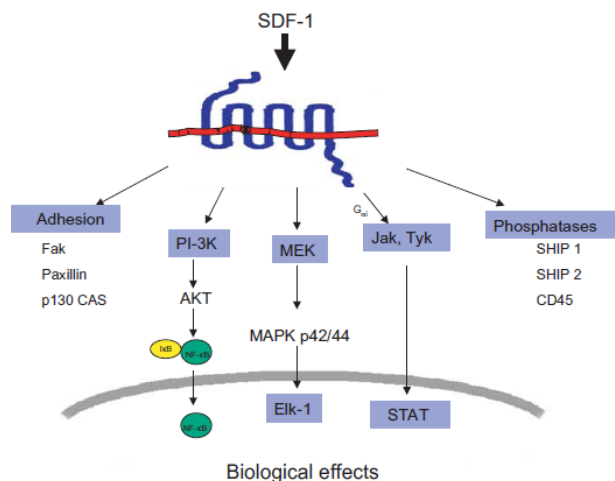
كما أظهرت الدراسات أن الـ SDF-1 رابطة الـ CXCR4 تُفرز من قبل عدة أنسجة (أعضاء) في الجسم والمصدر الأهم لها هي خلايا مصورات الليف في نقي العظام والعقد اللمفية والعضلات والرئة (Zou et al., 1998, Ratajczak et al., 2003)، كما تفرزها الخلايا الكبدية والكلوية وفي مناطق متعددة من الجهاز العصبي المركزي (Stumm et al., 2002).

^٣ خلية Jurkat: وهي سلسلة من الخلايا اللمفية التائية غير الناضجة تستعمل لدراسة اللوكيميا التائية ودراسة اشارات الخلية التائية وتعبيرية مستقبلات الكيموكين المختلفة عليها عند التعرض للحمات الراشحة (virus) خاصة الـ HIV

٤-٣-١ الإشارات المتوسطة بالارتباط CXCR4-SDF1

:CXCR4-SDF1 mediated signaling

يفعل الارتباط CXCR4-SDF1 طرق إشارات متعددة ذات نتائج حيوية مختلفة (الشكل ١٣) تختلف هذه الطرق بين أنواع الخلايا وتختلف حسب مرحلة الارتباط CXCR4-SDF1، يؤدي الارتباط CXCR4-SDF1 لتنشيط CXCR4 واندخاله بالغشاء الهيولي ضمن الطبقة الشحمية مما يجعله أكثر قدرة على الارتباط بمستقبلات سطحية أخرى (Mañes et al., 2001 Nguyen and Taub, 2002), يعتبر هذا التنشيط الخارجي مع الاندخال بالغشاء الهيولي ضروريان ليصبح المستقبل CXCR4 فعالاً.



الشكل ١٣ الطرق المفعلة بالارتباط CXCR4-SDF1 تنظم بالنهاية الحركة والانجذاب والالتصاق

من أهم الطرق التي يفعلها الارتباط CXCR4-SDF1:

- شلال MEK kinase -MAPK p42/44 من خلال فسفرته وينتج عنه الانجذاب الكيميائي (Ganju et al., 1998 Kijowski et al., 2001), وذلك من خلال تفعيل تدفق الكالسيوم و تفعيل مكونات التصاق بؤرية كالـ Pyk2 و p130Cas و paxilin ، وكينازات التصاق بؤرية كالبروتين الورمي Crk ورابطته Crk-L

وبروتين كيناز C (PKC α) (Ganju et al., 1998, Tilton et al., 2000, Chernock et al., 2001, Helbig et al., 2003, Neuhaus et al., 2003)، وتؤدي الفسفرة القوية لكينازات الالتصاق البؤرية إلى تفعيل البروتين المفعّل للانقسام MAPK p42/44 وتفعيل البروتين كيناز AKT (Libura et al., 2002, Majka et al., 2000).

- قد يحدث في بعض أنواع الخلايا تفعيل للتيروزين كيناز JAK2 و JAK3 (Ganju et al., 1998) و Tyk-2 مما يؤدي لفسفرة بعض بروتينات أفراد عائلة STAT (بروتينات الإشارة المنشطة للنسخ) والتي يعتمد نوعها على نوع الخلية فمثلاً ١,٢,٣,٥,٦ في الخلايا MOLT4* في حين ١,٣,٥,٦ في الخلايا الدموية هذا التفعيل له أهمية كبيرة تقرير مصير الخلية من انجذاب أو استماتة أو انقسام .
- كما أظهرت الدراسات أن لا CXCR4 دوراً في عمل الأنزيمات SHIP1 و SHIP2 و CD45 الخاصة بالخلايا الدموية التي لها دوراً كبيراً في تحقيق الانجذاب الكيميائي وبالتالي هجرة التائيات والبائيات السليفة كما لها دور في تمايز ونمو ودورة انقسام هذه الخلايا ، ولقد وجد الـ CD45 مرتبطاً مع الـ CXCR4 بعد تفعيله بالارتباط CXCR4-SDF1 وذلك ضمن الطبقة الشحمية للغشاء الهولي هذا الارتباط CXCR4-CD45 يمكن كبحه عند العلاج بالـ β -cyclodextrin مما يبطل الانجذاب الكيميائي (Nguyen and Taub, 2002).

٤-٤ المستقبل الكيموكيني CXCR5/CXCR5 : Chemokine Receptor

أحد أفراد عائلة المستقبلات الكيموكينية، كما يعرف باسم CD185 أو Burkitt lymphoma receptor 1 (BLR1) مستقبل لمفوما بوركت، يربط الكيموكين CXCL13 الذي يعرف أيضاً بـ BLC (B-lymphocyte chemoattractant) ويعرف أنه مرتبط بعودة بعض اللمفاويات للأجربة اللمفية.

* MOLT : اسم لنسيلة خلايا ورمية تجريبية في المختبر

تظهر تعبيريته من قبل الخلايا البائية الساذجة (naïve) والخلايا البائية في الأجرة -دون الخلايا المصورة- وجزء من الخلايا التائية الذاكرة والتي تدعى $CD4+CD45RO+$ (Legler et al., 1998, Förster et al., 1996, Forster Gunn et al., 1998a, et al., 1994, Hargreaves et al., 2001) ونادراً ما تظهر تعبيريته على الخلايا التائية $CD8+$ ويغيب على التائيات الساذجة (naïve)، مع العلم أن هذه التعبيرية خاصة بخلايا العقد اللمفية التائية والبائية، والتي تختلف في الخلايا اللمفية الجائلة في الدوران.

أظهرت الفئران ذات الانتاج المعيب للكيموكين CXCL13 أو مستقبله CXCR5 عيوباً في حجم المراكز النتوجة وتوضعها (Ansel et al., 2000, Voigt et al., 2000, Förster et al., 1996) ولكن مازالت المعلومات غير أكيدة حول كون هذه العيوب نتاج فشل هذه الفئران في تطوير أجرة أولية أو أن هذه العيوب تعكس وظيفة الكيموكين CXCL13 في المراكز النتوجة. في الدراسات المخبرية عندما تتجو الخلايا البائية في المراكز النتوجة من الاستماتة السريعة من خلال فرط تعبيريتها لمضاد الاستماتة Bcl-2 فإنها تظهر استجابة قوية للكيموكين SDF-1 و CXCL13 وذلك في المراكز النتوجة في المنطقة العاتمة dark zone أكثر منها في المنطقة النيرة light zone. تظهر تعبيرية CXCR4 أكثر على centroblast منها على ال centrocyte وهذا المستقبل ضروري لتموضع ال centroblast في المنطقة العاتمة في حين يعتبر ال CXCR5 مميزاً بمساعدته الواضحة للخلايا الإيجابية له في المنطقة النيرة لكنه لا يعتبر ضرورياً للعزل الخلوي بين المنطقتين العاتمة والنيرة (Allen et al., 2004)، كما وجد Allen في دراسته حول تموضع المستقبلين CXCR4 و CXCR5 في الأجرة الثانوية للعقد اللمفية تعاكس وجود المستقبلين على الخلايا بين مناطق مراكز الأجرة اللمفية النتوجة (Allen et al., 2004).

ظهرت تعبيرية ال CXCR5 العالية في خلايا مصورات العظم والخلايا الجذعية الميزانشيمية (MSCs) mesenchymal stem cells التي تعتمد عليه في تمايزها وسير تحركها وخاصة لأماكن التجدد (Lisignoli et al., 2006aZhang et al., 2015)،

كما تقوم الـ MSCs بدورها بالاعتماد على الـ CXCR5 بتحفيز تمايز مصورات العظم (Cristino et al., 2008b; Lisignoli et al., 2006).

كما أظهرت الدراسات أن الكيموكين CXCL13 يلعب دوراً منظماً في تعبيرية الخلايا مصورات العظم للـ RANKL (المسؤولة عن تمايز كاسرات العظم) هذه التعبيرية مع عوامل بيئية أخرى تحفز على الامتصاص العظمي للسرطان والغزو العظمي (Yuvaraj et al., 2009)

٤-٥ المستقبل الكيموكيني CCR7 / Chemokine Receptor CCR7:

يعتبر المستقبل CCR7 ورابطتيه CCL21, CCL19 أساسياً في عودة الأنماط العديدة من الخلية اللمفية التائية والخلية المتغصنة إلى العقدة اللمفية، حيث تؤسس الخلية اللمفية التائية في العقدة اللمفية اتصالاً فيزيائياً وثيقاً (close physical contacts) بالخلايا المتغصنة مما يسمح بتفعيل مستضدها الخاص antigen specific الضروري لتدخل أمثل للمناعة (optimal initiation)، أشارت الدراسات الحديثة أن الاتصال الحاصل بين الخلية التائية والمتغصنة والمعتمد على الـ CCR7 ضروري للتحمل المحيطي peripheral tolerance ولتنظيم الاستجابة المناعية من خلال تنظيم CD4+ CD25+ (أو ما يدعى بالخلية T_{Reg}^*) كما بينت الدراسات أن المستقبل CCR7 لا غنى عنه في تطور التائيّات الليموسية وفي الانتقاء السلبي في التفاعلات التائية الذاتية[#] (Förster et al., 2008).

يختلف الارتباط CCL21-CCR7 عن الارتباط CCL19-CCR7 في كون الرابطة CCL21 نهمة بنيوياً للارتباط بالغليكوزأمينوغليكان وجزيئات أخرى (Yoshida et al., 1998) مما هو ضروري لظهور أمثل للمستقبل CCR7 على سطح الخلايا البطانية في الوريدات البطانية الدقيقة (High Epithelial Venous HEVS)

* تدعى T_{REG} أو T supressor أو $CD4^+ CD25^+$ وهي نمط من الخلايا اللمفية التائية والتي تحافظ على التحمل للمستضد الذاتي وتبطل الأمراض المناعية الذاتية.

[#] عند الإنسان يتفعل حوالي 1% - 10% من الخلايا التائية في حالة حصول استجابة ضد الطعم، في فترة تطور هذه الخلايا في الغدة الصعترية يحصل إقصاء للخلايا التي تتعرف على المكونات الذاتية بعملية تسمى الانتقاء السلبي و بينما يسمح للخلايا التائية الأخرى بالاستمرار بالتطور الانتقاء الإيجابي، و هذه الخلايا الأخيرة هي التي تقوم بالتعرف على الطعم الغريب و البدء بتفاعل الرفض المناعي (أبو ترابة، أيسر. ٢٠١٢)

(Stein et al., 2000Gunn et al., 1998b) التي تظهر تعبيرية[†] لل podoplanin كما تظهر أيضاً تعبيرية[†] لل CCL21 ومن المحتمل أن ال podoplanin ينظم توفر هذه الرابطة على سطح هذه الخلايا (Kerjaschki, 2005).

تعتبر الخلية المولدة للليف الشبكية (reticular fibroblast) مصدراً للكيموكين CCL21 في المنطقة الغنية بالتأثيرات في الأعضاء اللمفية الثانوية عند الإنسان والفئران وعند الفئران في الوريدات البطانية الدقيقة (HEVS) (Carlsen et al., 2005)، سواء في الحالات الالتهابية أو الطبيعية، في حين تكون هذه الخلية المصدر الوحيد للكيموكين CCL19 في العقد اللمفية غير المصابة بالالتهاب عند الفئران والإنسان (Link et al., 2007) يعتقد أن الخلية المتغصنة المفعلة التي أُحضرت للعقدة في الحالات الالتهابية هي مصدر آخر للكيموكين CCL19 عند الإنسان (Sallusto et al., 1999b).

يظهر المستقبل CCR7 على سطح الخلايا المتغصنة الناضجة ونصف الناضجة semimature (Ohl et al., 2004)، والخلايا التاييموسية* في مراحل محددة من تطورها (Misslitz et al., 2004)، والخلايا اللمفية البائية الساذجة naïve، والخلايا اللمفية التائية (Sallusto et al., 1999aReif et al., 2002)، والخلية اللمفية التائية المنظمة T_{Reg} (Szanya et al., 2002) ونوع من الخلايا اللمفية التائية الذاكرة تدعى التائية الذاكرة المركزية (central memory T TCM) (Sallusto et al., 1999a) كما تظهره خلايا غير ناضجة في العديد من الخلايا (Shields et al., 2007).

الاشارات المتوسطة بالارتباط CCR7 - CCL21 / أو CCL19 (الطريق المعتمد على المستقبل CCR7 في عودة التأثيرات لموطنها):

[†] بروتين مخاطي وجد عند الإنسان والفئران والجرذ والكلاب والهامستر على الخلايا البطانية للأوعية اللمفية والخلايا الشبكية في اللحمية وغيرها من الخلايا، وظيفته غير واضحة إلا أن الدراسات بينت دوره في ترابط الجهازين اللمفي والقلبي الوعائي. ASTARITA, J. L., ACTON, S. E. & TURLEY, S. J. 2012. Podoplanin: emerging functions in development, the immune system, and cancer. (*Frontiers in immunology*, 3, 283).

* وهي الخلايا غير المتميزة / المولدة في التاييموس (الغدة الصعترية) والتي تتميز إلى تائية ناضجة ضمن ثلاثة أطوار لكل منها واسماتها.

تدخل التائيّات بكافة أشكالها (بما في ذلك الساذجة (naïve) والذاكرة والمنظمة) العقد اللمفيّة عبر الوريدات البطانيّة الدقيقة HEVs تتبع في ذلك خطوات تسلسليّة في الالتصاق والارتباط بالخلايا البطانيّة.

أظهرت الدراسات أن العقد اللمفيّة ولويحات باير في الفئران ذات ال CCR7 المعيب تخلو من التائيّات إلّا أنّ التائيّات تظهر في الطحال، أي أنّ التائيّات لم تعد إلى موطنها في العقد اللمفيّة عندما كان ال CCR7 معيباً، في حين أن البائيّات تهاجر إلى العقد والطحال في هذه الفئران معيبة ال CCR7 (Förster et al., 1999).

ومع أن الدراسات أثبتت أن المستقبل CCR7 هو مستقبل عودة التائيّات للموطن lymph-node homing receptor إلّا أنّ دراسات أخرى أكدت تدخله في تنظيم دوران اللمفاويّات ودخولها للتصريف اللمفي (Bromley et al., Debes et al., 2005), (2005).

كما يساهم المستقبل CCR7 في نضج الخليّة المتغنّنة بالمشاركة مع معقد التوافق النسيجي الكبير MHCII وعوامل تحريض مساعدة ك CD83, CD80 و CD86 (Dieu et al., 1998, Yanagihara et al., 1998, Sozzani et al., 1998), كما يعتقد أن له دوراً هاماً في حركتها لكن الدراسات لم تؤكد ذلك بعد.

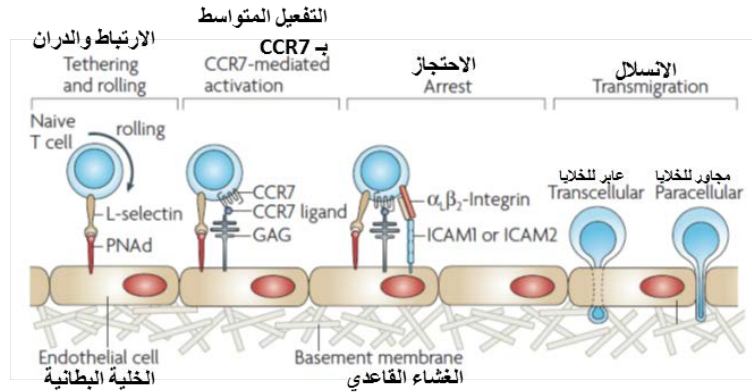
تهاجر التائيّة الساذجة naïve من الدم إلى العقد اللمفيّة المحيطة بآليّة جزيئيّة متعددة المراحل، تبدأ بالارتباط والدوران بتواسط المستقبل CCR7 (الشكل ١٤) إذ يبدأ الارتباط L-selectin على الخليّة اللمفيّة مع PNAd على الخليّة البطانيّة (HEVs) ومع الضّغط الأفقي للدوران والارتباط الوثيق السابق تدور الخليّة اللمفيّة على الخليّة البطانيّة.

تكون المرحلة التالية في ارتباط المستقبل CCR7 مع رابطته الكيموكينيّة سواء CCL21 و/أو CCL19 مع الغليكوزأمينوغليكانات السطحيّة على الخليّة البطانيّة، الذي يساعد على ثبات الارتباط كيموكين -مستقبله. ثم تحفز الإشارات المتواسطة بال CCR7 مع قوى الضّغط

الأفقي للدوران حدوث تغيرات جزيئية بالانتغرين $\alpha\beta2$ على الخلية اللمفية تسمح بارتباط قوي مع ICAM1 و ICAM2 على الخلية البطانية (HEVs).

المرحلة التالية هي تحرك الخلية اللمفية الجانبي على الخلية البطانية يتبعه الهجرة بين الخلايا البطانية (الانسلاخ) التي يعتقد أنها متواسطة بالمستقبل CCR7 لوجود رابطته على السطح اللعي والجانبي للخلية البطانية (HEVs)، ولانسلاخ طريقين إما مجاور للخلايا paracellular تتحرك فيه الخلية اللمفية حول الخلية البطانية أو عابر transcellular تنقب فيه الخلية اللمفية هيولى الخلية البطانية (Ley et al., 2007).

حالما تصل الخلية التائية الساذجة للعقدة اللمفية فإنها تتحرك على الخلايا الشبكية الضامة reticular stromal cells (Bajénoff et al., 2006) والتي تُظهر تحت المجهر ثنائي الفوتون تعبيرية للكيموكينين CCL19 و CCL21 (Link et al., 2007) الفوتون تعبيرية للكيموكينين CCL19 و CCL21 (Bardi et al., 2001) مما يجعلها تتحكم بسرعة حركة التائية الساذجة (naïve) دون اتجاهها (Okada and Cyster, 2007, Huang et al., Worbs et al., 2007). (2007).



الشكل ١٤ مراحل هجرة الخلية اللمفية : الارتباط والدوران-التفاعلات المعتمدة على المستقبل CCR7-الاحتجاز-العبور.

من الواضح الاستعمال الموظف لمستقبلات الكيموكين من قبل العقد اللمفية، فالمستقبل CCR7 ينقل الإشارات التي توجه الخلايا لمنطقة الخلايا التائية في حين يقود المستقبل CXCR5 الخلايا للأجربة اللمفية، تقوم الأجربة اللمفية بعد التفعيل بتخفيض الاستجابة downregulate CXCR5 وزيادة الاستجابة upregulate CCR7 (Reif et al.,).

(2002)، يسمح تناوب تعبيرية مستقبلات الكيموكين هذا بتتقل عابر للخلايا البائية من الأجرة نحو المنطقة تائية الخلايا حيث يتطلب تفعيل البائيات مساعدة من التائية المساعدة T_H وبالمثل يتم ظهور فئة من التائيات المساعدة تكون $CD4+ CXCR5+$ في نهاية مرحلة الاستجابة المناعية، تظهر هذه الخلايا تعبيرية أقل لـ $CCR7$ مما يسمح لها بالهجرة للأجرة البائية لمساعدتهم بتقديم الأضداد وتغيير صنف الغلوبولين المناعي immunoglobulin class switching (Arnold et al., 2007). (Hardtke et al., 2005)

٤-٦ الكيموكينات ومستقبلاتها والسرطان Chemokines and

:Chemokine Receptors on Cancer Cells

تتدخل الكيموكينات في حركية الكريات البيضاء فقد وجد أن الكيموكينين $CCL19, CCL21$ ومستقبلهما $CCR7$ مسؤولان عن جذب للمفاويات التائية للعقد اللمفية، كما يعتبر الكيموكين $CXCL13$ ومستقبلها $CXCR5$ ضروريان لدخول للمفاويات البائية للعقد اللمفية ولنضج الخلايا البائية، كما أن للمستقبل $CXCR4$ ورابطته $SDF1$ دوراً هاماً في الالتصاق والانجذاب وحل القالب خارج الخلوي وتكون الأوعية وفي هجرة الخلايا السليفة، ونظراً لاكتساب الخلايا السرطانية لخاصية الحركة والهجرة والاستقرار في أماكن مختلفة عن مكان تنشؤها بمنهجية قريبة لما يحدث للخلايا اللمفية الأمر الذي استدعى العلماء للاستقصاء عن دور الكيموكينات ومستقبلاتها في السرطانات وطرح بينهم التساؤل التالي: هل تتبع الخلايا السرطانية نهج الخلايا اللمفية لتدخل العقد اللمفية؟

وللإجابة عن هذا السؤال أجري في عام 2001 فحص لكافة مستقبلات الكيموكينات في خلايا سرطان الثدي وتبين أن التعبيرية لم تكن عشوائية وكانت تعبيرية المستقبلين $CXCR4, CCR7$ واضحة.

أجريت دراسات على نماذج سرطانية عند الفئران تبين أن تعبيرية مستقبل الكيموكين مرتبطة بارتفاع قابلية الانتقالات. وبدراسة أخرى تبين أن مضادات مستقبل الكيموكين الكابحة لنفوذية البالعات الكبيرة macrophage يمكنها وقف نمو الورم أو دفعه للاستماتة كما تمنع انتقالاته (Zlotnik, 2006).

بينت الدراسات أن لنوع وعدد مستقبلات الكيموكين التي تظهرها الخلية السرطانية دوراً هاماً في زيادة قابلية هذه الخلايا للانتقال ولتحديد مسار الانتقالات ففي دراسة علمية سبب تعديل أحد هذه المستقبلات على خلية سرطانية تحول مسار الانتقالات من العقدة اللمفية للرئة (Zlotnik, 2006).

بينت دراسات عديدة أن الخلايا السرطانية تظهر مستقبلات الكيموكينات على سطحها الغشائي، وتقوم الدراسات الحالية بربط السرطانات مع هذه المستقبلات (جدول ٤)، فمثلاً ظهرت تعبيرية المستقبل CXCR4 في معظم السرطانات حيث تم إثبات وجوده فيما لا يقل عن ٢٣ سرطاناً مختلفاً بما فيها سرطان الثدي والكولون والورم الصباغي الخبيث والسرطان شائك الخلايا (Balkwill, 2004)، والذي تكون رابطته CXCL12 أكثر تعبيرية في الرئة ونقي العظام والعقد اللمفية وبشكل أقل في الكبد والدماغ والتي هي أشيع مناطق الانتقالات للعديد من السرطانات (Zlotnik, 2006)، في حين أثبت علمياً اشتراك كلا المستقبلين CCR7, CXCR4 في الانتقالات السرطانية للكبد والرئة ونقي العظام والعقد اللمفية (Vela et al., 2015).

وجد Takanami في دراسة على خلايا سرطان الرئة non-small cell ارتباطاً شديداً بين تعبيرية المستقبل CCR7 في خلايا هذا السرطان وقدرتها على الانتشار للعقد اللمفية (Takanami, 2003).

كما وجد Shimansky النتيجة نفسها في سرطان الكولون (Schimanski et al., 2005).

وجد Wang النتيجة نفسها في سرطان شائع الخلايا للرأس والعنق بالنسبة للمستقبل CCR7 (Wang et al., 2004).

وجد Laverdiere ارتباطاً بين الغزو والإنذار السيء وتعبيرية المستقبل CXCR4 في السرطان العظمي (Laverdiere et al., 2005).

Cancer	Receptor expressed	Referances
Breast	CXCR4, CCR7	(Müller et al., 2001) (Li et al., 2004)
Overian	CXCR4	(Milliken et al., 2002)
Prostate	CXCR4	(M darash-yahana et al., 2004)
Pancreas	CXCR4	(F Marchesi et al., 2004)
Melanoma	CXCR4, CCR10, CCR7, CCR9	(Müller et al., 2001 Letsch et al., 2004, Scala et al., 2005)
Esophageal	CXCR4	(kaifi et al., 2005, Ding et al., 2003)
Lung (NSCLC)	CXCR4, CCR7	(pillips et al., 2003 , Takanami, 2003)
Head and Neck	CXCR4, CCR7, CXCR5	(Katayama et al., 2005 (Muller et al., 2006
Bladder	CXCR4	(Eisenhardt et al., 2005)
Colorectal	CXCR4, CCR7	(Kim et al., 2005 , Gunther et al., 2005 , Schimanski et al., 2005)
Osteosarcoma	CXCR4	(Laverdiere et al., 2005)
Neuroblastoma	CXCR4	Russell et al., 2004
Acute-lymphoblastic leukemia	CXCR4, CXCR3	Corcione et al., 2006
Chronic-myelogenous leukemia	CXCR4, CXCR5, CXCR3	(Burger et al., 2002, Trentin et al., 2004)
Stomach cancer	CCR7	Mashino et al., 2002

جدول ٤ : مثال عن المستقبلات الكيموكينية التي تظهرها بعض السرطانات

وجد Onoue للارتباط CXCR4/CXCL12 دوراً هاماً في التحول البشري الميزانشيمي وهي المرحلة الحاسمة ما قبل السرطانية في السرطان الفموي والتي تكتسب فيها الخلية الورمية صفات عدوانية فتفقد الاتصال الخلوي وتزداد حركيتها (Onoue et al., 2006)

كما وجد Zhang و Hermann في سرطان الكولون والبنكرياس على الترتيب ارتباطاً بين نسيلة الخلايا ايجابية الـ CXCR4 وقدرتها على التحول البشري الميزانشيمي (epithelial-mesenchymal transition EMT) وقدرتها على الانتقال فيما بعد (Hermann et al., 2007, Zhang et al., 2012).

وجد Muller بدراسة مقارنة بين سرطان الخلية العنبيّة ACC وسرطان شائع الخلايا للرأس والعنق HNSCC أن شدة تعبيرية الـ CXCR4 العالية في الـ ACC أكبر منها في الـ SCC بلغت ايجابية الـ CXCR4 في الـ SCC بالدرجات السريرية العالية ٥٨% وفي نقائلها العقدية بنسبة ٤١%، في حين بلغت نسبة ايجابية الـ CCR7 في الـ SCC بالدرجات السريرية العالية ١٠٠% (Muller et al., 2006)

وجد Uchida أن تحويل الصيغة الجينية (transfection) لـ CXCR4 بإحدى نسايل السرطان الفموي ذات القدرات الانتقالية الضعيفة يجعلها قادرة عند زرعها في نماذج دراسة فئانية على إعطاء سلالة ذات قدرات انتقالية عالية نحو العقد اللمفية دون الأعضاء البعيدة وعند حقنها mitogen activated protein (MAP) kinase inhibitors أو phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) inhibitors، كوابح الـ PI3K توقف هذا الغزو العقدي (Uchida et al., 2004).

وجد Samara أن لا CXCR4 دوراً مهماً في زيادة اللصق الخلوي وزيادة إنتاج الـ MMP9 الذي يعتبر مفتاح العبور في القلب خارج الخلوي ECM (Samara et al., 2004).

وجد Ghobrial علاقة بين انداز كلاً من اللوكيميا ذات الخلايا اللمفية البائية المزمنة (B cell chronic lymphocytic leukemia) و اللّفوما صغيرة الخلايا اللمفية

(small lymphocytic lymphoma) وتعبيرية كلاً من CXCR4 و CCR7 (Zlotnik, 2006, Ghobrial et al., 2004).

يعتبر المستقبل CCR7 وسيطاً أقوى لهجرة الخلايا السرطانية للعقد اللمفية من CXCR4 (Humrich et al., 2006) وترافقت تعبيريته مع الغزو العقدي في الكثير من السرطانات منها سرطان الثدي والكلون والمري والورم الصباغي الخبيث والسرطان شائك الخلايا (Wiley et al., 2001, Wang et al., 2004, Müller et al., 2001, Mashino et al., 2002, Ding et al., 2003)

وجد Ding أن التعبير العالية لـ CCR7 في السرطان شائك الخلايا في المري ترافق مع تزايد المعطيات السريرية من عمق الورم والتصنيف TNM والغزو العقدي Ding et al., (2003).

أظهرت الدراسات أن الخلايا السرطانية تظهر المستقبل CXCR5 والذي يعطي لهذه الخلايا عند حدوث الارتباط كيموكين/مستقبل CXCR5/CXCL13 نفوذية موضعية وهروب من الاستماتة وتكاثراً للورم (Zhang et al., 2015)

أهم العوامل التي تبين دورها في تحديد نمط تعبيرية مستقبلات الكيموكين في السرطان:
الجوع الأكسجيني hypoxia وعوامل النمو البطانية والاستروجين (بعض السرطانات)، فلقد لوحظ تحفيز تشكل مستقبل الكيموكين على الخلايا السرطانية في مواقع الانتقالات عالية الأكسجة (Balkwill, 2004) هذه العوامل لا تؤثر فقط على مستقبلات الكيموكينات التي تظهرها الخلايا السرطانية فقط إنما تؤثر أيضاً على مستقبلات الكيموكينات التي تظهرها خلايا لحمة السرطان والتي لا تكون ورمية (سواء كانت بشرية أو ضامة أو دموية) المؤلفة من البالعات الكبيرة واللمفاوية والبطانية ومصورات الليف وغيرها مما قد يوجد في بعض الأورام (Coussens and Werb, 2002, Negus et Brigati et al., 2002, al., 1997, Pollard, 2004)، هذه الخلايا مع الخلايا الورمية لهما علاقة في إنتاج كيموكينات موضعية تتسبب في نفوذية الكريات البيضاء leukocyte-infiltration، فمثلاً

تبين أن لعائلة الكيموكينات CC دوراً هاماً في نفوذية البالعات الكبيرة واللمفاويات ضمن سرطانات الثدي والبنكرياس والرحم والسرطانات الضامة والدبقية البشرية (Bottazzi et al., 1983, Balkwill and Mantovani, 2001)، في حين تتدخل في سرطانات المبيض عائلي الكيموكينات CC, CXC (Milliken Negus et al., 1995), (et al., 2002).

كما وضحت الدراسات أن خلية ريد ستيرنبرغ في لمفوما هودجكن تجذب التائية T_{H2} دون T_{H1} -بالاعتماد على كيموكينات محددة - مع العلم أن T_{H2} لا تكون فعالة عادة ضد الأورام والحمات الراشحة (virus)(Skinnider and Mak, 2002).

وقد أظهرت إحدى الدراسات أن وجود أكثر من ممال تركيزي للكيموكينات (والذي يدعى بشبكة الكيموكين chemokine network) في الأورام الصلدة يفرض رقابة دقيقة على كمية وحركة الكريات البيضاء النافذة للورم مما ينعكس على التعبيرية المحدودة لمستقبل الكيموكين (Balkwill, 2004).

إذاً تقوم اللحمية السرطانية بإفراز العديد من البروتينات منها مركبات قلبية وأنزيمات حالة وعوامل نمو وسيتوكينات قبيل التهابية وكيموكينات، تلعب هذه الأخيرة دوراً هاماً في حيوية (biology) السرطان من حيث إنتقائية نفوذية كريات الدم البيضاء وتحفيز نمو الورم وتشكل الأوعية والرد المناعي، بالمقابل تظهر العديد من الخلايا السرطانية مستقبلات كيموكينية لم تكن تظهرها في حالتها الطبيعية، تستجيب هذه المستقبلات لإشارات الكيموكينات وتتجذب لها فتتجو من رقابة العضوية بهجرتها (انتقالاتها) لمكان انتاج رباط هذه المستقبلات (Vela et al., 2015).

٤-٧ المعالجات السرطانية المناعية المعتمدة على أضداد مستقبلات

الكيموكينات Chemokine receptor-specific antibodies in :cancer immunotherapy

تتراوح المعالجات السرطانية بين جراحية وشعاعية وكيميائية غير نوعية سامة ومعالجات هدفية تهدف لمحاربة الخلايا السرطانية بتعديل البيئة المحيطة بالسرطان أو تحفيز المناعة ضد السرطان (Liotta and Kohn, 2001, Burger and Gribben, 2014, Vanneman and Dranoff, 2012)، إحدى محاولات الأبحاث العلاجية الجديدة للسرطان تهدف لتطوير أضداد وحيدة النسيلة mAbs والتي تعتبر جزيئات ذات أهمية عالية دوائياً:

- لأنها ذات نصف عمر عالٍ في الدم.
- لقدرتها على تكوين علاقات عالية الألفة مع غيرها من الجزيئات أو مع خلايا الجهاز المناعي.
- لسميتها المنخفضة نسبياً (Glassman and Balthasar, Chames et al., 2009, Scott et al., 2012, Zhang et al., 2007).

إلا أنّ الأدوية المعتمدة على الأضداد صعبة التطوير ومكلفة التطوير والانتاج ومع ذلك فقد اجتازت أشواطاً كبيرة من التقدم والنجاح الملحوظ.

تمّ تصنيف الأضداد العلاجية المستخدمة في المعالجة الوريّة إلى :

- جزيئات سطحية التعبير على الخلايا الوريّة.
- سيتوكينات وعوامل نمو ومستقبلات سطحية أو جزيئات أخرى ضرورية لنمو ونجاة الورم أو لحمته أو كليهما.
- جزيئات سطحية للخلايا المناعية ضرورية لتنظيم التعرف على خلايا الورم والتعامل معه.

وعلى هذا الأساس صُنفت الأضداد وحيدة النسيلة mAbs القاتلة للخلايا الورمية إلى (Scott et al., 2012) :

- ذات تأثير مباشر (مستقلة عن المضيف) أضداد حاملة لعوامل سمية أو لنظائر مشعة.
- ذات تأثير غير مباشر (معتمدة على المضيف) تعدل الاستجابة المناعية وهي عدة أنواع: منها السمية الخلوية المعتمدة على الأضداد ADCC ومنها السمية المعتمدة على المتممة CDC ومنها البلعمة المعتمدة على الأضداد ADP. أو ذات تأثير هدفي منظم لجزيئات في خلايا الجهاز المناعي للمضيف.

تحاول الشركات الدوائية تطوير أضداد دوائية للكيموكينات ومستقبلاتها لكن تركيبها الجزيئي جعل هذا التطوير فائق الصعوبة (Klarenbeek et al., 2013). لكن مع تطور العلم كان التقدم في تطوير أضداد دوائية لمستقبل الكيموكينات أكثر فاعلية من الأضداد الدوائية المطورة للكيموكينات نفسها (Schall and Proudfoot, Klarenbeek et al., 2013), 2011) فهذه الأضداد الدوائية لا تقطع إشارة الرابطة فقط - فلا يحدث ارتباط كيموكين مستقبل - إنما تحفز الاستجابة المناعية ضد الخلايا الورمية المرتبطة بالعدوى الدوائية، كما طورت هذه الأضداد الدوائية لمعالجة الالتهابات والأمراض الخمجية، فاستعمل anti-CCR2 لأمراض الرثية وتصلب الشرايين (Vergunst et al., 2008)، واستعمل anti-CCR3 و anti-CCR4 للربو والتهابات القصبات (Catley et Ben et al., 2008), 2007, Wang et al., 2009, Perros et al., 2011, al.)، كما استعمل anti-CXCR4 و anti-CCR5 للأخماج بفيروس الـ HIV (Carnec et al., 2005), 2009 (Olson and Jacobson)، كما استعمل anti-CCR7 للتليف الرئوي (Pierce et al., 2007). تمّ تطوير ضد دوائي لـ CXCR4 سريرياً على المرضى البشر في حين ما يزال الضدين الدوائيين لـ CCR7 و CXCR5 ضمن التجارب تحت السريرية، فلقد نجح علماء يابان بعد مشوار طويل بإيجاد دواء هو ضد لمستقبل الكيموكين CXCR4 سمي (Moganulizumab) وتمّ من خلاله علاج اللوكيميا التائية والمفوما

(Vela et al., 2015) وتهدف الدراسات التالية لتطوير أدوية مماثلة معالجة لكل نوع سرطاني على حدى.

الباب الثاني المواد والطرق

Materials and Methods

١ - المواد:

١-١ العينة:

١-١-١ تصميم الدراسة:

دراستنا هي دراسة مقارنة (Case\Control Comparatative Study):تشمل كلاً من:
دراسة تأثير نوع الخزعة النسيجية (سرطانية/ شاهدة) والبروتين المدروس على فرط التعبيرية
(المعطى الثابت هو نوع الخزعة والمعطى المتغير نوع البروتين)

١-١-٢ حجم العينة:

شملت العينة ١٤٧ خزعة نسيجية تم تقسيمها الى مجموعتين:

- المجموعة المرضية: تألفت من ٦٠ خزعة لـ ٦٠ حالة سرطان شائك الخلايا للرأس والعنق أولي {موزعة حسب الجدول (٥) تبعاً للدرجة السريرية} منها ٣٠ حالة ورم أولي ضمن الدرجة الأولى والثانية من التصنيف السريري حسب WHO (أي بدون نقائل عقدية)، و ٣٠ حالة ورم أولي اندرجت ضمن الدرجة الثالثة والرابعة في التصنيف السريري.

