مجلة العلوم البحتة والتطبيقية
Journal of Pure & Applied Sciences
www.Suj.sebhau.edu.ly ISSN 2521-9200
Received 12/02/2020 Revised 12/06/2020 Published online 30/06/2020

سرطان الثدي(التشخيص الجزيئي و محاولات العلاج الجيني)

نجوى شحات جعراني[1] و أحمدعلي الجنقه[2]
[1] قسم علم الحيوا - كلية العلو - جامعة سبها، ليبيا
[2] قسم التقنيات الحيو - كلية العلو - جامعة سبه ، ليبيا
*للمراسلة : nj.khalifa@sebhau.edu.ly

الملخص سرطان الثدي من السرطانات الأكثر شيوعا والسبب الرئيسي لوفاة النساء حول العالم. يمكن أن يبدأ سرطان الثـــدي كمرض موضعي ولكن يمكن أن ينتقل إلى جزء بعيد من الجسم وخاصة إلى العقدة الليمفاوية والعظام والعمود الفقري مما يجعلها أكثر فتــكا، زيد فرص الإصابة بسرطان الثدي مع زيادة العمر و شرب الكحول وتناول حبوب منع الحمل عن طريق الفم. يمثل سرطان الثدي نسبة 3 % من مجموع حالات السرطانات الجديدة و 1 % من أجمالي الوفيات بالسرطان، مما يجعل سرطان الثدي أكثر الأورام المميتة في النساء، ووفقا للدراسات الأخيرة يتم تجميع عوامل الاستعداد وفقا لارتباطها مع حدوث المرض، على سبيل المثال تؤدي الطفرة في BRCA1 الى زيادة مخاطر الإصابة بنسبة 0 % مكما ان الطفرة في BRCA2 تزيد من خطر الإصابة بنسبة 5 % ويحدث سرطان الثدي المرتبط بهذه الطفرات في النساء الأصغر سنا. ويبدأ تشخيص سرطان الثدي بالفحص البدني، والتشخيص من خلال التصوير الماموغرافي أو التصوير بالموجات الفوق صوتية. وهناك العديد من التحاليل التي تعمل على تحليل وتحديد طفرة BRCA1/2 باستخدام أ وات جزيئية مختلفة منها(MS-PCR، DNA sequencing، Next generation DNA sequencing حيث تعتمد هذه الطرق على PCR، والتي من بينها HPLC) فهي تعتبر من الطرق الجديد لفحص الحمض النووي DNA، وأظهرت فعاليتها في فصل النيكولوتيدات المفردة، ومن مزاياها الدقة العالية و سرعة التحليل، فتحديد الطفرات و الكشف المبكر تساعد لتقديم العديد من العلاجات فسرطان الثدي قابل للشفاء إذا تم تشخيصه بشكل دقيق وفي المرحلة المبكرة فهناك العديد من الطرق المستخدمة في علاجه منها العلاج الكيميائي والعلاج هرموني ، والعلاج الإ عاعي ، العلاج الجيني , غيرها مما يحسن من التوقعات والبقاء على قيد الحياة.

الكلمات المفتاحية: الاختبارات الجزيئية، تشخيص سرطان الثدي، جينات سرطان الثدي؛ سرطان الثدي، علاج سرطان الثدي.

Breast Cancer (Molecular diagnostics and gene therapy attempts)

*Najwa Shehat Jaheranee[1] , Ahmed Ali Ejanga[2]
[1] Department of Zoology, Faculty of Science, Sebha University, Sebha
[2] Department of Biotechnology, Faculty of Science, Sebha University
*Corresponding author: nj.khalifa@sebhau.edu.ly

Abstract Breast cancer is one of the most common cancers, and the foremost cause of death for women around the world. It may begin as a normal disease, then it may spread deep to part of the body, especially to the lymph node, bones and spine, making it more deadly. The chances of breast cancer increase with increasing in age, drinking alcohol and taking oral contraceptives. Breast cancer represents 23% of all new cancers and 14% of all cancer deaths. This established fact makes it the most deadly tumor in women. According, to recent studies, predisposition factors are grouped according to associating them with the occurrence of the disease; for example the mutation in BRCA1 leads to the risk of infection increases by 80%, and the BRCA2 mutation increases the risk by 45%. Breast cancer associated, with these mutations, occurs in younger women. The diagnosis of breast cancer begins with a physical examination, and diagnosing it through a mammogram or ultrasound. There are many analyzes that work on analyzing and identifying the BRCA1 / 2 mutation using different molecular tools, including (MS-PCR, DNA sequencing, next generation DNA sequencing). This method has shown its effectiveness in separating single nucleotides, and its advantages are with high accuracy and speed of analysis, as identifying mutations and early detection help to provide many treatments, especially, that breast cancer is curable if it is diagnosed accurately in the early stage. There are many methods used in its treatment, including chemotherapy and hormone therapy, Radiation therapy, gene therapy, etc. improves expectations and survival.

Key words: molecular testing, breast cancer diagnosis, breast cancer genetics, breast cancer, breast cancer treatment.

المقدمة – Introduction

سرطان الثدي من أكثر السرطانات شيوعا في النساء و يأتي في المرتبة الثانية بعد سرطان الرئة كسبب لوفيات النساء التي يتراوح أعمارهن بين 40 و 50 عام ، حيث سجلت نسبة وفيات النساء نتيجة إصابتهن بسرطان الثدي تصل مابين25% إلى 0 %(1) .

ويمثل سرطان الثدي نسبة 23% من مجموع حالات السرطانات الجديدة و 14% من أجمالي الوفيات بالسرطان و السبب الرئيسي لوفاة النساء في جميع أنحاء العالم.[3]

و بعد جهود من البحث المكثف تم تحديد إثنين من الجنيات الحساسة لسرطان الثدي و التي تلعب دور مهم في حدوث سرطان الثدي و هذه الجينات يشار أليها بـBRCA1، BRCA2 وهي من أكثر و أهم الجينات التي تم تحديدها . حوالي 20% من الأسر التي لديها قابلية لوراثة سرطان الثدي تكون حاملة لطفرات في جيناتBRCA1، BRCA2[4]

و يحدث معظم سرطان الثدي الوراثي بسبب طفرة في الجينات BRCA1، BRCA2 و تتعرض النساء الحاملة لطفرة في هذه الجينات لي مخاطر عالية لتطور سرطان الثدي.[5]

علي الرغم من إن سرطان الثدي من أكثر السرطانات دراسة إلا أن التحاليل الوراثية للتحولات الكروموسومية وطفرات الجينات لم تكن كذلك ولم يتم إنشاء تسلسل الأحداث التي تؤدي إلي الإصابة بسرطان الثدي بصورة متفرقة[5،7،3] .

و ذلك بسبب عدم التجانس الوراثي الذي حجب أساس سرطان الثدي بصورة متفرقة وهذ يعطي تفسيراً جزئياً ؛ إن تحويل الخلايا الطبيعة الي خلايا سرطانية يتطلب تعديلات متعددة علي مستوى الجيني و الكروموسومي[9،10] .

الأدلة التي تؤيد هذا المفهوم تأتي من خلال مراقبة التغيرات الجينية المتعددة مثل الحذف و الأدراج و إعادة الترتيب و الطفرات النقطية في جينوم الورم تحديد جميع التعديلات الممكنة ستعطي تفسيرا أفضل للتفاعلات بين الجينات التي تشارك في التحريض علي حدوث سرطان الثدي[11،12،13] .