كما تألفت من ٧٧ خزعة لـ ٧٧ حالة نقيلة للعقد اللمفية الرقبية التابعة للدرجات السريرية الثالثة والرابعة، أي أنّ المجموع الكلي للخزعات المدرسة ١٣٧ خزعة موزعة بين ورم أولي ونقيلة عقدية.

أخذت العينات من مرضى مشفى المواساة غير الخاضعين لعلاجات كيميائية أو شعاعية سابقة بين عامي ٢٠١٢-٢٠١٥، وبمراعاة أخلاقيات البحث العلمي من موافقة الجهات المسؤولة.

- المجموعة الشّاهدة: تألفت من ١٠ خزعات لـ ١٠ حالات من بشرة فموية سليمة أخذت من كلية طب الأسنان جامعة دمشق.

بالتالي تمّ توزيع العيّنة كما هو مبين بـ (الجدول ٥):

المجموعة الشّاهدة ١٠ بشرة فموية سليمة	المجموعة المرضية ١٣٧ سرطان شائك الخلايا			
	الدرجة ٤ ٩٠ حالة		الدرجة ٣ ١٧ حالة	
	الدرجة ٢ ١١		الدرجة ١ ١٩	
	١٩ ورم أولي		١١ ورم أولي	
	٣٠ ورم أولي بين الدرجتين (٣-٤) السريريتين		٣٠ ورم أولي بين الدرجتين (١-٢) السريريتين	
	٦٩ نقائل عقدية		٩٠ نقائل	
	٢١ أولي		٩ أولي	
	٧٧ نقيلة عقدية بين الدرجتين (٣-٤) السريريتين		٨ نقائل	

جدول ٥ توزيع العيّنة

١-١-٣ شروط انتقاء العيّنة:

- وجود الدّرجات السريريّة الأربعة كتصنيف أساسي (٣٠ حالة من الدرجتين السريريتين ٢-١ و ٣٠ حالة من الدرجتين السريريتين ٣-٤)
- تمّ أخذ النّقائل العقدية النّاحية لكل من الدرجتين الثالثة والرابعة (الدّرجة ٣ نقيلة واحدة حسب تصنيف WHO والدّرجة الرابعة كل حالة لها وضعها الخاص من حيث عدد النّقائل)
- بالنسبة للدرجة النسيجية (كتصنيف ثانوي) راعينا وجود درجات الخباثة النسيجية جميعاً

١-٢ مواد البحث:

- ١-٢-١ مجموعة التلوين المناعي النسيجي المفرد single stain kit من شركة (BIO SB - الأمريكية) كاف لتلوين ٣٦٦ سلايد تحتوي على (الشكل ١٥):

- محلول كبح البيروكسيداز anti- rabbit/mouse Polydetector peroxidase blocker ٣٠مل جاهز للاستعمال.
- ضد ثانوي ضد-أرنب/فأر anti- rabbit/mouse Polydetector HRP (Horseradish Peroxidase) label ٣٠مل. جاهز للاستعمال
- anti- rabbit/mouse Polydetector DAB Buffer ٣٠مل. جاهز للاستعمال.
- Polydetector DAB chromogen ٦مل. جاهز للاستعمال.
- ١-٢-٢ محلول استرجاع المستضد antigen retrieval ، ٢ل ، جاهز للاستعمال
- ١-٢-٣ أقراص السائل الدائري: Phosphate Buffer Solution PBS يتم حلها بماء مقطر حسب ارشادات الشركة المصنعة (الشكل ١٥)
- ١-٢-٤ ضد متعدد النسائل للـ CXCR4 البشري 2,392mg/ml بتمديد 1/500 (من شركة abcam - البريطانية) (الشكل ١٦)
- ١-٢-٥ ضد متعدد النسائل للـ CXCR5 البشري 1mg/ml بتمديد 1ug/ml (من شركة abcam - البريطانية) (الشكل ١٦)
- ١-٢-٦ ضد متعدد النسائل للـ CCR7 البشري 0,50mg/ml بتمديد 1/100 (من شركة abcam - البريطانية) (الشكل ١٦)
- ١-٢-٧ قلم التحديد Dako Pen (الشكل ١٧)
- ١-٢-٨ المواد الأخرى : كزيلول، كحول، ماء مقطر، بلسم كندا، الملونات النسيجية التقليدية: الهيماتوكسولين والأيوزين.



الشكل ١٥ كيت التلوين المناعي المفرد وأقراص السائل الدائري TBS



الشكل ١٦ الأضداد الأولية من اليمين CCR7 – CXCR4 – CXCR5



الشكل ١٧ قلم التحديد من Dako

٣.١ - الأجهزة والأدوات المستخدمة:

صفائح slids- وصفائح مناعية immunoslids- وساترات- والمبشرة النسيجية Microtome (الشكل ١٨) - ومحمّ مائي لفرش المقاطع النسيجية (LEICA RM 2155، ألمانيا) (الشكل ١٧) - وفرن التجفيف (Necht drehen، ألمانيا) (الشكل ١٨) - ومايكروويف -

والمجهر الضوئي (NIKON SE، يابان) (الشكل ١٨) -وممص pipet عدد ٢ بقياس ٠,١-١٠
 ١٠ ميكرون وقياس ١٠-١٠٠ ميكرون (eppendorf-أمريكا) (الشكل ١٩)- ورؤوس
 ممصات قياس ١٠ وقياس ١٠٠- وسحاحة عدد ٢- وقطن.



الشكل ١٨ يوضح الأجهزة المستخدمة في البحث : أ المباشرة النسيجية، ب المحم المائي، ج الفرن الحراري، د المجهر الضوئي.



الشكل ١٩ الممص pipet : السفلي بقياس ٠,١-١٠ ميكرون والعلوي بقياس ١٠-١٠٠ ميكرون مع رؤوسهما.

٢- الطرق:

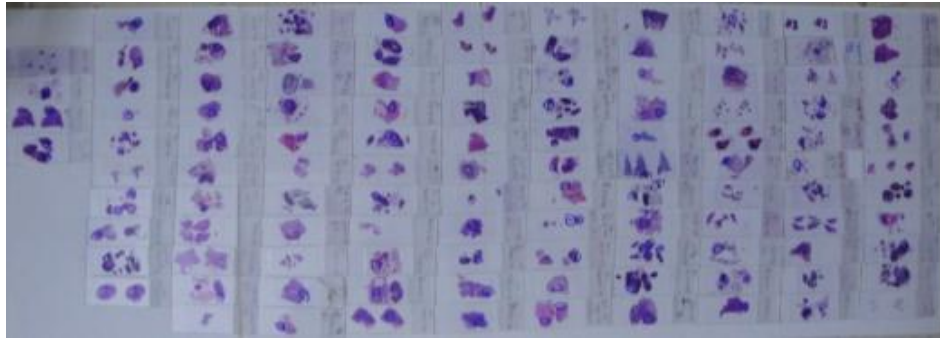
١.٢- التلوين التقليدي:

- تمّ قطع العينات المصبوبة في القوالب الشمعية بواسطة المبشرة النسيجية (microtome) بسماكة ٥ ميكرون ، ٤ شرائح من كل مقطع.
- توضع الشرائح في محم مائي بدرجة حرارة ٣٠°م لإزالة التجمدات ولتحميلها على الصفائح الزجاجية.
- تفرش ٣ شرائح على صفائح (slides) زجاجية خاصة مطلية باللاصق المناعي وذلك لتلوينها بالملونات المناعية والتي سيتم شرحها في الفقرة التالية.
- تفرش الشريحة الرابعة على صفيحة (slide) زجاجية عادية بالتالي نحصل على ١٢٢ شريحة لـ ١٢٢ مقطعاً نسيجياً (عينة البحث) والتي سنتابع فيها هذه الخطوة.
- توضع الشرائح على صفيحة حرارية لربع ساعة ممّا يقلل التجميدات في الشرائح للحد الأدنى
- توضع الشرائح في فرن حراري بدرجة ٦٠°م.
- تمرر المحضرات على ثلاثة أحواض من الكزيلول لإزالة الشمع المتبقي
- ثمّ تمرر على ثلاثة أحواض من الكحول بتركيزات متدرجة لطرد الكزيلول لمدة ٦ دقائق.
- تغسل المحضرات بالماء الجاري لمدة ٥ دقائق لطرد الكحول.
- توضع المحضرات في الهيماتوكسيلين لمدة دقيقة
- تغسل المحضرات بالماء لمدة دقيقة
- توضع المحضرات بالأيوزين لمدة ٣٠ ثانية
- تغسل المحضرات بالماء بشكل جيد
- توضع المحضرات بالكحول ٧٠% لمدة دقيقة، ثمّ ٩٥% لمدة دقيقة، ثمّ الكحول المطلق مرتين كل مرة لمدة دقيقة واحدة، وذلك لنزع الماء من النسيج.
- توضع المحضرات في ٣ أحواض كزيلول متدرجة في التناوة لمدة ١٠د في كلّ منها.
- تترك المحضرات لتجف.

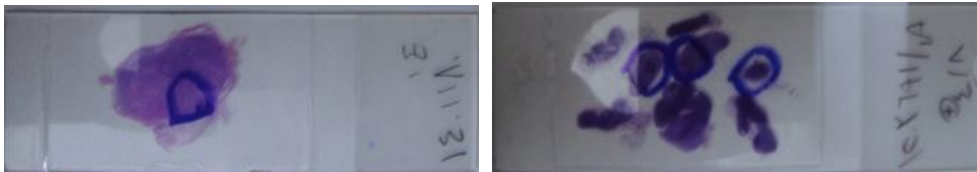
- تستر المحضرات بوضع قطرة من بلسم كندا بالقرب من المقطع النسيجي من ثمّ توضع الساترة ويضغط عليها بلطف لإزالة الفقاعات المتشكلة.
- تزال بقايا بلسم كندا المحيطة بالساترة بواسطة قطنة مبللة بالكزيلول وتكون بالتالي المحضرات جاهزة للدراسة تحت المجهر (الشكل ٢٠).

٢-٢ دراسة السلايدات الهيماتوكسيلين أيوزين :

- الورم الأولي: تمت دراسة السلايدات الملونة بالهيماتوكسيلين أيوزين للورم الأولي، وتمّ تحديد الدّرجة النسيجيّة من قبل مراقبين مستقلّين وصنفت ضمن جداول الدراسة كما تمّ تحديد الجزء الكافي من الورم للدراسة، وعلى أساسه تمّ قطع الشرائح الشمعيّة وإبقاء من النّسيج ماهو سرطاني وكافٍ للدراسة وإزالة الباقي بشفرة حادة (الشكل ٢١)
- العقد اللمفيّة: تمت دراسة السلايدات الملونة بالهيماتوكسيلين أيوزين H&E لكافة العقد اللمفيّة وتحديد الأجزاء المصابة منها وعلى أساس دراستنا تمّ قطع الشرائح الشمعيّة وإبقاء العقد المصابة وإزالة الأجزاء والعقد السليمة منها بشفرة حادة (الشكل ٢١)



الشكل ٢٠ العينة كاملة ملونة بالهيماتوكسيلين أيوزين ومحدد الجزء النسيجي المراد تلوينه



الشكل ٢١ لشريحتين نسيجيتين ملونتين بال H&E بعد دراستها وتحديد الجزء النسيجي المراد تلوينه أو العقد المصابة المراد تلوينها والجزء المتبقي يتمّ إزالته بشفرة حادة.

٢-٣ تلوين العينات بالكواشف المناعية

• إزالة شمع البارافين :

بعد التقطيع بالمبشرة النسيجية وتجهيز السلايدات بالطريقة التي سبق ذكرها تسخن الشرائح في فرن بدرجة حرارة 58 درجة مئوية لمدة ساعتين، ثم تمرر الشرائح في سلسلة من الحمامات تتضمن حمامين من الكزيلول لمدة 3-5 دقائق لكل منهما، ليتبع بثلاثة حمامات من الكحول تبدأ بالكحول المطلق ثم الكحول 95 % ، ومن ثم 70 % لمدة 3 دقائق لكل حمام بعدها تغسل الشرائح بالماء الجاري بلطف.

• عملية استرجاع المستضد :

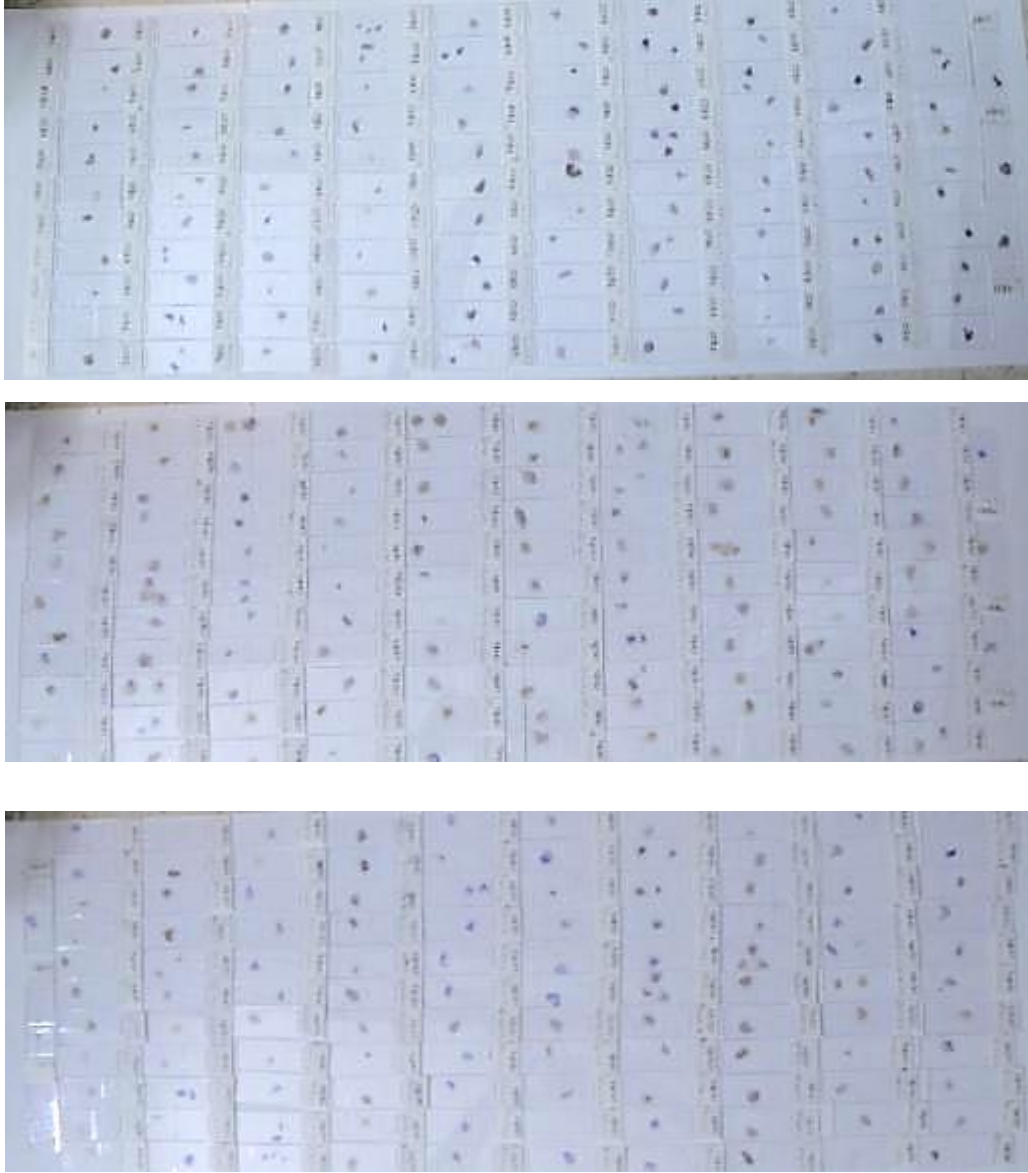
وضعت الشرائح ضمن وعاء يحوي كمية كافية من محلول استرجاع المستضد وغمرت الشرائح فيه بشكل كامل.

• وضع الوعاء في الميكرويف لمدة 15 دقيقة (حوالي 10 دقائق بعد الغليان)، ثم ترك بعدها لحوالي (15-20 دقيقة) ليبرد في درجة حرارة الغرفة. ثم وضعت الشرائح في حوض يحوي السائل الدارئ PBS (المحضر مسبقاً) لمدة 5 دقائق، ثم نقلت إلى حوض آخر يحوي السائل الدارئ أيضاً PBS لمدة 3 دقائق مع الانتباه لعدم جفاف المقاطع النسيجية خلال مراحل التلوين كافة.

• تطبيق: Peroxidase Blocker

يزال المحلول الدارئ PBS الزائد ويمسح حول العينة بلطف، ويتم استخدام قلم التحديد من DAKO لتحديد حول المقاطع النسيجية بهدف منع تسرب المواد المطبقة خارج النسيج . وطبقت المادة بواسطة الممص Eppendorf بحيث غطيت كامل العينة وتركت 5 دقائق. غسلت الشرائح بعدها بالمحلول الدارئ PBS مع تجنب الغسيل المباشر للعينة النسيجية، ثم وضعت في حمام جديد من السائل الدارئ لمدة 5 دقائق.

- تطبيق الضد الأولي: primary antibody
حضرت الأضداد الأولية ومددت بالسائل الداري PBS حسب التراكيز المذكورة سابقاً، وبعدها أزيل المحلول الداري الزائد مع المسح حول العينة بلطف. ثم طبق الضد الأولي CXCR4/CCR7/CXCR5 (كل على حدى) بواسطة الممص بحيث تغطي كامل العينة. وكان زمن الحضانة 30 دقيقة. غسلت بعدها الشرائح بالمحلول الداري ووضعت في حوض من السائل الداري لمدة 5 دقائق.
- تطبيق HRP Label وحضنه لمدة ٤٥ دقيقة يغسل بعدها بالسائل الداري لمدة ٥ دقائق.
- تطبيق: DAB
حُضر حسب توصيات الشركة المنتجة (1 مل من SUBSTRATE BUFFER مقابل 20 ميكرونياً من DAB CHROMOGEN) مع المزج جيداً ضمن عبوة مناسبة، كذلك أزيل المحلول الداري من حول العينة وطبقت المادة بلطف بواسطة الممص بحيث تغطي 1 مل العينة وحضنه لمدة 10 دقائق، ثم غسلت الشرائح بالماء بلطف.
- ثم طبق الهيماتوكسيلين مايرز على العينات لمدة تقارب 30 ثانية ثم غسلت بالماء.
- بعدها مررت الشرائح بحمامات متتالية من الكحول ثم كحول مطلق (كل حمام لمدة 3 - 5 دقائق) ثم حمامين من الكزيلول 3-5 (دقائق لكل منها)، وفي النهاية سترت العينات ببلم كندا وأصبحت جاهزة للدراسة المناعية (الشكل ٢٢).
تم تلوين عينات مراقبة PILOT STUDY وتحديد الـ PH السائل الداري المناسب لكل ضد أولي وتحديد التركيز المناسب له ثم تابعنا التلوين المناعي لباقي عينة الدراسة.



الشكل ٢٢ العينة كاملة ملونة بالملونات الثلاثة ١- CCR7 ٢- CXCR4 ٣- CXCR5

٢-٤ قياسات الدراسة النسيجية الكيميائية المناعية :

Immunohistochemical Study Measurements

تمّ تقييم النتائج من قبل مراقبين مستقلين وتمّ تفسير البيانات تبعاً لمعايير العد في الأورام، حيث تمّ تقييم نسبة الخلايا المتلونة مع شدة التلون مجتمعة، كما تمّ احتساب النسبة المئوية للخلايا المتلونة من مجموع خلايا الورم كاملة عند التكبير العالي x40 في ٤ ساحات مجهرية عشوائية منفصلة وتشمل معظم أجزاء العينة

(Ding et al., 2003) وبذلك كان وسطي عدد الخلايا المدروسة في كل شريحة ٤٠٠ خلية وذلك لتراوح العينات بين ساحات ورمية محدودة وساحات غنية بالخلايا الورمية.

إن الأضداد الثلاثة المدروسة في البحث تنتمي لعائلة واحدة وهي مستقبل الكيموكين فلها الخصائص النسيجية نفسها لذا اتبعت على الأضداد الثلاثة الطريقة ذاتها في الدراسة، أما الخلايا التي اعتبرت إيجابية فتلك التي تظهر التعبير الغشائي والهيولية معاً أو الغشائية فقط وأهملت الخلايا التي تظهر التعبير الهيولية فقط - وذلك لأن المستضد الفعال هو الغشائي- في الخلايا الظهارية الشائكة الورمية في سرطان شائك الخلايا والشاهدة في البشرة الطبيعية. أما الشدة اللونية فقيمت بين العالية والمتوسطة والضعيفة.

٥-٢ الدراسة الإحصائية :

تمّ استخدام برنامج R statistical programming language v.3 للتحليل الإحصائي للبيانات ، كما استعنا ببرنامج (MS Excel 2010) لإنجاز الرسوم البيانية.

إن الطرائق الإحصائية التي تمّ استخدامها في تحليل البيانات هي :

١-٥-٢ اختبار تحليل التباين (One-Way ANOVA) :

اختبار إحصائي يستخدم لدراسة الفروق بين متوسطات عدة عينات مستقلة ، أي مقارنة معيار معين بين عدة مجموعات منفصلة ، حيث تحسب قيمة المعنوية (P-value) من إحصاء الاختبار (F) ثم نقارنها بالقيمة ($\alpha=0.05$) ، فإذا كانت (P-value < 0.05) فإن الاختبار معنوي ونقبل الفرضية البديلة H1 بثقة 95 % . ويمكن صياغة الفرضيات التي يختبرها بالشكل التالي :

فرضية العدم H_0 : العينات المدروسة تعود إلى المجتمع نفسه ، أي لا يوجد فرق معنوي بين العينات أو لا توجد فروق معنوية بين متوسطات المجموعات.

الفرضية البديلة H_1 : العينات المدروسة تعود إلى مجتمعات مختلفة ، أي يوجد فرق معنوي بين العينات أو توجد فروق معنوية بين متوسطات المجموعات.

فكانت دراستنا مثلاً حول وجود فروق في تعبيرية كل ملون في الورم بين متغيرات عديدة كدرجات حجم الورم و درجات النقايل العقدية والدرجات السريرية والدرجات النسيجية فكانت الفرضيات :

H_0 لا يوجد فروق في تعبيرية كل ملون على حدى بين الدرجات في كل متغير على حدى.

H_1 يوجد فروق في تعبيرية كل ملون على حدى بين الدرجات في كل متغير على حدى. وفي حال وجود فروق معنوية بين المجموعات ، نجري اختبار LSD للمقارنات الثنائية بين كل مجموعتين.

٢-٥-٢ اختبار ستيودنت لعينتين مستقلتين (Independent t - test) :

اختبار إحصائي وسيطي يستخدم لدراسة الفروق بين عينتين مستقلتين ، أي مقارنة معيار معين بين مجموعتين منفصلتين ، حيث تحسب قيمة المعنوية (P-value) من إحصاء الاختبار (t) ، ثم نقارنها بالقيمة ($\alpha=0.05$) ، فإذا كانت ($P\text{-value} < 0.05$) فإن الاختبار معنوي ونقبل الفرضية البديلة H_1 بثقة 95 %.

ويمكن صياغة الفرضيات التي يختبرها بالشكل التالي :

الفرضية الابتدائية: العينتان المدروستان تعودان إلى المجتمع نفسه ، أي لا يوجد فرق معنوي بين العينتين أو لا توجد فروق معنوية بين متوسطي المجموعتين ($\mu_1=\mu_2$).

الفرضية البديلة: العينتان المدروستان تعودان إلى مجتمعين مختلفين ، أي يوجد فرق معنوي بين العينتين.

وفي دراستنا تم تطبيق هذا الاختبار مثلاً على وجود فروق في تعبيرية كل ملون في الورم الأولي بين الجنسين الذكور والاناث فكانت الفرضيات :

H0: يوجد فروق في تعبيرية كل ملون على حدى في الورم الأولي بين الجنسين الذكور والاناث

H1: لا يوجد فروق في تعبيرية كل ملون على حدى في الورم الأولي بين الجنسين الذكور والاناث

٢-٥-٣ معامل ارتباط بيرسون (Pearson correlation coefficient) :

يتم حساب معامل ارتباط بيرسون (r) لدراسة وجود ارتباط بين متغيرين عدديين ، بحيث تقع قيمة هذا العامل ما بين -١ و ١ ، بحيث تشير قيمة معامل الارتباط الايجابي الى علاقة إيجابية بين المتغيرين ، وتشير قيمة معامل الارتباط السلبي الى علاقة سلبية بين المتغيرين المدروسين ، وبينما تشير قيمة معامل الارتباط القريبة من الصفر الى انعدام الارتباط ، فإن قوة هذا الارتباط تزداد شدة كلما ما اقتربنا من ١ أو -١ وتفسر حسب (الجدول ٦). وتحسب قيمة المعنوية (P-value) من إحصاء الاختبار (t) ، ثم نقارنها بالقيمة ($\alpha=0.05$) ، فإذا كانت ($P\text{-value} < 0.05$) فإن الاختبار معنوي ونقبل الفرضية البديلة H1 بثقة 95 %.

ويمكن صياغة الفرضيات التي يختبرها بالشكل التالي :

الفرضية الابتدائية: لا يوجد ارتباط بين المتغيرين ($r = 0$).

الفرضية البديلة: يوجد ارتباط بين المتغيرين ($r \neq 0$).

وفي دراستنا تمت دراسة الارتباط في تعبيرية كل ملون على حدى بين ورمه الأولي ونقائله العقدية فكانت الفرضيات :

H0 : لا يوجد ارتباط في تعبيرية كل ملون على حدى بين ورمه الأولي ونقائله العقدية.

H1: يوجد ارتباط في تعبيرية كل ملون على حدى بين ورمه الأولي ونقائله العقدية.

التفسير	مجال معامل ارتباط بيرسون
ارتباط ضعيف	$0 < r < 0.3$
ارتباط متوسط الشدة	$0.3 < r < 0.7$
ارتباط قوي	$0.7 < r < 1$

جدول ٦ تفسير مجال معامل ارتباط بيرسون

٢-٥-٤ اختبارات المقارنات الثنائية LSD

عند رفض فرض عدم الخاص بتساوي المتوسطات في تحليل التباين، يقترح الباحث أن ذاك المقارنة بين كل وسطين لمعرفة أي من الأوساط يختلف عن الأوساط الأخرى. وفي هذه الحالة يتم إجراء مقارنات عديدة تسمى بالـ (Multiple Comparisons) المقارنات المتعددة أو المقارنات الثنائية وهناك الكثير من الطرق الإحصائية لإجراء مثل هذه المقارنات، والتي تجرى خاصة بعد إجراء التجربة من أهمها وأبسطها طريقة أقل فرق معنوي محمي (LSD) Protected Least Significant Difference

تتلخص خطوات إجراء هذه الطريقة في الآتي:

- تكوين جدول تحليل التباين، وحساب إحصائية الاختبار $F = MSB / MSE$
- تكوين الفرضية الابتدائية وعند قبولها يتم التوقف عند هذا الحد من تحليل التباين
- في حال رفضها يستدل من ذلك أنه على الأقل يوجد متوسطين مختلفين ويتم

حساب LSD

$$LSD = t_{(1-\alpha/2, \nu)} S_{(\bar{y}_i - \bar{y}_{i'})}$$

:

$$S_{(\bar{y}_i - \bar{y}_{i'})} = \sqrt{MSE \left(\frac{1}{n_i} + \frac{1}{n_{i'}} \right)}, \text{ if } n_i \neq n_{i'}$$

$$S_{(\bar{y}_i - \bar{y}_{i'})} = \sqrt{MSE \left(\frac{2}{n} \right)}, \text{ if } n_i = n_{i'} = n$$

MSE هو متوسط مربعات الأخطاء العشوائية ونحصل عليه من جدول تحليل التباين، V هي درجات حرية الأخطاء ونحصل عليها أيضاً من جدول تحليل التباين.

- ترتيب المتوسطات الحسوبة تصاعديا وحساب الفرق بين كل متوسطين متتاليين ومقارنة هذا الفرق بأقل فرق معنوي LSD فإذا كان LSD أصغر ترفض فرضية العدم وتقبل البديلة ويستدل من ذلك على وجود فرق معنوي بين المتوسطين.

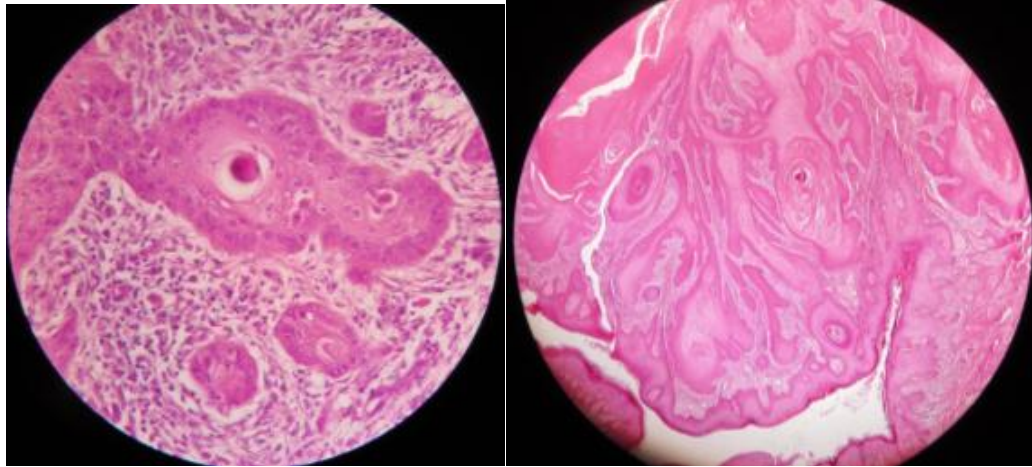
الباب الثالث النتائج

Results

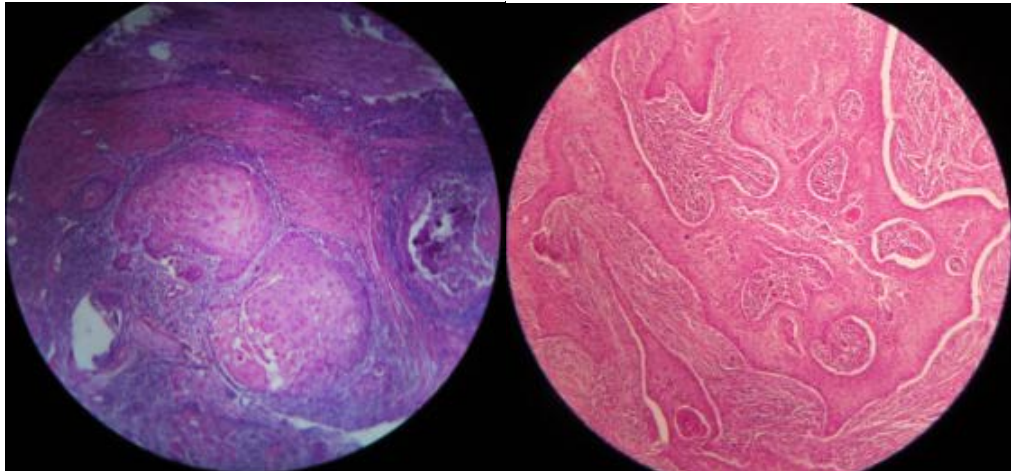
١ - توصيف للمشاهدات النسيجية :

شملت عينة البحث على ٦٠ ورماً أولياً من سرطان شائك الخلايا للرأس والعنق وتمّ تصنيفها سريريا في أربع درجات (stage) حسب منظمة الصحة العالمية WHO تبعاً للمعلومات الواردة في تقرير التشريح المرضي وإصابة المريض، وبعد التأكد أو نفي إصابة العقد اللمفية بنقائل ورمية بدراسة المقاطع النسيجية الملونة بالهيماتوكسيلين أيوزين. كما شملت عينة البحث على النقائل العقدية للأورام الأولية ذات الدرجات السريرية العالية و التي بلغ عددها في عينة البحث ٧٧ نقيلة عقدية.

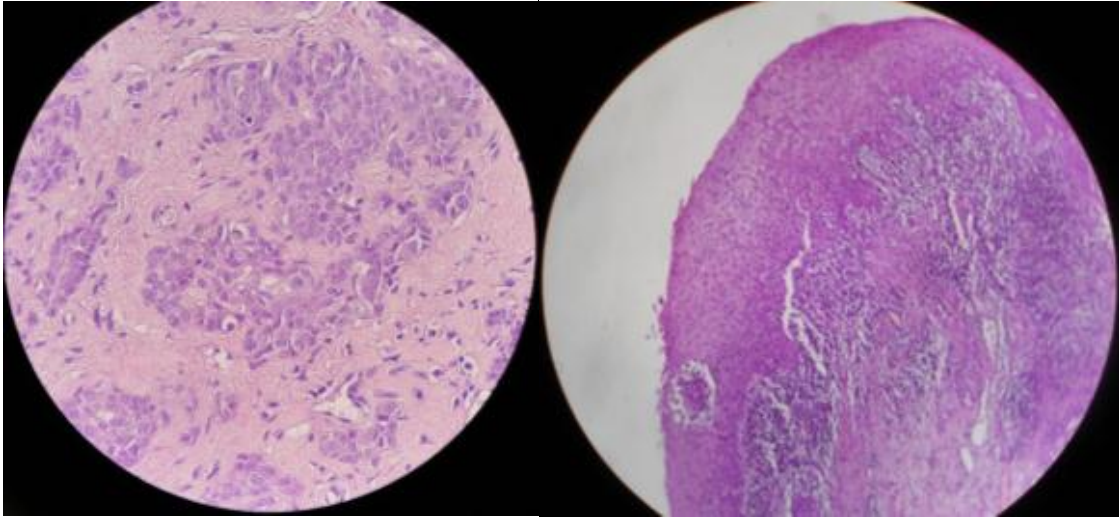
تمت دراسة المقاطع النسيجية للأورام الأولية الملونة بالهيماتوكسيلين أيوزين لتأكد من الدرجة النسيجية وتمّ تصنيفها في أربع درجات (grade) حسب تصنيف Border و Border المعدل سابق الذكر (شكل ٢٣-٢٤-٢٥-٢٦-٢٧)



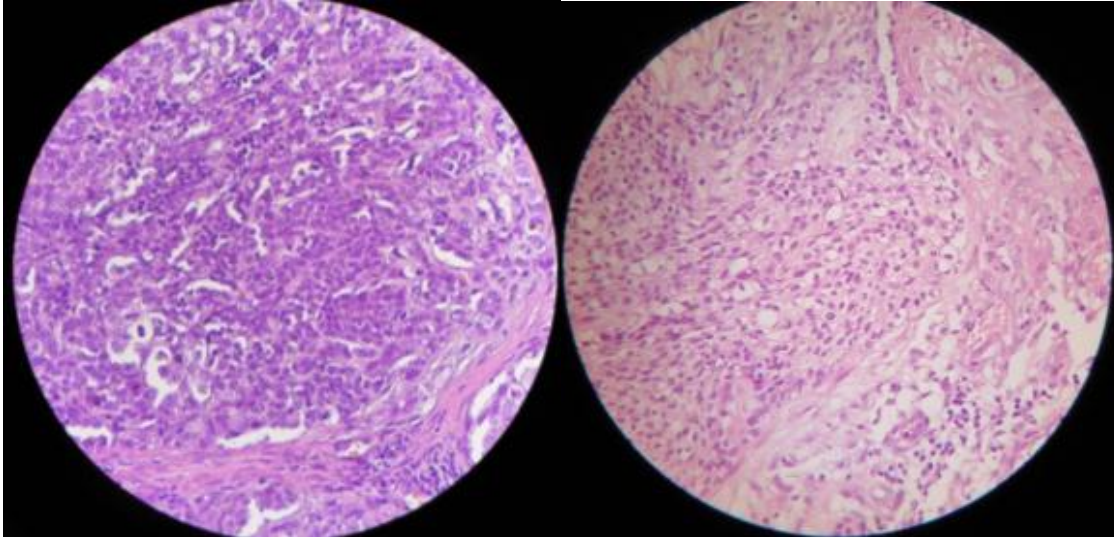
الشكل ٢٣ مقطع نسيجي ملون بالهيماتوكسيلين أيوزين للدرجة الأولى النسيجية (grade 1) جيدة التمايز (well differentiated)



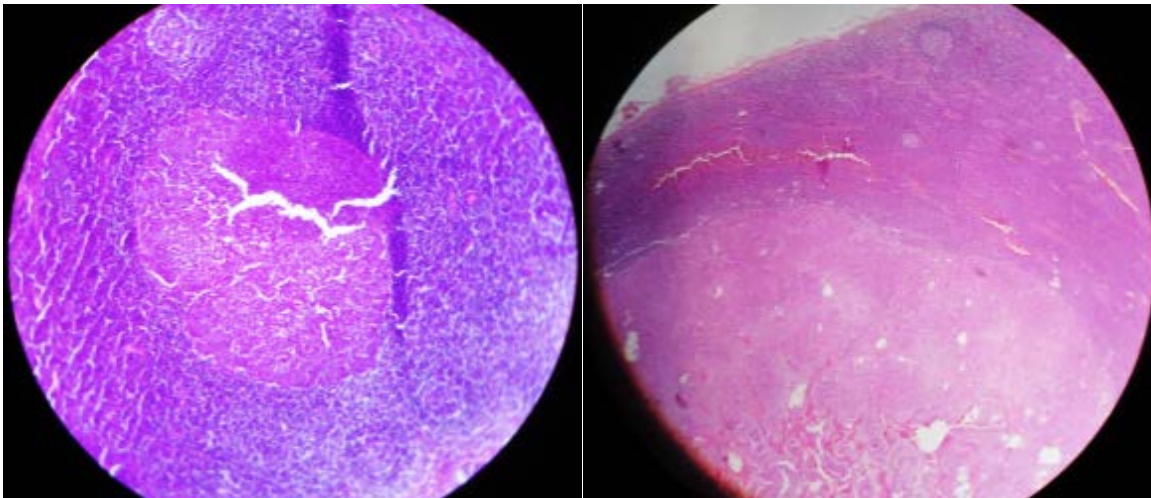
الشكل ٢٤ مقطع نسيجي ملون بالهيماتوكسيلين أيوزين للدرجة الثانية النسيجية (grade 2) متوسطة التمايز (moderate differentiated)



الشكل ٢٥ مقطع نسيجي ملون بالهيماتوكسيلين أيوزين للدرجة الثالثة النسيجية (grade 3) ضعيفة التمايز (poor differentiated)



الشكل ٢٦ مقطع نسيجي ملون بالهيماتوكسيلين أيوزين للدرجة الرابعة النسيجية (grade 4) غير متميزة (undifferentiated)



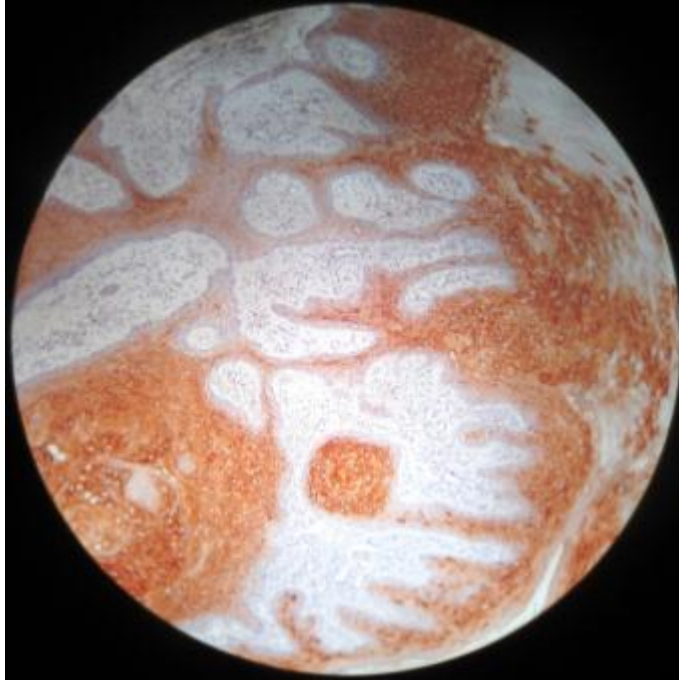
الشكل ٢٧ مقطع نسيجي ملون بالهيماتوكسيلين أيوزين للنقائل العقدية

١-١ المشاهدات النسيجية عند التلوين بـ CXCR4:

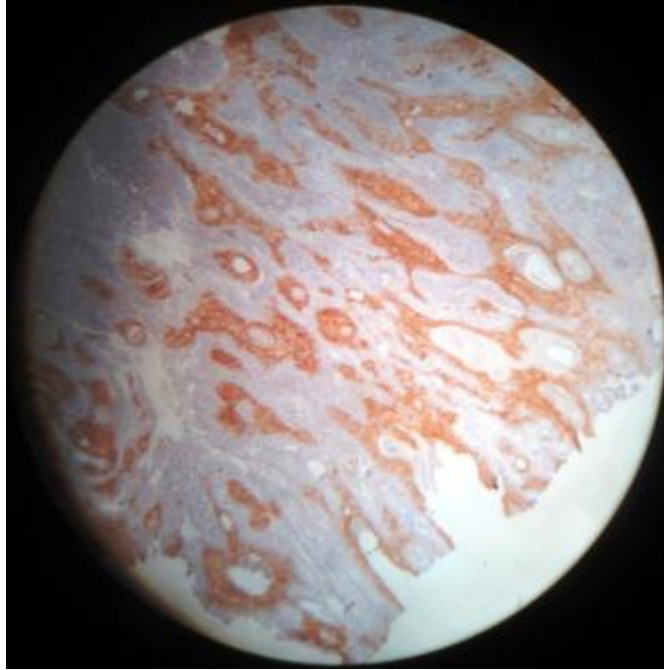
ظهرت التعبيرية الـ CXCR4 في الغشاء الهولي وهولي الخلايا البشروية. كانت التعبيرية إيجابية في ٥٥ عينة من مجمل ٦٠ عينة سرطانية وذلك بنسبة ٩١.٦% وسلبية في ٥ عينات بنسبة ٨.٤% في العينات السرطانية للورم الأولي في حين كانت عدد الحالات الإيجابية في العقد اللمفية المصابة بنقائل عقدية ٦٥ عينة من مجمل ٧٧ نقيلة عقدية بنسبة ٨٤.٤% والحالات السلبية ١٢ حالات وذلك بنسبة ١٥.٦% اعتمدت دراستنا الخلية كوحدة احصائية فكانت نسبة الإيجابية في الورم الأولي ٥٠.١٩% ونسبة السلبية في الورم الأولي ٤٩.٨% ونسبة الإيجابية في العقد اللمفية المصابة بنقائل عقدية ٢٠.٤% ونسبة السلبية ٧٩.٦% .

أما الشدة اللونية فتراوحت بين عالية ٤٠ من عينات السرطان الأولي وذلك بنسبة ٦٦.٦% وفي ٤٥ حالة من النقائل العقدية بنسبة ٥٨.٤% في حين كانت التعبيرية متوسطة في ٣ حالات بنسبة ٥% وفي ٩ حالة من النقائل العقدية بنسبة ١١.٧% وخفيفة في ١٢ حالة بنسب ٢٠% وفي ١١ حالة من النقائل العقدية بنسبة ١٤.٣% (الأشكال ٢٨-٣٦)، في حين كانت سلبية في العينات الشاهدة كلها أي بنسبة ١٠٠% من العينات الشاهدة (الشكل ٣٨)

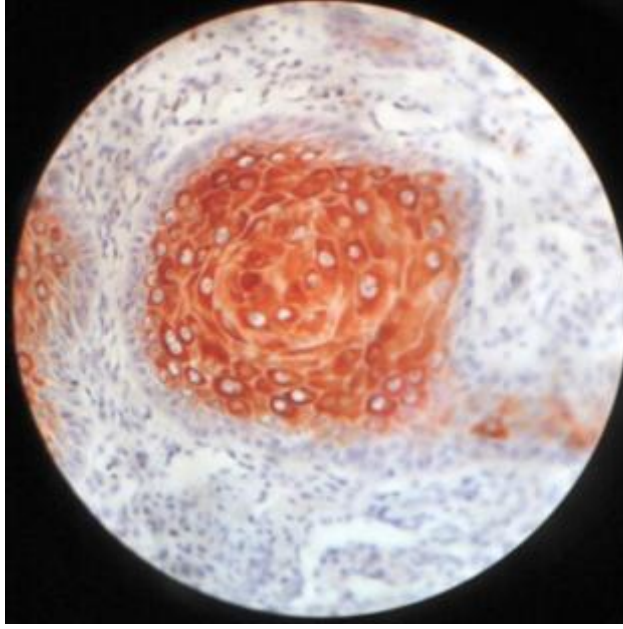
ظهرت التعبيرية في الخلايا المركزية من الجزر والحبال السرطانية بشكل ملفت للنظر كما ظهرت التعبيرية في الخلايا الحشوية دون القاعدية في البشرة السرطانية (الشكل ٣٠-٣١-٣٢-٣٣). كما ظهرت التعبيرية واضحة في بعض الأوعية الدموية المرافقة للحمية السرطانية بشكل ملفت للنظر (الشكل ٣٩-٤٠)



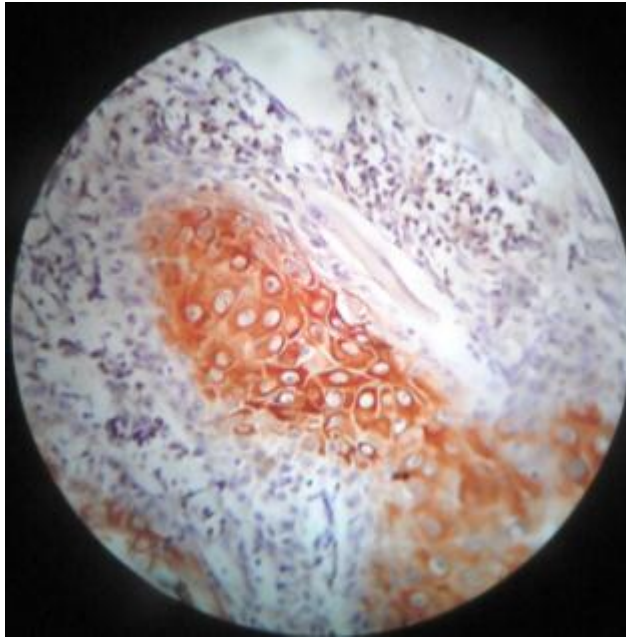
الشكل ٢٨ تكبير X10 تظهر تعبيرية الـ CXCR4 العالية في جزر وحبال سرطان شائك الخلايا



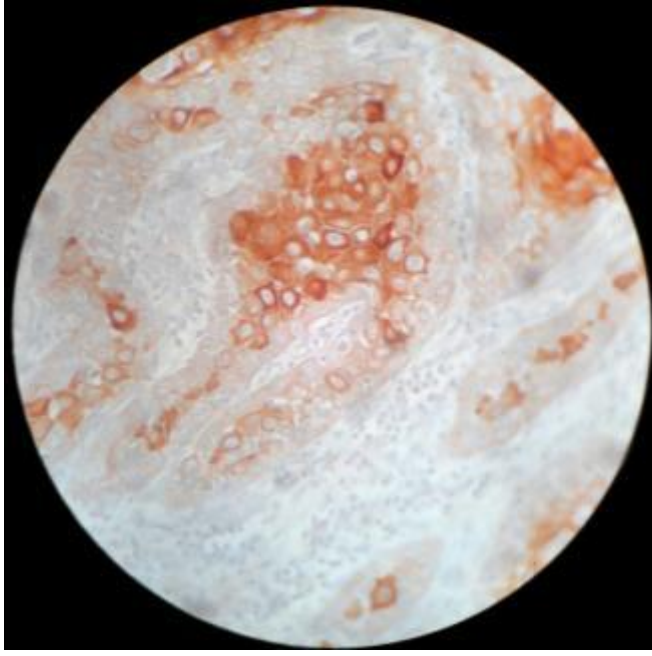
الشكل ٢٩ تكبير X10 تظهر تعبيرية الـ CXCR4 العالية في جزر وحبال سرطان شائك الخلايا



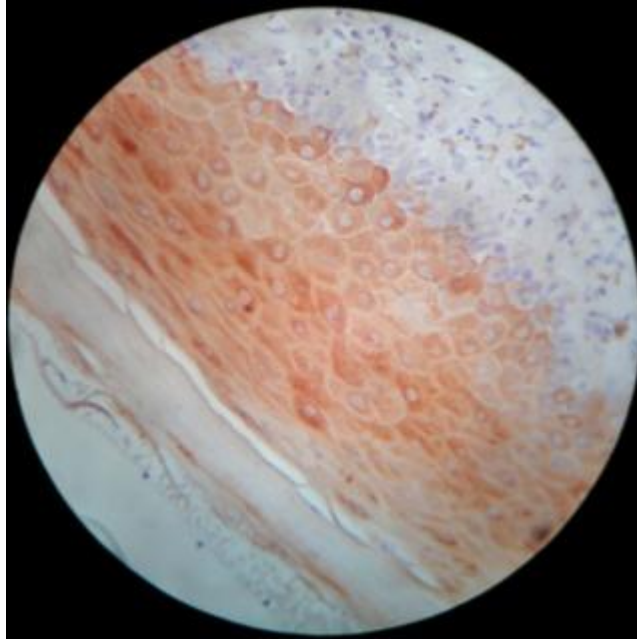
الشكل ٣٠ تكبير X40 تظهر التعبير العالية لـ CXCR4 للخلايا الحرشفية (تعبيرية هيولية وغشائية) المركزية دون المحيطية في الجزر السرطانية لسرطان شائك الخلايا



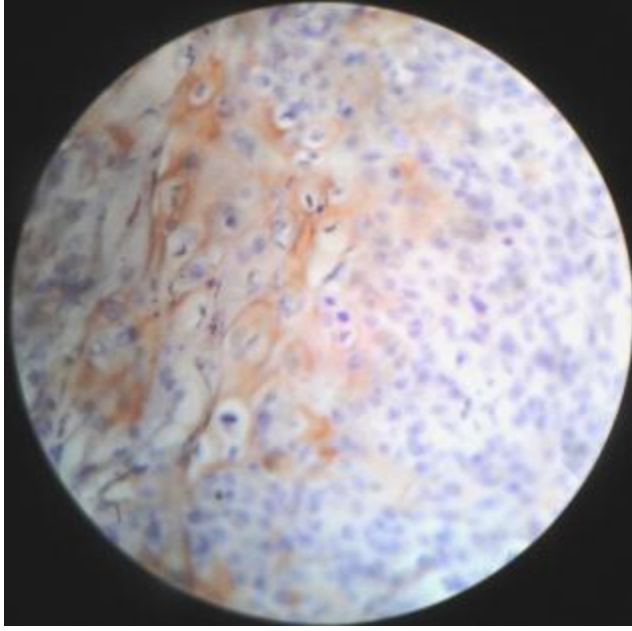
الشكل ٣١ تكبير X40 تظهر التعبير العالية لـ CXCR4 للخلايا الحرشفية (تعبيرية هيولية وغشائية) المركزية دون المحيطية في الجزر السرطانية لسرطان شائك الخلايا



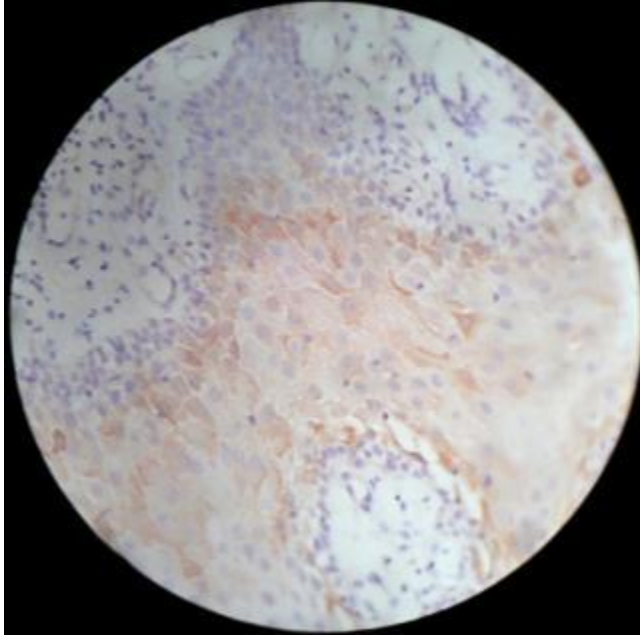
الشكل ٣٢ تكبير X40 تظهر التعبير العالية لـ CXCR4 للخلايا الحشوية (تعبيرية هيولية وغشائية) المركزية دون المحيطية في الجزر السرطانية لسرطان شائك الخلايا



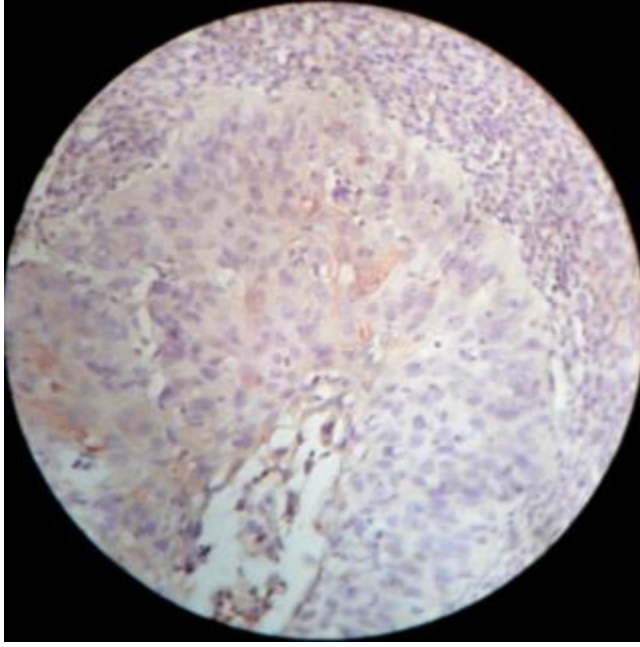
الشكل ٣٣ تكبير X40 تظهر التعبير العالية لـ CXCR4 للخلايا الحشوية دون القاعدية في البشرة السرطانية



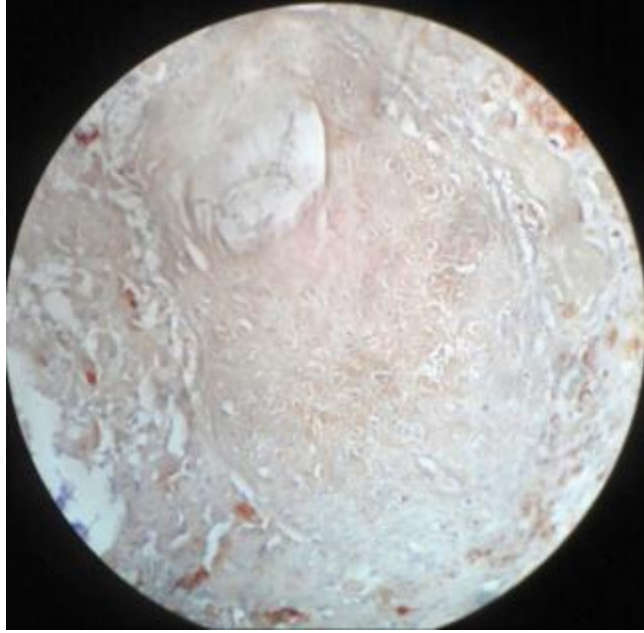
الشكل ٣٤ تكبير X40 تظهر التعبير المتوسطة لـ CXCR4 للخلايا الحرشفية السرطانية في سرطان شائع الخلايا



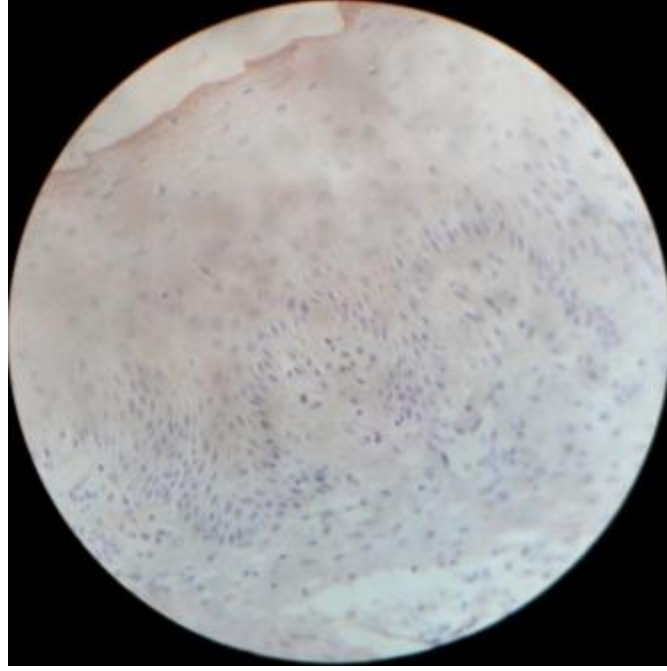
الشكل ٣٥ تكبير X40 تظهر التعبير المتوسطة لـ CXCR4 للخلايا الحرشفية السرطانية في سرطان شائع الخلايا



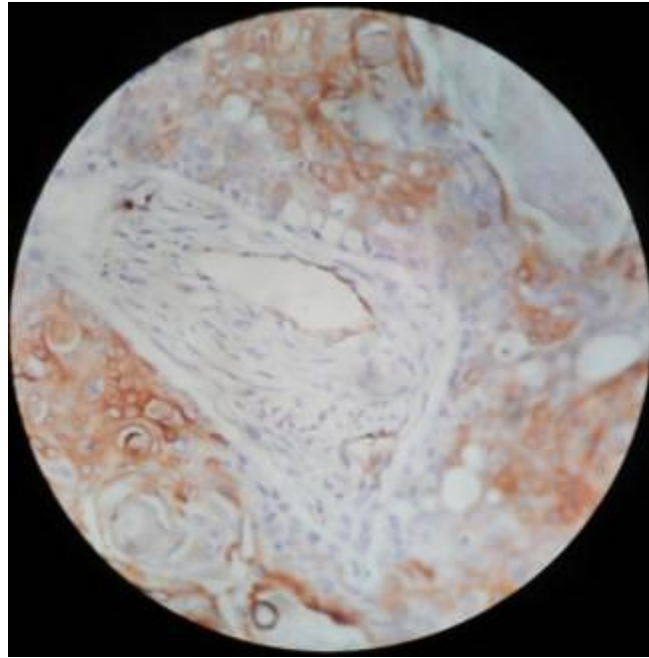
الشكل ٣٦ تكبير X40 تظهر التعبير المنخفضة لـ CXCR4 للخلايا الحشوية السرطانية في إحدى الجزر السرطانية لسرطان شائع الخلايا



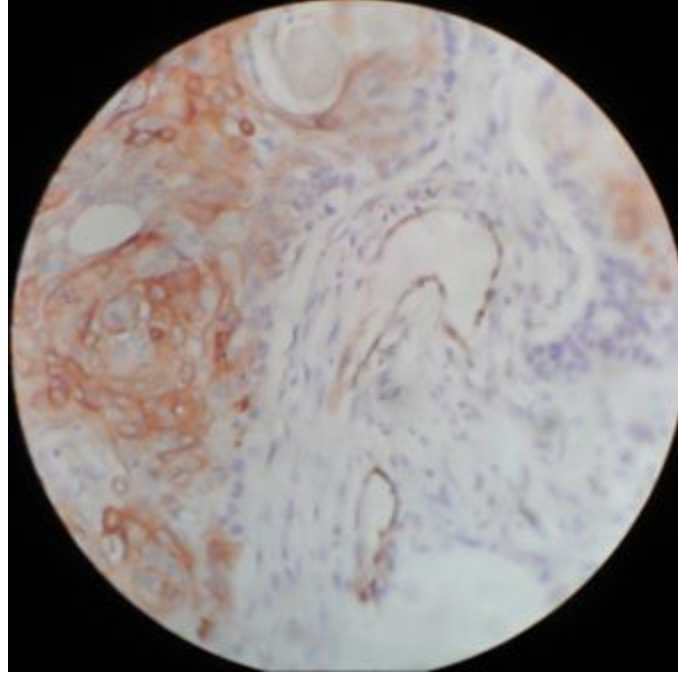
الشكل ٣٧ تكبير X40 تظهر التعبير السلبية لـ CXCR4 للخلايا الحشوية السرطانية لإحدى عينات سرطان شائع الخلايا



الشكل ٣٨ تكبير X40 تظهر التعبير السلبية لـ CXCR4 للخلايا الحشوية في العينة الشاهدة (البشرة السليمة)



الشكل ٣٩ تكبير X40 تظهر التعبير الإيجابية لـ CXCR4 في الخلايا البطانية لإحدى الأوعية الدموية في لحمة إحدى عينات سرطان شائع الخلايا



الشكل ٠ ٤ تكبير X40 تظهر التعبير الإيجابية لـ CXCR4 في الخلايا البطانية للأوعية الدموية في لحمة إحدى عينات سرطان شائع الخلايا

٢-١ المشاهدات النسيجية عند التلوين بـ CCR7:

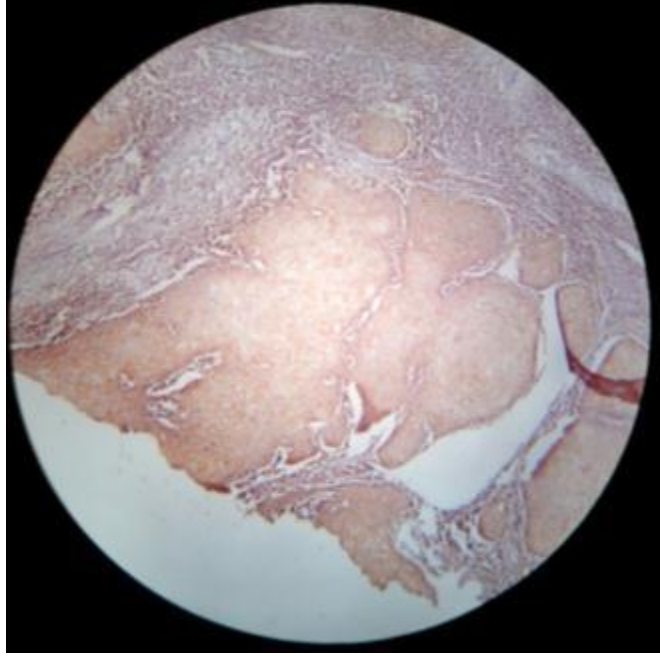
ظهرت التعبيرية في الغشاء الهيولي غالباً دون الهيولى وقليلًا مع الهيولى كانت التعبيرية إيجابية في ٥٦ عينة من مجمل ٦٠ عينة سرطانية وذلك بنسبة ٩٣,٩% وسلبية في ٤ عينات بنسبة ٦,٧% في العينات السرطانية للورم الأولي في حين كانت عدد الحالات الإيجابية في العقد اللمفية المصابة بنقائل عقدية ٧٣ عينة من مجمل ٧٧ نقيلة عقدية بنسبة ٩٤,٩% والحالات السلبية ٤ حالات وذلك بنسبة ٥,١%

اعتمدت دراستنا الخلية كوحدة احصائية فكانت نسبة الإيجابية في الورم الأولي ٦٨.٣% ونسبة السلبية في الورم الأولي ٣١.٧% ونسبة الإيجابية في العقد اللمفية المصابة بنقائل عقدية ٤١.٢% ونسبة السلبية ٥٨.٣%

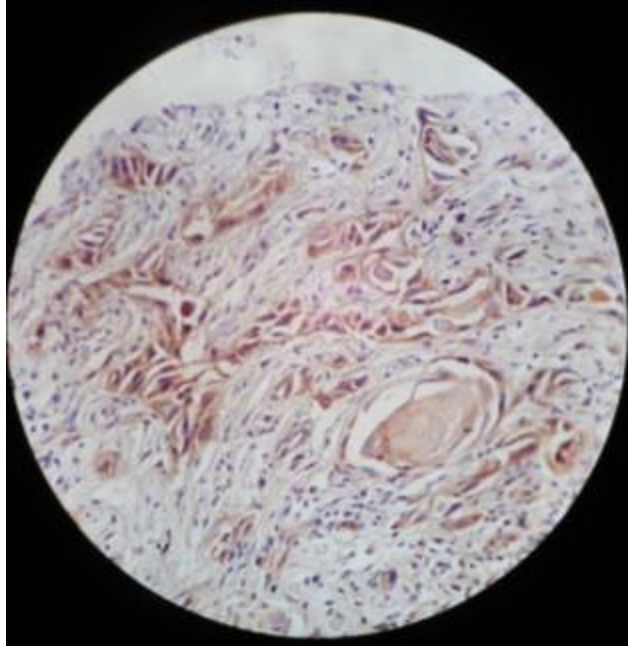
أما الشدة اللونية فتراوحت بين عالية في ٣٧ من عينات السرطان الأولي وذلك بنسبة ٦١.٦% وفي ٥٤ حالة من النقائل العقدية بنسبة ٧٠.١٢% في حين كانت التعبيرية متوسطة في ٥ حالات بنسبة ٨.٣% وفي ١٥ حالة من النقائل العقدية بنسبة ١٩.٤% وخفيفة في ١٤ حالة بنسبة ٢٣.٣% وفي ٤ حالة من النقائل العقدية بنسبة ٥.٢% (الأشكال ٤١-٤٨)، في حين كانت سلبية في العينات الشاهدة كلها أي بنسبة ١٠٠% من العينات الشاهدة (الشكل ٤٩).

ظهرت التعبيرية واضحة في الخلايا السرطانية المحيطية والمركزية تارة في بعض جزر السرطان شائك الخلايا (الشكل ٤٣) في حين ظهرت تارة أخرى في خلايا الجزر المحيطية فقط (الشكل ٤٤).

ظهرت التعبيرية في بعض الأوعية الدموية المرافقة للحمية الورم كما ظهرت الإيجابية في بعض الأعصاب الموجودة في لحمية الورم بشكل ملفت للنظر (الشكل ٥٠-٥١-٥٢).

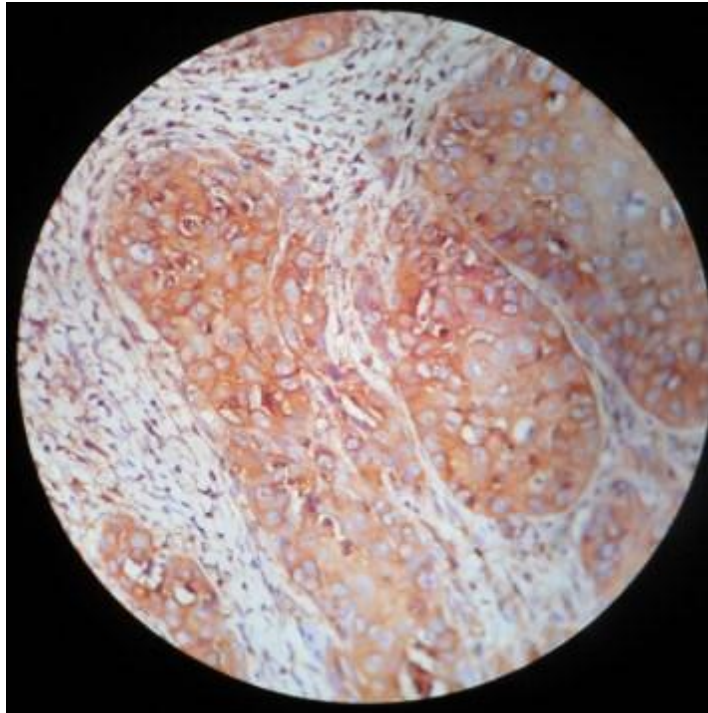
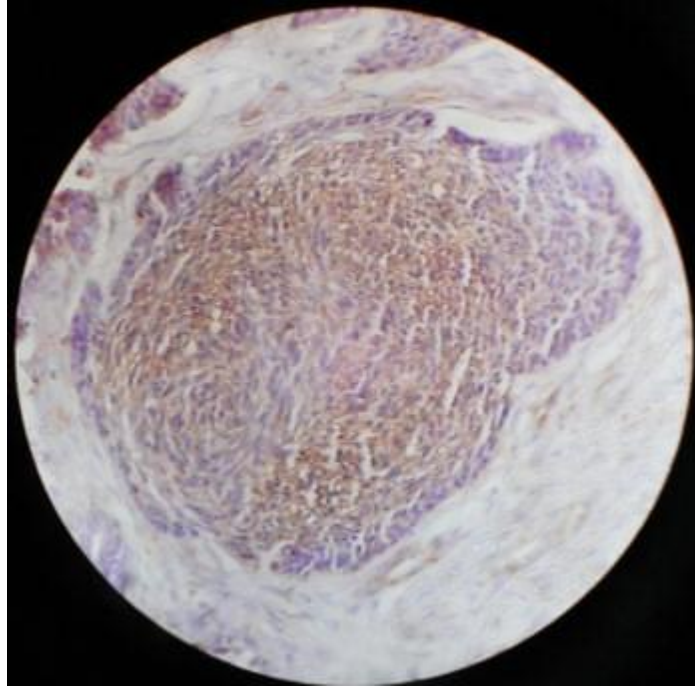


الشكل ١ تكبير X10 تظهر تعبيرية الـ CCR7 العالية في جزر سرطان شائك الخلايا

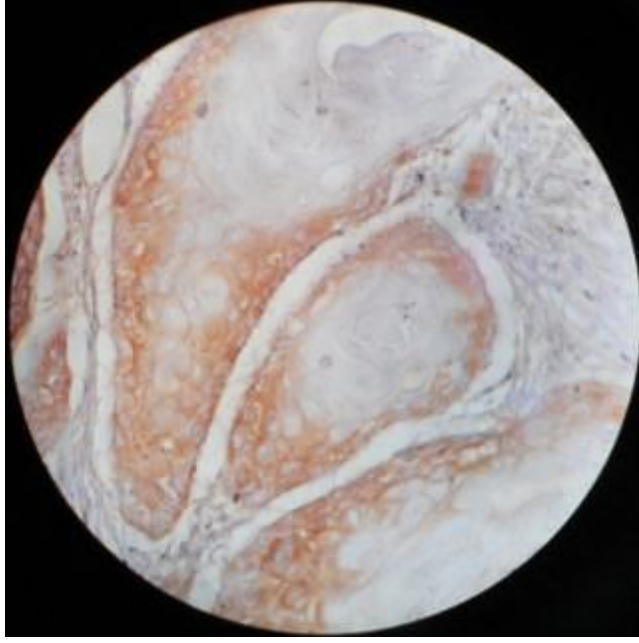


الشكل ٢ تكبير X40 تظهر التعبيرية العالية لـ CCR7 للخلايا الحشوية (تعبيرية غشائية) في الحبال

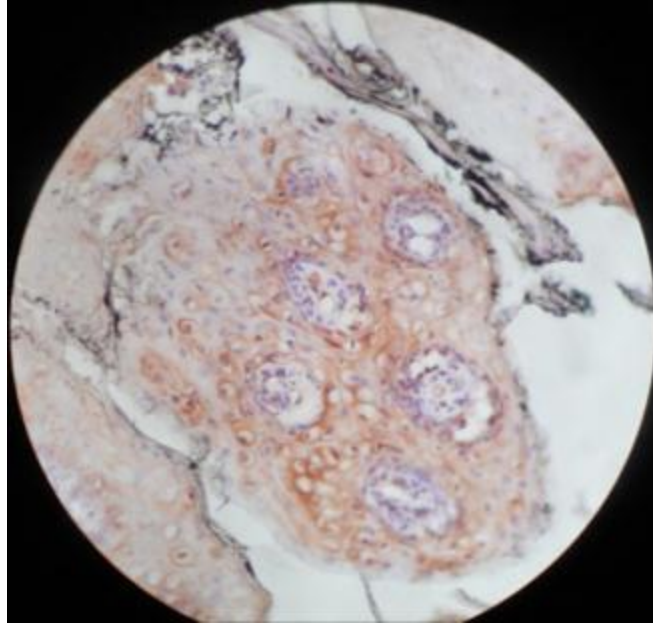
السرطانية لسرطان شائك الخلايا في إحدى العينات ذات الدرجة النسيجية متوسطة التمايز



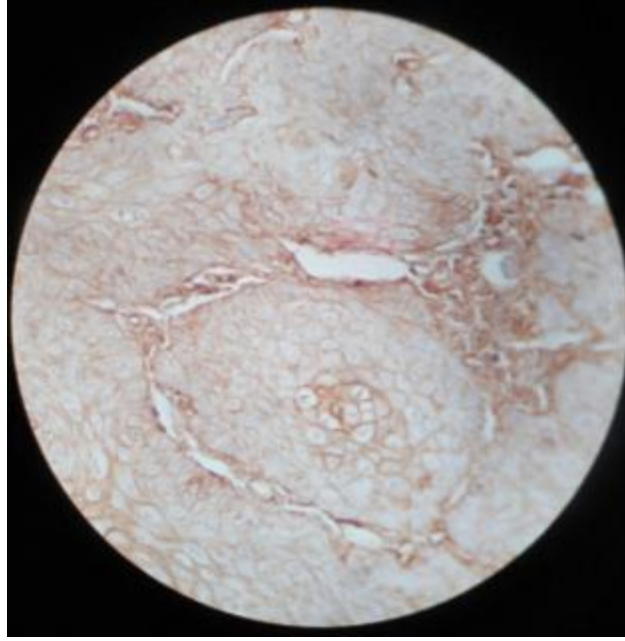
الشكل ٣؛ تكبير 40X تظهر التعبير العالية لـ CCR7 للخلايا الحرفية (تعبيرية غشائية وهيولية) في الجزر السرطانية لسرطان شائع الخلايا في إحدى العينات ذات الدرجة النسيجية عالية التمايز