حقق العلاج الكيميائي انجازاً كبيراً للحد من الوفاة بالسرطان[14] . فسرطان الثدي هو النوع الأول من السرطانات الصلبة المستهدفة لعلاجه بنجاح بالعلاج الجزيئي[15،16] حيث وضعت العديد من الطرق القائمة علي PCR للكشف عن الطفرات في الجينات المسببة لسرطان الثدي[11،12،13] . **تهدف** هذه الورقة لتوفير المعلومات عن سرطان الثدي والجينات المسببة له و الاختبارات الجزيئية المستخدمة في تشخيص سرطان الثدي.

2.1 الدراسات السابقة Review of literature

هناك العديد من الدراسات حول سرطان الثدي و الجينات المسببة له حيث عرف سرطان الثدي بانه نمو خبيث (سرطاني) يسببه النمو الغير طبيعي و الغير متحكم فيه في خلايا الثدي[17] .

وجد هوول وأخرون ان العلاقة بين العديد من علامات الحمض النووي في المنطقة 7q21 من الذراع الطويل من الكروموسوم 17 وحدوث الإصابة المبكرة لسرطان الثدي[18] .

و أشار هاريس في عام 1992 أن سرطان الثدي من أكثر السرطان شيوعا بين النساء ويأتي المرتبة الثانية بعد سرطان الرئة كسبب لوفيات النساء[1] .

وتم التعرف علي الجينات المسببة لسرطان الثدي العائلي من قبل ميكي و آخرون في عام1994 وأشار إليه ب BRCA1 من خلال أجراء يحلل الربط بين الأنساب العائلية التي تميل للإصابة بسرطان الثدي[20] . وفي عام1995 حدد وستر و آخرون موضع الجينات الحساسة لسرطان الثديBRCA2 [19] .

و أشار ميكي و آخرون في عام 1994 و وستر و آخرون في عام 1995 إلى إن الأفراد الذين يعانون من طفرات في الجينات BRCA1 تظهر استعدادا للإصابة بسرطان المبيض في حين الأفراد الذين يعانون من طفرات في الجينات BRCA2 تظهر استعداد للإصابة بسرطان البروستاتا[19،20] .

و في عام1996 اشار جورجينسر و آخرون و تورليكسر و آخرون إن طفرات BRCA لها علاقة بحدوث الأورام البنكرياسية[21،22] .

و حددت وظائف البروتينات BRCA1 و BRCA2 من خلال البيانات البيوكيميائية و البيولوجية بحيث تقوم بالمشاركة في الاستجابة لتلف الحمض النووي و إعادة تركيب الحمض النووي وتساهم معهما بروتين إصلاح الحمض النووي Hrad50 في عام 1997 بواسطة سكولي و آخرون و ونج وآخرون[23،24] .

وضح رحمان و ستراتون في عام 1998 إلى إن الطفرات في BRAC1 و BRCA2 لا تحدث بشكل متكرر في السرطان المتقطع غير عائلي)[25] .

و أشار ايستون في عام 1999 إلى إن تحديد عدد قليل من الجينات الطافرة يحتمل إن تكون مسئولة عن باقي مخاطر سرطان الثدي العائلي[26] .

أشاروا ناتتسون و آخرون في عام 2001 إلى إن الطفرات في جينات BRCA1 و BRCA2 تمثل(ة –(% من حالات السرطان العائلي[27] .

أشار بوتشر و آخرون في عام 2004 إلى إن معظم أنواع سرطان الثدي الوراثي بسبب طفرة في الجينات BRCA1 وتقريبا مثلهاBRCA2[5] .

وضح نيلسون و آخرون في عام 2009 ان سرطان الثدي يرجع الى خلل في دورة الخلية[13].

و في عام 2010 ازداد عدد سجلات السرطان في شمال أفريقيا المغرب والجزائر وتونس وليبيا ومصر)خلال السنوات القليلة الماضيا من 1 الى % عام 2006[28] .

في عام 2011 في دراسة تم اجراءه على الإناث الليبيات ، اللواتي يترددن على عيادة الثدي - قسم الجراحة مستشفى المركزي -

طرابلس-ليبيا للكشف عن وجود الطفرات 185 delAG و insC 5382 في الجين BRCA1 فوجدو ان الطفرة 185delAG كانت موجودة في 52 من أصل77(67.5%) من العينات المدروسة ، والطفرة 5382insC كانت غائبة في هذه الدراسة (19،29) . ثم تسجيل أكثر أنواع السرطانات شيوعا في النساء في عام 2012 هي الثدي و الرئة و القولون(30) .وأشار تومسون و آخرون في عام 2014 إلى إن فرص الإصابة بسرطان الثدي تزيد مع زيادة العمر واستهلاك الكحول و تناول حبوب منع الحمل(31) .

2. سرطان الثدي Breast cancer

سرطان الثدي هو نمو خبيث (سرطاني) يسببه النمو الغير طبيعي والغير متحكم فيه في خلايا الثدي (17) . يمكن للخلايا السرطانية أن تغزو وتدمر الأنسجة المحيطة وتنتشر في جميع أنحاء الجسم عن طريق الدم أو السوائل اللمفاوية للانتشار في مواقع جديد ، يؤثر سرط ن الثدي بشكل رئيسي على النساء و يكون أقل شيوعا في الرجال(32) .

فسرطان الثدي يتكون من خلايا خبيثة مما يؤدي إلى سلسلة متصلة من السرطان الموضعي (الغير غازية) إلى السرطان المنتشر (غازية) (33،34) . السرطانات الموضعية (الغير غازية) هي تكاثر الخلايا الظهارية في القناة الثديية سرطان الأقنية الموضعي (CIS)، أو من الفصيصات سرطان الفصيصي الموضعي(CIS،). السرطانات الموضعية لا تنتشر ، السرطانات الغازية لها إمكانات انتقالية يعني أن السرطان قد انتشر إلى مواقع أخرى في الجسم ،و الأماكن الأكثر شيوعا هي العقد الليمفاوية المجاورة ، العظام والكبد والرئة والدماغ (33،35) . و يمثل سرطان الأقنية الغازية ما يقارب 70٪ إلى 80٪ من سرطانات الثدي الغازية ، و يمثل سرطان الفصيصي(% سرطان الثدي الغازية (33،35) .

2. مراحل سرطان الثدي :

مرحلة سرطان الثدي

تصنيف مراحل سرطان الثدي توفر وصفا لمدى انتشار السرطان (36)، والنظام الأكثر شيوعا هو نظام اللجنة الأمريكية المشتركة للسرطان نظام TNM (37) .

ويتم تحديد مرحلة الورم من خلال حجم الورم وانتشار الورم في العقد اللمفاوية وانتشار المرض في الأجزاء البعيدة من الجسم .

صنيف مراحل السرطان بنظام T N M لوصف مرحلة السرطان حيث يصف كل حرف لمرحلة معينة:

يشير الحرف Tumor - T لحجم الورم ويكون متبوعا برقم من (الى 4 يصف حجم الورم وانشاره إلى الجلد او تحت جدار الثدي،و الأعدا الأكبر من T تشير لوجود ورم أكبر أو انتشار أوسع للورم في الأنسجة القريبة من الثدي.