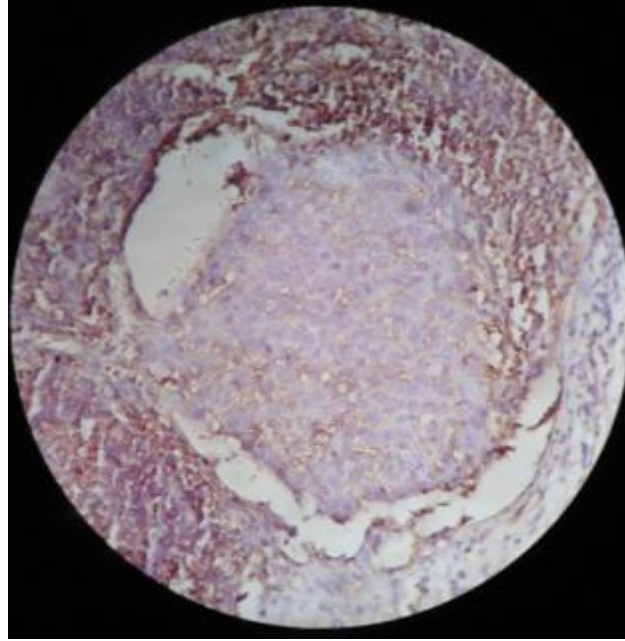
الشكل ٤ : تكبير 40X تظهر التعبير العالية لـ CCR7 للخلايا الحشفية المحيطية دون المركزية (تعبيرية غشائية وهيولية) في الجزر السرطانية لسرطان شاتك الخلايا في إحدى العينات ذات الدرجة النسيجية عالية التمايز



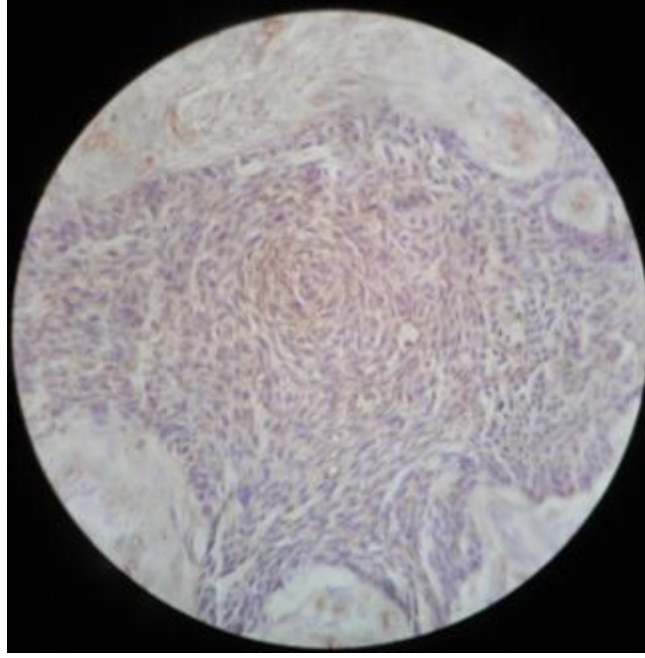
الشكل ٥ : تكبير 40X تظهر التعبير العالية لـ CCR7 للخلايا الحشفية (تعبيرية غشائية) في البشرة السرطانية لسرطان شاتك الخلايا وتأخذ فيها الخلايا الحشفية والقاعدية تعبيرية إيجابية



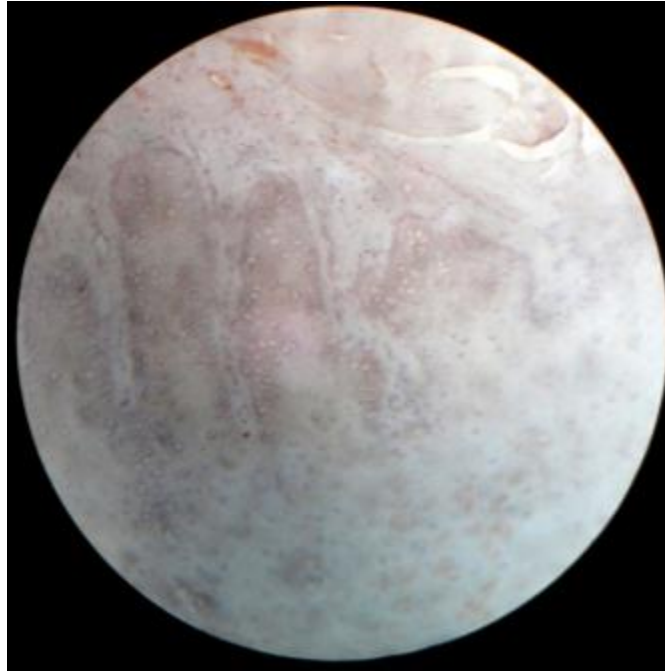
الشكل ٤٦: تكبير 40X تظهر التعبير المتوسطة لـ CCR7 للخلايا الحشوية (تعبيرية غشائية) في الجزر السرطانية لسرطان شائع الخلايا في إحدى العينات ذات الدرجة النسيجية عالية التمايز



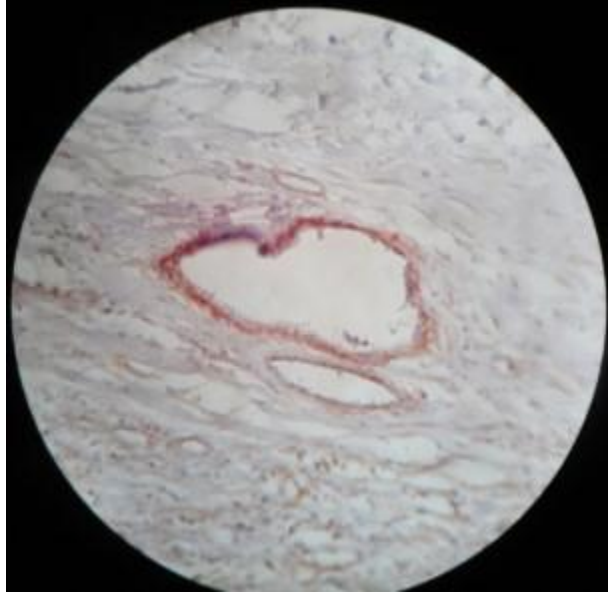
الشكل ٤٧: تكبير 40X تظهر التعبير المنخفضة لـ CCR7 للخلايا الحشوية (تعبيرية غشائية) في الجزر السرطانية لسرطان شائع الخلايا في إحدى عينات النقيلة العقدية محاطة بخلايا لمفاوية ذات إيجابية عالية غشائية



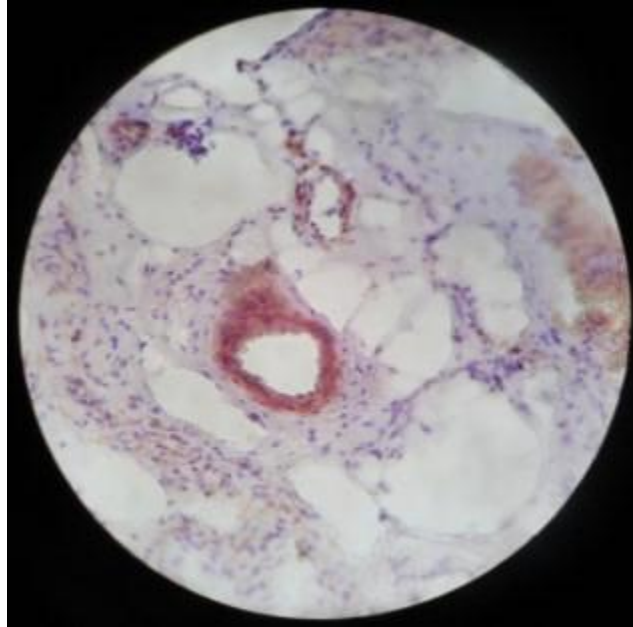
الشكل ٨ ٤ تكبير X40 تظهر التعبير المنخفضة لـ CCR7 للخلايا الحشفية (تعبيرية غشائية) في الجزر السرطانية لسرطان شائع الخلايا في إحدى العينات ذات الدرجة النسيجية عالية التمايز



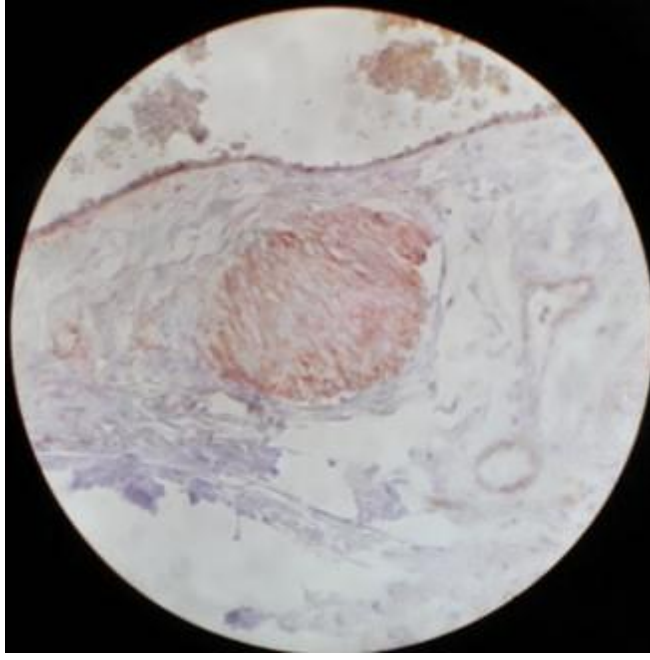
الشكل ٩ ٤ تكبير X40 تظهر التعبير السلبية لـ CCR7 للخلايا الحشفية في العينة الشاهدة (البشرة السليمة)



الشكل ٥٠ تكبير 40X تظهر التعبير الإيجابية لـ CCR7 في الخلايا البطانية لإحدى الأوعية الدموية في لحمة إحدى عينات سرطان شائع الخلايا



الشكل ٥١ تكبير 40X تظهر التعبير الإيجابية لـ CCR7 في الخلايا البطانية لإحدى الأوعية الدموية في لحمة إحدى عينات سرطان شائع الخلايا



الشكل ٥٢ تكبير 40X تظهر التعبير الإيجابية لـ CCR7 في إحدى الأعصاب في لحمة إحدى عينات سرطان شائع الخلايا

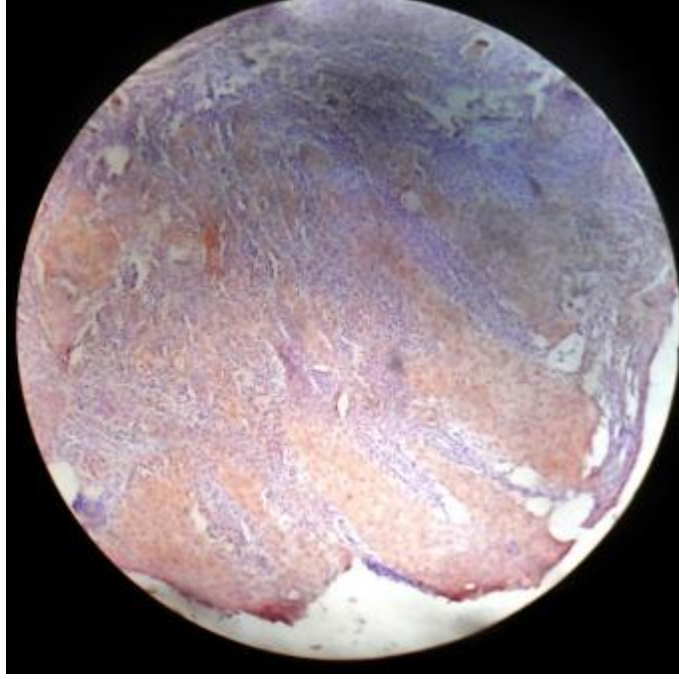
٣-١ المشاهدات النسيجية عند التلوين بـ CXCR5:

ظهرت التعبيرية في الغشاء الهبولى مع الهبولى كانت التعبيرية إيجابية في ٤٧ عينة من مجمل ٦٠ عينة سرطانية وذلك بنسبة ٧٨.٣% وسلبية في ١٣ عينات بنسبة ٢١.٦% في العينات السرطانية للورم الأولي في حين كانت عدد الحالات الإيجابية في العقد اللمفية المصابة بنقائل عقدية ٦٠ عينة من مجمل ٧٧ نقيلة عقدية بنسبة ٧٧,٩% والحالات السلبية ١٧ حالات وذلك بنسبة ٢٢,١%

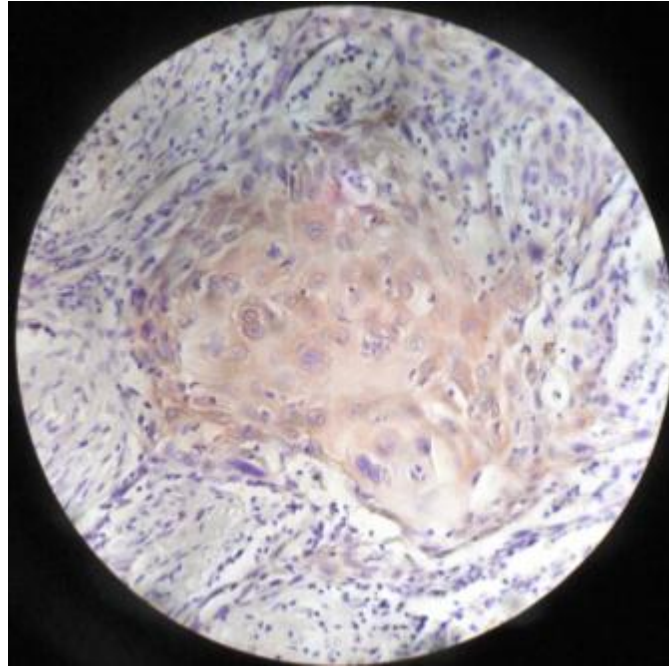
اعتمدت دراستنا الخلية كوحدة احصائية فكانت نسبة الإيجابية في الورم الأولي ٢٨.١% ونسبة السلبية في الورم الأولي ٧١.٨% ونسبة الإيجابية في العقد اللمفية المصابة بنقائل عقدية ١٧.٨% ونسبة السلبية ٨٢.١%

أما الشدة اللونية فتراوحت بين عالية في ٨ من عينات السرطان الأولي وذلك بنسبة ١٣.٣% وفي ١٥ حالة من النقائل العقدية بنسبة ١٩.٥% في حين كانت التعبيرية متوسطة في ١٥ حالات بنسبة ٢٥% وفي ١٢ حالة من النقائل العقدية بنسبة ١٥.٥% وخفيفة في ٢٤ حالة بنسبة ٤٠% وفي ٣٣ حالة من النقائل العقدية بنسبة ٤٢.٩% (الأشكال ٥٣-٥٧)، في حين كانت سلبية في العينات الشاهدة كلها أي بنسبة ١٠٠% من العينات الشاهدة (الشكل ٥٨).

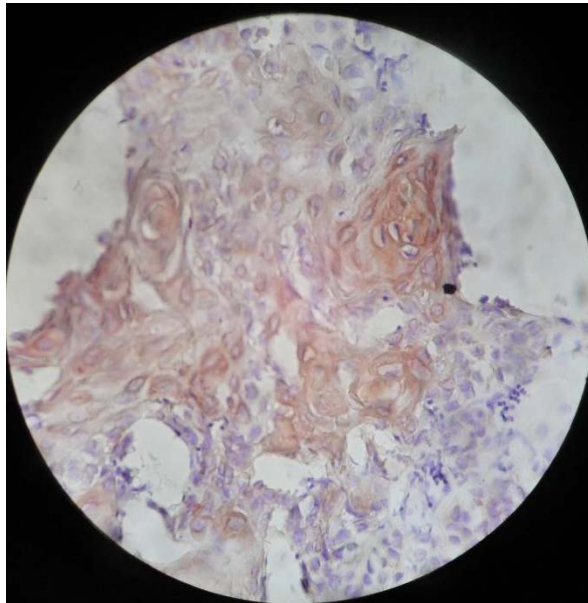
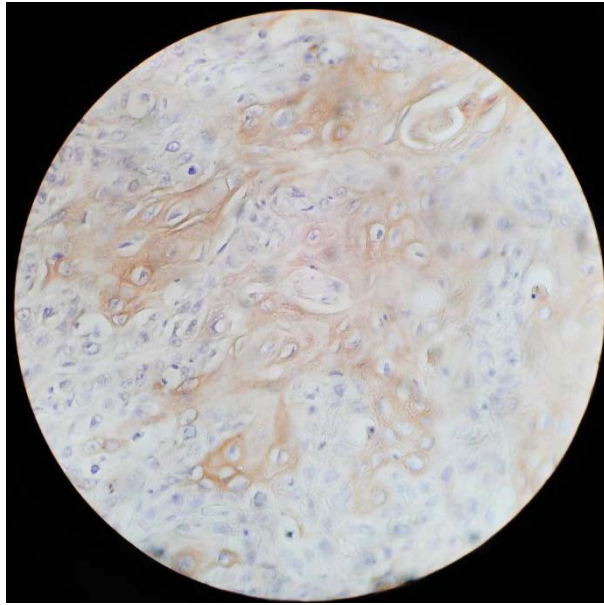
في حين لم تشاهد أي إيجابية للأوعية أو الأعصاب المجاورة.



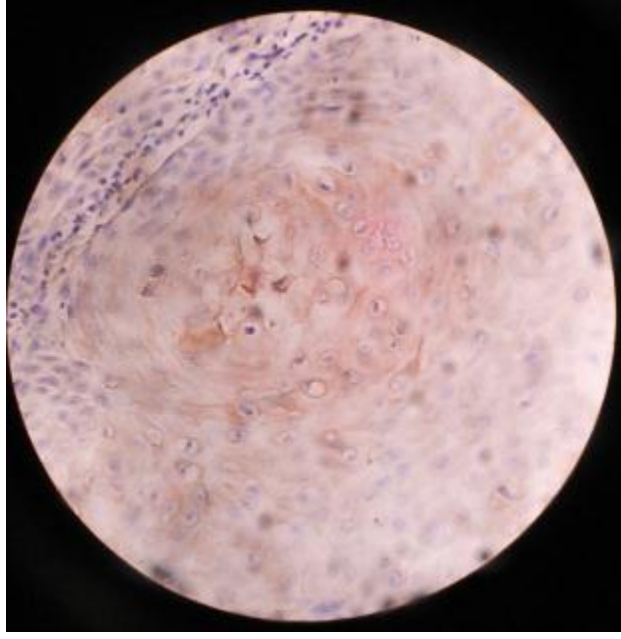
الشكل ٥٣ تكبير X10 تظهر تعبيرية الـ CXCR5 العالية في جزر سرطان شائع الخلايا



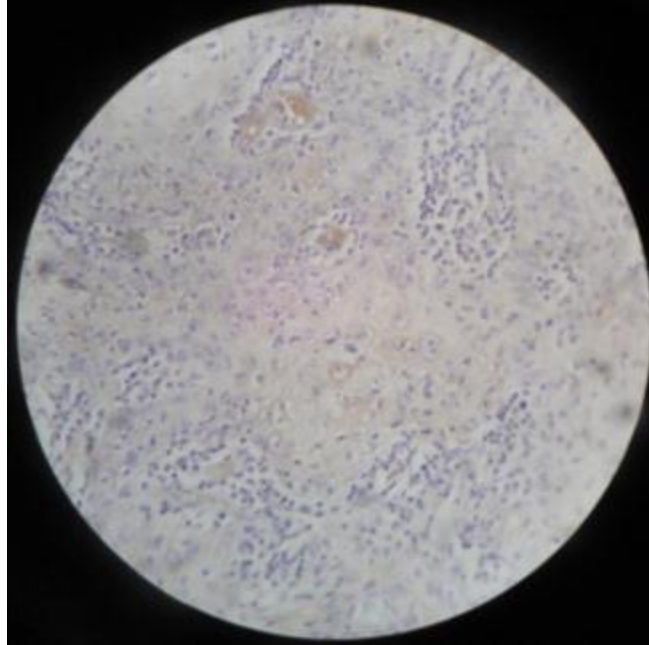
الشكل ٥٤ تكبير X40 تظهر تعبيرية الـ CXCR5 المتوسطة في إحدى جزر سرطان شائع الخلايا



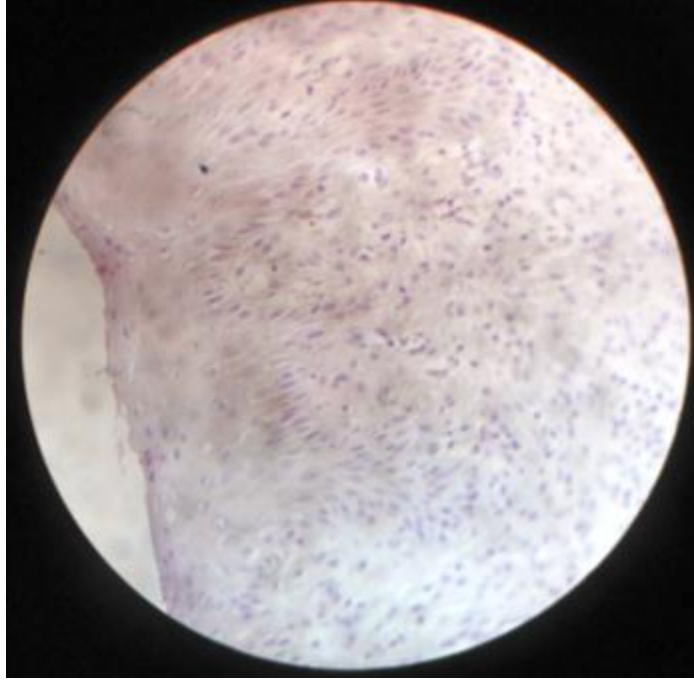
الشكل ٥٥ تكبير X40 تظهر تعبيرية الـ CXCR5 المتوسطة في إحدى جزر سرطان شائع الخلايا



الشكل ٥٦ تكبير X40 تظهر تعبيرية الـ CXCR5 المنخفضة في إحدى جزر سرطان شائك الخلايا



الشكل ٥٧ تكبير X40 تظهر التعبير السلبية لـ CXCR5 للخلايا الحشوية في إحدى عينات سرطان شائك الخلايا



الشكل ٥٨ تكبير X40 تظهر التعبير السلبية لـ CXCR5 للخلايا الحشيفية في العينة الشاهدة (البشرة السليمة)

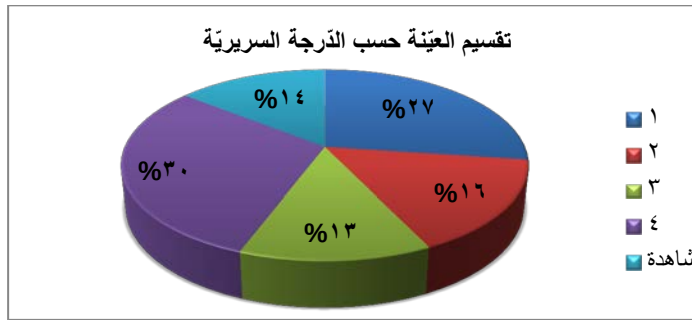
٢- الدراسة الاحصائية

٢-١ عينة البحث :

تألفت عينة البحث من ٧٠ مريضاً، توزعوا حسب الدرجة السريرية إلى ٥ مجموعات كما يلي (جدول ٧) (شكل ٥٩):

الدرجة السريرية	عدد أفراد المجموعة	النسبة المئوية
1	19	27.1 %
2	11	15.7 %
3	9	12.9 %
4	21	30.0 %
شاهدة	10	14.3 %
المجموع	70	100 %

جدول ٧ مجموعات عينة البحث حسب الدرجة السريرية

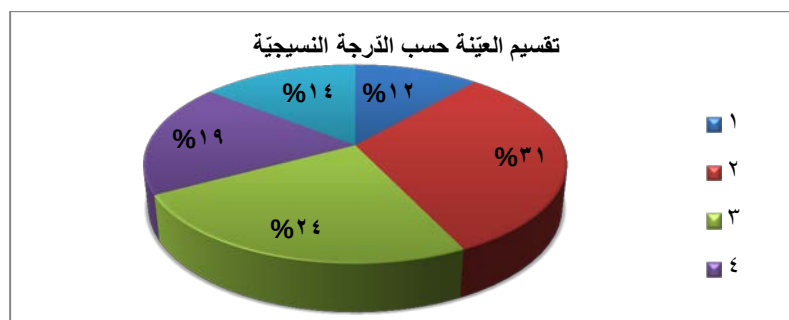


الشكل ٥٩ تقسيم عينة البحث حسب الدرجة السريرية

بعد الفحص النسيجي، تبين أن توزيع عينة الدراسة حسب الدرجة النسيجية كما في (الجدول 8 والشكل ٦٠) :

الدرجة النسيجية	عدد أفراد المجموعة	النسبة المئوية
1	8	11.4 %
2	22	31.4 %
3	17	24.3 %
4	13	18.6 %
شاهدة	10	14.3 %
المجموع	70	100 %

جدول ٨ مجموعات عينة البحث حسب الدرجة النسيجية

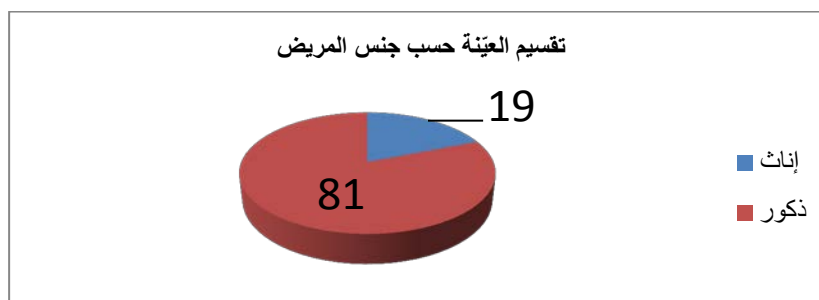


الشكل ٦٠ تقسيم العينة حسب الدرجة النسيجية

كما تضمنت العينة على مرضى من الجنسين، حيث توزعوا في العينة كما في (الجدول ٩) و(الشكل ٦١):

جنس المريض	عدد أفراد المجموعة	النسبة المئوية
إناث	13	18.6 %
ذكور	57	81.4 %
المجموع	70	100 %

جدول ٩ توزع العينة حسب جنس المريض

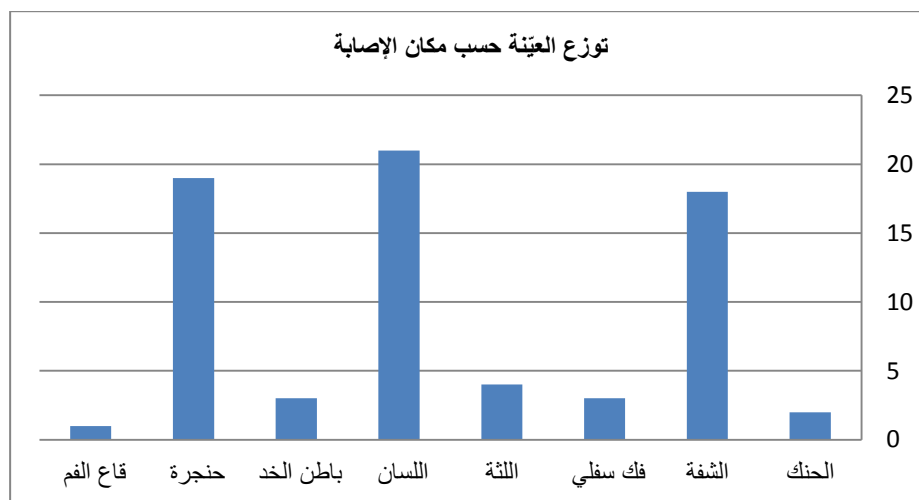


الشكل ٦١ تقسيم العينة حسب جنس المريض

أخذت العينات من أماكن مختلفة كما هو موضح في (الجدول ١٠) و(الشكل ٦٢) :

المكان	العدد	النسبة المئوية
الفك	6	9%
الشفة	18	26%
اللثة	4	6%
اللسان	18	26%
باطن الخد	3	4%
الحنجرة	19	27%
النكفة	1	1%
قاع الفم	1	1%
المجموع	70	100%

جدول ١٠ مجموعات عينة البحث حسب مكان الإصابة



الشكل ٦٢ توزيع العينة حسب مكان الإصابة

ويعرض (الجدول ١١) أهم الإحصاءات الوصفية المتعلقة بعمر المرضى وعدد العقد وحجم الورم الأولي حيث أعطي (١) للقطر الأعظمي > ٢ سم، ٢ للقطر الأعظمي بين ٢ - ٤ سم، ٣ للقطر الأعظمي < ٤ سم) (الشكل ٦٣):

المتوسط	الانحراف المعياري	أدنى قيمة	أعلى قيمة	
٦٠.٧٦٦	١٣.١١١	١٩	٨٦	العمر
٣.٥٠١	٢.٥٣٠	٠.٥	١٥	حجم الورم
٢.٥٦٦	٢.٣٧٣	٠	١٠	عدد العقد

جدول ١١ أهم الإحصاءات الوصفية المتعلقة بعمر المرضى وعدد العقد وحجم الورم



الشكل ٦٣ توزيع العينة تبعاً لحجم الورم

٢-٢ الدراسة الإحصائية التحليلية:

١-٢-٢ دراسة تعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 في الورم

الأولي :

١-١-٢-٢ دراسة علاقة تعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5

في الورم الأولي مع جنس المريض:

لدراسة الفروق في متوسط تعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 في الورم الأولي حسب جنس المريض، استخدمنا اختبار ستيودنت لعينتين مستقلتين، بحيث تظهر نتائج الاختبار في الجدول ١٢-١٣-١٤ مع توضيح لأهم الإحصاءات الوصفية لكل بروتين على حدى :

CCR7

الجنس	العدد	وسط حسابي	انحراف معياري	خطأ معياري
ذكر	47	51.36	23.44058	3.30251
أنثى	8	59.3750	24.70360	8.73404
T	1.006			
Sig	0.342			
	فرق غير معنوي			

جدول ١٢ اختبار ستيودنت لدراسة علاقة تعبيرية البروتينات CCR7 في الورم الأولي مع جنس المريض

CXCR4

الجنس	العدد	وسط حسابي	انحراف معياري	خطأ معياري
ذكر	47	50.4814	22.64086	3.30251
أنثى	8	59.3414	25.15816	8.89475
T	1.008			
Sig	0.318			
	فرق غير معنوي			

جدول ١٣ اختبار ستيودنت لدراسة علاقة تعبيرية البروتينات CXCR4 في الورم الأولي مع جنس المريض

CXCR5

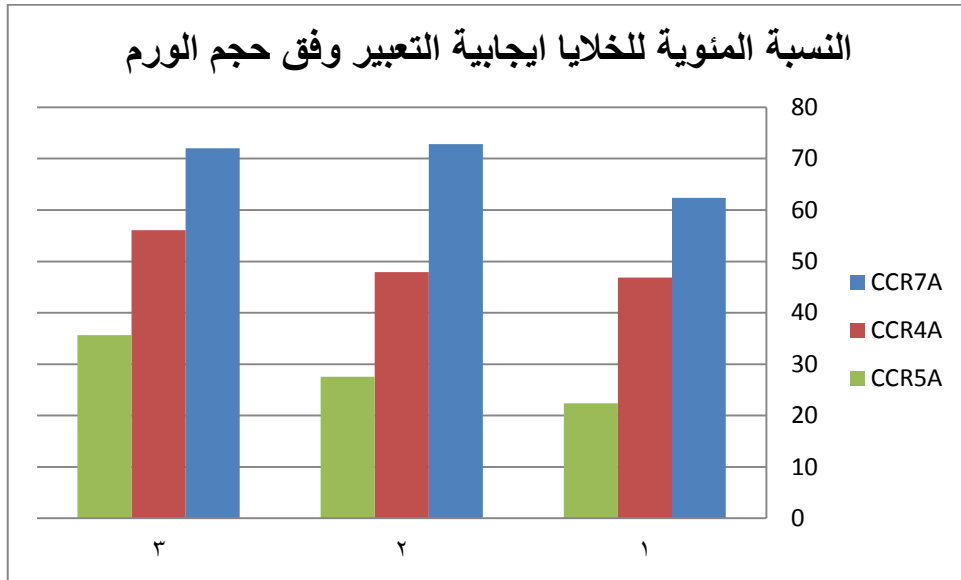
الجنس	العدد	وسط حسابي	انحراف معياري	خطأ معياري
ذكر	40	35.5983	23.98052	3.79165
أنثى	7	37.8571	22.00514	8.31716
T			0.232	
Sig			0.817	
			فرق غير معنوي	

جدول ١٤ اختبار ستيوننت لدراسة علاقة تعبيرية البروتينات CXCR5 في الورم الأولي مع جنس المريض

يتضح من نتيجة الاختبار عدم وجود فروق ذات دلالة إحصائية في متوسط تعبيرية البروتينات CXCR5، CXCR4، CCR7 في الورم الأولي بين الذكور والإناث ، وذلك عند مستوى ثقة ٩٥%.

٢-١-٢-٢ دراسة علاقة تعبيرية البروتينات CXCR5، CXCR4، CCR7 في الورم الأولي مع حجم الورم الأولي:

يوضح (الجدول ١٥) أهم الإحصاءات الوصفية المتعلقة بتعبيرية البروتينات CCR7، CXCR5، CXCR4 في الورم الأولي حسب درجة حجم الورم الأولي (حسب تصنيف منظمة الصحة العالمية لحجم الورم) كما (الشكل ٦٤) :



الشكل ٦٤ النسبة المئوية للخلايا ايجابية التعبير وفق حجم الورم

العينة		CCR7A	CXCR4A	CXCR5A
الشهادة	وسط حسابي	0.000	0.000	0.000
	إنحراف معياري	0.000	0.000	0.000
	الخطأ المعياري	0.000	0.000	0.000
	عدد الحالات	10.000	10.000	10.000
1	وسط حسابي	62.396	46.833	22.396
	إنحراف معياري	34.613	29.499	23.803
	الخطأ المعياري	7.065	6.021	4.859
	عدد الحالات	24.000	24.000	24.000
2	وسط حسابي	72.813	47.891	27.547
	إنحراف معياري	20.994	26.015	26.265
	الخطأ المعياري	5.248	6.504	6.566
	عدد الحالات	16.000	16.000	16.000
3	وسط حسابي	72.000	56.075	35.625
	إنحراف معياري	28.798	25.849	26.306
	الخطأ المعياري	6.439	5.780	5.882
	عدد الحالات	20.000	20.000	20.000
Total	وسط حسابي	58.607	43.025	24.154
	إنحراف معياري	36.402	30.812	25.609
	الخطأ المعياري	4.351	3.683	3.061
	عدد الحالات	70.000	70.000	70.000
قيمة F		18.291	11.623	5.254
Sig		0.00	0.00	0.003

جدول ١٥ أهم الإحصاءات الوصفية المتعلقة بتعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 في الورم الأولي حسب درجة حجم الورم الأولي

لدراسة الفروق في متوسط تعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 في الورم الأولي بين حجوم الورم الأولي استخدمنا اختبار تحليل التباين one-way ANOVA، بحيث تظهر نتائج الاختبار في (الجدول ١٥)، فتبين وجود فروق ذات دلالة إحصائية في متوسط تعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 في الورم الأولي بين حجوم الورم الأولي، وذلك عند مستوى ثقة ٩٥%.

ولدراسة هذه الفروق بالتفصيل، أجرينا الاختبارات الثنائية للمقارنة (LSD) بين كل مجموعتين كما في (الجدول ١٦):

Sig.	Std. Error	Mean Difference (I-J)	(J) Size	(I) Size	Dependent Variable
.000	10.3518606	-62.3958333(*)	1.00	.00	CCR7A
.000	11.0869288	-72.8125000(*)	2.00		
.000	10.6519767	-72.0000000(*)	3.00		
.000	10.3518606	62.3958333(*)	.00	1.00	
.245	8.8766472	-10.4166667	2.00		
.253	8.3270332	-9.6041667	3.00		
.000	11.0869288	72.8125000(*)	.00	2.00	
.245	8.8766472	10.4166667	1.00		
.930	9.2248824	.8125000	3.00		
.000	10.6519767	72.0000000(*)	.00	3.00	
.253	8.3270332	9.6041667	1.00		
.930	9.2248824	-.8125000	2.00		
.000	9.5916816	-46.8333333(*)	1.00	.00	CCR4A
.000	10.2727708	-47.8906250(*)	2.00		
.000	9.8697589	-56.0750000(*)	3.00		
.000	9.5916816	46.8333333(*)	.00	1.00	
.898	8.2247991	-1.0572917	2.00		
.235	7.7155454	-9.2416667	3.00		
.000	10.2727708	47.8906250(*)	.00	2.00	
.898	8.2247991	1.0572917	1.00		
.342	8.5474619	-8.1843750	3.00		
.000	9.8697589	56.0750000(*)	.00	3.00	
.235	7.7155454	9.2416667	1.00		
.342	8.5474619	8.1843750	2.00		
.014	8.8546536	-22.3958333(*)	1.00	.00	CCR5A
.005	9.4834076	-27.5468750(*)	2.00		
.000	9.1113633	-35.6250000(*)	3.00		
.014	8.8546536	22.3958333(*)	.00	1.00	
.500	7.5928028	-5.1510417	2.00		
.068	7.1226804	-13.2291667	3.00		
.005	9.4834076	27.5468750(*)	.00	2.00	
.500	7.5928028	5.1510417	1.00		
.310	7.8906721	-8.0781250	3.00		
.000	9.1113633	35.6250000(*)	.00	3.00	
.068	7.1226804	13.2291667	1.00		

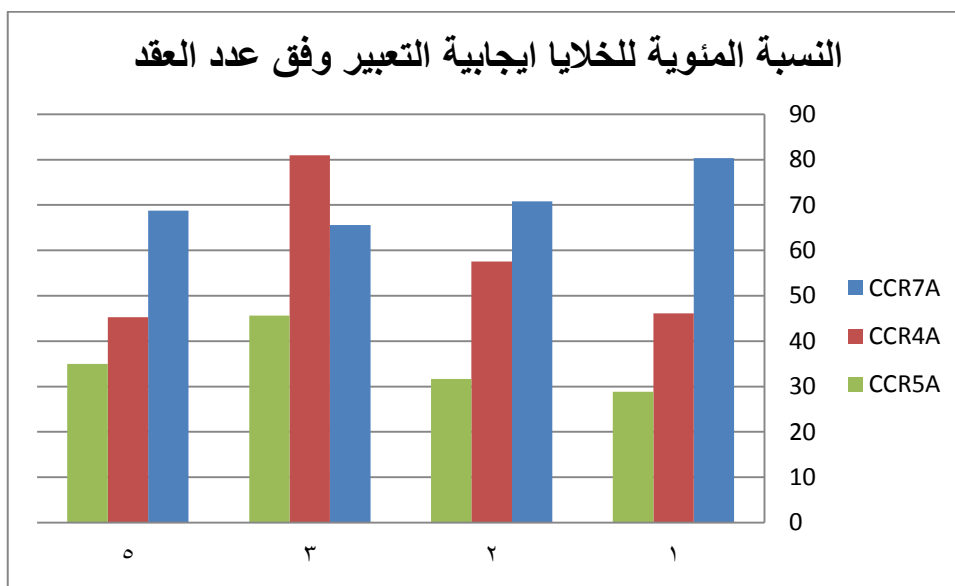
310.	7.8906721	8.0781250	2.00
------	-----------	-----------	------

جدول ١٦ اختبارات الثنائية للمقارنة لدراسة علاقة تعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 في الورم الأولي مع حجم الورم الأولي

تبين نتائج اختبارات المقارنات الثنائية عدم وجود فروق ذات دلالة إحصائية في متوسط تعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 بين أحجام الورم الأولي وذلك عند مستوى ثقة ٩٥%.