يشير الحرف Lymph Nodes - N لانتشار الورم في العقد اللمفاوية ويكون متبوعا برقم من (إلى3 .

يشير الحرف Metastasis - M لانتشار المرض في الأجزاء البعيدة من الجسم كالرئتين و العظام ويكون متبوعا برقم (إلى1 ،يتميز سرطان الثدي في المرحلة 0 الى سرطان الثدي في الموضع أي الخلايا السرطانية لم تغز الأنسجة المحيطة.

درجة سرطان الثدي

توفر وصف درجة الورم مدى التشابه بين خلايا سرطان الثدي مع انسجة الثدي الطبيعية عند الفحص المج ري (36) ،يتم تحديد درجة الورم بالاعتماد على ثلاث سمات شكلية لخلايا رطان الثدي:

1. درجة تكوين الأوعية داخل الورم.
2. نشاط الانقسام.
3. تعدد أشكال النوى(38) .

يتم إضافة القيم معا لتعطي درجة من -9 والتي يتم تعين درجاتها كما يلي:

المجموع 5 : الدرجة تكون 1 يكون متميزا جدا.

المجموع -7 : الدرجة تكون 2 متباين بشكل معتدل.

المجموع -9 : الدرجة تكون 3 سيئة التميز.

تشير الدرجة المنخفضة لبطء نمو الورم والدرجة الكبيرة تشير لسرعة نموه، وتعبر هذه الدرجات مؤشر هام لإمكانية العلاج و البقاء على قيد الحياة(36) .

2.2 الوبائية Epidemiology

يختلف معدل حدوث بعض أنواع السرطان بين المجموعات السكانية المختلفة والمواقع الجغرافية. قد تكون هذه الأختلافات مرتبطة باسباب وراثية، او بيئية، او عرقية (39) .وقد تكون هناك اختلافات بين الدول النامية و المتقدمة من حيت وبائية امراض السرطان.

فمعدل الإصابة بالسرطان في البلدان النامية يتزايد بسبب الشيخوخه،ونمط الحياة المرتبط بحدوث السرطان كالتدخين و السمنه وقلةالنشاط البدني(40،41) .

ليبيا دولة كبيرة تمتد على مساحة تزيد عن 1،759،540 كيلومتر مربع،مما يجعلها تحتل الرقم 16 كأكبر بلدان العالم مساحةً و تقع في التحول الوبائي حيث يعتبر السرطان السبب الثالث للوفاة بعد امراض القلب التاجية و حوادث المرور. لذلك ، من الضروري إلقاء الضوء على الوضع الوبائي للسرطانات في مختلف المناطق.

تم إجراء عدد كبير من الدراسات الوبائية حول معدل الإصابة بالسرطان في ليبيا لتحديد حجم المشكلة[42،43] ، اشارت دراسة اجريت في عام 2014 ان اكثر السرطانات شيوعا على التوالي هي سرطان البروستاتا والرئة والقولون والمستقيم والمثانة والجلد لدى الذكور. والثدي والرئة والقولون والمستقيم و الرحم والغدة الدرقية في الإناث[39] .

وسرطان الثدي هو أكثر أنواع السرطانات انتشارا بين المريضات الليبيات بنسبة 0 ٪ . هذا المعدل المرتفع لسرطان الثدي مماثل للتقارير السابقة في ليبيا وأماكن أخرى[44،45،46،47] .

تظهر الدراسات الحالية أن سرطان القولون والمستقيم هو ثاني أكثر السرطانات شيوعاً بين الذكور والإناث. تتفق هذه النتيجة مع الدراسات السابقة في ليبيا والتي تثبت أن سرطان القولون والمستقيم هو أكثر أنواع الأورام الخبيثة المعوية انتشاراً بين الذكور والإناث الليبيين[44،48] .

3.2 أسباب سرطان الثدي Causes Of Breast Cancer

ان سرطان الثدي غير متجانس وراثيا و مرضيا و الألية الكامنة وراء تطور سرطان الثدي لا تزال غير واضحة لحد كبير[26، 20، 19] ،وتم تقسيم اسباب سرطان الثدي الى:

- **متفرقة** Sporadic Cancer : **أكثر من 0 -5 % من سرطان الثدي لا علاقة لها بتاريخ العائلي، تظهر عشوائيا متقطعة و ليست محددة وراثيا أي لا تنتقل بالوراثة[3] .**
- **عائلية** Familial Cancer : **يعتبر التاريخ العائلي احد اهم اسباب تطور سرطان الثدي[49] ،ترث النساء اللواتي لديهن تاريخ عائلي للإصابة بسرطان الثدي بعض طفرات الجينية التي تعدل عوامل الخطر للمرض وخصائصه السريرية ومع ذلك ، لا يبدو أن هناك نمطًا محدداً لوراثة سرطان الثدي[50] .**
- **وراثية** Hereditary Cancer **:يحدث عند وراثة جينات عالية النفاذية من خلال نمط وراثي الجسمي السائد[51] ،وهذه الجينات تلعب دورا كبيرا في تطوير سرطان الثدي وهما جينات** BRCA1/2 [52] .

4.2 العوامل التي تزيد من خطر سرطان الثدي Factors that increase the risk of breast cancer

هناك العديد من العوامل التي ارتبطت بسرطان الثدي أو تزيد من خطر الإصابة بسرطان الثدي فعامل الخطر هو أي شيء يزيد من فرصة الشخص بالإصابة بالمرض[54] . و تشمل عوامل الخطر العمر تزداد فرصة الإصابة بسرطان الثدي في النساء مع تقدم العمر حيث وجدوا إن 8 من أصل 10 نساء مصابات بسرطان الثدي أعمارهن فوق 50 عام[54] .

رتبط التاريخ العائلي كعامل بعدد الأقارب المتضررين و درجة العلاقة والعمر عند تشخيص المرض لأفراد العائلة المصابة [53] . والعوامل المرتبطة بالهرمونات (بداية مبكرة من الحيض ، وانقطاع الطمث المتأخر ، وعدم الرضاعة الطبيعية ، استخدام العلاج بالهرمونات البديلة أكثر من أربع سنوات ، والسمنة بعد سن اليأس) ، استهلاك الكحول ، والتعرض لدخان السجائر والإشعاع[47،48] .

5.2 تشخيص سرطان الثدي Diagnosis of breast cancer

يعتمد التشخيص عادة على العديد من العوامل بما في ذلك المرحلة ، التكرار ، العمر وصحة المريض مرحلة سرطان الثدي هو العامل الأكثر أهمية يتم تقييم درجة سرطان الثدي من خلال المقارنة بين الخلايا السرطانية و الخلايا الطبيعية للثدي[53] .

و يبدأ تشخيص سرطان الثدي بالاعتماد على الفحص الذاتي و التشخيص السريري مع التصوير الإشعاعي Mammography و الخزعة(أخذ عينة فحص نسيجية).

الفحص الذاتي

يبدأ تشخيص سرطان الثدي بالفحص الذاتي[55] حيث أكثر من نصف حالات سرطان الثدي تم اكتشافه من قبل النساء أنفسهن أو من قبل أطبائهن[56] . يساعد الفحص الذاتي في الكشف المبكر لسرطان الثدي وبذلك يزيد فرصة الشفاء [57،58] .