٢-١-٣ دراسة علاقة تعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 في الورم الأولي مع عدد النقائل العقدية :

يوضح (الجدول ١٧) أهم الإحصاءات الوصفية المتعلقة بتعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 في الورم الأولي وعدد النقائل العقدية (١ للنقائل العقدية الواحدة و ٢ للنقائل العقدية في عقدتين ٣ للنقائل العقدية في ٣ عقد و ٥ للنقائل العقدية في ٥ عقد وتم إقصاء الباقي لعدم تكرارها) (الشكل ٦٥).



الشكل ٦٥ النسبة المئوية للخلايا ايجابية التعبير وفق عدد العقد

عدد العقد		CCR7A	CXCR4A	CXCR5A
1	وسط حسابي	80.3125	46.0938	28.8438
	إنحراف معياري	28.04453	17.36475	20.29644
	الخطأ المعياري	9.91524	6.13937	7.17587
	عدد الحالات	8	8	8
2	وسط حسابي	70.8333	57.5278	31.6667
	إنحراف معياري	21.21320	24.06126	25.76941
	الخطأ المعياري	7.07107	8.02042	8.58980
	عدد الحالات	9	9	9
3	وسط حسابي	65.6250	80.9375	45.6250
	إنحراف معياري	44.36473	7.17163	30.02603
	الخطأ المعياري	22.18236	3.58582	15.01302
	عدد الحالات	4	4	4
5	وسط حسابي	68.7500	45.3125	35.0000
	إنحراف معياري	33.26034	23.05733	40.15595
	الخطأ المعياري	16.63017	11.52867	20.07797
	عدد الحالات	4	4	4
الإجمالي	وسط حسابي	72.7000	55.6600	33.5300
	إنحراف معياري	28.20055	22.58236	26.25122
	الخطأ المعياري	5.64011	4.51647	5.25024
	عدد الحالات	25	25	25
قيمة F		0.289	3.089	0.356
Sig		0.833	0.04	0.785

جدول ١٧ أهم الإحصاءات الوصفية المتعلقة بتعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 في الورم الأولي وعدد النقايل العقدية

لدراسة الفروق في متوسط تعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 في الورم الأولي بين الحالات المختلفة النقايل العقدية عددياً، استخدمنا اختبار تحليل التباين one-way ANOVA، بحيث تظهر نتائج الاختبار في (الجدول ١٨):

CXCR5A	CXCR4A	CCR7A	
0.356	3.089	0.289	قيمة F
0.785	0.04	0.833	Sig

جدول ١٨ تحليل التباين one-way ANOVA لدراسة الفروق في متوسط تعبيرية البروتينات CXCR5، CXCR4، CCR7 في الورم الأولي بين الحالات المختلفة النقايل العقدية عددياً.

نجد من نتيجة الاختبار عدم وجود فروق ذات دلالة إحصائية في متوسط تعبيرية البروتينات CXCR5، CCR7 في الورم الأولي مع عدد النقايل العقدية، ووجود فروق ذات دلالة إحصائية في متوسط تعبيرية البروتين CXCR4 في الورم الأولي مع عدد النقايل العقدية وذلك عند مستوى ثقة ٩٥%. ولدراسة هذه الفروق بالتفصيل ، أجرينا الاختبارات الثنائية للمقارنة (LSD) بين كل مجموعتين كما في (الجدول ١٩):

Sig.	Mean Difference (I-J)	(J)		Dependent Variable
		VAR00000 1	(I) VAR00001	
.255	-11.43403	2.00	1.00	CXCR4
.010	-34.84375(*)	3.00		
.950	.78125	5.00		
.255	11.43403	1.00	2.00	
.066	-23.40972	3.00		
.324	12.21528	5.00		
.010	34.84375(*)	1.00	3.00	
.066	23.40972	2.00		
.021	35.62500(*)	5.00		
.950	-.78125	1.00	5.00	
.324	-12.21528	2.00		
.021	-35.62500(*)	3.00		

جدول ١٩ الاختبارات الثنائية للمقارنة لدراسة الفروق التفصيلية في متوسط تعبيرية البروتين CXCR4 في الورم الأولي مع عدد النقايل العقدية

تبين نتائج اختبارات المقارنات الثنائية وجود فروق ذات دلالة إحصائية في متوسط تعبيرية البروتين CXCR4 في الورم الأولي مع عدد النقايل العقدية بين الحالات ذات النقيلة الواحدة والحالات ذات الثلاث نقائل ، وبين الحالات ذات الثلاث نقائل والحالات ذات الخمس نقائل وذلك عند مستوى ثقة ٩٥%.

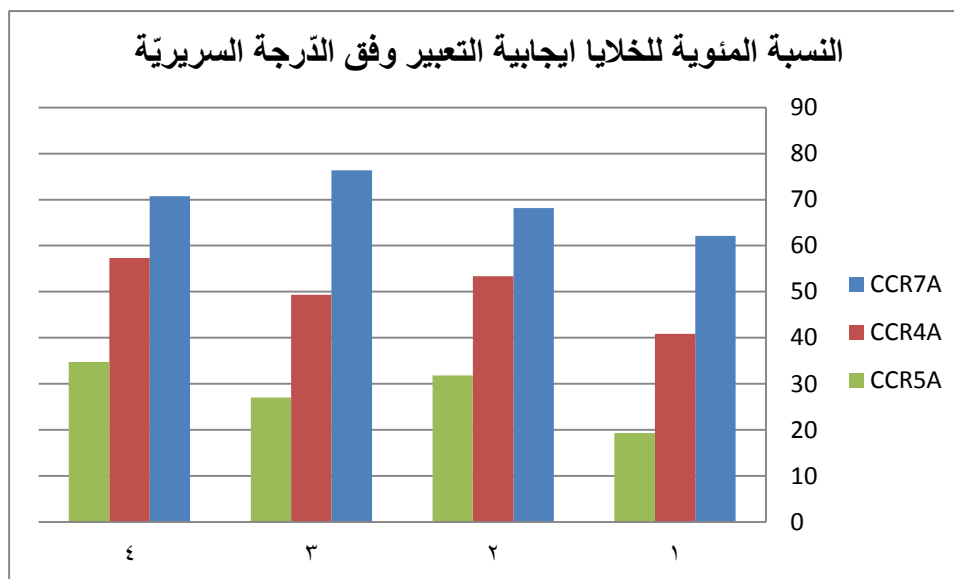
٢-٢-١-٤ دراسة علاقة تعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 في الورم الأولي مع الدرجة السريرية:

يوضح (الجدول ٢٠) أهم الإحصاءات الوصفية المتعلقة بتعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 في الورم الأولي حسب الدرجة السريرية (الشكل ٦٦):

العينة	CCR7A	CCR4A	CXCR5A
الشاهدة	وسط حسابي	0.000	0.000
	إنحراف معياري	0.000	0.000
	الخطأ المعياري	0.000	0.000
	عدد الحالات	10.000	10.000
SCC stage1	وسط حسابي	62.105	19.342
	إنحراف معياري	33.822	22.045
	الخطأ المعياري	7.759	5.058
	عدد الحالات	19.000	19.000
SCC stage 2	وسط حسابي	68.182	31.818
	إنحراف معياري	30.844	25.571
	الخطأ المعياري	9.300	7.710
	عدد الحالات	11.000	11.000
SCC stage 3	وسط حسابي	76.389	27.028
	إنحراف معياري	28.753	19.752
	الخطأ المعياري	9.584	6.584
	عدد الحالات	9.000	9.000
SCC stage 4	وسط حسابي	70.714	34.762
	إنحراف معياري	25.692	29.569
	الخطأ المعياري	5.606	6.452
	عدد الحالات	21.000	21.000
الإجمالي	وسط حسابي	58.607	24.154
	إنحراف معياري	36.402	25.609

3.061	3.683	4.351	الخطأ المعياري	
70.000	70.000	70.000	عدد الحالات	
4.236	9.667	13.51	Fقيمة	
0.004	0.00	0.00	Sig	

جدول ٢٠ أهم الإحصاءات الوصفية المتعلقة بتعبيرية البروتينات CXCR5، CXCR4، CCR7 في الورم الأولي حسب الدرجة السريرية



الشكل ٢٦ النسبة المئوية للخلايا ايجابية التعبير وفق الدرجة السريرية

لدراسة الفروق في تعبيرية البروتينات CXCR5، CXCR4، CCR7 في الورم الأولي حسب الدرجة السريرية، تم استخدام اختبار تحليل التباين one-way ANOVA، بحيث تظهر نتائج الاختبار في (الجدول ٢١):

CCR5A	CCR4A	CCR7A		
4.236	9.667	13.51	Fقيمة	
0.004	0.00	0.00	Sig	

جدول ٢١ اختبار تحليل التباين one-way ANOVA لدراسة الفروق في تعبيرية البروتينات CXCR5، CXCR4، CCR7 في الورم الأولي حسب الدرجة السريرية

يتضح من نتيجة الاختبار وجود فروق ذات دلالة إحصائية في متوسط تعبيرية البروتينات CXCR5، CXCR4، CCR7 في الورم الأولي بين الدرجات السريرية مع العينة الشاهدة، ولدراسة هذه الفروق بالتفصيل، أجرينا الاختبارات الثنائية للمقارنة (LSD) بين كل مجموعتين كما في (الجدول ٢٢):

المعنوية	درجة الخطأ	الفرق بين الوسطين	(J) DS	(I) DS		
.000	10.8268781	-62.1052632(*)	1.00	.00	LSD	CCR7A
.000	12.1086117	-68.1818182(*)	2.00			
.000	12.7331716	-76.3888889(*)	3.00			
.000	10.6476127	-70.7142857(*)	4.00			
.000	10.8268781	62.1052632(*)	.00	1.00		
.565	10.4994979	-6.0765550	2.00			
.207	11.2140376	-14.2836257	3.00			
.330	8.7745448	-8.6090226	4.00			
.000	12.1086117	68.1818182(*)	.00	2.00		
.565	10.4994979	6.0765550	1.00			
.512	12.4559956	-8.2070707	3.00			
.807	10.3145443	-2.5324675	4.00			
.000	12.7331716	76.3888889(*)	.00	3.00		
.207	11.2140376	14.2836257	1.00			
.512	12.4559956	8.2070707	2.00			
.609	11.0410601	5.6746032	4.00			
.000	10.6476127	70.7142857(*)	.00	4.00		
.330	8.7745448	8.6090226	1.00			
.807	10.3145443	2.5324675	2.00			
.609	11.0410601	-5.6746032	3.00			
.000	9.8205773	-40.8815789(*)	1.00	.00	LSD	CXCR4A
.000	10.9831806	-53.3863636(*)	2.00			
.000	11.5496911	-49.3055556(*)	3.00			
.000	9.6579738	-57.3333333(*)	4.00			
.000	9.8205773	40.8815789(*)	.00	1.00		
.194	9.5236254	-12.5047847	2.00			
.411	10.1717525	-8.4239766	3.00			
.043	7.9589975	-16.4517544(*)	4.00			
.000	10.9831806	53.3863636(*)	.00	2.00		
.194	9.5236254	12.5047847	1.00			
.719	11.2982771	4.0808081	3.00			
.675	9.3558623	-3.9469697	4.00			
.000	11.5496911	49.3055556(*)	.00	3.00		
.411	10.1717525	8.4239766	1.00			
.719	11.2982771	-4.0808081	2.00			
.426	10.0148523	-8.0277778	4.00			
.000	9.6579738	57.3333333(*)	.00	4.00		
.043	7.9589975	16.4517544(*)	1.00			
.675	9.3558623	3.9469697	2.00			
.426	10.0148523	8.0277778	3.00			
.039	9.1807174	-19.3421053(*)	1.00	.00	LSD	CXCR5A
.003	10.2675712	-31.8181818(*)	2.00			
.015	10.7971706	-27.0277778(*)	3.00			
.000	9.0287082	-34.7619048(*)	4.00			
.039	9.1807174	19.3421053(*)	.00	1.00		
.166	8.9031134	-12.4760766	2.00			
.422	9.5090116	-7.6856725	3.00			
.042	7.4404288	-15.4197995(*)	4.00			
.003	10.2675712	31.8181818(*)	.00	2.00		

.166	8.9031134	12.4760766	1.00		
.652	10.5621376	4.7904040	3.00		
.738	8.7462808	-2.9437229	4.00		
.015	10.7971706	27.0277778(*)	.00	3.00	
.422	9.5090116	7.6856725	1.00		
.652	10.5621376	-4.7904040	2.00		
.412	9.3623343	-7.7341270	4.00		
.000	9.0287082	34.7619048(*)	.00	4.00	
.042	7.4404288	15.4197995(*)	1.00		
.738	8.7462808	2.9437229	2.00		
.412	9.3623343	7.7341270	3.00		

جدول ٢٢ الاختبارات الثنائية للمقارنة لدراسة الفروق في متوسط تعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 في الورم الأولي بين الدرجات السريرية مع العينة الشاهدة

تبين نتائج اختبارات المقارنات الثنائية وجود فروق ذات دلالة إحصائية في متوسط تعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 بين العينة الشاهدة وجميع العينات السرطانية. وعدم وجود فروق ذات دلالة إحصائية في متوسط تعبيرية البروتين CCR7 في الورم الأولي بين الدرجات السريرية ، وجود فروق ذات دلالة إحصائية في متوسط تعبيرية البروتين CXCR4 بين الدرجتين الأولى والرابعة، وجود فروق ذات دلالة إحصائية في متوسط تعبيرية البروتين CXCR5 بين الدرجتين الأولى والرابعة وذلك عند مستوى ثقة ٩٥%.

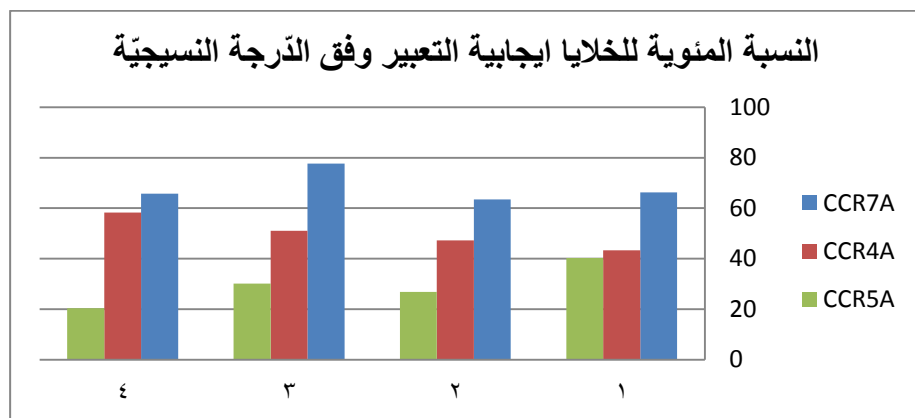
٢-٢-١-٥ دراسة علاقة تعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 في الورم الأولي مع الدرجة النسيجية:

يوضح (الجدول ٢٣) أهم الإحصاءات الوصفية المتعلقة بتعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 في الورم الأولي حسب الدرجة النسيجية (الشكل ٦٧):

العينة	CCR7A	CCR4A	CXCR5A
الشاهدة	وسط حسابي	0.000	0.000
	إنحراف معياري	0.000	0.000
	الخطأ المعياري	0.000	0.000
	عدد الحالات	10.000	10.000
SCC grade 1	وسط حسابي	66.250	40.313
	إنحراف معياري	36.401	19.200
	الخطأ المعياري	12.870	6.788

8.000	8.000	8.000	عدد الحالات	
26.852	47.261	63.523	وسط حسابي	SCC grade 2
25.936	22.617	31.723	إنحراف معياري	
5.530	4.822	6.763	الخطأ المعياري	
22.000	22.000	22.000	عدد الحالات	
30.147	51.029	77.647	وسط حسابي	SCC grade 3
29.468	30.127	21.857	إنحراف معياري	
7.147	7.307	5.301	الخطأ المعياري	
17.000	17.000	17.000	عدد الحالات	
20.385	58.308	65.769	وسط حسابي	SCC grade 4
21.934	32.513	30.557	إنحراف معياري	
6.083	9.017	8.475	الخطأ المعياري	
13.000	13.000	13.000	عدد الحالات	
24.154	43.025	58.607	وسط حسابي	الإجمالي
25.609	30.812	36.402	إنحراف معياري	
3.061	3.683	4.351	الخطأ المعياري	
70.000	70.000	70.000	عدد الحالات	
3.966	8.812	13.914	Fقيمة	
0.006	0.00	0.00	Sig	

جدول ٢٣ أهم الإحصاءات الوصفية المتعلقة بتعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 في الورم الأولي حسب الدرجة النسيجية



الشكل ٦٧ النسبة المئوية للخلايا ايجابية التعبير وفق الدرجة النسيجية

لدراسة الفروق في متوسط تعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 في الورم الأولي بين الدرجات النسيجية، نستخدم اختبار تحليل التباين one-way ANOVA، بحيث تظهر نتائج الاختبار في (الجدول ٢٤):

CCR5A	CCR4A	CCR7A	
3.966	8.812	13.914	Fقيمة
0.006	0.00	0.00	Sig

جدول ٢٤ اختبار تحليل التباين one-way ANOVA لدراسة الفروق في متوسط تعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 في الورم الأولي بين الدرجات النسيجية

يلاحظ من نتيجة الاختبار وجود فروق ذات دلالة إحصائية في متوسط تعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 في الورم الأولي بين الدرجات النسيجية مع العينة الشاهدة، وذلك عند مستوى ثقة ٩٥%. ولدراسة هذه الفروق بالتفصيل، أجرينا الاختبارات الثنائية للمقارنة (LSD) بين كل مجموعتين كما في (الجدول ٢٥):

المعنوية	درجة الخطأ	الفرق بين الوسطين	(J) DS	(I) DS		
.000	13.0576806	-66.2500000(*)	1.00	.00	LSD	CCR7A
.000	10.4987702	-63.5227273(*)	2.00			
.000	10.9706460	-77.6470588(*)	3.00			
.000	11.5788925	-65.7692308(*)	4.00			
.000	13.0576806	66.2500000(*)	.00	1.00		
.811	11.3652521	2.7272727	2.00			
.338	11.8025360	-11.3970588	3.00			
.969	12.3699447	.4807692	4.00			
.000	10.4987702	63.5227273(*)	.00	2.00		
.811	11.3652521	-2.7272727	1.00			
.117	8.8893762	-14.1243316	3.00			
.816	9.6299889	-2.2465035	4.00			
.000	10.9706460	77.6470588(*)	.00	3.00		
.338	11.8025360	11.3970588	1.00			
.117	8.8893762	14.1243316	2.00			
.246	10.1423659	11.8778281	4.00			
.000	11.5788925	65.7692308(*)	.00	4.00		
.969	12.3699447	-.4807692	1.00			
.816	9.6299889	2.2465035	2.00			
.246	10.1423659	-11.8778281	3.00			
.001	12.1253001	-43.3125000(*)	1.00	.00	LSD	CXCR4A
.000	9.7491081	-47.2613636(*)	2.00			
.000	10.1872897	-51.0294118(*)	3.00			
.000	10.7521046	-58.3076923(*)	4.00			
.001	12.1253001	43.3125000(*)	.00	1.00		
.709	10.5537191	-3.9488636	2.00			

.484	10.9597788	-7.7169118	3.00		
.196	11.4866719	-14.9951923	4.00		
.000	9.7491081	47.2613636(*)	.00	2.00	
.709	10.5537191	3.9488636	1.00		
.650	8.2546324	-3.7680481	3.00		
.221	8.9423619	-11.0463287	4.00		
.000	10.1872897	51.0294118(*)	.00	3.00	
.484	10.9597788	7.7169118	1.00		
.650	8.2546324	3.7680481	2.00		
.442	9.4181527	-7.2782805	4.00		
.000	10.7521046	58.3076923(*)	.00	4.00	
.196	11.4866719	14.9951923	1.00		
.221	8.9423619	11.0463287	2.00		
.442	9.4181527	7.2782805	3.00		
.001	11.2208484	-40.3125000(*)	1.00	.00	
.004	9.0219016	-26.8522727(*)	2.00		
.002	9.4273984	-30.1470588(*)	3.00		
.045	9.9500825	-20.3846154(*)	4.00		
.001	11.2208484	40.3125000(*)	.00	1.00	
.173	9.7664950	13.4602273	2.00		
.320	10.1422658	10.1654412	3.00		
.065	10.6298568	19.9278846	4.00		
.004	9.0219016	26.8522727(*)	.00	2.00	
.173	9.7664950	-13.4602273	1.00		
.668	7.6389020	-3.2947861	3.00		
.437	8.2753323	6.4676573	4.00		
.002	9.4273984	30.1470588(*)	.00	3.00	
.320	10.1422658	-10.1654412	1.00		
.668	7.6389020	3.2947861	2.00		
.267	8.7156329	9.7624434	4.00		
.045	9.9500825	20.3846154(*)	.00	4.00	
.065	10.6298568	-19.9278846	1.00		
.437	8.2753323	-6.4676573	2.00		
.267	8.7156329	-9.7624434	3.00		

جدول ٢٥ الاختبارات الثنائية للمقارنة لدراسة الفروق في متوسط تعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 في الورم الأولي بين الدرجات النسيجية مع العينة الشاهدة

تبين نتائج اختبارات المقارنات الثنائية وجود فروق ذات دلالة إحصائية في متوسط تعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 بين العينة الشاهدة وجميع العينات السرطانية. وعدم وجود فروق ذات دلالة إحصائية في متوسط تعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 في الورم الأولي بين الدرجات السريرية وذلك عند مستوى ثقة ٩٥%.

٢-٢-٢ مقارنة تعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 بين الورم الأولي والورم الثانوي (النقائل العقدية) :

لدراسة الفروق في متوسط تعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 بين الورم الأولي والورم الثانوي، استخدمنا اختبار ستودنت لعينتين مستقلتين، كما أجرينا عليهما تحليل معامل الارتباط الخطي (بيرسون) وتظهر نتائج الاختبار في (الجدول ٢٦-٢٧-٢٨) مع توضيح لأهم الإحصاءات الوصفية لكل بروتين على حدى :

Std. Error of Mean	Std. Deviation	Mean	FAC
4.23938	22.82975	74.9138	الأولي
5.79676	29.55780	60.8899	الثانوي
2.227			T-TEST
0.03			SIG
فرق معنوي			
معنوي (sig = 0.033) 0.4108			معامل الارتباط الخطي

جدول ٢٦ تحليل معامل الارتباط الخطي (بيرسون) لدراسة الفروق في متوسط تعبيرية البروتينات CCR7 بين الورم الأولي والورم الثانوي

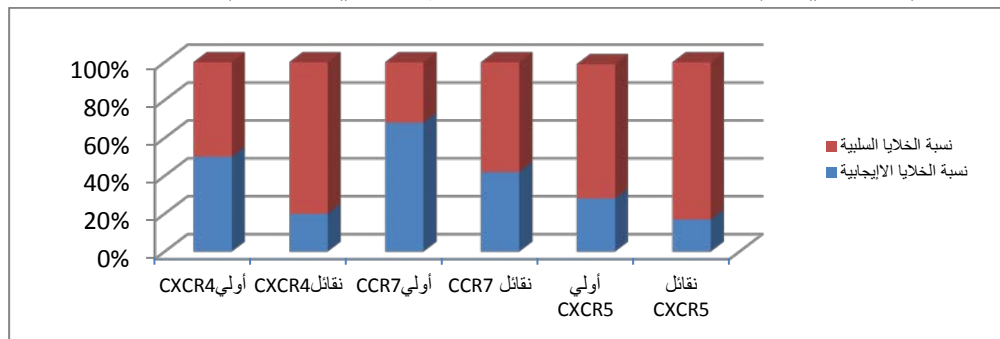
Std. Error of Mean	Std. Deviation	Mean	FAC
4.52815	24.38483	56.8190	الأولي
4.80495	24.50056	37.4622	الثانوي
2.933			T-TEST
0.005			SIG
فرق معنوي			
معنوي (sig = 0.046) 0.402			معامل الارتباط الخطي

جدول ٢٧ تحليل معامل الارتباط الخطي (بيرسون) لدراسة الفروق في متوسط تعبيرية البروتينات CXCR4 بين الورم الأولي والورم الثانوي

Std. Error of Mean	Std. Deviation	Mean	FAC
4.94460	24.72300	38.9300	الأولي
5.00674	22.94378	33.1131	الثانوي
0.821			T-TEST
0.146			SIG
فرق غير معنوي			
معنوي (sig < 0.001) 0.898			معامل الارتباط الخطي

جدول ٢٨ تحليل معامل الارتباط الخطي (بيرسون) لدراسة الفروق في متوسط تعبيرية البروتينات CXCR5 بين الورم الأولي والورم الثانوي

نجد من نتيجة الاختبار وجود فروق ذات دلالة إحصائية في متوسط تعبيرية البروتينات كلاً من CCR7، CXCR4 في الورم الأولي بين الورم الأولي والثانوي، وعدم وجود فروق ذات دلالة إحصائية في متوسط تعبيرية البروتين CXCR5 بين الورم الأولي والثانوي وذلك عند مستوى ثقة ٩٥% (الشكل ٦٨). ونجد من نتيجة الاختبار وجود ارتباط خطي بين الورم الأولي والثانوي إيجابي أي العلاقة طردية بين الورم الأولي والثانوي لكل بروتين على حدى.



الشكل ٦٨ مقارنة تعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 بين الورم الأولي والثانوي (النقائل العقدية)

٢-٢-٣ مقارنة تعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 فيما بينها في الورم الأولي :

٢-٢-٣-١ مقارنة تعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 فيما بينها في الورم الأولي تبعاً للدرجة السريرية :

لدراسة الفروق في متوسط تعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 فيما بينها في الورم الأولي تبعاً للدرجات السريرية، استخدمنا اختبار تحليل التباين one-way ANOVA، بحيث تظهر نتائج الاختبار في (الجدول ٢٩):

Std. Error of Mean	Std. Deviation	Mean	CCRA
3.1890639	23.8647688	73.258929	CCR7
3.1869695	23.6351983	54.759091	CXCR4
3.4186245	23.4369085	35.973404	CXCR5
31.805			F
0.00			SIG
فرق معنوي			

جدول ٢٩ اختبار تحليل التباين one-way ANOVA لدراسة الفروق في متوسط تعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 فيما بينها في الورم الأولي تبعاً للدرجات السريرية

نجد من نتيجة الاختبار عدم وجود فروق ذات دلالة إحصائية في متوسط تعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 فيما بينها في الورم الأولي تبعاً للدرجات السريرية وذلك عند مستوى ثقة ٩٥%. ولدراسة هذه الفروق بالتفصيل ، نجري الاختبارات الثنائية للمقارنة (LSD) بين كل مجموعتين كما في (الجدول ٣٠):

Sig.	Std. Error	Mean Difference (I-J)		
.000	4.4913023	18.4998377(*)	CCR4	CCR7
.000	4.6801721	37.2855243(*)	CCR5	CCR7
.000	4.4913023	-18.4998377(*)	CCR7	CCR4
.000	4.6995466	18.7856867(*)	CCR5	CCR4
.000	4.6801721	-37.2855243(*)	CCR7	CCR5
.000	4.6995466	-18.7856867(*)	CCR4	CCR5

* The mean difference is significant at the .05 level.

جدول ٣٠ الاختبارات الثنائية للمقارنة لدراسة الفروق في متوسط تعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 فيما بينها في الورم الأولي تبعاً للدرجات السريرية

تبين نتائج اختبارات المقارنات الثنائية وجود فروق ذات دلالة إحصائية في متوسط تعبيرية كلاً من البروتين CCR7 و CXCR4 وكلاً من CCR7 و CXCR5 وكلاً من CXCR4 و CXCR5 تبعاً للدرجة السريرية ولتوضيح الفروقات تم إجراء اختبارات المقارنات الثنائية على البروتينات الثلاث في كل درجة سريرية على حدى، فكانت النتائج كما في الجدولين ٣١-٣٢ للدرجة السريرية الرابعة، الجدولين ٣٣-٣٤ للدرجة السريرية الثالثة، الجدولين ٣٥-٣٦ للدرجة السريرية الثانية، الجدولين ٣٧-٣٨ للدرجة السريرية الأولى.

المقارنة بين الأولى للدرجة السريرية ٤

ANOVA

Sig.	F	Mean Square	df	Sum of Squares	
.000	8.814	6933.825	2	13867.651	Between Groups
		786.646	60	47198.762	Within Groups
			62	61066.413	Total

جدول ٣١ اختبار ANOVA لدراسة الفروق في متوسط تعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 فيما بينها في الورم الأولي في الدرجة السريرية الرابعة

Sig.	Mean Difference (I-J)	(J) VAR00003	(I) VAR00003
.127	13.38095	CCR4	CCR7
.000	35.95238(*)	CCR5	
.127	-13.38095	CCR7	CCR4
.011	22.57143(*)	CCR5	
.000	-35.95238(*)	CCR7	CCR5
.011	-22.57143(*)	CCR4	

جدول ٣٢ اختبارات المقارنات الثنائية لدراسة الفروق في متوسط تعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 فيما بينها في الورم الأولي في الدرجة السريرية الرابعة

المقارنة بين الأولي للدرجة السريرية ٣

Sig.	F	Mean Square	Df	Sum of Squares	
.001	10.485	5499.488	2	10998.977	Between Groups
		524.517	24	12588.417	Within Groups
			26	23587.394	Total

جدول ٣٣ اختبار ANOVA لدراسة الفروق في متوسط تعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 فيما بينها في الورم الأولي في الدرجة السريرية الثالثة

Sig.	Mean Difference (I-J)	(I) VAR00005	(J) VAR00005
.019	27.08333(*)	CCR4	CCR7
.000	49.36111(*)	CCR5	
.019	-27.08333(*)	CCR7	CCR4
.010	22.57778(*)	CCR5	
.000	-49.36111(*)	CCR7	CCR5
.010	-22.57778(*)	CCR4	

جدول ٣٤ اختبارات المقارنات الثنائية لدراسة الفروق في متوسط تعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 فيما بينها في الورم الأولي في الدرجة السريرية الثالثة

المقارنة بين الأولي للدرجة السريرية ٢

Sig.	F	Mean Square	Df	Sum of Squares	
.014	4.939	3678.411	2	7356.822	Between Groups
		744.711	30	22341.318	Within Groups
			32	29698.140	Total

جدول ٣٥ اختبار ANOVA لدراسة الفروق في متوسط تعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 فيما بينها في الورم الأولي في الدرجة السريرية الثانية

Sig.	Mean Difference (I-J)	(J)	(I)
		VAR00007	VAR00007
.213	14.79545	CCR4	CCR7
.004	36.36364(*)	CCR5	
.213	-14.79545	CCR7	CCR4
.014	22.56818(*)	CCR5	
.004	-36.36364(*)	CCR7	CCR5
.014	-22.56818(*)	CCR4	

جدول ٣٦ اختبارات المقارنات الثنائية لدراسة الفروق في متوسط تعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 فيما بينها في الورم الأولي في الدرجة السريرية الثانية

المقارنة بين الأولي للدرجة السريرية ١

Sig.	F	Mean Square	df	Sum of Squares	
.000	10.480	8686.424	2	17372.849	Between Groups
		828.840	54	44757.362	Within Groups
			56	62130.211	Total

جدول ٣٧ اختبار ANOVA لدراسة الفروق في متوسط تعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 فيما بينها في الورم الأولي في الدرجة السريرية الأولى

Sig.	Mean Difference (I-J)	(J)	(I)
		VAR00015	VAR00015
.127	21.22368	CCR4	CCR7
.000	42.76316(*)	CCR5	
.127	-21.22368	CCR7	CCR4
.025	21.53947(*)	CCR5	
.000	-42.76316(*)	CCR7	CCR5
.025	-21.53947(*)	CCR4	

* The mean difference is significant at the .05 level.

جدول ٣٨ اختبارات المقارنات الثنائية لدراسة الفروق في متوسط تعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 فيما بينها في الورم الأولي في الدرجة السريرية الأولى

أظهرت نتائج المقارنات الثنائية بين البروتينات الثلاثة في كل درجة سريرية على حدى :
وجود فروق بين تعبيرية CCR7 و CXCR4 في الدرجة الثالثة السريرية.
وجود فروق بين تعبيرية CXCR4 و CXCR5 في الدرجات السريرية كافة.
وجود فروق بين تعبيرية CCR7 و CXCR5 في الدرجات السريرية كافة.

٢-٣-٢-٢ مقارنة تعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 فيما بينها في الورم الأولي تبعاً للدرجة النسيجية :

لدراسة الفروق في متوسط تعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 فيما بينها في الورم الأولي تبعاً للدرجات النسيجية، استخدمنا اختبار تحليل التباين one-way ANOVA، ولتوضيح الفروقات تم إجراء اختبارات المقارنات الثنائية على البروتينات الثلاث في كل درجة نسيجية على حدى، فكانت النتائج كما في الجدولين ٣٩-٤٠ للدرجة النسيجية الرابعة، الجدول ٤١-٤٢ للدرجة الثالثة، والجدولين ٤٣-٤٤ للدرجة الثانية، والجدول ٤٥ للدرجة الأولى.

المقارنة بين الأولي للدرجة النسيجية ٤

Sig.	F	Mean Square	df	Sum of Squares	
.001	9.344	7699.462	2	15398.923	Between Groups
		823.966	36	29662.779	Within Groups
			38	45061.702	Total

جدول ٣٩ اختبار ANOVA لدراسة الفروق في متوسط تعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 فيما بينها في الورم الأولي في الدرجة النسيجية الرابعة

Sig.	Mean Difference (I-J)	(J) VAR00021	(I) VAR00021
.512	7.46154	CCR4	CCR7
.000	45.38462(*)	CCR5	
.512	-7.46154	CCR7	CCR4
.002	37.92308(*)	CCR5	
.000	-45.38462(*)	CCR7	CCR5
.002	-37.92308(*)	CCR4	

* The mean difference is significant at the .05 level.

جدول ٤٠ اختبارات المقارنات الثنائية لدراسة الفروق في متوسط تعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 فيما بينها في الورم الأولي في الدرجة النسيجية الرابعة

المقارنة بين الأولي للدرجة النسيجية ٣

Sig.	F	Mean Square	df	Sum of Squares	
.000	12.827	9635.662	2	19271.324	Between Groups
		751.227	48	36058.875	Within Groups
			50	55330.199	Total

جدول ٤١ اختبار ANOVA لدراسة الفروق في متوسط تعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 فيما بينها في الورم الأولي في الدرجة النسيجية الثالثة

		(J) VAR0002 3	(I) VAR0002 3
Sig.	Mean Difference (I-J)		
.007	26.61765(*)	CCR4	CCR7
.000	47.50000(*)	CCR5	
.007	-26.61765(*)	CCR7	CCR4
.031	20.88235(*)	CCR5	
.000	-47.50000(*)	CCR7	CCR5
.031	-20.88235(*)	CCR4	

* The mean difference is significant at the .05 level.