التشخيص السريري لسرطان الثدي

عادةً ما يكون العارض الأول لسرطان الثدي عبارة عن كتلة تختلف عن بقية نسيج الثدي ، وتشمل الأعراض الأخرى سماكة في نسيج الثدي و تغيرات في شكل وحجم الثدي أو شكل الحلمات، و تجعد الجلد، وافرازات من الحلمة،ألم مستمر في جزء من الثدي أو الإبط أو تورم تحت الإبط[50] .

و لوصف سرطان الثدي يشمل على النحو الأمثل كل من التشريح المرضي،درجة انشار المرض، مرحلة المرض حالة المستقبلات وفحوصات الحمض النووي .[51] وغالبًا ما يقارن بين خلايا سرطان الثدي وأنسجة الثدي الطبيعية الخلايا السرطانية عادة ما تكون غير متمايزة و يصبح الانقسام الخلوي غير متحكم فيه حيث تفقد الخلايا بشكل تدريجي الملامح المشاهدة في خلايا الثدي الطبيعية .[52] وغالبا ما يصنف سرطان الثدي بالعديد من الأنظمة التي يمكن أن تؤثر على التشخيص والاستجابة للعلاج[53] .

التصوير الإشعاعي Mammography

يعتبر افضل الطرق لإكتشاف سرطان الثدي المبكر وبذلك يمكن انقاذ حياة النساء،حيث اظهرت الدراسات انخفاض معدل الوفيات

بنسبة30% نتيجة استخدام الفحص الماموغرافي للكشف المبكر عن سرطان الثدي[55،56].

ظلت برامج فحص سرطان الثدي على مستوى العالم تدعم الفحص الماموغرافي كأفضل اداة متاحة للكشف المبكر عن سرطان الثدي والتقليل من معدل الوفيات [56] .

التصوير بالموجات الفوق الصوتية

يتيح الفحص بالموجات الفوق صوتية صورة للأورام الثدي بالكامل و التي لا يمكن تحديدها بالفحص الماموغرافي[57] .

ويظهر الفحص بالموجات الفوق صوتية حجم الورم و موقعه وكذلك لتحديد ما اذا كان الورم الموجود صلبا أو يحتوي على سائل . و يحتاج الى أخذ خزعة لاستبعاد وجود السرطان وسرعان ما أصبح التصوير بالموجات الفوق الصوتية أجراء روتينيا لتشخيص السرطان في النساء الشابات[58-69] .

التصوير بالرنين المغناطيسيMRI

هو جزء لا يتجزأ من تشخيص سرطان الثدي لبعض المرضى يطبق التصوير بالرنين المغناطيسي عندما يكون التصوير الماموغرافي محدودا أو غير حاسما أو إذا أريد قياس انتشار المرض او للمرضى الذين لديهم عوامل خطورة عالية لسرطان الثدي [70] .

الخزعةBiopsy

هي أفضل طريقة لتشخيص سرطان الثدي[71] ،وهناك أنواع عديدة ومختلفة من خزعات سرطان الثدي، ويستخدم خزعة الثدي لتعزيز دقة التشخيص و التخلص من النتائج السلبية الكاذبة او النتائج المثيرة للشكوك من نتائج التصوير الإشعاعي للثدي أو الموجات الفوق صوتيا[71] .

التشخيص الجزيئي

تقدير تعبير مستقبلات هرمون الأستروجين و البروجيستروز هي الأن تستخدم في الممارسات الروتينية لتشخيص و إدارة سرطان الثدي و هي مفيدة لتحديد خطر التكرار و العلاج [55] .

5.2 علاج سرطان الثديBreast Cancer Treatment

يعتمد علاج سرطان الثدي على العديد من العوامل بما في ذلك مرحلة السرطان ،وعمر المريض . يتم علاج سرطان الثدي عادة بالجراحة ، و يمكن أن يتبعها العلاج الكيميائي أو العلاج الإشعاعي أو كليهما غالبا ما يتم علاج الأورام السرطانية المستقبلة للهرمونات بالعلاج بالهرمونات[72] .

6.2.1 الجراحة

كانت الجراحة هي الطريقة الاساسية لعلاج سرطان الثدي لعدة قرون ، [73] تعتمد الجراحه على مرحلة ونوع الورم قد يكون مجرد استئصال الورم هو كل ما هو ضروري أو إزالة كميات أكبر من أنسجة الثدي قد تكون ضرورية ويسمى الاستئصال الجراحي للثدي كاملا استئصال الثدي.[74]

الجراحة لا تشمل فقط الثدي ولكن أيضا الغدد الليمفاوية التي ترتبط بالورم الخبيث بالنسبة للثدي فهو يعتمد بشكل رئيسي على نوعين من الجراحة الحفاظ على الثدي(استئصال الورم) أو استئصال الثدي.[74]

6.2.2 العلاج الإشعاعي:

هو علاج مساعد لمعظم النساء بعد استئصال الورم أو استئصال الثدي الغرض من الإشعاع هو الحد من تكرار الورم ، يتضمن العلاج الإشعاعي استخدام أشعة سينية عالية الطاقة أو أشعة جاما تستهدف الورم أو موقع الورم هذا الإشعاع فعال جدا في قتل الخلايا السرطانية التي قد تبقى بعد الجراحة أو تتكرر حيث تمت إزالة الورم[75] .

عادة ما يعاني المرضى الذين يخضعون لبعض أسابيع للعلاج الإشعاعي من التعب الناجم عن الأنسجة السليمة التي ترمم نفسها يصاب بعض مرضى سرطان الثدي بتغير في لون البشرة في المنطقة التي يتم علاجها هذا اللون الأسود الداكن عادة ما يعود إلى طبيعتها في شهر إلى شهرين بعد العلاج ؛ وتشمل الآثار الجانبية الأخرى تصلب العضلات وتورم خفيف و ألم الثدي لاحظ العديد من المرضى بعد الجراحة ، وبعد الانتهاء من العلاج الإشعاعي والعلاجات الأخرى أن الثدي المصاب يبدو أصغر ، ويرجع ذلك إلى إزالة الأنسجة خلال عملية استئصال الكتلة الورمية[76] .

6.2.3 العلاج الكيميائي

يمكن إعطاء العلاج الكيميائي كجزء من العلاج المساعد ومدته غالبا ما تكون من 3 إلى 5 أشهر حسب الدواء المستخدم أو قد تكون المدة أطول في المراحل المتقدمة للسرطان[74] .

و يمكن استخدام العلاج الكيميائي قبل الجراحة و بعد الجراحة أو بدلاً من الجراحة للحالات غير القابلة للعملية سيحصل المرضى الذين يعانون من أورام ذات مستقبلات الاستروجين الموجبة على علاج هرموني بعد اكتمال العلاج الكيميائي[77] .

6.2.4 العلاج الموجه

يستخدم علاج سرطان الثدي الموجه العقاقير التي تمنع نمو خلايا سرطان الثدي بطرق محددة . على سبيل المثال في المرضى الذين يعانون من سرطان فرط تعبير البروتين HER2 يتم استخدام الأجسام المضادة وحيدة النسيلة المعروفة باسم التراستوزوماب

trastuzumab لمنع نشاط البروتين HER2 في خلايا سرطان الثدي في الحالات المتقدمة ، يمكن استخدام التراستوزوماب rastuzumab بالاشتراك مع العلاج الكيميائي لتأخير نمو السرطان وتحسين بقاء المريض(78) تشمل الأدوية الأخرى المستخدمة للعلاج الموجه مثبطات التكوّن الوعائي مثل (bevacizumab) التي تمنع نمو الأوعية الدموية الجديدة مما يؤدي إلى قطع إمدادات الأكسجين والمغذيات إلى الخلايا السرطانيا(79) .

5. 6.2 العلاج بالهرمونات

يشمل معظم العلاج بالهرمونات عقاقير إما أن تخفض مستوى الإستروجين أو تمنع عمل الأستروجين على خلايا سرطان الثدي . العلاجات المضادة للاستروجين هي انتقائية مستقبلات هرمون الاستروجين مثل تاموكسيفين Tamoxifen ، الرلوكسيفين Raloxifene ، والتورميفين Toremifene التي تمنع نشاط ER(30) . فعقار تاموكسيفين وهو العقار الأمثل الذي يعطى للنساء قبل انقطاع الطمث لتثبيط مستقبلات هرمون الاستروجين ومثبطات الأروماتيز التي تعطى للنساء بعد سن اليأس لتخفيض كمية الاستروجين في أنظمتهن.(77)

7.2 العلاج الجيني Gene therapy

هو النهج العلاجي الجديد للسرطان (31) ،و يمكن تعريفه بأنه إيصال الجينات إلى خلايا السرطانية في الجسم ، ويكون لها تأثير علاجي مباشر أو غير مباشر في الشخص. ينطوي توصيل الجينات العلاجية على استخدام الناقلات ، والتي يمكن أن تستهدف على وجه التحديد أنسجة أو خلايا السرطان. لتحقيق التأثير العلاجي الأمثل يجب أن يستوفي الناقل شروطاً معينة ، مثل كفاءة عالية للنقل و يجب أن يستهدف الناقل الخلايا السرطانية على وجه التحديد بما في ذلك الخلايا النقيلية (32) ، للتعبير الجيني الأمثل يجب أن يكون ويمكن تصنيف نواقل الجينات على أنها نواقل فيروسيا(69،70) .و نواقل غير فيروسيا(78،79) .

هناك عدد من النواقل المستخدمة منها الناقلات الفيروسية لها كفاءة نقل أعلى مقارنة بالنواقل غير الفيروسية. تعد كفاءة النقل واحدة من اهم العوامل الرئيسية في علاج الجينات السرطانية لأن الهدف العام هو تحويل أكبر عدد ممكن من الخلايا السرطانية مع الجينات العلاجيا(30) .

الناقلات الفيروسية الارتدادية (الرجعية) retroviruses هي الناقلات الأكثر شيوعاً المستخدمة حالياً للعلاج في جميع الأمراض ، الناقلات الفيروسية الغدية Adenoviruses هي ثاني أكثر النواقل شيوعاً. على الرغم من أنها مفيدة فإنها تتسبب في تفاعلات مناعية والتهابية قد تجعل تكرار التحكم فيها مستحيل ، على الرغم من أن النواقل غير الفيروسية تُستخدم بشكل أقل (31) ، إلا أنها تتمتع ببعض المزايا الهامة على النواقل الفيروسية ترد في الجدول (1) مقارنة بين النواقل الفيروسية والنواقل الغير فيروسية. على الرغم من أن النواقل لفيروسية لها عيوب كثيرة مقارنة بالنواقل الغير فيروسية، إلا ان يفضل استخدامها أكثر من النواقل الغير فيروسية و ذلك لكفاءتها العالية في النقل(32) .

جدول 1 مقارنة بين النواقل الفيروسية و النواقل الغير فيروسيا(32)

وجه المقارنة	النواقل الفيروسية	النواقل الغير فيروسية
القدرة الاستيعابيا للحمض النووي	محدودة	غير محدود
التعبير	متغير	قصير
كفاءة النقل	عالية	غير فعالة
المناعة	عالية	منخفضة (سامة)
التصنيع	صعب	سهل

6.2. نهج العلاج الجيني Approaches to Gene Therapy

1)تعديل الجينات

استخدم الباحثون الطرق التالية لتعديل الجينات المعيبة:

- **العلاج البديل** Replacement treatment : **استبدال الجين الطبيعي بجين غير طبيعي من خلال إعادة التركيب المتماثل .**
- **العلاج الجيني المعدل** Modifier gene therapy : **استعادة الوظيفة الطبيعية للجين المعيب من خلال الطفرة العكسية الانتقائية**
- تعديل التعبير عن جين معين

2) طريقة نقل الجينات

هناك ثلاث طرق فيزيائية وكيميائية وبيولوجية لنقل الجينات.

3) نقل الجينات إلى خط خلية معين

ينقسم هذا الخط إلى فئتين من العلاج الجيني الجسدي والعلاج الجيني للخلايا الجنسية.

4) اعتماد نهج هندسة وراثية مناسب

تشمل أشكال للهندسة الوراثية استهداف الجينات والقضاء على جينات معينة من خلال هندسة نوكاز (33) .

2.6.2 استراتيجيات العلاج الجيني Gene Therapy Strategies

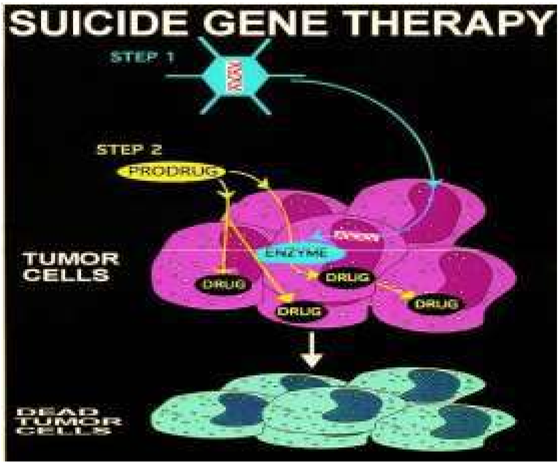
يمكن تصنف استراتيجيات العلاج الجيني للخلايا السرطانية الى:

1 توزيع الجينات الانتحارية Delivery of suicide genes :

العلاجات الجينية هي تقنيات لتعديل الجينوم الخلوي لفائدة علاجية. في العلاج الجيني للسرطان ،قد تكون كل من الخلايا الخبيثة وغير الخبيثة أهدافاً مناسبة. تم اقتراح إمكانية جعل الخلايا السرطانية أكثر حساسية للعلاجات الكيميائية أو السموم من خلال إدخال "جينات الا نتحار". وهذه الاستراتيجية لها خيارين: العلاج الجيني للسموم ،حيث يتم نقل جينات المنتجات السامة مباشرة إلى الخلايا السرطانية ؛والعلاج بالأدوية الأولية المنشط للإنزيم ،حيث تقوم الجينات المحورة بتشفير الإنزيمات التي تنشط عقاقير أولية معينة لإنتاج منتجات سامة.

يمكن استخدام الاستراتيجية الأخيرة، المعروفة باسم العلاج الأولي للعقاقير الإنزيمية الموجه بالجينات gene-directed enzyme prodrug therapy (GDEPT) [35،84] أو العلاج بالعقاقير الأولية بالإنزيم الموجه بالفيروس virus-directed enzyme prodrug therapy (VDEPT) ، بمفرد ها أو جن ا إلى جنب مع استراتيجيات أخرى [36] .