جدول ٤٢ : اختبارات المقارنات الثنائية لدراسة الفروق في متوسط تعبيرية البروتينات CCR7، CCR4، CXCR5، فيما بينها في الورم الأولي في الدرجة النسيجية الثالثة

المقارنة بين الأولي للدرجة النسيجية ٢

Sig.	F	Mean Square	df	Sum of Squares	
.000	10.172	7427.512	2	14855.025	Between Groups
		730.191	63	46002.006	Within Groups
			65	60857.030	Total

جدول ٤٣ : اختبار ANOVA لدراسة الفروق في متوسط تعبيرية البروتينات CCR7، CCR4، CXCR5، فيما بينها في الورم الأولي في الدرجة النسيجية الثانية

		(J) VAR0002 5	(I) VAR0002 5
Sig.	Mean Difference (I-J)		
.050	16.26136	CCR4	CCR7
.000	36.67045(*)	CCR5	
.050	-16.26136	CCR7	CCR4
.015	20.40909(*)	CCR5	
.000	-36.67045(*)	CCR7	CCR5
.015	-20.40909(*)	CCR4	

* The mean difference is significant at the .05 level.

جدول ٤٤ : اختبارات المقارنات الثنائية لدراسة الفروق في متوسط تعبيرية البروتينات CCR7، CCR4، CXCR5، فيما بينها في الورم الأولي في الدرجة النسيجية الثانية

المقارنة بين الأولي للدرجة النسيجية ١

Sig.	F	Mean Square	df	Sum of Squares	
.152	2.065	1610.510	2	3221.021	Between Groups
		779.967	21	16379.313	Within Groups
			23	19600.333	Total

جدول ٤٥ : اختبار ANOVA لدراسة الفروق في متوسط تعبيرية البروتينات CCR7، CCR4، CXCR5، فيما بينها في الورم الأولي في الدرجة النسيجية الأولى

أظهرت نتائج المقارنات الثنائية بين البروتينات الثلاثة في كل درجة نسيجية على حدى :
وجود فروق بين تعبيرية CCR7 و CXCR4 في الدرجة الثالثة النسيجية.
وجود فروق بين تعبيرية CXCR4 و CXCR5 في الدرجات الثانية والثالثة والرابعة النسيجية.
وجود فروق بين تعبيرية CCR7 و CXCR5 في الدرجات الثانية والثالثة والرابعة النسيجية.
أما في الدرجة النسيجية الأولى فلم تظهر أية فروق في تعبيرية الملونات الثلاثة مع باقي الدرجات النسيجية.

٢-٢-٤ مقارنة تعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 فيما بينها في الورم الثانوي :

لدراسة الفروق في متوسط تعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 فيما بينها في الورم الثانوي تبعاً للدرجات السريرية، استخدمنا اختبار تحليل التباين one-way ANOVA ، بحيث تظهر نتائج الاختبار في (الجدول ٤٦):

Std. Error of Mean	Std. Deviation	Mean	1.
5.94964	30.91525	58.8199	CCR7
4.80495	24.50056	37.4622	CCR4
5.00674	22.94378	33.1131	CCR5
6.715			F
0.002			SIG
فرق معنوي			

جدول ٤٦ : اختبار تحليل التباين one-way ANOVA لدراسة الفروق في متوسط تعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 فيما بينها في الورم الثانوي تبعاً للدرجات السريرية

نجد من نتيجة الاختبار عدم وجود فروق ذات دلالة إحصائية في متوسط تعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 فيما بينها في الورم الثانوي وذلك عند مستوى ثقة ٩٥%.
ولدراسة هذه الفروق بالتفصيل ، أجرينا الاختبارات الثنائية للمقارنة (LSD) بين كل مجموعتين كما في الجدول ٤٧:

Sig.	Std. Error	Mean Difference (I-J)		
.005	7.31965	21.35771(*)	CCR4	CCR7
.001	7.75086	25.70679(*)	CCR5	
.005	7.31965	-21.35771(*)	CCR7	CCR4
.580	7.81580	4.34908	CCR5	
.001	7.75086	-25.70679(*)	CCR7	CCR5
.580	7.81580	-4.34908	CCR4	

* The mean difference is significant at the .05 level.

جدول ٤٧ الاختبارات الثنائية للمقارنة لدراسة الفروق في متوسط تعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 فيما بينها في الورم الثانوي تبعاً للدرجات السريرية

تبين نتائج اختبارات المقارنات الثنائية وجود فروق ذات دلالة إحصائية في متوسط تعبيرية كلاً من البروتين CCR7 و CXCR4 و كلاً من CCR7 و CXCR5 وعدم وجود فروق ذات دلالة إحصائية بين كلاً من CXCR4 و CXCR5 في الورم الثانوي.

الباب الرابع المناقشة

Discussion

تعتبر النقائل السرطانية السبب الأهم في وفيات السرطان والتي منها نقائل للعقد اللمفية ومنها نقائل لأعضاء الجسم المختلفة. تسبب النقائل السرطانية للعقد اللمفية تشوشاً فيها الأمر الذي ينعكس وظيفياً على الجملة المناعية، مما جعل الباحثين يولون اهتماماً كبيراً في فهم الآليات التي تستخدمها الخلية السرطانية لنتهرب من الدفاعات المناعية.

تعتبر آلية محاكاة الخلية الدموية وخاصة البيضاء في حركتها وانجذابها لموطنها إحدى الآليات الخطيرة التي تستخدمها الخلية السرطانية، فالخلية الظهارية الطبيعية خلية ثابتة نسبياً ولا قدرة لها على الحركة ولا تتجذب لوسائط كيميائية، في حين تظهر الخلية السرطانية في العديد من السرطانات مستقبل الكيموكين الذي يجذب للكيموكين النوعي له، والذي تظهره أوساط عديدة منها لحمة السرطان ومنها أعضاء تبيّن أنها تلك الأعضاء التي يكثر فيها الانتقالات كالعقد اللمفية والرئة والكبد والعظام (Müller et al., 2001).

نالت بعض السرطانات النصيب الأكبر من الدراسات على مستقبلات الكيموكين كما في سرطان الثدي ، ولم ينل السرطان شائك الخلايا للرأس والعنق الحظ الوافر من الدراسات مع وجود بعض الدراسات القليلة غير الكافية.

فمثلا بعض الدراسات التي تناولت المستقبل CXCR5 كانت قليلة جداً ولم تتعدى ٤ مقالات، وهي مع ذلك لم تستعرض الجوانب الإحصائية التي تناولتها الدراسات التي شملت المستقبلين CXCR4 وCCR7 (Muller et al., 2006) (Pandruvada et al., 2010) (Yuvaraj, 2009).

كما أن الدراسات جميعها لم تُفصّل في علاقة التعبير التي يبديها الورم الأولي مع التعبير التي تبديها النقائل العقدية، والتي لها أهمية كبيرة في الدراسة الإحصائية، كما لم تدرس علاقة تعبيرية المستقبلات مع بعضها البعض في ورما الأولي من جهة وفي نقائله العقدية من جهة أخرى، الأمر الذي يجعل البحث الذي أجريناه جديداً من الناحية الدراسية كخطوة لفهم تفصيلي لحيوية (biology) سرطان شائك الخلايا للرأس والعنق ومنها لآفاق علاجية متطورة.

١- دراسة تعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 في الورم الأولي:

١-١ دراسة علاقة تعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 في الورم الأولي مع جنس المريض:

نجد من نتيجة الاختبار عدم وجود فروق ذات دلالة إحصائية في متوسط تعبيرية البروتينات CXCR5، CXCR4، CCR7 في الورم الأولي بين الذكور والإناث وذلك عند مستوى ثقة ٩٥% .

وتعلينا أن هذه البروتينات هي تشفير لمورثات غير مرتبطة بالصبغيات الجنسية أو الهرمونات الجنسية في هذا الورم مما يجعل الفروق الإحصائية في تعبيريتها في الأورام الأولية غير موجودة بين الذكور والإناث.

لم يجد كلاً من Almofti و Katayama و YIN وأي علاقة بين تعبيرية CXCR4 و جنس المريض (Yin and Gao, 2007, Katayama et al., 2005, Almofti et al., 2004).

كما لم يجد علاقة بين تعبيرية CXCR4 و CCR7 و جنس المريض (Ueda et al., 2010).

لم يجد Shang و Tsuzuki و Ishida علاقة بين تعبيرية CCR7 و جنس المريض (Shang et al., 2009) (Tsuzuki et al., 2006) (Ishida et al., 2009).

أمّا فيما يخصّ علاقة تعبيرية CXCR5 و جنس المريض فلم نجد أية دراسة حول هذه العلاقة.

٢-١ دراسة علاقة تعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 في الورم الأولي مع حجم الورم الأولي:

تبين نتائج اختبارات المقارنات الثنائية عدم وجود فروق ذات دلالة إحصائية في متوسط تعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 بين حجوم الورم الأولي وذلك عند مستوى ثقة ٩٥%.

ونعلل نتائجنا بأن الـ CCL19 رابطة الـ CCR7 التي تسمح ببقاء خلايا الورم على قيد الحياة والانتشار تنتج من قبل خلايا الورم ذاته (فتشكل بذلك حلقة ذاتية الاشباع)، ومن قبل الخلايا التائية المحيطة بالورم، ولم يرتبط اسمها مع حالات المادة الأساسية MMPs مما يجعل انتشار هذه الخلايا محدوداً، في حين الـ SDF1 رابطة CXCR4 التي تنتج من قبل خلايا مصورات الليف في لحمة السرطان والتي لها علاقة بتحريض إفراز الـ MMPs الحالة للقلب خارج الخلوي والمسهلة للغزو تكون أقل فاعلية في تحريض انقسام خلايا الورم الأولي منها في العقدة اللمفية، وتكون مكبوحة مؤقتاً من قبل البالعات الكبيرة المفعلة التي تفرز سيتوكينات مثل IL-1 و TNF α مما يجعل الممال الأكبر للـ SDF1 في اللحمية البعيدة عن الخلايا السرطانية، بالتالي فإن حدوث الارتباط للخلايا التي تظهر المستقبل CXCR4 مع مستقبله يكون صعباً وان حدث فتكون وظيفة الارتباط موجّهة لتسهيل الهجرة أكثر من الانتشار في اللحمية.

أما بالنسبة لـ CXCR5 فيبدو دوره بالغزو العظمي المجهرى، الذي تلعب فيه البروتينات الحالة MMPs دوراً مهماً في الغزو بشكل عام والغزو العظمي بشكل خاص، والذي أكدت الدراسات تنظيمه من قبل الكيموكين CXCL13 الرابط للمستقبل الكيموكيني CXCR5 بالإضافة لتحفيزه رابطة الـ RANKLE على مصورات العظم المحفزة على تمايز كاسرات العظم مما يجعل الانتشار مجهرياً microinvasement ولا علاقة له بالحجم، أضف أن العينات المترافقة مع غزو عظمي كانت محدودة مما لم يسمح لنا بتقدير النتيجة.

اتفقنا مع كلاً من Almofti و Uchida و Ishikawa و Yin إذ لم يجدوا أية علاقة بين تعبيرية CXCR4 وحجم الورم (Almofti et al., 2004) (Yin and Gao, 2007) (Uchida et al., 2003)

في حين اختلفنا مع Teng و Ueda في وجود علاقة بين تعبيرية ال CXCR4 والتصنيف T لحجم الورم (Teng et al., 2009) (Ueda et al., 2010)

اتفقنا مع Singh (Singh et al., 2009) الذي قام بدراسة تأثير المستقبل CXCR5 على سلالة خلايا سرطانية كبدية فتبين أن له تأثير في زيادة الحجم لكنه تأثير محدود (حيث بقي حجم الورم صغيراً) ولمدة قصيرة ١٦-٢٠ يوم، واستنتج عدم ارتباط تعبيرية المستقبل CXCR5 مع حجم الورم في سرطان الكبد.

كما اتفقت نتائجنا مع Biswas الذي أكد عدم ارتباط تعبيرية ال CXCR5 في الورم الأولي لسرطان الثدي مع حجم الورم (Biswas et al., 2014)

اتفقنا مع Oliveira في عدم وجود علاقة بين تعبيرية ال CCR7 وحجم الورم الأولي (Oliveira-Neto et al., 2013)

في حين اختلفنا مع ما وجد كلاً من Ueda و Shang و Ding إذ وجدوا علاقة واضحة بين تعبيرية CCR7 وحجم الورم الأولي (Ueda et al., 2010, Shang et al., 2009, Ding et al., 2003)

ونفق بذلك أيضاً مع نتائج Tsuzuki الذي وجد أن الخلايا الورمية في سرطان شائع الخلايا التي تظهر CCR7 تبدي أيضاً عامل النمو الورمي PCNA، كما وجد أن رابطة ال CCR7 ال CCL19 تظهر في خلايا الورم والتأثيرات المحيطة بالورم. وحدث الارتباط بين المستقبل CCR7 على الخلايا السرطانية وكيموكينة CCL19 في الورم الأولي يسمح للخلايا السرطانية بالبقاء على قيد الحياة والانتشار (Tsuzuki et al., 2006).

كما وجد Banas أن الخلايا المسراقية الكبيبية في الكلية renal mesangial cells عند البشر التي تظهر CCR7 يقل استماتتها نتيجة تنشيط تفعيل Caspase-3 (Banas et al., 2002) مما يتوافق مع تحليل نتيجتنا السابقة.

١-٣ دراسة علاقة تعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 في الورم الأولي مع عدد النّقائل العقدية :

نجد من نتيجة الاختبار عدم وجود فروق ذات دلالة إحصائية في متوسط تعبيرية البروتينات CCR7، CXCR5 في الورم الأولي مع عدد النّقائل العقدية، ووجود فروق ذات دلالة إحصائية في متوسط تعبيرية البروتين CXCR4 في الورم الأولي مع عدد النّقائل العقدية وذلك عند مستوى ثقة ٩٥%.

تبين نتائج اختبارات المقارنات الثنائية وجود فروق ذات دلالة إحصائية في متوسط تعبيرية البروتين CXCR4 في الورم الأولي مع عدد النّقائل العقدية بين الحالات ذات النقلة الواحدة والحالات ذات الثلاث نقائل، وبين الحالات ذات الثلاث نقائل والحالات ذات الخمس نقائل وذلك عند مستوى ثقة ٩٥%.

نفسر نتائجنا هذه -نظراً للنسب المئوية للخلايا السرطانية إيجابية التعبير للمستقبل CCR7 في الورم الأولي تبعاً لعدد العقد- أن هذا المستقبل مرتبط بانتقال الخلايا للعقد اللمفية إلا أن نتيجتنا تظهر عدم وجود فروق في تعبيره في الحالات التي تظهر نقيلة واحدة أو أكثر مما يمكن تفسيره بأن المستقبل CCR7 يشجع على الانتقالات في مراحلها المبكرة (نقيلة واحدة) ويستمر في تشجيعه هذا للخلايا السرطانية في الحالات السريرية عالية الدرجة السريرية (الثالثة والرابعة). بعبارة أخرى CCR7 يقترح الانتقالات.

نتفق بنتائجنا مع دراسة Tsuzuki و Ding في كون الكيموكين الرابط للمستقبل CCR7 المسؤول عن هجرة الخلايا السرطانية هو CCL21 ينتج في العقدة اللمفية فقط (Tsuzuki et al., 2006) (Ding et al., 2003)، ونتفق مع Shang (Shang et al., 2009) في كون ممال الـ CCL21 يختلف من عقدة لأخرى

نفسر نتائجنا هذه -نظراً للنسب المئوية للخلايا السرطانية إيجابية التعبير للمستقبل CXCR4 في الورم الأولي تبعاً لعدد العقد- أن هذا المستقبل مرتبط بانتقال الخلايا للعقد اللمفية إلا أن نتائجنا تظهر وجود فروق في تعبيره في الحالات التي تظهر نقيلة واحدة عن التي تظهر أكثر من نقيلة عقدية لصالح الأخيرة، مما يمكن تفسيره بأن المستقبل CXCR4 يشجع على الانتقالات في مراحلها المتأخرة (أكثر من نقيلة) وذلك في الحالات السريرية عالية الدرجة السريرية (الثالثة والرابعة) بعبارة أخرى CXCR4 هو استراتيجية تالية بعد قدح الانتقالات من قبل CCR7.

تتفق نتائجنا مع ما توصل له Uchida و Katayama في أن الخلايا السرطانية التي تظهر المستقبل CXCR4، تنقسم بشدة عالية عند ارتباطها برابطتها في النّقايل العقدية أكثر منها في ورمها الأولي (Uchida et al., 2003) (Katayama et al., 2005)، كما نتفق مع Katayama الذي وجد أن mRNA للكيموكين SDF-1 أكثر تعبيرية في لحمة الورم في النّقايل العقدية منه في لحمة الورم الأولي (Katayama et al., 2005).

وجد Ueda (Ueda et al., 2010) ارتباطاً بين تعبيرية CXCR4 في الورم الأولي وظهور نقائل لمفية متعددة N2b، كما وجد Kato ارتباط فرط تعبيرية CXCR4 في الخلايا السرطانية مع زيادة النّقايل العقدية في سرطان الثدي (Kato et al., 2003)

كما ذكر العلماء أن رابطة المستقبل CXCR4 في الخلايا السرطانية تلعب دوراً هاماً في إنتاج الـ MMP2, MMP9 كما في الـ megakaryocytes* الناضجة والخلايا CD34+ النقيوية وبواسطتها تكون قادرة على تحديد وجهتها أثناء حركتها (Lane et al, 2000, Scotton et al, 2002, Janowska-Wieczorek et al, 2000)

نفسر نتائجنا بالنسبة لـ CXCR5 في عدم وجود فروق احصائية في تعبيرية المستقبل بالورم الأولي تبعاً لعدد العقد، وبأخذ عين الاعتبار النسبة المئوية للإيجابية الضعيفة أن الخلايا

* خلية megakaryocyte أو الخلية النواة وهي خلية نقيوية تعطي فيما بعد الصفائح الدموية.

السرطانية المستعمرة تظهره لكنه ليس له دور مباشر في هجرتها إنما يوجد آلية أخرى مسببة لهجرتها .

نتفق مع Yuvaraj في دور الـ CXCR5 التمايزي (Yuvaraj, 2009). ولم تظهر أية دراسة دوره في تحرك الخلايا السرطانية.

١-٤ دراسة علاقة تعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 في الورم الأولي مع الدرجة السريرية:

يتضح من نتائجنا وجود فروق ذات دلالة إحصائية في متوسط تعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 في الورم الأولي بين الدرجات السريرية مع العينة الشاهدة، كما تبين نتائج اختبارات المقارنات الثنائية وجود فروق ذات دلالة إحصائية في متوسط تعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 بين العينة الشاهدة وجميع العينات السرطانية. نعلل ذلك بأن المستقبلات الثلاثة لا تظهرها الخلايا الظهارية السليمة إنما هي خاصة ببعض الخلايا المتحركة، وإحدى استراتيجيات الخلايا السرطانية هي تقليد هذه الخلايا في الحركة باظهارها لهذه المستقبلات وانجذابها لرابطتها.

اتفقت نتائجنا مع Xia في دراسته حول سرطان شائع الخلايا في اللسان في كون العينة الشاهدة السليمة سلبية تماماً للمستقبل CCR7 (Xia et al., 2015) يعود ذلك للطفرات الجينية الأكثر حدوثاً في الخلايا السرطانية منها في الخلايا الطبيعية، وكما ذكر Muller تسبب التغيرات الجينية أو النسخية transcriptional لتحفيز ظهور تعبيرية CCR7 (Müller et al., 2001)

كما اتفقت نتائجنا مع Katayama في كون العينة الشاهدة السليمة سلبية تماماً للمستقبل CXCR4 (Katayama et al., 2005). كما اتفقنا مع Teng الذي درس المورثتين SDF1 و CXCR4 في الخلايا التي تحررها وتظهرها على الترتيب سواء في السليمة والسرطانية فتبين أن مورثة الـ SDF1 هي نفسها (غير طافرة) في كلتا الحالتين وتحررها الخلايا الظهارية السليمة والورمية، أما مورثة الـ CXCR4 فهي طافرة في الحالة السرطانية ولا تظهرها الخلايا الظهارية السليمة إنما فقط السرطانية (Teng et al., 2009)

اتفقنا مع Singh في أن البشرة الطبيعية للبروستات سلبية التعبير للمستقبل CXCR5 بعكس خلايا سرطان البروستات (Singh et al., 2009) كما اتفقت نتائجنا مع Biswas الذي أكد ارتباط تعبيرية الـ CXCR5 في الورم الأولي لسرطان الثدي مع التحول البشري الميزانثيمي EMT (Biswas et al., 2014)

كما بينت دراستنا على عدم وجود فروق ذات دلالة إحصائية في متوسط تعبيرية البروتين CCR7 في الورم الأولي بين الدرجات السريرية ، وجود فروق ذات دلالة إحصائية في متوسط تعبيرية البروتين CXCR4 بين الدرجتين الأولى والرابعة، وجود فروق ذات دلالة إحصائية في متوسط تعبيرية البروتين CXCR5 بين الدرجتين الأولى والرابعة وذلك عند مستوى ثقة ٩٥%

تتوافق هذه النتيجة مع نتائجنا السابقة في عدم وجود فروق إحصائية بين تعبيرية البروتين CCR7 في الورم الأولي تبعاً لحجمه ولعدد نقائله العقدية مع العلم أن هذا التحليل يختلف عن سابقه فهنا تمت المقارنة بين ٤ مجموعات هي الدرجات السريرية في حين تمت المقارنة سابقاً بين ٣ مجموعات تبعاً لحجم الورم وبين ٤ مجموعات تبعاً لعدد النقائل محصورتان بين الدرجتين السريريتين الثالثة والرابعة

ويمكننا الاستفادة من هذه النتيجة في كون الـ CCR7 عامل تشخيصي للسرطان.

اتفقنا مع Oliveira في دراسته التي أظهرت أن تعبيرية الـ CCR7 عالية في الخلايا السرطانية لسرطان الفم سواء ترافقت الأورام مع نقائل عقدية أم لم تترافق (Oliveira-Neto et al., 2013)

وجد Ding ترافق التعبيرية العالية لـ CCR7 في سرطان شائع الخلايا في المري مع تزايد المعطيات السريرية من عمق الورم والتصنيف TNM والغزو العقدي (Ding et al., 2003)

ولاحظ Xia وجود علاقة بين شدة التعبيرية مع الدرجة السريرية فكانت الإيجابية بالدرجتين ٣-٤ ٢٤/٢٠ بنسبة ٨٣% و ٣٦/١٩ بالنسبة للدرجتين ١-٢ بنسبة ٢٥% (Xia et al., 2015).

كما تتوافق هذه النتيجة مع نتائجنا السابقة في عدم وجود فروق إحصائية بين تعبيرية البروتين CXCR4 في الورم الأولي تبعاً لحجمه ووجود فروق إحصائية بين تعبيرية البروتين CXCR4 في الورم الأولي تبعاً لعدد نقائله العقدية ويمكننا الاستفادة من هذه النتيجة في اعتبار فرط تعبيرية الـ CXCR4 في الورم الأولي كعامل انذاري.

وجد Ueda ارتباطاً وثيقاً بين تعبيرية الـ CXCR4 والنقائل العقدية والانتقالات البعيدة في السرطان شائك الخلايا للرأس والعنق (Ueda et al., 2010) كما وجد كلاً من Yin و Uchida و Oliveira-Neto و Almofti و Ishikawa النتائج ذاتها مع السرطان شائك الخلايا الفموي (Almofti et al., 2004, Ishikawa et al., 2006, Oliveira-Neto et al., 2008, Uchida et al., 2003, Yin and Gao, 2007) ووجد Albert و Delilbasi في سرطان شائك الخلايا في اللسان النتيجة نفسها (Albert et al., 2012, Delilbasi et al., 2004) ووجد Tan و Zhang في سرطان شائك الخلايا للحنجرة والبلعوم الفموي النتائج ذاتها (Tan et al., 2008, Zhang et al., 2005).

أما فيما يتعلق بـ CXCR5 فما توصلت إليه نتائجنا السابقة من عدم وجود فروق إحصائية في تعبيرية الـ CXCR5 في الورم الأولي تبعاً لحجم الورم أو تبعاً لعدد النقائل يتطلب أن تكون النتيجة هي عدم وجود فروق إحصائية في تعبيريته في الورم الأولي تبعاً للدرجة السريرية (ونكرر أن هذا التحليل مختلف عن سابقه) لكننا نعلل أن الفرق بين الدرجتين الأولى والرابعة كان بالحدود الدنيا (جدول ٢٢) وعند العودة (للجدول ١٦) نجد أن أكبر فرق كان في تعبيرية CXCR5 بين القيمة ١ و ٣ المعطى لحجم الورم الأولي وذلك بين الملونات الثلاثة وهو وإن كان غير دال إحصائياً إلا أنه الأقرب لإحداث فرق إحصائي، وهذا يعود لكون الحالات ذات الحجم الكبير بعضها يترافق مع غزو عظمي.

اتفقنا بذلك مع Muller الذي وجد تعبيرية عالية لمستقبل الكيموكين CXCR5 في نسيلة خلايا سرطان شائك الخلايا المندرجة من عقد لمفية مصابة بنقائل سرطانية (Muller et al., 2006).

اتفقنا أيضاً مع Pandruvada في تجربته على السرطان الفموي المستحدث عند الفئران ودور مضاد الـ CXCL13 (anti-CXCL13) في تخفيض تعبيرية MMP9، مما أثبت دور الارتباط CXCL13/CXCR5 في الغزو السرطاني للعظم وفي تنظيم تعبيرية الـ MMP9 في السرطان شائك الخلايا الفموي (Pandruvada et al., 2010).

نتفق مع دراسة Miyazaki في أن التنظيم الراجع down regulation لا CXCR5 يقلل من تقدم الورم سريرياً (Yeudall et al., 2007). ونتفق مع El-Haibi في ارتباط تعبيرية CXCR5 في سرطان البروستات مع تقدم الورم والذي أثبت أن لا CXCR5 دوراً هاماً في تحفيز الـ ERK، التي بدورها تحفز تمايز كاسرات العظم مع c-MYC والـ RANKL على مصورات العظم (El-Haibi et al., 2011).

١-٥ دراسة علاقة تعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 في الورم الأولي مع الدرجة النسيجية:

يتضح من نتائجنا وجود فروق ذات دلالة إحصائية في متوسط تعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 في الورم الأولي بين الدرجات النسيجية مع العينة الشاهدة ، وذلك عند مستوى ثقة ٩٥%.

تبين نتائج اختبارات المقارنات الثنائية وجود فروق ذات دلالة إحصائية في متوسط تعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 بين العينة الشاهدة وجميع العينات السرطانية.

وعدم وجود فروق ذات دلالة إحصائية في متوسط تعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5، في الورم الأولي بين الدرجات السريرية وذلك عند مستوى ثقة ٩٥%.

ويمكن أن يُفسر ذلك أن المستقبلات CCR7، CXCR4، CXCR5 لا تتدخل بالتغيرات التمايزية التي تطرأ على الخلية السرطانية وتحدد درجته النسيجية، ونستطيع القول أن لا علاقة للدرجة النسيجية بالقدرة على تشكيل انتقالات.

وجد Ding في دراسته علاقة ارتباط بين شدة تعبيرية المستقبل CCR7 والدرجة النسيجية فبلغت نسبة التعبيرية الشديدة للدرجة النسيجية جيدة التمايز ٣٥% وللدرجة النسيجية متوسطة التمايز ٥٠% وللدرجة النسيجية منخفضة التمايز ٣١% (Ding et al., 2003) ولم يذكر وجود علاقة بين درجة تعبيرية الملون المستقبل CCR7 بين الدرجات النسيجية الأربع المختلفة للأورام المدروسة.

واتفقت نتائجنا مع ISHIDA في عدم وجود علاقة بين تعبيرية المستقبل CCR7 بين الدرجات النسيجية (Ishida et al., 2009).

وجد Ueda و Xia في دراسة كل منهما ارتباطاً بين تعبيرية الـ CCR7 والدرجة النسيجية (Ueda et al., 2010) (Xia et al., 2015)

وجد Katayama عدم ارتباط تعبيرية الـ CXCR4 مع الدرجة النسيجية (Katayama et al., 2005) كذلك أكدت دراسة Ishikawa على عدم وجود علاقة بين التمايز النسيجي وتعبيرية المستقبل CXCR4 (Ishikawa et al., 2006) في حين وجدت دراسة Yin ارتباط تعبيرية المستقبل CXCR4 مع النمط النسيجي (Yin and Gao, 2007)

أما بالنسبة لـ CXCR5 فلم نجد أية دراسة تتعلق بتعبيرية هذا المستقبل في خلايا سرطان شائع الخلايا للرأس والعنق وارتباطها بدرجته النسيجية، ولعل دراستنا هي الأولى في هذا المجال. إلا أن نتائجنا اتفقت مع Biswas الذي لم يجد ارتباط بين تعبيرية الـ CXCR5 في الورم الأولي لسرطان الثدي مع الدرجة النسيجية (Biswas et al., 2014)

٢- مقارنة تعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 بين الورم الأولي والورم الثانوي (النقائل العقدية) :

يتضح من نتائجنا وجود فروق ذات دلالة إحصائية في متوسط تعبيرية البروتينات كلاً من CCR7، CXCR4 في الورم الأولي بين الورم الأولي والثانوي، وعدم وجود فروق

ذات دلالة إحصائية في متوسط تعبيرية البروتين CXCR5 بين الورم الأولي والثانوي وذلك عند مستوى ثقة ٩٥%.

ونجد من نتيجة الاختبار وجود ارتباط خطي إيجابي بين الورم الأولي والثانوي أي أن العلاقة طردية بين الورم الأولي والثانوي لكل بروتين على حدى.

يفسر الفرق لصالح الورم الأولي (حيث بلغت متوسط تعبيرية CCR7 في الورم الأولي 75% ومتوسط تعبيريته في العقد 61%)

يفسر الفرق لصالح الورم الأولي (حيث بلغت متوسط تعبيرية CXCR4 في الورم الأولي ٥٦% ومتوسط تعبيريته في العقد ٣٧%)

إنّ الخلايا السرطانية للنسيلة التي تظهر المستقبل سواء CXCR4 أو CCR7 في الورم الأولي قادرة على الهجرة نتيجة انجذابها للأوعية بتأثير إنتاج خلاياها البطانية للكيموكين SDF-1 و CCL21 على الترتيب، ثمّ تسير في اللف وتصل للعقد اللمفية ذات الممال الكيموكيني المناسب و بطريقة الولوج نفسها ترتبط هذه الخلايا السرطانية بالخلايا البطانية وتتسل للعقد اللمفية، وعندما يحصل الارتباط تتكاثر هذه الخلايا السرطانية بشدة في العقدة لدور هذا الكيموكين ومستقبله بالانقسام.

نعتقد أنّ وجود كيموكين متخصص لا CCR7 في العقدة مختلف عن شريكه في لحمة الورم دوراً أعلى في تكاثر الخلايا الورمية وهذا ما تظهره الأرقام فالفرق بين التعبيرية بالأولي والنقائل بسيط (في الورم الأولي 75% ومتوسط تعبيريته في العقد 61%) لكنهما بعلاقة طردية لظهار الخلايا الورمية لهذا المستقبل ودور الكيموكين المتخصص في الورمين الأولي والثانوي بالانقسام وان كنا نعتقد أن الانقسام في الثانوي أعلى.

في حين تفرد المستقبل الكيموكيني CXCR4 بمستقبل واحد SDF-1 يجعل الفعالية الانقسامية أقل لكنّها مطلوبة للهجرة (حيث بلغت متوسط تعبيرية CXCR4 في الورم الأولي ٥٧% ومتوسط تعبيريته في العقد ٣٧%) فالارتباط مستقبل -كيموكين ذاته المحرض على التكاثر في الورم الأولي محرض على الانقسام في النقائل ممّا يفسر

الارتباط الخطّي بينهما. مع العلم أن فعالية الارتباط CXCR4-SDF1 المحرّضة على الانقسام في الورم الأولي أقل منها في العقدة اللمفية.

نتفق مع Ding بازدياد التعبيريّة لـ CCR7 بالورم الأولي مع النفوذية اللمفاوية (Ding et al., 2003).

نتفق مع Tsuzuki أن الـ CCL21 المفرز في العقدة يساعد على هجرة الخلايا الورمية للعقدة (Tsuzuki et al., 2006, Ishida et al., 2009).

اتفقنا مع ISHIDA أن الخلايا البطانية للأوعية اللمفية تظهر تعبيرية لـ CCR7 (Ishida et al., 2009) كما أكدت دراسة ISSA العلاقة الطردية بين VEGF-C وتعبيرية الـ CCR7 في الخلايا السرطانية وفُسرّت هذه النتائج أن لـ CCR7 دوراً في الغزو الوعائي السرطاني المكتسب وبالمقابل يحث الـ VEGF-C على الانتاج اللمفي للكيموكين CCL21 (والذي مستقبله CCR7) وبالتالي الجذب الكيماوي للخلايا السرطانية (Issa et al., 2009).

نتفق مع ishikawa أن الخلايا السرطانية ذات التلون العالي لـ CXCR4 كانت في حواف الورم الغازية (Ishikawa et al., 2006).

كما نتفق مع Kijowski و Shen أن لـ CXCR4 يمكنه زيادة التصاق الخلايا التي تظهره والمرتبطة بالـ SDF-1، ICAM-1، VCAM-1 والفيبرونكتين والفيبرينوجين من خلال تحكمه بالعديد من الانتغرينات السطحية (Kijowski et al., 2001, Shen et al., 2001).

تتفق نتائجنا مع ما توصل له Uchida و Katayama أن الخلايا السرطانية التي تظهر المستقبل CXCR4 تنقسم بشدة عالية عند ارتباطها برابطتها في النّقايل العقدية أكثر منها في ورمها الأولي (Uchida et al., 2003) (Katayama et al., 2005)، كما نتفق مع Katayama الذي وجد أن mRNA للكيموكين SDF-1 أكثر تعبيرية في لحمة الورم في النّقايل العقدية منه في لحمة الورم الأولي (Katayama et al., 2005).

في حين نعلل عدم وجود فرق احصائي بين تعبيرية الـ CXCR5 في الورم الأولي والنقائل، (حيث بلغت متوسط تعبيرية CXCR5 في الورم الأولي 39% ومتوسط تعبيريته في العقد 33%) لكونه مميز بالغزو العظمي، ولم تشمل العينة إلا جزءاً صغيراً يترافق مع الغزو العظمي أما تفسير وجود هذه الخلايا بالعقدة رغم عدم ارتباطه بالهجرة احتمال ترافق تعبيريته مع مستقبل آخر كالـ CXCR4 في الخلايا السرطانية في العقدة (حيث تقارب الرقمان في التعبيرية بالثنائي)، وهو تفسير يحتاج لدراسات أخرى تثبته أو تنفيه، وهذا مايفسر الارتباط بين تعبيرية الخلايا في الورم الأولي والثانوي.

أظهرت دراسة Meijer على إحدى سلالات خلايا سرطان البنكرياس إظهار الخلايا إيجابية الـ CXCR5 للمستقبل CXCR4 في حين أظهرت السلالات الأخرى تعبيرية فقط للـ CXCR4 (Meijer et al, 2006) وهذا ما يتوافق مع فرضيتنا لكنها تبقى فرضية غير مقاسة.

٣- مقارنة تعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 فيما بينها في الورم الأولي :

٣-١ مقارنة تعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 فيما بينها في الورم الأولي تبعاً للدرجة السريرية :

يتضح من نتائجنا عدم وجود فروق ذات دلالة إحصائية في متوسط تعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 فيما بينها في الورم الأولي تبعاً للدرجات السريرية وذلك عند مستوى ثقة 95%

أظهرت نتائج المقارنات الثنائية بين البروتينات الثلاثة في كل درجة سريرية على حدى : وجود فروق بين تعبيرية CCR7 و CXCR4 في الدرجة السريرية الثالثة لصالح CCR7. يمكننا تفسير نتائجنا بأن كلا المستقبلين يساهمان في غزو النقائل العقدية لكن الفرق بينهما في مرحلة فعالية كلاً منهما، فالـ CCR7 مشجع على الغزو العقدي في الدرجتين الثالثة والرابعة السريرية بالشدة نفسها في حين الـ CXCR4 مشجع على الغزو النقائلي في الدرجة الرابعة فقط وهذا سبب الفرق، وهذا ما يعزز نتائجنا السابقة.

هذه النتيجة تأكيدية لما سبق وتتفق مع الدراسات التي ذكرت ولن نعيدها منعا للتكرار .
وجود فروق بين تعبيرية CXCR4 و CXCR5 في الدرجات السريرية كافة.
وجود فروق بين تعبيرية CCR7 و CXCR5 في الدرجات السريرية كافة.
يمكن تفسير هذه النتائج وفقا لما سبق من نتائج في كون تعبيرية CXCR5 منخفضة في كل الحالات السريرية ما عدا الدرجة الرابعة والتي لم تصل لدرجة تقاربها سواء مع CXCR4 أو CCR7.

٢-٣ مقارنة تعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 فيما بينها في الورم الأولي تبعا للدرجة النسيجية :

أظهرت نتائج المقارنات الثنائية بين البروتينات الثلاثة في كل درجة نسيجية على حدى :
وجود فروق بين تعبيرية CCR7 و CXCR4 في الدرجة الثالثة النسيجية.
وجود فروق بين تعبيرية CXCR4 و CXCR5 في الدرجات الثانية والثالثة والرابعة النسيجية.
وجود فروق بين تعبيرية CCR7 و CXCR5 في الدرجات الثانية والثالثة والرابعة النسيجية.
أما في الدرجة النسيجية الأولى فلم تظهر أية فروق في تعبيرية الملونات الثلاثة مع باقي الدرجات النسيجية

وللنتيجة الأخيرة والتي تبين أن في الدرجة النسيجية الأولى لم تظهر أية فروق في تعبيرية الملونات الثلاثة مع باقي الدرجات النسيجية أهمية عالية لهذه المستقبلات فهي رغم عدم علاقتها بالتمايز النسيجي لكل بروتين على حدا كما أسلفنا إلا أنها تساهم كلها أو بعضها بشكل غير مباشر في زيادة خباثة الورم وذلك لزيادتها وفروقتها عن بعضها البعض في الدرجات النسيجية ٢-٣-٤، ومع ملاحظة أن كلاً من CCR7 و CXCR4 على حدا يظهر فروق مع CXCR5 في باقي الدرجات النسيجية لصالح كلاً من CCR7 و CXCR4 فنستنتج CXCR5 في دوره في زيادة خباثة الورم.

مع ملاحظة نتيجة وجود فرق بين تعبيرية CCR7 و CXCR4 في الدرجة الثالثة النسيجية فيمكننا القول أن المتورط الأكبر بين هذه المستقبلات في زيادة خباثة الورم هو CCR7

وذلك في الدرجة الثالثة النسيجية وهذا التورط قد يكون غير مباشر لكون الـ CCR7 لم يكن له علاقة بالدرجة النسيجية. بذلك تتقارب دراستنا مع ما وجد Ueda و Xia في دراسة كل منهما ارتباطاً بين تعبيرية الـ CCR7 والدرجة النسيجية (Ueda et al., 2010) (Xia et al., 2015)

٤ - مقارنة تعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 فيما بينها في الورم الثانوي :

يتضح من نتائجنا عدم وجود فروق ذات دلالة إحصائية في متوسط تعبيرية البروتينات CCR7، CXCR4، CXCR5 فيما بينها في الورم الثانوي وذلك عند مستوى ثقة ٩٥% تبين نتائج اختبارات المقارنات الثنائية وجود فروق ذات دلالة إحصائية في متوسط تعبيرية كلاً من البروتين CCR7 و CXCR4 و كلاً من CCR7 و CXCR5 وعدم وجود فروق ذات دلالة إحصائية بين كلاً من CXCR4 و CXCR5 في الورم الثانوي ونعلل ذلك بأن CCR7 في الورم الثانوي كان مرتفع سواء في الدرجة الثالثة أو الرابعة السريرية أي سواء ترافق الورم مع عقدة مصابة أو أكثر لتدخله في حدوث النقائل في مراحلها المبكرة

في حين كان CXCR4 أعلى في الحالات المترافقة مع أكثر من عقدة مصابة وهذا ما فسرناه بتدخل الـ CXCR4 في حدوث النقائل في مراحلها المتأخرة من هنا جاء الفرق بين تعبيرية كلاً من CCR7 و CXCR4

كما تظهر نتائج هذه الدراسة عدم وجود فرق بين كلاً من CXCR4 و CXCR5 في الورم الثانوي، وهو ما فسرناه سابقاً بتشارك خلايا الورم في العقدة بهذين المستقبلين وهو أمر يحتاج لدراسات معمقة لأهميته.

وعليه فإن وجود فرق بين كلاً من CCR7 و CXCR5 واضح ولا يحتاج لتفسير.

تم تلخيص نتائج البحث والمعلومات الواردة حول المستقبلات الكيموكينية الثلاثة بالجدول ٤٨.

المستقبل الجينومي	CXCR5	CXCR4	CCR7
الخلايا التي تظهره	الخلايا البائية الساذجة الخلايا التائية الذاكرة الخلايا كسرات العظم	الخلايا الجذعية الدموية الخلايا التائية والبائية الساذجة الخلايا البائية المتمايزة الخلايا المنتشة الليفية- الخلايا العضلية المنتشة الخلايا (الكبدية والعصبية والصباغية) الجذعية	الخلايا المتغصنة الناضجة ونصف الناضجة الخلايا اللمفية البائية الساذجة الخلايا اللمفية التائية الخلايا التيموسية
الكيموكين	CXCL13=BLC المراكز التنترجية بالعقدة الخلايا مصورة العظم الخلايا الميزانشيمية الجذعية	CXCL12=SDf1 الخلايا المصورة الليف (اللحمة) - التي-الماغ- القلب-العقدة-العضلات - الرية-الكلىة -الحال- خلايا التيموس الخلايا الكبدية-الكروية-العصبية	CCI21-CCl19 الخلايا المصورة الليف الخلايا المولدة لليف الشبكية الخلايا المتغصنة-الخلايا البطانية HEV المناطق القشرية بالعقدة
الخلايا التي تفرزه	تمايز وحركة الخلايا الميزانشيمية الجذعية تمايز الخلايا مصورات و كسرات العظم بقاء الخلايا البائيات بالاجربة	تكاثر ونجاة الخلايا السليفة هجرة الخلايا البائية انجذاب الوحدات اختيار الخلايا التائية	عودة التائيات للعقدة دوران للمفاوضات ودخولها للتصريف اللمفي نضج المتغصنة وحركتها حركية البائيات بما يساعد على تفعيلها
السرطانات التي تظهر المستقبل	الرأس والعنق-اللوكميا المزمنة النقوية	الميلانوما-اللوكميا الحادة للمفاوية-اللوكميا المزمنة القوية-البكرياس-البروستات-الذي- المثانة-الرية-الرأس والعنق-الأمعاء-المبيض- العظم-المري	الذي-الميلانوما-الرية-الرأس والعنق-الأمعاء- المعدة
نتائج دراستنا فيما يتعلق بسرطان شائك الخلايا والنقائل العقيدية	له دور كعامل إنزاري في الدرجات السريرية المتقدمة عدم تورطه المستقل في حدوث النقائل العقيدية	له دور كعامل إنزاري في الدرجات السريرية المتقدمة له دور في هجرة الخلايا السرطانية للعقد اللمفية في المرحلة المتأخرة	له دور في بقاء وتكاثر الخلايا السرطانية وفي هجرة الخلايا السرطانية للعقد اللمفية من المرحلة المبكرة تورطه في كافة الدرجات السريرية

الجدول ٤٨ : يلخص نتائج بحثنا و المعلومات المتعلقة بالمستقبلات الكيموكينية CXCR4 و CCR7 و CXCR5

الباب الخامس الاستنتاجات

Conclusion

الاستنتاجات

- إن كلاً من المستقبلات الثلاثة CCR7,CXCR4,CXCR5 بروتينات غير موجودة على خلايا البشرة السليمة .
- إن كلاً من المستقبلات الثلاثة CCR7,CXCR4,CXCR5 بروتينات سطحية مميزة للخلايا الظهارية السرطانية.
- تؤكد نتائجنا تورط المستقبل CCR7 في كافة الدرجات السريرية.
- تؤكد نتائجنا دور المستقبل CCR7 في بقاء وتكاثر الخلايا السرطانية و دوره في هجرة الخلايا السرطانية للعقد اللمفية من المرحلة المبكرة.
- تظهر نتائجنا دور المستقبل CXCR4 كعامل إنذاري في الدرجات السريرية المتقدمة في هجرة الخلايا السرطانية للعقد اللمفية في المرحلة المتأخرة.
- تظهر نتائجنا دور المستقبل CXCR5 كعامل إنذاري في الدرجات السريرية المتقدمة.
- تؤكد نتائجنا عدم تورط المستقبلات CCR7,CXCR4,CXCR5 في الدرجات النسيجية.
- تؤكد نتائجنا ارتباط تعبيرية المستقبلات CCR7,CXCR4,CXCR5 في الورم الأولي ونقائلها.
- تظهر نتائجنا عدم تورط الـ CXCR5 المستقل في حدوث النقائل العقدية .
- تدعم النتائج التي توصل لها البحث نظرية الانجذاب الكيماوي ونظرية الالتصاق في آلية الانتقالات والغزو.

الباب السادس المقترحات والتوصيات

Suggestion and recommendations

المقترحات

١. نقترح اجراء دراسات أخرى لتحديد علاقة لكل من المستقبلين CXCR4 و CCR7 مع الأوعية الدموية في اللحمية الورمية وعلاقة تعبيريته في الأوعية مع الغزو الوعائي أو حجم الورم أو انتشاره أو خباثته.
٢. نقترح اجراء دراسات أخرى لتحديد علاقة المستقبل CCR7 مع الأعصاب الموجودة في منطقة الورم وعلاقة تعبيريته في الأعصاب مع الغزو العصبي أو التنبهات العصبية المؤثرة في الورم سواء حجم الورم أو انتشاره أو خباثته.
٣. نقترح اجراء دراسات أخرى يستخدم فيها التلوين المضاعف للمستقبلات CXCR4,CCR7,CSCR5 لدراسة عدد المستقبلات الكيموكينية التي تظهرها النسائل السرطانية وعلاقة ذلك بالدرجة السريرية.
٤. نقترح اجراء دراسات تجريبية علاجية على حيوانات التجربة المستحدث فيها سرطان شائك الخلايا وحقنها بمضادات مستقبلات CXCR5 ,CCR7 ,CXCR4 ودراسة التغيرات التي تطرأ على الورم.

التوصيات

١. نوصي باعتماد المستقبل CCR7 كعامل تشخيصي في النّقاثل العقديّة.
٢. نوصي باعتماد المستقبل CXCR4 كعامل انذاري للدرجات السريريّة العالية.

الباب السابع المصادر

References

- ABBAS, A. K. 2005a. cells and tissues of the immune system. *cellular and molecular immunology*. 5th ed.: ELSEVIER SAUNDERS.
- Ahmedin Jemal, Freddie Bray, Melissa M. , Jacques Ferlay, Elizabeth Ward, David Forman; Global Cancer Statistics; CA CANCER J CLIN 2011;61:69–90
- ALBERT, S., HOURSEAU, M., HALIMI, C., SEROVA, M., DESCATOIRE, V., BARRY, B., COUVELARD, A., RIVEIRO, M. E., TIJERAS-RABALLAND, A. & DE GRAMONT, A. 2012. Prognostic value of the chemokine receptor CXCR4 and epithelial-to-mesenchymal transition in patients with squamous cell carcinoma of the mobile tongue. *Oral oncology*, 48, 1263-1271.
- ALLEN, C. D., ANSEL, K. M., LOW, C., LESLEY, R., TAMAMURA, H., FUJII, N. & CYSTER, J. G. 2004. Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. *Nature immunology*, 5, 943-952.
- ALMOFTI, A., UCHIDA, D., BEGUM, N. M., TOMIZUKA, Y., IGA, H., YOSHIDA, H. & SATO, M. 2004. The clinicopathological significance of the expression of CXCR4 protein in oral squamous cell carcinoma. *International journal of oncology*, 25, 65-72.
- Anneroth, G.R. and L.S. Hansen, A methodologic study of histologic classification and grading of malignancy in oral squamous cell carcinoma. *European Journal of Oral Sciences*, 1984 .(5) : p92. 448-468.
- ANSEL, K. M., NGO, V. N., HYMAN, P. L., LUTHER, S. A., FÖRSTER, R., SEDGWICK, J. D., BROWNING, J. L., LIPP, M. & CYSTER, J. G. 2000. A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles. *Nature*, 406, 309-314.
- ARA, T., NAKAMURA, Y., EGAWA, T., SUGIYAMA, T., ABE, K., KISHIMOTO, T., MATSUI, Y. & NAGASAWA, T. 2003. Impaired colonization of the gonads by primordial germ cells in mice lacking a chemokine, stromal cell-derived factor-1 (SDF-1). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 5319-5323.
- ARNOLD, C. N., CAMPBELL, D. J., LIPP, M. & BUTCHER, E. C. 2007. The germinal center response is impaired in the absence of T cell-expressed CXCR5. *European journal of immunology*, 37, 100-109.
- ASTARITA, J. L., ACTON, S. E. & TURLEY, S. J. 2012. Podoplanin: emerging functions in development, the immune system, and cancer. *Frontiers in immunology*, 3, 283.
- Avraamides, C.J., Garmy-Susini, B. and Varner, J.A., 2008. Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature Reviews Cancer*, 8(8), pp.604-617.
- BAGRI, A., GURNEY, T., HE, X., ZOU, Y.-R., LITTMAN, D. R., TESSIER-LAVIGNE, M. & PLEASURE, S. J. 2002. The chemokine SDF1 regulates migration of dentate granule cells. *Development*, 129, 4249-4260.
- BAJENOFF, M., EGEN, J. G., KOO, L. Y., LAUGIER, J. P., BRAU, F., GLAICHENHAUS, N. & GERMAIN, R. N. 2006. Stromal cell networks regulate lymphocyte entry, migration, and territoriality in lymph nodes. *Immunity*, 25, 989-1001.
- BALKWILL, F. 2004. Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer*, 4, 540-50.
- BALKWILL, F. & MANTOVANI, A. 2001. Inflammation and cancer: back to Virchow? *The lancet*, 357, 539-545.
- BARDI, G., LIPP, M., BAGGIOLINI, M. & LOETSCHER, P. 2001. The T cell chemokine receptor CCR7 is internalized on stimulation with ELC, but not with SLC. *European journal of immunology*, 31, 3291-3297.
- BARNES, L. 2005. *Pathology and genetics of head and neck tumours*, IARC.
- BARSEVICK, A. M., SWEENEY, C., HANEY, E. & CHUNG, E. A systematic qualitative analysis of psychoeducational interventions for depression in patients with cancer. *Oncology nursing forum*, 2002.

- BEN, S., LI, X., XU, F., XU, W., LI, W., WU, Z., HUANG, H., SHI, H. & SHEN, H. 2008. Treatment with anti-CC chemokine receptor 3 monoclonal antibody or dexamethasone inhibits the migration and differentiation of bone marrow CD34+ progenitor cells in an allergic mouse model. *Allergy*, 63, 1164-1176.
- BLANCHARD, C. M., COURNEYA, K. S. & LAING, D. Effects of acute exercise on state anxiety in breast cancer survivors. *Oncology nursing forum*, 2001.
- BONAVIA, R., BAJETTO, A., BARBERO, S., PIRANI, P., FLORIO, T. & SCHETTINI, G. 2003. Chemokines and their receptors in the CNS: expression of CXCL12/SDF-1 and CXCR4 and their role in astrocyte proliferation. *Toxicology letters*, 139, 181-189.
- Broders, A.C., 1921. SQUAMOUS-CELL EPITHELIOMA OF THE SKIN: A STUDY OF 256 CASES. *Annals of surgery*, 73(2), p.141.
- BOTTAZZI, B., POLENTARUTTI, N., ACERO, R., BALSARI, A., BORASCHI, D., GHEZZI, P., SALMONA, M. & MANTOVANI, A. 1983. Regulation of the macrophage content of neoplasms by chemoattractants. *Science*, 220, 210-212.
- BRIGATI, C., NOONAN, D. M., ALBINI, A. & BENELLI, R. 2002. Tumors and inflammatory infiltrates: friends or foes? *Clinical & experimental metastasis*, 19, 247-258.
- BROMLEY, S. K., THOMAS, S. Y. & LUSTER, A. D. 2005. Chemokine receptor CCR7 guides T cell exit from peripheral tissues and entry into afferent lymphatics. *Nature immunology*, 6, 895-901.
- BURGER, J. A. & GRIBBEN, J. G. The microenvironment in chronic lymphocytic leukemia (CLL) and other B cell malignancies: insight into disease biology and new targeted therapies. *Seminars in cancer biology*, 2014. Elsevier, 71-81.
- Burger, J.A. and Kipps, T.J., 2002. Chemokine receptors and stromal cells in the homing and homeostasis of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leukemia & lymphoma*, 43(3), pp.461-466.
- CAMERON, M. D., SCHMIDT, E. E., KERKVLIT, N., NADKARNI, K. V., MORRIS, V. L., GROOM, A. C., CHAMBERS, A. F. & MACDONALD, I. C. 2000. Temporal progression of metastasis in lung: cell survival, dormancy, and location dependence of metastatic inefficiency. *Cancer research*, 60, 2541-2546.
- CARLSEN, H. S., HARALDSEN, G., BRANDTZAEG, P. & BAEKKEVOLD, E. S. 2005. Disparate lymphoid chemokine expression in mice and men: no evidence of CCL21 synthesis by human high endothelial venules. *Blood*, 106, 444-446.
- CARNEC, X., QUAN, L., OLSON, W. C., HAZAN, U. & DRAGIC, T. 2005. Anti-CXCR4 monoclonal antibodies recognizing overlapping epitopes differ significantly in their ability to inhibit entry of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of virology*, 79, 1930-1933.
- CATLEY, M. C., COOTE, J., BARI, M. & TOMLINSON, K. L. 2011. Monoclonal antibodies for the treatment of asthma. *Pharmacology & therapeutics*, 132, 333-351.
- CAWSON, R. A. & ODELL, E. W. 2008. *Cawson's essentials of oral pathology and oral medicine*, Elsevier Health Sciences.
- CHAMBERS, A., GROOM, A. & MACDONALD, I. 2002. Dissemination and Growth of Cancer Cells in Metastatic Sites, *Nat. Rev. Cancer*, 2, 563-572.
- CHAMBERS, A., NAUMOV, G., VARGHESE, H., NADKARNI, K., MACDONALD, I. & GROOM, A. 2001. Critical steps in hematogenous metastasis: an overview. *Surgical oncology clinics of North America*, 10, 243-55, vii.
- CHAMBERS, A. F. 2002. Metastasis: dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature Reviews Cancer*, 2, 563-572.
- CHAMES, P., VAN REGENMORTEL, M., WEISS, E. & BATY, D. 2009. Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. *British journal of pharmacology*, 157, 220-233.

- Chang, Y.S., di Tomaso, E., McDonald, D.M., Jones, R., Jain, R.K. and Munn, L.L., 2000. Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(26), pp.14608-14613
- CHERNOCK, R. D., CHERLA, R. P. & GANJU, R. K. 2001. SHP2 and cbl participate in α -chemokine receptor CXCR4-mediated signaling pathways. *Blood*, 97, 608-615.
- Condeelis, J. and Pollard, J.W., 2006. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell*, 124(2), pp.263-266.
- Corcione, A., Arduino, N., Ferretti, E., Pistorio, A., Spinelli, M., Ottonello, L., Dallegri, F., Basso, G. and Pistoia, V., 2006. Chemokine receptor expression and function in childhood acute lymphoblastic leukemia of B-lineage. *Leukemia research*, 30(4), pp.365-372
- COUSSENS, L. M. & WERB, Z. 2002. Inflammation and cancer. *Nature*, 420, 860-867.
- CRANE, I. J., WALLACE, C. A., MCKILLOP-SMITH, S. & FORRESTER, J. V. 2000. CXCR4 receptor expression on human retinal pigment epithelial cells from the blood-retina barrier leads to chemokine secretion and migration in response to stromal cell-derived factor 1 α . *The Journal of Immunology*, 165, 4372-4378.
- CRESPI, B. & SUMMERS, K. 2005. Evolutionary biology of cancer. *Trends in ecology & evolution*, 20, 545-552.
- CRISTINO, S., PIACENTINI, A., MANFERDINI, C., CODELUPPI, K., GRASSI, F., FACCHINI, A. & LISIGNOLI, G. 2008. Expression of CXC chemokines and their receptors is modulated during chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells grown in three-dimensional scaffold: evidence in native cartilage. *Tissue Engineering Part A*, 14, 97-105.
- Darash-Yahana, M., Pikarsky, E., Abramovitch, R., Zeira, E., Pal, B., Karplus, R., Beider, K., Avniel, S., Kasem, S., Galun, E. and Peled, A., 2004. Role of high expression levels of CXCR4 in tumor growth, vascularization, and metastasis. *The FASEB Journal*, 18(11), pp.1240-1242.
- DEBES, G. F., ARNOLD, C. N., YOUNG, A. J., KRAUTWALD, S., LIPP, M., HAY, J. B. & BUTCHER, E. C. 2005. Chemokine receptor CCR7 required for T lymphocyte exit from peripheral tissues. *Nature immunology*, 6, 889-894.
- DELILBASI, C. B., OKURA, M., IIDA, S. & KOGO, M. 2004. Investigation of CXCR4 in squamous cell carcinoma of the tongue. *Oral oncology*, 40, 154-157.
- DIEU, M.-C., VANBERVLIET, B., VICARI, A., BRIDON, J.-M., OLDHAM, E., AIT-YAHIA, S., BRIERE, F., ZLOTNIK, A., LEBECQUE, S. & CAUX, C. 1998. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *The Journal of experimental medicine*, 188, 373-386.
- DING, Y., SHIMADA, Y., MAEDA, M., KAWABE, A., KAGANOI, J., KOMOTO, I., HASHIMOTO, Y., MIYAKE, M., HASHIDA, H. & IMAMURA, M. 2003. Association of CC chemokine receptor 7 with lymph node metastasis of esophageal squamous cell carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 9, 3406-3412.
- Eisenhardt, A., Frey, U., Tack, M., Roskopf, D., Lümnen, G., Rübber, H. and Siffert, W., 2005. Expression analysis and potential functional role of the CXCR4 chemokine receptor in bladder cancer. *European urology*, 47(1), pp.111-117.
- Elyse L. Walk , Scott A. Weed., 2011. Recently Identified Biomarkers That Promote Lymph Node Metastasis in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancers*, 3, 747-772
- El Haibi, C.P., Sharma, P.K., Singh, R., Johnson, P.R., Suttles, J., Singh, S. and Lillard, J.W., 2010. PI3Kp110-, Src-, FAK-dependent and DOCK2-independent migration and invasion of CXCL13-stimulated prostate cancer cells. *Molecular cancer*, 9(1), p.85.
- ENGEL, J., ECKEL, R., KERR, J., SCHMIDT, M., FURSTENBERGER, G., RICHTER, R., SAUER, H., SENN, H.-J. & HÖLZEL, D. 2003. The process of metastasis for breast cancer. *European journal of cancer*, 39, 1794-1806.
- EWING, J. 1928. NEOPLASTIC DISEASES. A TREATISE ON TUMORS. *The American Journal of the Medical Sciences*, 176, 278.

- FIDLER, I. J. & KRIPKE, M. L. 1977. Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor. *Science*, 197, 893-895.
- FÖRSTER, R., DAVALOS-MISLITZ, A. C. & ROT, A. 2008. CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nature Reviews Immunology*, 8, 362-371.
- FORSTER, R., EMRICH, T., KREMMER, E. & LIPP, M. 1994. Expression of the G-protein--coupled receptor BLR1 defines mature, recirculating B cells and a subset of T-helper memory cells. *Blood*, 84, 830-840.
- FÖRSTER, R., MATTIS, A. E., KREMMER, E., WOLF, E., BREM, G. & LIPP, M. 1996. A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen. *Cell*, 87, 1037-1047.
- FÖRSTER, R., SCHUBEL, A., BREITFELD, D., KREMMER, E., RENNER-MULLER, I., WOLF, E. & LIPP, M. 1999. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell*, 99, 23-33.
- FRITSCH, V. A. & LENTSCH, E. J. 2014. Basaloid squamous cell carcinoma of the head and neck: location means everything. *Journal of surgical oncology*, 109, 616-622.
- GANJU, R. K., BRUBAKER, S. A., MEYER, J., DUTT, P., YANG, Y., QIN, S., NEWMAN, W. & GROOPMAN, J. E. 1998. The α -chemokine, stromal cell-derived factor-1 α , binds to the transmembrane G-protein-coupled CXCR-4 receptor and activates multiple signal transduction pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 23169-23175.
- GHOBRIL, I. M., BONE, N. D., STENSON, M. J., NOVAK, A., HEDIN, K. E., KAY, N. E. & ANSELL, S. M. Expression of the chemokine receptors CXCR4 and CCR7 and disease progression in B-cell chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma. *Mayo Clinic Proceedings*, 2004. Elsevier, 318-325.
- GLASSMAN, P. M. & BALTHASAR, J. P. 2014. Mechanistic considerations for the use of monoclonal antibodies for cancer therapy. *Cancer biology & medicine*, 11, 20-33.
- GUNN, M. D., NGO, V. N., ANSEL, K. M., EKLAND, E. H., CYSTER, J. G. & WILLIAMS, L. T. 1998a. A B-cell-homing chemokine made in lymphoid follicles activates Burkitt's lymphoma receptor-1. *Nature*, 391, 799-803.
- GUNN, M. D., TANGEMANN, K., TAM, C., CYSTER, J. G., ROSEN, S. D. & WILLIAMS, L. T. 1998b. A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naïve T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 258-263.
- Gunther K, Leier J, Henning G, Dimmler A, Weissbach R, Hohenberger W, Forster R. Prediction of lymph node metastasis in colorectal carcinoma by expression of chemokine receptor CCR7. *Int J Cancer* 2005;116:726–33.
- HARDTKE, S., OHL, L. & FÖRSTER, R. 2005. Balanced expression of CXCR5 and CCR7 on follicular T helper cells determines their transient positioning to lymph node follicles and is essential for efficient B-cell help. *Blood*, 106, 1924-1931.
- HARGREAVES, D. C., HYMAN, P. L., LU, T. T., NGO, V. N., BIDGOL, A., SUZUKI, G., ZOU, Y.-R., LITTMAN, D. R. & CYSTER, J. G. 2001. A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements. *The Journal of experimental medicine*, 194, 45-56.
- HATCH, H. M., ZHENG, D., JORGENSEN, M. L. & PETERSEN, B. E. 2002. SDF-1 α /CXCR4: a mechanism for hepatic oval cell activation and bone marrow stem cell recruitment to the injured liver of rats. *Cloning & Stem Cells*, 4, 339-351.
- HELBIG, G., CHRISTOPHERSON, K. W., BHAT-NAKSHATRI, P., KUMAR, S., KISHIMOTO, H., MILLER, K. D., BROXMEYER, H. E. & NAKSHATRI, H. 2003. NF- κ B promotes breast cancer cell migration and metastasis by inducing the expression of the chemokine receptor CXCR4. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 21631-21638.

- Hendrix, M.J., Seftor, E.A., Hess, A.R. and Seftor, R.E., 2003. Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma. *Nature Reviews Cancer*, 3(6), pp.411-421.
- HERMANN, P. C., HUBER, S. L., HERRLER, T., AICHER, A., ELLWART, J. W., GUBA, M., BRUNS, C. J. & HEESCHEN, C. 2007. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell stem cell*, 1, 313-323.
- HOMEY, B., MULLER, A. & ZLOTNIK, A. 2002. Chemokines: agents for the immunotherapy of cancer? *Nature Reviews Immunology*, 2, 175-184.
- HUANG, J. H., CÁRDENAS-NAVIA, L. I., CALDWELL, C. C., PLUMB, T. J., RADU, C. G., ROCHA, P. N., WILDER, T., BROMBERG, J. S., CRONSTEIN, B. N. & SITKOVSKY, M. 2007. Requirements for T lymphocyte migration in explanted lymph nodes. *The Journal of Immunology*, 178, 7747-7755.
- HUMRICH, J. Y., HUMRICH, J. H., AVERBECK, M., THUMANN, P., TERMEER, C., KÄMPGEN, E., SCHULER, G. & JENNE, L. 2006. Mature monocyte-derived dendritic cells respond more strongly to CCL19 than to CXCL12: consequences for directional migration. *Immunology*, 117, 238-247.
- HUSEMANN, Y., GEIGL, J. B., SCHUBERT, F., MUSIANI, P., MEYER, M., BURGHART, E., FORNI, G., EILS, R., FEHM, T. & RIETHMULLER, G. 2008. Systemic spread is an early step in breast cancer. *Cancer cell*, 13, 58-68.
- ISSA, A., LE, T. X., SHOUSHARI, A. N., SHIELDS, J. D. & SWARTZ, M. A. 2009. Vascular endothelial growth factor-C and CC chemokine receptor 7 in tumor cell-lymphatic cross-talk promote invasive phenotype. *Cancer research*, 69, 349-357.
- ISHIDA, K., IWAHASHI, M., NAKAMORI, M., NAKAMURA, M., YOKOYAMA, S., IIDA, T., NAKA, T., NAKAMURA, Y. & YAMAUE, H. 2009. High CCR7 mRNA expression of cancer cells is associated with lymph node involvement in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *International journal of oncology*, 34, 915.
- ISHIKAWA, T., NAKASHIRO, K., HARA, S., KLOSEK, S. K., LI, C., SHINTANI, S. & HAMAKAWA, H. 2006. CXCR4 expression is associated with lymph-node metastasis of oral squamous cell carcinoma. *International journal of oncology*, 28, 61-66.
- JANOWSKA-WIECZOREK, A., MARQUEZ, L. A., DOBROWSKY, A., RATAJCZAK, M. Z. & CABUHAT, M. L. 2000. Differential MMP and TIMP production by human marrow and peripheral blood CD34+ cells in response to chemokines. *Experimental hematology*, 28, 1274-1285.
- Kaifi, J.T., Yekebas, E.F., Schurr, P., Obonyo, D., Wachowiak, R., Busch, P., Heinecke, A., Pantel, K. and Izbic, J.R., 2005. Tumor-cell homing to lymph nodes and bone marrow and CXCR4 expression in esophageal cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 97(24), pp.1840-1847.
- KATAYAMA, A., OGINO, T., BANDO, N., NONAKA, S. & HARABUCHI, Y. 2005. Expression of CXCR4 and its down-regulation by IFN- γ in head and neck squamous cell carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 11, 2937-2946.
- KATO, M., KITAYAMA, J., KAZAMA, S. & NAGAWA, H. 2003. Expression pattern of CXC chemokine receptor-4 is correlated with lymph node metastasis in human invasive ductal carcinoma. *Breast Cancer Research*, 5, 1.
- KERJASCHKI, D. 2005. Lymphatic neoangiogenesis in human neoplasia and transplantation as experiments of nature. *Kidney International*, 68, 1967-1967.
- KIJOWSKI, J., BAJ-KRZYWOREK, M., MAJKA, M., RECA, R., MARQUEZ, L. A., CHRISTOFIDOU-SOLOMIDOU, M., JANOWSKA-WIECZOREK, A. & RATAJCZAK, M. Z. 2001. The SDF-1-CXCR4 axis stimulates VEGF secretion and activates integrins but does not affect proliferation and survival in lymphohematopoietic cells. *Stem cells*, 19, 453-466.
- KIM, J.-W., WONG, C. W., GOLDSMITH, J. D., SONG, C., FU, W., ALLION, M.-B., HERLYN, M., AL-MEHDY, A. B. & MUSCHEL, R. J. 2004. Rapid apoptosis in the pulmonary vasculature distinguishes non-metastatic from metastatic melanoma cells. *Cancer letters*, 213, 203-212.

- Kim, J., Takeuchi, H., Lam, S.T., Turner, R.R., Wang, H.J., Kuo, C., Foshag, L., Bilchik, A.J. and Hoon, D.S., 2005. Chemokine receptor CXCR4 expression in colorectal cancer patients increases the risk for recurrence and for poor survival. *Journal of Clinical Oncology*, 23(12), pp.2744-2753.
- KLARENBECK, A., MAUSSANG, D., BLANCHETOT, C., SAUNDERS, M., VAN DER WONING, S., SMIT, M., DE HAARD, H. & HOFMAN, E. 2013. Targeting chemokines and chemokine receptors with antibodies. *Drug Discovery Today: Technologies*, 9, e237-e244.
- KOTWALL, C., SAKO, K., RAZACK, M. S., RAO, U., BAKAMJIAN, V. & SHEDD, D. P. 1987. Metastatic patterns in squamous cell cancer of the head and neck. *The American Journal of Surgery*, 154, 439-442.
- KUCIA, M., JANKOWSKI, K., RECA, R., WYSOCZYNSKI, M., BANDURA, L., ALLENDORF, D. J., ZHANG, J., RATAJCZAK, J. & RATAJCZAK, M. Z. 2004. CXCR4–SDF-1 signalling, locomotion, chemotaxis and adhesion. *Journal of molecular histology*, 35, 233-245.
- KUMAR, V., ABBAS, A. K. & ASTER, J. C. 2013. *Robbins basic pathology*, Elsevier Health Sciences.
- LANE, W. J., DIAS, S., HATTORI, K., HEISSIG, B., CHOY, M., RABBANY, S. Y., WOOD, J., MOORE, M. A. & RAFII, S. 2000. Stromal-derived factor 1–induced megakaryocyte migration and platelet production is dependent on matrix metalloproteinases. *Blood*, 96, 4152-4159.
- LAVERDIERE, C., HOANG, B. H., YANG, R., SOWERS, R., QIN, J., MEYERS, P. A., HUVOS, A. G., HEALEY, J. H. & GORLICK, R. 2005. Messenger RNA expression levels of CXCR4 correlate with metastatic behavior and outcome in patients with osteosarcoma. *Clinical Cancer Research*, 11, 2561-2567.
- LAZARINI, F., THAM, T. N., CASANOVA, P., ARENZANA-SEISDEDOS, F. & DUBOIS-DALCQ, M. 2003. Role of the α -chemokine stromal cell-derived factor (SDF-1) in the developing and mature central nervous system. *Glia*, 42, 139-148.
- LEGLER, D. F., LOETSCHER, M., ROOS, R. S., CLARK-LEWIS, I., BAGGIOLINI, M. & MOSER, B. 1998. B cell–attracting chemokine 1, a human CXC chemokine expressed in lymphoid tissues, selectively attracts B lymphocytes via BLR1/CXCR5. *The Journal of experimental medicine*, 187, 655-660.
- Levental, K.R., Yu, H., Kass, L., Lakins, J.N., Egeblad, M., Erler, J.T., Fong, S.F., Csiszar, K., Giaccia, A., Weninger, W. and Yamauchi, M., 2009. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell*, 139(5), pp.891-906.
- Letsch, A., Keilholz, U., Schadendorf, D., Assfalg, G., Asemisen, A.M., Thiel, E. and Scheibenbogen, C., 2004. Functional CCR9 expression is associated with small intestinal metastasis. *Journal of Investigative Dermatology*, 122(3), pp.685-690.
- LEY, K., LAUDANNA, C., CYBULSKY, M. I. & NOURSHARGH, S. 2007. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature Reviews Immunology*, 7, 678-689.
- Li, Y.M., Pan, Y., Wei, Y., Cheng, X., Zhou, B.P., Tan, M., Zhou, X., Xia, W., Hortobagyi, G.N., Yu, D. and Hung, M.C., 2004. Upregulation of CXCR4 is essential for HER2-mediated tumor metastasis. *Cancer cell*, 6(5), pp.459-469.
- LIBURA, J., DRUKALA, J., MAJKA, M., TOMESCU, O., NAVENOT, J. M., KUCIA, M., MARQUEZ, L., PEIPER, S. C., BARR, F. G. & JANOWSKA-WIECZOREK, A. 2002. CXCR4–SDF-1 signaling is active in rhabdomyosarcoma cells and regulates locomotion, chemotaxis, and adhesion. *Blood*, 100, 2597-2606.
- LINK, A., VOGT, T. K., FAVRE, S., BRITSCHGI, M. R., ACHA-ORBEA, H., HINZ, B., CYSTER, J. G. & LUTHER, S. A. 2007. Fibroblastic reticular cells in lymph nodes regulate the homeostasis of naïve T cells. *Nature immunology*, 8, 1255-1265.
- LIOTTA, L. A. 2001. Cancer: an attractive force in metastasis. *Nature*, 410, 24-25.
- LIOTTA, L. A. & KOHN, E. C. 2001. The microenvironment of the tumour–host interface. *Nature*, 411, 375-379.