تتم استراتيجية GDEPT و VDEPT لعلاج الأورام الصلبة في خطوتين كما موضح في الشكل 1 .



شكل 1 يوضح استراتيجية GDEPT و VDEPT لعلاج الأورام الصلبة [38]

في الخطوة الأولى ، يتم تسليم الجين الخاص بالإنزيم الخارجي واستهدافه الورم حيث يتم التعبير عنه.

في الخطوة الثانية ، يتم إعطاء دواء أولي يتم تنشيطه بشكل انتقائي للدواء بواسطة الإنزيم الخارجي المعبر عنه في الورم.

ينبغي لتعبير الجيني للإنزيم ان يكون محصورا في الخلايا السرطانية وان يصل لتركيز كاف لتفعيل الدواء الأولي ،يجب ان يكون النشاط التحفيزي للبروتين المعبر عنه كافيا لتفعيل الدواء الولي في ظل الظروف الفسيولوجية.

نظراً لأن التعبير عن الإنزيمات الخارجية لن يحدث في جميع خلايا الورم المستهدف في الجسم الحي ، يلزم وجود تأثير متفرج bystander effect (BE) ، حيث يتم شق الدواء الأولي إلى عقار نشط لا يقتل فقط الخلايا السرطانية التي يتكون فيها ، ولكن أيضاً الخلايا السرطانية المجاورة التي لا تعبر عن الإنزيم الخارجي [37] .

2 توصيل الجينات القامع للورم Delivery of tumor suppressor genes

يتم فقدان العديد من الجينات الكابتة للورم أثناء تكوين الورم[89] .تعد إعادة إثبات التأثير العلاجي لــ p53 وزيادة كمية مثبطات كيناز المعتمدة على السيكلين CDK من الأساليب الشائعة في العلاج الجيني للسرطان[90] .

عند تقييم التأثير العلاجي لــ p53 و p21 و p16 تمت مقارنته في الخلايا السرطانية؛ أعطى p16 و p21 تأثير قمع الورم أعلى منp53 [91] .وعلاوة على ذلك ، عند مقارنة فعالية الكينازات المعتمدة على السيكلين ، لوحظ أن الخلايا المنقولة بـــ p16 و p18 (p18) و p27 تسببت في حدوث أكبر قدر من موت الخلايا وتحريض موت الخلايا المبرمج بالإضافة إلى ذلك كانت إعادة إنشاء p27 و p16 هي الأكثر فعالية في تثبيط نمو السرطان [92] .

3 تثبيط الأوعية الدموية (مكافحة الأوعية الدموية) Inhibition of angiogenesis (anti-angiogenesis)

تثبيط تكون الأوعية الدموية من الاستراتيجيات المهمة والجيدة للعلاج الجيني للسرطان لأن الأورام الصلبة لا يمكن أن تنمو أكثر من 2 –3 مم بدون أكسجين وتغذية كافية.

بعض الجينات الشائعة المضادة لتولد الأوعية هي مستقبلات عامل النمو البطاني الوعائي(VEGF) ، وأنجيوستاتين ، وبعض السيتوكينات [93] .

4 العلاج المناعي Immunotherapy

يعتمد العلاج المناعي على تعزيز التعرف المناعي على مستضدات الورم من خلال ارتباطها بجزيئات مثل السيتوكينات [94] .

السيتوكينات التي تم تقييمها في العلاج المناعي للسرطان هي IL-1، 2، 4، و 12 ، INFa ، ، ، GMCSF و TNF [95] .

نظراً لأن العلاج بالسيتوكينات لا يمكن تطبيقه لفترات طويلة على المرضى بسبب آثاره الجانبية السامة ،لذلك يعد استخدام جينات السيتوكينات في العلاج الجيني للسرطان نهجاً جديداً في العلاج الجيني [95] .

5 . استخدام الفيروسات الحالة للأورام Use of oncolytic viruses

فيروسات الأورام غير مصممة لنقل الجينات إلى الخلايا السرطانية المستهدفة، وانما لاستئصال هذه الخلايا بعد الإصابة.

العديد من الفيروسات الحالة للأورام، التي تخضع حالياً لتـ ارب سريرية، تشمل الفيروس الغدي الطافرmutant adenovirus ،والفيروسات التنفسية المعوية بشرية سلالة الثالثة the human reovirus (strain type 3 Dearing) ،فيروس التهاب الفم الحويصلي(VSV) [96] .

يحتوي الفيروس الغـ ي الطافر على طفرة عديمة المعنى و ـد فرة الحذف التي من المعروف أنها مرتبطة بالمعاملات من النوع البري p53 ومنع نشاط النسخ الخاص به [97] .

وبالتالي، لا يمكن لهذا الفيروس أن يتكاثر إلا في الخلايا p53 الطافر،حيث يُسمح بالدخول إلى المرحلة S . ومع ذلك، فإن الخلايا الطبيعية ليست في خطر نظراً لأن لديها p53 طبيعي يمكن أن يؤدي إلى توقف نمو الخلايا أو موت الخلايا المبرمج عند الإصابة بالفيروس[98] .

استهداف الريبوزيم / مضاد المعنى Ribozyme/antisense targeting

الهدف الرئيسي لهذا النوع من الاستراتيجيات العلاجية هو مستوى التعبير الحمض النووي DNA ، وتقليل من توفر الرنا المرسال mRNA لعملية الترجمة.

استهداف الريبوزيم شق mRNA المختار) [99] والاستراتيجيات المضادة للنسخ (التدخل في النسخ) هي مفاهيم جديدة لتطبيقات العلاج الجيني ، وخاصة فيما يتعلق بتثبيط الجينات المسرطنة، قدرتهم على هندسة استهداف تسلسلات محددة يجعلها جذابة للغاية ا علاج الجيني للسرطان [100] .

3 جيني BRCA1 وBRCA2

إن التعرف على الجينات المسئولة عن السرطانات الوراثية أمر مهم حيث تبث ان هذه الجينات تلعب دورا حيويا في مجموعة متنوعا من السرطان.[101]

تم التعرف علي الجينات المسببة لسرطان الثدي العائلي وأشار إليه ب BRCA1 من قبل ميكي و آخرون في عام 1994 [20] وقد ثم تحديد ارتباط الجينات BRCA1 و BRCA2 الكابحه للورم بسرطان الثدي العائلي حيث قام هال و اخرين بإجراء تحاليل ترابطية للأنساب التي تظهر نسبة عالية من سرطان الثدي العائلي [18] .

وتساهم BRCA1 و BRCA2 في 6-10% فقط في الإصابة بسرطان الثدي و المبيض في حين 30% من العائلات الحاملة لهذه الطفرات لا تظهر خطر الإصابة ، و هذا راجع لحقيقة انه قد تكون هناك جينات اخرى تلعب دور في الاستعداد للإصابة بسرطان الثدي [20،102] .

1.3 تركيب جينات BRCA1 و BRCA2 Structure of BRCA1 and BRCA2 genes

على الرغم من ان التسلسل هذه الجينات غير متشابه الا ان العديد من الملامح الوظيفية تكون متشابه حيث اول جين تم اكتشافه من جينات الحساسية لسرطان الثدي هو الجين BRCA1 يوجد على الذراع الطويلة لكرموسوم17. على المقطع 21 [19،20] الذي يشفر لبروتين يتكون من 1863 حامض اميني [20] ،ويتكون من 24 اكسون ويتضمن اكسون كبير جدا وهو اكسون 11 [20] .

و تم تحديد الجين BRCA2 يوجد على الذراع الطويلة لكرموسوم 13 المقطع32 [20] الذي يشفر لبروتين يتكون من 3418 حامض اميني وهو اكبر بكثير من الجينBRCA1 [103] . والخلل في تركيب الشفرة الوراثية لهذين الجينين تسبب الإصابة بسرطان الثدي بنسبة 20-60%[27] .

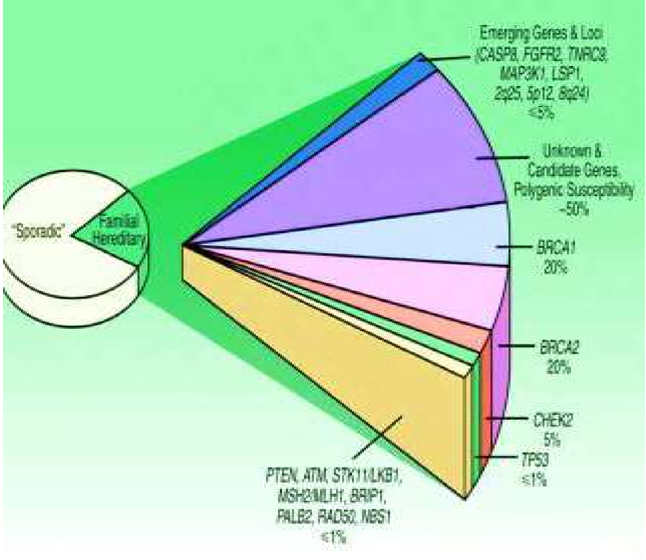
وحدوث الخلل في تركيب الشفرة الوراثية لجين BRCA1 يكون مسئول عن 50% من سرطان الثدي الوراثي ، و العائلات الحاملة لهذه الطفرة تكون عرضة للإصابة بسرطان الثدي و المبيض، و أنواع الطفرات التي تمت رؤيتها في جين BRCA1 تشمل الأنقلاب الحذف ، الأدراج وطفرات صامته[104] .

2.3 التأثير الطافر للجينات المسببة لسرطان الثدي The effect of the mutant genes that cause breast cancer

BRCA1 و BRCA2: دور الجينات BRCA1 و BRCA2 في الخلايا الطبيعية منع النمو الغير طبيعي للخلايا و هي جينات عالية النفاذية [105] ، الأورام التي تنشأ من BRCA1/2 الطافرة تفتقر للتعبير الجيني الطبيعي للجين BRCA و هذا يدفع لعدم الاستقرار و الذي بدوره يحفز تطور السرطان تحمل BRCA1 وBRCA2 تكرارا عاليا من طفراتP53 [106،107] . يتم تنظيم تعبير الجين BRCA1 بواسطةP53[108] ،و يتم تنظيم مستويات BRCA1 استجابة ل P53 المستحث من قبل حدوث تلف بالحمض النووي في الخلايا التي تمر بتوقف النمو أو الموت المبرمج[109] .

تؤدي الطفرة في BRCA1 الى زيادة نسبة الخطر بنسبة80% كما ان الطفرة في BRCA2 تزيد من خطر الإصابة بنسبة 45% يحدث سرطان الثدي المرتبط بهذه الطفرة في كثيرا من الأحيان بين النساء الأصغر سنا [39] . والجيناتSTK11 ،CDH1 ، TP 53 هي جينات نادرة لكنها شديدة النفاذية التي تسبب جنبا لجنب مع جينات BRCA1 و BRCA2 مايقارب 25% من حالات سرطان الثدي الوراثي كما في الشكل(2) [110،111] ،و تزيد خطر الإصابة بسرطان الثدي في النساء الذين يرثن نسخ معيبة من جينات BRCA1 وBRCA2 فعند وجود طفرة في BRCA1 تظهر

الأفراد استعدادا للإصابة بسرطان المبيض في حين وجود طفرة في BRCA2 الأفراد استعداد للإصابة بسرطان البروستاتا (19،20) كما يرتبط هذين الجينين بشكل أساسي بالمرحلة المبكرة لسرطان الثدي (19) ، و وجد إن الجين الطافر BRCA2 يساهم ايضا في حدوث بعض الأورام البنكرياسية (21،22) .



شكل 2 يوضح الجينات المشاركة في سرطان الثدي(130)

البروتين P53 : يدعى tumor protein البروتين الكابح للورم ويقوم بعملية تنظيم انقسام الخلايا بشكل طبيعي عن طريق منع انقسام الخلايا بسرعة كبيرة وغير متحكم فيها يوجد هذا البروتين داخل النواة ويرتبط بشكل مباشر مع ال DNA ؛ في حال تعرض ال DNA للتلف لأسباب عدة فإن بروتين P53 يلعب دوراً مهما في إصلاحه فإنه يقوم بتنشيط بروتينات أخرى لتقوم بذلك، أما في حال أنه لا يمكن إصلاحه فإن بروتين P53 يمنع الخلايا من الانقسام وبالتالي يساعد على منع نمو الأورام.(13)

حدوث طفرات في هذا البروتين تؤدي إلى زيادة مخاطر الإصابة بسرطان الثدي العديد من هذه طفرات تقوم بتغير واحد من الأحماض الأمينية في البروتين P53 مما يؤدي إلى تراكم البروتين المعيب في الخلايا ولا يقوم بدوره الطبيعي في كبح الأورام (13).

طفرة HER2: تؤثر هذه الطفرة في التشفير المورثي لبروتين يعرف باسم مستقبل عامل النمو البشري عند الانسان (Human Epidermal growth factor Receptor 2) (HER2) يستجيب بروتين HER2 المتواجد على سطح خلايا الثدي لعوامل النمو الكيميائية التي توجه خلايا الثدي لتنقسم بشكل صحيح يتلقى البروتين HER2 هذه العوامل وينقل التعليمات إلى داخل الخلية . فإذا كان الحمض النووي المشفر لمورثة HER2 تالفاً، فقد تزداد سرعة نشاطه لتصل إلى مستويات خطيرة فينتج الكثير جداً من البروتين HER2 ؛ ونتيجة لذلك تسبب نمو خلايا الثدي دون سيطرة (13) .