- LISIGNOLI, G., CRISTINO, S., PIACENTINI, A., CAVALLO, C., CAPLAN, A. I. & FACCHINI, A. 2006a. Hyaluronan-based polymer scaffold modulates the expression of inflammatory and degradative factors in mesenchymal stem cells: Involvement of Cd44 and Cd54. *Journal of cellular physiology*, 207, 364-373.
- LISIGNOLI, G., TONEGUZZI, S., PIACENTINI, A., CRISTINO, S., GRASSI, F., CAVALLO, C. & FACCHINI, A. 2006b. CXCL12 (SDF-1) and CXCL13 (BCA-1) chemokines significantly induce proliferation and collagen type I expression in osteoblasts from osteoarthritis patients. *Journal of cellular physiology*, 206, 78-85.
- LOMIZE, A. L., POGOZHEVA, I. D. & MOSBERG, H. I. 1999. Structural organization of G-protein-coupled receptors. *Journal of computer-aided molecular design*, 13, 325-353.
- Lugini, L., Matarrese, P., Tinari, A., Lozupone, F., Federici, C., Iessi, E., Gentile, M., Luciani, F., Parmiani, G., Rivoltini, L. and Malorni, W., 2006. Cannibalism of live lymphocytes by human metastatic but not primary melanoma cells. *Cancer research*, 66(7), pp.3629-3638.
- MA, Q., JONES, D., BORGHESEANI, P. R., SEGAL, R. A., NAGASAWA, T., KISHIMOTO, T., BRONSON, R. T. & SPRINGER, T. A. 1998. Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4-and SDF-1-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 9448-9453.
- MACDONALD, I. C., GROOM, A. C. & CHAMBERS, A. F. 2002. Cancer spread and micrometastasis development: quantitative approaches for in vivo models. *Bioessays*, 24, 885-893.
- MAHMOUDI, M. 2009. *Immunology Made Ridiculously Simple*, Medmaster.
- MAJKA, M., RATAJCZAK, J., KOWALSKA, M. A. & RATAJCZAK, M. Z. 2000. Binding of stromal derived factor-1 α (SDF-1 α) to CXCR4 chemokine receptor in normal human megakaryoblasts but not in platelets induces phosphorylation of mitogen-activated protein kinase p42/44 (MAPK), ELK-1 transcription factor and serine/threonine kinase AKT. *European journal of haematology*, 64, 164-172.
- MAÑES, S., LACALLE, R. A., GÓMEZ-MOUTÓN, C., DEL REAL, G., MIRA, E. & MARTÍNEZ-A, C. Membrane raft microdomains in chemokine receptor function. *Seminars in immunology*, 2001. Elsevier, 147-157.
- Manuela Marron; Cessation of alcohol drinking, tobacco smoking and the reversal of head and neck cancer risk; *International Journal of Epidemiology* 2010;39:182–196
- Marchesi, F., Monti, P., Leone, B.E., Zerbi, A., Vecchi, A., Piemonti, L., Mantovani, A. and Allavena, P., 2004. Increased survival, proliferation, and migration in metastatic human pancreatic tumor cells expressing functional CXCR4. *Cancer research*, 64(22), pp.8420-8427.
- MARQUEZ-CURTIS, L., DOBROWSKY, A., MONTANO, J., TURNER, A., RATAJCZAK, J., RATAJCZAK, M. & JANOWSKA-WIECZOREK, A. 2001. Matrix metalloproteinase and tissue inhibitors of metalloproteinase secretion by haematopoietic and stromal precursors and their production in normal and leukaemic long-term marrow cultures. *British journal of haematology*, 115, 595-604.
- MASHINO, K., SADANAGA, N., YAMAGUCHI, H., TANAKA, F., OHTA, M., SHIBUTA, K., INOUE, H. & MORI, M. 2002. Expression of chemokine receptor CCR7 is associated with lymph node metastasis of gastric carcinoma. *Cancer research*, 62, 2937-2941.
- McDonald, D.M. and Foss, A.J., 2000. Endothelial cells of tumor vessels: abnormal but not absent. *Cancer and Metastasis Reviews*, 19(1-2), pp.109-120.
- MEHLEN, P. & PUISIEUX, A. 2006. Metastasis: a question of life or death. *Nature Reviews Cancer*, 6, 449-458.
- MILLIKEN, D., SCOTTON, C., RAJU, S., BALKWILL, F. & WILSON, J. 2002. Analysis of chemokines and chemokine receptor expression in ovarian cancer ascites. *Clinical Cancer Research*, 8, 1108-1114.

- MISSLITZ, A., PABST, O., HINTZEN, G., OHL, L., KREMMER, E., PETRIE, H. T. & FÖRSTER, R. 2004. Thymic T cell development and progenitor localization depend on CCR7. *The Journal of experimental medicine*, 200, 481-491.
- MULLER, A., HOMEY, B., SOTO, H., GE, N., CATRON, D., BUCHANAN, M. E., MCCLANAHAN, T., MURPHY, E., YUAN, W. & WAGNER, S. N. 2001. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*, 410, 50-56.
- MULLER, A., SONKOLY, E., EULERT, C., GERBER, P. A., KUBITZA, R., SCHIRLAU, K., FRANKEN-KUNKEL, P., POREMBA, C., SNYDERMAN, C. & KLOTZ, L. O. 2006. Chemokine receptors in head and neck cancer: association with metastatic spread and regulation during chemotherapy. *International journal of cancer*, 118, 2147-2157.
- MURPHY, P. M., BAGGIOLINI, M., CHARO, I. F., HEBERT, C. A., HORUK, R., MATSUSHIMA, K., MILLER, L. H., OPPENHEIM, J. J. & POWER, C. A. 2000. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacological reviews*, 52, 145-176.
- NEGUS, R., STAMP, G., HADLEY, J. & BALKWILL, F. R. 1997. Quantitative assessment of the leukocyte infiltrate in ovarian cancer and its relationship to the expression of CC chemokines. *The American journal of pathology*, 150, 1723.
- NEGUS, R., STAMP, G., RELF, M., BURKE, F., MALIK, S., BERNASCONI, S., ALLAVENA, P., SOZZANI, S., MANTOVANI, A. & BALKWILL, F. R. 1995. The detection and localization of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in human ovarian cancer. *Journal of Clinical Investigation*, 95, 2391.
- NEUHAUS, T., STIER, S., TOTZKE, G., GRUENEWALD, E., FRONHOFFS, S., SACHINIDIS, A., VETTER, H. & KO, Y. D. 2003. Stromal cell-derived factor 1 α (SDF-1 α) induces gene-expression of early growth response-1 (Egr-1) and VEGF in human arterial endothelial cells and enhances VEGF induced cell proliferation. *Cell proliferation*, 36, 75-86.
- NEVILLE 2009. Epithelial Pathology. *Oral and Maxillofacial Pathology* 3ed.: SAUNDERS ELSEVIER.
- NGUYEN, D. H. & TAUB, D. 2002. CXCR4 function requires membrane cholesterol: implications for HIV infection. *The Journal of Immunology*, 168, 4121-4126.
- NGUYEN, D. X. & MASSAGUE, J. 2007. Genetic determinants of cancer metastasis. *Nat Rev Genet*, 8, 341-52.
- NOWELL, P. C. 1976. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, 194, 23-28.
- OHL, L., MOHAUPT, M., CZELOTH, N., HINTZEN, G., KIAFARD, Z., ZWIRNER, J., BLANKENSTEIN, T., HENNING, G. & FÖRSTER, R. 2004. CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. *Immunity*, 21, 279-288.
- OKADA, T. & CYSTER, J. G. 2007. CC chemokine receptor 7 contributes to Gi-dependent T cell motility in the lymph node. *The Journal of Immunology*, 178, 2973-2978.
- OLIVEIRA-NETO, H. H., DE SOUZA, P. P. C., DA SILVA, M. R. B., MENDONCA, E. F., SILVA, T. A. & BATISTA, A. C. 2013. The expression of chemokines CCL19, CCL21 and their receptor CCR7 in oral squamous cell carcinoma and its relevance to cervical lymph node metastasis. *Tumor Biology*, 34, 65-70.
- OLIVEIRA-NETO, H. H., SILVA, E. T., LELES, C. R., MENDONCA, E. F., ALENCAR, R. D. C., SILVA, T. A. & BATISTA, A. C. 2008. Involvement of CXCL12 and CXCR4 in lymph node metastases and development of oral squamous cell carcinomas. *Tumor Biology*, 29, 262-271.
- OLSON, W. C. & JACOBSON, J. M. 2009. CCR5 monoclonal antibodies for HIV-1 therapy. *Current opinion in HIV and AIDS*, 4, 104.
- ONOUE, T., UCHIDA, D., BEGUM, N. M., TOMIZUKA, Y., YOSHIDA, H. & SATO, M. 2006. Epithelial-mesenchymal transition induced by the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 system in oral squamous cell carcinoma cells. *International journal of oncology*, 29, 1133-1138.
- PAGET, S. 1889. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *The lancet*, 133, 571-573.

- PANDRUVADA, S. N., YUVARAJ, S., LIU, X., SUNDARAM, K., SHANMUGARAJAN, S., RIES, W. L., NORRIS, J. S., LONDON, S. D. & REDDY, S. V. 2010. Role of CXC chemokine ligand 13 in oral squamous cell carcinoma associated osteolysis in athymic mice. *International journal of cancer*, 126, 2319-2329.
- PERROS, F., HOOGSTEDEN, H., COYLE, A., LAMBRECHT, B. & HAMMAD, H. 2009. Blockade of CCR4 in a humanized model of asthma reveals a critical role for DC-derived CCL17 and CCL22 in attracting Th2 cells and inducing airway inflammation. *Allergy*, 64, 995-1002.
- Phillips, R.J., Burdick, M.D., Lutz, M., Belperio, J.A., Keane, M.P. and Strieter, R.M., 2003. The stromal derived factor-1/CXCL12-CXC chemokine receptor 4 biological axis in non-small cell lung cancer metastases. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 167(12), pp.1676-1686.
- PIERCE, E. M., CARPENTER, K., JAKUBZICK, C., KUNKEL, S. L., FLAHERTY, K. R., MARTINEZ, F. J. & HOGABOAM, C. M. 2007. Therapeutic targeting of CC ligand 21 or CC chemokine receptor 7 abrogates pulmonary fibrosis induced by the adoptive transfer of human pulmonary fibroblasts to immunodeficient mice. *The American journal of pathology*, 170, 1152-1164.
- PITUCH-NOWOROLSKA, A., MAJKA, M., JANOWSKA-WIECZOREK, A., BAJ-KRZYWORZEKA, M., URBANOWICZ, B., MALEC, E. & RATAJCZAK, M. Z. 2002. Circulating CXCR4-positive stem/progenitor cells compete for SDF-1-positive niches in bone marrow, muscle and neural tissues: an alternative hypothesis to stem cell plasticity. *Folia histochemica et cytobiologica/Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society*, 41, 13-21.
- POLLARD, J. W. 2004. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nature Reviews Cancer*, 4, 71-78.
- Provenzano, P.P., Eliceiri, K.W., Campbell, J.M., Inman, D.R., White, J.G. and Keely, P.J., 2006. Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion. *BMC medicine*, 4(1), p.38.
- QIAN, F., HANAHAN, D. & WEISSMAN, I. L. 2001. L-selectin can facilitate metastasis to lymph nodes in a transgenic mouse model of carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98, 3976-3981.
- RATAJCZAK, M. Z., MAJKA, M., KUCIA, M., DRUKALA, J., PIETRZKOWSKI, Z., PEIPER, S. & JANOWSKA-WIECZOREK, A. 2003. Expression of Functional CXCR4 by Muscle Satellite Cells and Secretion of SDF-1 by Muscle-Derived Fibroblasts is Associated with the Presence of Both Muscle Progenitors in Bone Marrow and Hematopoietic Stem/Progenitor Cells in Muscles. *Stem cells*, 21, 363-371.
- REGEZI, J. A., SCIUBBA, J. J. & JORDAN, R. C. 2016. *Oral pathology: clinical pathologic correlations*, Elsevier Health Sciences.
- REIF, K., EKLAND, E. H., OHL, L., NAKANO, H., LIPP, M., FÖRSTER, R. & CYSTER, J. G. 2002. Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position. *Nature*, 416, 94-99.
- ROSSI, D. & ZLOTNIK, A. 2000. The biology of chemokines and their receptors. *Annual review of immunology*, 18, 217-242.
- Russell, H.V., Hicks, J., Okcu, M.F. and Nuchtern, J.G., 2004. CXCR4 expression in neuroblastoma primary tumors is associated with clinical presentation of bone and bone marrow metastases. *Journal of pediatric surgery*, 39(10), pp.1506-1511.
- SALLUSTO, F., LENIG, D., FÖRSTER, R., LIPP, M. & LANZAVECCHIA, A. 1999a. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*, 401, 708-712.
- SALLUSTO, F., PALERMO, B., LENIG, D., MIETTINEN, M., MATIKAINEN, S., JULKUNEN, I., FORSTER, R., BURGSTÄHLER, R., LIPP, M. & LANZAVECCHIA, A. 1999b. Distinct patterns and kinetics of

- chemokine production regulate dendritic cell function. *European journal of immunology*, 29, 1617-1625.
- SAMARA, G. J., LAWRENCE, D. M., CHIARELLI, C. J., VALENTINO, M. D., LYUBSKY, S., ZUCKER, S. & VADAY, G. G. 2004. CXCR4-mediated adhesion and MMP-9 secretion in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer letters*, 214, 231-241.
- SANCHEZ, X., COUSINS-HODGES, B., AGUILAR, T., GOSSELINK, P., LU, Z. & NAVARRO, J. 1997. Activation of HIV-1 coreceptor (CXCR4) mediates myelosuppression. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 27529-27531.
- Scala, S., Ottaiano, A., Ascierto, P.A., Cavalli, M., Simeone, E., Giuliano, P., Napolitano, M., Franco, R., Botti, G. and Castello, G., 2005. Expression of CXCR4 predicts poor prognosis in patients with malignant melanoma. *Clinical Cancer Research*, 11(5), pp.1835-1841.
- SCHALL, T. J. & PROUDFOOT, A. E. 2011. Overcoming hurdles in developing successful drugs targeting chemokine receptors. *Nature Reviews Immunology*, 11, 355-363.
- SCHIMANSKI, C. C., SCHWALD, S., SIMIANTONAKI, N., JAYASINGHE, C., GÖNNER, U., WILSBURG, V., JUNGINGER, T., BERGER, M. R., GALLE, P. R. & MOEHLER, M. 2005. Effect of chemokine receptors CXCR4 and CCR7 on the metastatic behavior of human colorectal cancer. *Clinical Cancer Research*, 11, 1743-1750.
- SCOTT, A. M., WOLCHOK, J. D. & OLD, L. J. 2012. Antibody therapy of cancer. *Nature Reviews Cancer*, 12, 278-287.
- SCOTTON, C. J., WILSON, J. L., SCOTT, K., STAMP, G., WILBANKS, G. D., FRICKER, S., BRIDGER, G. & BALKWILL, F. R. 2002. Multiple actions of the chemokine CXCL12 on epithelial tumor cells in human ovarian cancer. *Cancer research*, 62, 5930-5938.
- SHANG, Z. J., LIU, K. & SHAO, Z. 2009. Expression of chemokine receptor CCR7 is associated with cervical lymph node metastasis of oral squamous cell carcinoma. *Oral oncology*, 45, 480-485.
- SHEN, W., BENDALL, L. J., GOTTLIEB, D. J. & BRADSTOCK, K. F. 2001. The chemokine receptor CXCR4 enhances integrin-mediated in vitro adhesion and facilitates engraftment of leukemic precursor-B cells in the bone marrow. *Experimental hematology*, 29, 1439-1447.
- SHIELDS, J. D., FLEURY, M. E., YONG, C., TOMEI, A. A., RANDOLPH, G. J. & SWARTZ, M. A. 2007. Autologous chemotaxis as a mechanism of tumor cell homing to lymphatics via interstitial flow and autocrine CCR7 signaling. *Cancer cell*, 11, 526-538.
- SINGH, S., SINGH, R., SINGH, U. P., RAI, S. N., NOVAKOVIC, K. R., CHUNG, L. W., DIDIER, P. J., GRIZZLE, W. E. & LILLARD, J. W. 2009. Clinical and biological significance of CXCR5 expressed by prostate cancer specimens and cell lines. *International journal of cancer*, 125, 2288-2295.
- SKINNIDER, B. F. & MAK, T. W. 2002. The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*, 99, 4283-4297.
- SOZZANI, S., ALLAVENA, P., D'AMICO, G., LUINI, W., BIANCHI, G., KATAURA, M., IMAI, T., YOSHIE, O., BONECCHI, R. & MANTOVANI, A. 1998. Cutting edge: differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *The Journal of Immunology*, 161, 1083-1086.
- SPORN, M. B. 1996. The war on cancer. *The lancet*, 347, 1377-1381.
- STEIN, J. V., ROT, A., LUO, Y., NARASIMHASWAMY, M., NAKANO, H., GUNN, M. D., MATSUZAWA, A., QUACKENBUSH, E. J., DORF, M. E. & VON ANDRIAN, U. H. 2000. The CC chemokine thymus-derived chemotactic agent 4 (TCA-4, secondary lymphoid tissue chemokine, 6Ckine, exodus-2) triggers lymphocyte function-associated antigen 1-mediated arrest of rolling T lymphocytes in peripheral lymph node high endothelial venules. *The Journal of experimental medicine*, 191, 61-76.
- STUMM, R. K., RUMMEL, J., JUNKER, V., CULMSEE, C., PFEIFFER, M., KRIEGLSTEIN, J., HÖLLT, V. & SCHULZ, S. 2002. A dual role for the SDF-1/CXCR4 chemokine receptor system in adult brain: isoform-selective regulation of SDF-1 expression modulates CXCR4-dependent

- neuronal plasticity and cerebral leukocyte recruitment after focal ischemia. *The Journal of neuroscience*, 22, 5865-5878.
- SZANYA, V., ERMANN, J., TAYLOR, C., HOLNESS, C. & FATHMAN, C. G. 2002. The subpopulation of CD4⁺ CD25⁺ splenocytes that delays adoptive transfer of diabetes expresses L-selectin and high levels of CCR7. *The Journal of Immunology*, 169, 2461-2465.
- TAKANAMI, I. 2003. Overexpression of CCR7 mRNA in nonsmall cell lung cancer: correlation with lymph node metastasis. *International journal of cancer*, 105, 186-189.
- TAN, C.-T., CHU, C.-Y., LU, Y.-C., CHANG, C.-C., LIN, B.-R., WU, H.-H., LIU, H.-L., CHA, S.-T., PRAKASH, E. & KO, J.-Y. 2008. CXCL12/CXCR4 promotes laryngeal and hypopharyngeal squamous cell carcinoma metastasis through MMP-13-dependent invasion via the ERK1/2/AP-1 pathway. *Carcinogenesis*, 29, 1519-1527.
- TENG, Y. H., LIU, T. H., TSENG, H. C., CHUNG, T. T., YEH, C. M., LI, Y. C., OU, Y. H., LIN, L. Y., TSAI, H. T. & YANG, S. F. 2009. Contribution of genetic polymorphisms of stromal cell-derived factor-1 and its receptor, CXCR4, to the susceptibility and clinicopathologic development of oral cancer. *Head & neck*, 31, 1282-1288.
- TILTON, B., HO, L., OBERLIN, E., LOETSCHER, P., BALEUX, F., CLARK-LEWIS, I. & THELEN, M. 2000. Signal Transduction by Cxc Chemokine Receptor 4 Stromal Cell-Derived Factor 1 Stimulates Prolonged Protein Kinase B and Extracellular Signal-Regulated Kinase 2 Activation in T Lymphocytes. *The Journal of experimental medicine*, 192, 313-324.
- TSUZUKI, H., TAKAHASHI, N., KOJIMA, A., NARITA, N., SUNAGA, H., TAKABAYASHI, T. & FUJIEDA, S. 2006. Oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas expressing CCR7 have poor prognoses. *Auris Nasus Larynx*, 33, 37-42.
- UCHIDA, D., BEGUM, N.-M., ALMOFTI, A., NAKASHIRO, K.-I., KAWAMATA, H., TATEISHI, Y., HAMAKAWA, H., YOSHIDA, H. & SATO, M. 2003. Possible role of stromal-cell-derived factor-1/CXCR4 signaling on lymph node metastasis of oral squamous cell carcinoma. *Experimental cell research*, 290, 289-302.
- UCHIDA, D., BEGUM, N.-M., TOMIZUKA, Y., BANDO, T., ALMOFTI, A., YOSHIDA, H. & SATO, M. 2004. Acquisition of lymph node, but not distant metastatic potentials, by the overexpression of CXCR4 in human oral squamous cell carcinoma. *Laboratory investigation*, 84, 1538-1546.
- UEDA, M., SHIMADA, T., GOTO, Y., TEI, K., NAKAI, S., HISA, Y. & KANNAGI, R. 2010. Expression of CC-chemokine receptor 7 (CCR7) and CXC-chemokine receptor 4 (CXCR4) in head and neck squamous cell carcinoma. *Auris Nasus Larynx*, 37, 488-495.
- UNDERWOOD, J.C.E.; 2004:256. Carcinogenesis And Neoplasia. *General And Systematic Pathology*. USA: CHURCHILL LIVINGSTONE.
- VANNEMAN, M. & DRANOFF, G. 2012. Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment. *Nature Reviews Cancer*, 12, 237-251.
- VELA, M., ARIS, M., LLORENTE, M., GARCIA-SANZ, J. A. & KREMER, L. 2015. Chemokine receptor-specific antibodies in cancer immunotherapy: achievements and challenges. *Front Immunol*, 6, 12.
- VERGUNST, C. E., GERLAG, D. M., LOPATINSKAYA, L., KLARESKOG, L., SMITH, M., VAN DEN BOSCH, F., DINANT, H. J., LEE, Y., WYANT, T. & JACOBSON, E. W. 2008. Modulation of CCR2 in rheumatoid arthritis: A double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial. *Arthritis & Rheumatism*, 58, 1931-1939.
- VESELY, M. D., KERSHAW, M. H., SCHREIBER, R. D. & SMYTH, M. J. 2011. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annual review of immunology*, 29, 235-271.
- VOIGT, I., CAMACHO, S. A., DE BOER, B. A., LIPP, M., FORSTER, R. & BEREK, C. 2000. CXCR5-deficient mice develop functional germinal centers in the splenic T cell zone. *European journal of immunology*, 30, 560-567.
- WANG, J., XI, L., HUNT, J. L., GOODING, W., WHITESIDE, T. L., CHEN, Z., GODFREY, T. E. & FERRIS, R. L. 2004. Expression pattern of chemokine receptor 6 (CCR6) and CCR7 in squamous cell

- carcinoma of the head and neck identifies a novel metastatic phenotype. *Cancer research*, 64, 1861-1866.
- WANG, K., LI, W. & HUANG, H. Q. 2007. Human C-C chemokine receptor 3 monoclonal antibody inhibits pulmonary inflammation in allergic mice. *Acta Pharmacologica Sinica*, 28, 1791-1796.
- WILEY, H. E., GONZALEZ, E. B., MAKI, W., WU, M.-T. & HWANG, S. T. 2001. Expression of CC chemokine receptor-7 and regional lymph node metastasis of B16 murine melanoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 93, 1638-1643.
- WOOLGAR, J. A. & TRIANTAFYLLOU, A. 2009. Pitfalls and procedures in the histopathological diagnosis of oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma and a review of the role of pathology in prognosis. *Oral oncology*, 45, 361-385.
- WORBS, T., MEMPEL, T. R., BÖLTER, J., VON ANDRIAN, U. H. & FÖRSTER, R. 2007. CCR7 ligands stimulate the intranodal motility of T lymphocytes in vivo. *The Journal of experimental medicine*, 204, 489-495.
- XIA, X., LIU, K., ZHANG, H. & SHANG, Z. 2015. Correlation between CCR7 expression and lymph node metastatic potential of human tongue carcinoma. *Oral diseases*, 21, 123-131.
- YANAGIHARA, S., KOMURA, E., NAGAFUNE, J., WATARAI, H. & YAMAGUCHI, Y. 1998. EBI1/CCR7 is a new member of dendritic cell chemokine receptor that is up-regulated upon maturation. *The Journal of Immunology*, 161, 3096-3102.
- YIN, D. & GAO, Z. 2007. [Expression and clinical significance of chemokine receptor 4 in oral squamous cell carcinoma]. *Hua xi kou qiang yi xue za zhi= Huaxi kouqiang yixue zazhi= West China journal of stomatology*, 25, 392-395.
- YOSHIDA, R., NAGIRA, M., KITaura, M., IMAGAWA, N., IMAI, T. & YOSHIE, O. 1998. Secondary lymphoid-tissue chemokine is a functional ligand for the CC chemokine receptor CCR7. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 7118-7122.
- YUVARAJ, S., GRIFFIN, A. C., SUNDARAM, K., KIRKWOOD, K. L., NORRIS, J. S. & REDDY, S. V. 2009. A novel function of CXCL13 to stimulate RANK ligand expression in oral squamous cell carcinoma cells. *Molecular Cancer Research*, 7, 1399-1407.
- Yeudall, W.A., Miyazaki, H., 2007. Chemokines and squamous cancer of the head and neck: targets for therapeutic intervention?. Expert review of anticancer therapy, 7(3), pp.351-360.
- ZHANG, L., YANG, C. & LI, M. 2005. [Expression of chemokine receptor CXCR4 and CCR7 in laryngeal carcinoma]. *Lin chuang er bi yan hou ke za zhi= Journal of clinical otorhinolaryngology*, 19, 985-7, 991.
- ZHANG, Q., CHEN, G., LIU, X. & QIAN, Q. 2007. Monoclonal antibodies as therapeutic agents in oncology and antibody gene therapy. *Cell research*, 17, 89-99.
- ZHANG, S.-S., HAN, Z.-P., JING, Y.-Y., TAO, S.-F., LI, T.-J., WANG, H., WANG, Y., LI, R., YANG, Y. & ZHAO, X. 2012. CD133+ CXCR4+ colon cancer cells exhibit metastatic potential and predict poor prognosis of patients. *BMC medicine*, 10, 1.
- ZHANG, Y., MA, C., YU, Y., LIU, M. & YI, C. 2015. Are CXCL13/CXCR5/FAK critical regulators of MSCs migration and differentiation? *Medical hypotheses*, 84, 213-215.
- ZLOTNIK, A. 2006. Chemokines and cancer. *Int J Cancer*, 119, 2026-9.
- ZLOTNIK, A. & YOSHIE, O. 2000. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*, 12, 121-127.
- ZOU, Y.-R., KOTTMANN, A. H., KURODA, M., TANIUCHI, I. & LITTMAN, D. R. 1998. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature*, 393, 595-599.

مراجع الأشكال والجداول الخارجية

الشكل 1 VESELY, M. D., KERSHAW, M. H., SCHREIBER, R. D. & SMYTH, M. J. 2011. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annual review of immunology*, 29, 235-271.

الشكل 2 أ، ب، د NEVILLE 2009. Epithelial Pathology. *Oral and Maxillofacial Pathology* 3ed.: SAUNDERS ELSEVIER.

الشكل 2 ج Marx R.E, Stern D 2003. Premalignant and malignant epithelial tumors of mucosa and skin, *Oral and Maxillofacial Pathology A Rational for Diagnosis and Treatment*. Qquintessene Publishing Co, Inc , ISBN 0-86715-390-3.

الشكل 3 <https://www.cancer.gov/types/head-and-neck/head-neck-fact-sheet>

الشكل 4 أ، ج REGEZI, J. A., SCIUBBA, J. J. & JORDAN, R. C. 2016. *Oral pathology: clinical pathologic correlations*, Elsevier Health Sciences.

الشكل 4 ب، د NEVILLE 2009. Epithelial Pathology. *Oral and Maxillofacial Pathology* 3ed.: SAUNDERS ELSEVIER.

الشكل 4 ن Marx R.E, Stern D 2003. Premalignant and malignant epithelial tumors of mucosa and skin, *Oral and Maxillofacial Pathology A Rational for Diagnosis and Treatment*. Qquintessene Publishing Co, Inc , ISBN 0-86715-390-3.

الشكل 4 هـ BARNES, L. 2005. *Pathology and genetics of head and neck tumours*, IARC.

الشكل 4 و، ي <http://atlasgeneticsoncology.org/Tumors/HeadNeckSCCID5078.html>

الشكل 5 BARNES, L. 2005. *Pathology and genetics of head and neck tumours*, IARC.

الشكل 6 أ، ب، ث NEVILLE 2009. Epithelial Pathology. *Oral and Maxillofacial Pathology* 3ed.: SAUNDERS ELSEVIER.

الشكل 6 ت

<http://scanscope2.path.med.umich.edu:82/html/filmstrip.htm?loc=aHR0cCUzQSUyRiUyRjE0MS4yMTQuNjUuMTcxJTJGUzVzaWRlbnQIMjBFZHVjYXRpb24IMkZMaWVlZXJtYW4lMkZTdHVkeSUyMFNldCUyRkNlcnZpeCUyRlNxdWFtb3VzJTlwY2FyY2lub21hJTJGSCUyNkVfMTI0NDJubC5zdnM=&myname=12442&stain=H%26E>

- الشكل 7** ABBAS, A. K. 2005a. cells and tissues of the immune system. *cellular and molecular immunology*. 5th ed.: ELSEVIER SAUNDERS.
- الشكل 8** ABBAS, A. K. 2005a. cells and tissues of the immune system. *cellular and molecular immunology*. 5th ed.: ELSEVIER SAUNDERS.
- الشكل 9** ABBAS, A. K. 2005a. cells and tissues of the immune system. *cellular and molecular immunology*. 5th ed.: ELSEVIER SAUNDERS.
- الشكل 10** Galzi, J.L., Hachet-Haas, M., Bonnet, D., Daubeuf, F., Lecat, S., Hibert, M., Haiech, J. and Frossard, N., 2010. Neutralizing endogenous chemokines with small molecules: principles and potential therapeutic applications. *Pharmacology & therapeutics*, 126(1), pp.39-55.
- الشكل 11** BALKWILL, F. 2004. Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer*, 4, 540-50.
- الشكل 12** Fernandez, E.J. and Lolis, E., 2002. Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 42(1), pp.469-499.
- الشكل 13** KUCIA, M., JANKOWSKI, K., RECA, R., WYSOCZYNSKI, M., BANDURA, L., ALLENDORF, D. J., ZHANG, J., RATAJCZAK, J. & RATAJCZAK, M. Z. 2004. CXCR4–SDF-1 signalling, locomotion, chemotaxis and adhesion. *Journal of molecular histology*, 35, 233-245.
- الشكل 14** FÖRSTER, R., DAVALOS-MISSLITZ, A. C. & ROT, A. 2008. CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nature Reviews Immunology*, 8, 362-371.
- الجدول 1** BARNES, L. 2005. *Pathology and genetics of head and neck tumours*, IARC.
- الجدول 2** BARNES, L. 2005. *Pathology and genetics of head and neck tumours*, IARC.
- الجدول 3** Anneroth, G.R. and L.S. Hansen, A methodologic study of histologic classification and grading of malignancy in oral squamous cell carcinoma. *European Journal of Oral Sciences*, 1984 .(5) :p92. 448-468
- الجدول 4** ZLOTNIK, A. 2006. Chemokines and cancer. *Int J Cancer*, 119, 2026-9.

Investigation some invasion proteins expression in invasive nodes and compare with their primary tumor in head and neck squamous cell carcinoma (clinical immunohistochemistry study)

Abstract

Squamous cell carcinoma SCC is an important malignancy in head and neck tumors , Its high stages resulting in poor survival because of metastasis—especially lymph nodes- and secondary tumors . lymph nodes LN have biological importance because of their immunity role as a base of immunity defensive lines and lymphatic fluid purification, Recently chemokine receptors have been reported to be correlated with many malignancies ,In particular CCR7and CXCR4 and CXCR5. CCR7 has been reported to be strong mediator for LN metastases, while CXCR4 has been reported to be strong mediator for far metastases ,CXCR5 has been reported with bone metastasis.The correlation of these receptors has not yet been definitive in head and neck squamous cell carcinoma HNSCC, and researches haven't discuss the relation between each CCR7,CXCR4,CXCR5 expression in primary tumor and its metastatic lymph nodes .

Aims of this study:

Investigate each of CCR7,CXCR4,CXCR5 expression in primary HNSCC tumors in all tumor sizes and all lymph nodes involvement and in all clinical stages and in all histological grades, then compare it with control normal oral epithelial tissues.

Compare metastatic lymph nodes of each CCR7,CXCR4,CXCR5 expression with their primary HNSCC tumors.

Compare between CCR7,CXCR4,CXCR5 expressions in primary HNSCC tumors according to clinical stages and histological grades.

Compare CCR7,CXCR4,CXCR5 expressions in metastatic lymph nodes according to clinical stages.

Materials And Methods:

the sample consisted of 60 formalin-fixed, paraffin-embedded specimens of primary HNSCC tumors, 77 others of metastatic lymph nodes, and 10 with control normal oral epithelial tissues that were conventionally stained with H&E and immunohistochemically stained with a monoclonal anti-CCR7 antibody (abcam) and with a monoclonal anti-CXCR4 antibody (abcam), and with a monoclonal anti-CXCR5 antibody (abcam) . And cells counted under microscope in four different fields (X40).

Results:

There are no differences between primary HNSCC tumors stained by CCR7,CXCR4,CXCR5 according to tumor size , There are no differences between primary HNSCC tumors stained by CCR7,CXCR5 according to lymph nodes involvement,while there are differences between primary HNSCC tumors stained by CXCR4 at one node involvement and 3 ,5 node involvement.

There are no differences between primary HNSCC tumors stained by CCR7,while There are a differences between primary HNSCC tumors stained by CXCR4,CXCR5 at clinical stages. And there are no differences between primary HNSCC tumors stained by CCR7 or CXCR4or CXCR5 at histological grades.

There are relation between primary HNSCC tumors stained by CCR7 or CXCR4 and their metastatic lymph nodes,and no relation between primary HNSCC tumors stained by CXCR5 and their metastatic lymph nodes .

There are differences between CCR7 ,CXCR4 in primary HNSCC tumors at clinical stage 3and at histological grade 3

There are differences is between CCR7 ,CXCR4,and between CCR7,CXCR5 in metastatic lymph nodes according to clinical stages, and no differences is between CXCR5 ,CXCR4 in metastatic lymph nodes according to clinical stages

Key words: CCR7,CXCR4 ,CXCR5, metastatic lymph nodes, HNSCC.

تحري تعبيرية بعض بروتينات الغزو في النقايل العقدية ومقارنتها بورمها الأولي في السرطان شائك الخلايا للرأس والعنق (دراسة سريرية كيميائية مناعية)

الملخص

يعتبر سرطان شائك الخلايا من أهم السرطانات في الرأس والعنق ، تترافق درجاته العالية السريرية مع نسبة نجاة منخفضة بسبب ترافقه مع انتقالات —خاصة للنقايل العقدية—وأوراماً ثانوية . تتمتع العقد اللغفية بأهمية وظيفية خاصة لدورها المناعي باعتبارها من الخطوط الدفاعية المناعية ولدورها في تنقية اللف. سجل حديثاً ارتباط مستقبلات الكيموكين مع العديد من السرطانات خاصة المستقبلات CXCR4, CXCR5, CCR7 . يعتبر CCR7 وسيطاً لهجرة النقايل للعقد اللغفية ، في حين ترافقت تعبيرية CXCR4 مع الانتقالات البعيدة ، و ترافقت تعبيرية CXCR5 مع الغزو العظمي. لم يثبت تورط هذه المستقبلات مع سرطان شائك الخلايا للرأس والعنق، ولم تتم دراسة العلاقة بين المستقبلات CXCR4, CXCR5, CCR7 في الأورام الأولية ونقايلها العقدية من هذا السرطان.

الهدف من البحث:

دراسة تعبيرية كلا من المستقبلات CXCR4, CXCR5, CCR7 في الورم الأولي للسرطانات شائكة الخلايا للرأس والعنق تبعاً لحجم الورم الأولي وتبعاً لعدد النقايل المعقدية المصابة وتبعاً للدرجة السريرية والنسجية ومقارنتها بالنسج السليمة من بشرة فموية

مقارنة تعبيرية كلا من المستقبلات CXCR4, CXCR5, CCR7 في كل نقيلة عقدية مع ورمها الأولي للسرطانات شائكة الخلايا للرأس والعنق.

مقارنة تعبيرية المستقبلات CXCR4, CXCR5, CCR7 مع بعضها البعض في الورم الأولي للسرطان شائك الخلايا للرأس والعنق تبعاً للدرجة السريرية وتبعاً للدرجة النسيجية

مقارنة تعبيرية المستقبلات CXCR4, CXCR5, CCR7 مع بعضها البعض في النقايل العقدية تبعاً للدرجة السريرية.

مواد وطرق البحث:

تألفت العينة من ٦٠ ورم أولي لسرطان شائك الخلايا على شكل قوالب شمعية بارافينية مثبتة بالفورمول، و ٧٧ نقيلة عقدية، و ١٠ عينات شاهدة من البشرة الفموية قطعت ولونت بالهيماتوكسيان أبوزين وبالملونات المناعية باستخدام أضداد بشرية وحيدة النسيلة لـ CXCR4, CXCR5, CCR7 من شركة abcam وتم عد الخلايا في ٤ ساحات مجهرية مختلفة عالية الدقة (x40).

النتائج:

لا يوجد فروق بين الأورام الأولية لسرطان شائك الخلايا للرأس والعنق الملونة بـ CXCR4, CXCR5, CCR7 تبعاً لحجم الورم الأولي

كما لا يوجد فروق بين الأورام الأولية لسرطان شائك الخلايا للرأس والعنق الملونة بـ CXCR5, CCR7 تبعاً لعدد النقايل العقدية المصابة في حين يوجد فروق بين هذه الأورام الأولية الملونة بـ CXCR4 بين الأورام المصابة بنقيلة واحدة والمصابة بـ ٣ و ٥ نقائل عقدية

لا يوجد فروق بين الأورام الأولية لسرطان شائك الخلايا للرأس والعنق الملونة بـ CCR7 تبعاً للدرجة السريرية في حين يوجد فروق بين هذه الأورام الملونة بـ CXCR4, CXCR5 بين الدرجتين الأولى والرابعة السريرية

لا يوجد فروق بين الأورام الأولية لسرطان شائك الخلايا للرأس والعنق الملونة بـ CXCR4, CXCR5, CCR7 تبعاً للدرجة النسيجية

يوجد علاقة بين الأورام الأولية لسرطان شائك الخلايا للرأس والعنق الملونة بـ CXCR4, CCR7 وبين نقائلها العقدية ولا يوجد علاقة بين هذه الأورام الملونة بـ CXCR5 وبين نقائلها العقدية.

يوجد فروق في تعبيرية CXCR4, CCR7 في الأورام الأولية عند الدرجة الثالثة السريرية والنسجية

يوجد فروق في تعبيرية CXCR4, CCR7 و CXCR5, CCR7 في النقايل العقدية تبعاً للدرجة السريرية في حين لا يوجد فرق في تعبيرية CXCR4, CXCR5 في النقايل العقدية تبعاً للدرجة السريرية.

الكلمات المفتاحية :

CXCR4, CCR7, CXCR5، النقايل العقدية ، السرطان شائك الخلايا للرأس والعنق .