3.3 طفرات BRCA1 و BRCA2 BRCA1 and BRCA2 mutations

من حالات سرطان الثدي تنشأ في 10%إلى5%إن ما يقدر بـ BRCA2 و BRCA1الأفراد الذين يرثون طفرة في جينات من BRCA2 وBRCA1(114،115). وتعتبر كل من جينات الجينات الكابتة للورم (116) ،تنتشر الطفرة في في داخل الجين BRCA1 طفرة مختلفة في جين600بأكمله و تم تحديد أكثر من ،معظم الطفرات المسببة للأمراض، BRCA2 طفرة في450و ينتج عنها بروتين مقطوع بسبب تحول الإطار ، وطفرات عديمة المعنى ، تحدث طفرات عديمة المعنى عندما ينتج استبدال)ويتم إنهاء TAG أو TAA، TGAالنوكليوتيدات كودون وقف (ترجمة البروتين في هذه المرحلة و تحدث الطفرات تحول الإطار عندما يتم إدراج واحد أو أكثر من النيوكليوتيدات أو حذفها مما يؤدي إلى فقدان أو عدم وجود بروتين وظيفي لصق موقع الطفرة تسبب إدراج غير طبيعي أو استبعاد الحمض النووي في تسلسل الترميز، مما أدى إلى بروتين غير طبيعي ؛ نوع آخر من الطفرات الناتجة عن إجراء تبديل انوكليوتيد واحد هو الطفرات عديمة المعنى التي تؤدي لاستبدال او تغيير حمض أميني واحد ولكن لا يؤثر على بقية ترجمة بروتين،(117،118)النساء الحملات لطفرة لديهم مخاطر عالية تتراوح بين BRCA2 و / أو BRCA1في 65% إلى 15% من الإصابة بسرطان الثدي و 85% و 50% سنة ، و قد 25خطر الإصابة بسرطان المبيض ،ابتداء من سن أيضًا إلى زيادة خطر إصابة النساء BRCA1تؤدي الطفرة بسرطان آخر (سرطان عنق الرحم و الرحم و البنكرياس و بسرطان الثدي BRCAالقولون)،(119،120) ترتبط طفرات والمبيض بنسبة أعلى من أنواع السرطان الأخرى ،لأن نمو نسجة الثدي والمبيض متحكم فيها هرمونيا (121،122).

تزيد طفرات BRCA2 لى خطر إصابة المرأة بسرطان البنكرياس، وسرطان المعدة و سرطان الجلد (23) . الرجال الذين يعانون من طفرات BRCA 1/2 لديهم خطر الاصابة بسرطان الثدي ، و سرطان البنكرياس ،و الخصية و سرطان البروستاتا (20) ، اثنين من أكثر الطفرات شيوعا في BRCA1 هي 185delAG و 5382ins C (24) ، والتي تمثل حوالي 10% من جميع الطفرات التي شهدتها BRCA1 (125،126) .

يختلف انتشار الطفرات BRCA1 و BRCA2 في مختلف السكان بسبب تأثيرات المؤسس والعوامل الجغرافية والبيئية الأخرى (127،128) . المناطق العرقية والجغرافية المختلفة لها طيف

انتشارمختلف من BRCA1 و BRCA2 ، ففي عائلة من ليبيا ، تم العثور على طفرة 100delAT في BRCA1 و 8765delAG في BRCA2 [29] .

يتم إجراء العديد من الدراسات لتحليل وتحديد طفرة BRCA1/2 باستخدام أدوات جزيئية مختلفة بما في ذلك تهجين قليل النوكليوتيد الخاص بالأليل ، اختبار اقتطاع البروتين PTT و تسلسل الحمض النووي من بين هذه الدراسات تم تحديد العديد من طفرات مؤسس في BRCA1 / 2 [24] .

4 الاختبارات الجينية Genetic testing

يتم تجميع عينات الدم من النساء المصابات بسرطان الثدي و أقربائهم الأصحاء و التي تتراوح اعمارهم ن 26- 70 عاما حيث يكون حجم العينة المسحوبة تتراوح من من 3 – 5 مل و تجمع في انابيب مانعه للتجلط (EDTA ، ويتم عزل DNA منها،وبعد ذلك يتم عمل الفحص الجيني بوسطة تقنية تفاعل البوليميريز المتسلسل (AS-PCR) للطفرات الشائعة في (BRCA1/2) ،او باستخدام تقنية تفاعل البوليميريز المتسلسل لفصل الطفرات المتعددة (MS-PCR) [31] أو كروماتوغرافيا السوائل عالية الأداء (DHPLC) ، DNA sequencing ، تسلسل الجيل القادم Next generation DNA sequencing .

4. - تقنية تسلسل الجيل القادم The next generation sequencing technology

الطريقة التقليدية لتسلسل الجينات هي طريقة الإنهاء المزدوج طريقة سانجر Sanger ،طريقة التحلل الكيميائي لجلبرت وماكسام ،من اهم التقنيات للكشف عن الجينات.

ومع ذلك ، فإن طريقة التسلسل سانجر Sanger بها العديد من العيوب منها التكلفة العالية ، والإنتاجية المنخفضة ، والا حراف عن الهدف [32] .

تقنية تسلسل الجيل القادم هي تقنية عالية الإنتاجية بالمقارنة مع طريقة تسلسل سانجر Sanger التقليدية ، تتميز تقنية تقنية تسلسل الجيل القادم بمزايا السرعة العالية والإنتاجية العالية والدقة العالية [33] .

على سبيل المثال ، تمتلك تقنية تسلسل الجيل القادم حساسية عالية في تشخيص التسلسل. أكد D'Argenio Valeria et al. في مقالته أن استخدام تقنية تسلسل الجيل القادم في اكتشاف جينات طفرة BRCA1 / 2 أكثر حساسية من طريقة تسلسل Sanger التقليدية ، وستحل محل الطريقة التقليدية في دراسة هذا الجين [34- 35] .

تطبيق تقنية تسلسل الجيل القادم في أبحاث سرطان الثدي

استخدم عدد كبير من الباحثين تقنية تسلسل الجيل القادم لتفسير تنوع جينوم سرطان الثدي ،حيث يتم استخدام تقنية تسلسل الجيل القادم في أبحاث سرطان الثدي بشكل أساسي في الجوانب الثلاثة التالية:

- **تحليل تسلسل الجينوم** DNA **(بما في ذلك تسلسل الجينوم الكامل ، وتسلسل اكسون ، واستهداف التسلسل الجيني) ،**
- **تسلسل مجموعة نسخ الحمض النووي الريبي**RNA **(بما في ذلك تحليل النسخ بالكامل** whole transcriptome analysis ، **تحليل الحمض النووي الريبي غير المشفر**noncoding RNA **) ،**
- **التسلسل اللاجيني (بما في ذلك تسلسل الترسيب المناعي للكروماتين** chromatin immunoprecipitation sequencing ، **تسلسل تحليل الميثلة** methylation analysis sequencing **)** [36] .

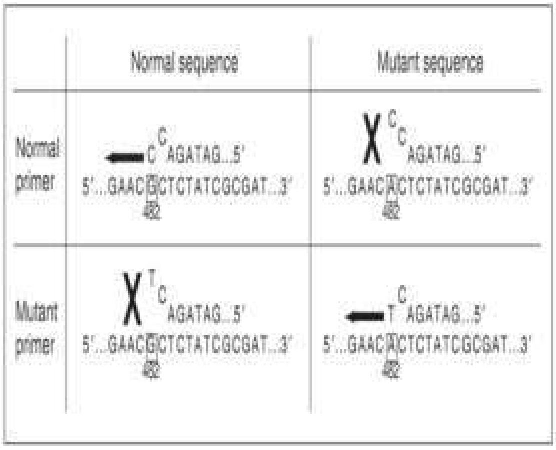
2.4 نظام تضخيم الطفرة (ARMS) – Amplification – refractory mutation system :

واحدة من أبسط الطرق وأقلها تكلفة للكشف عن الطفرات النقطية في الحمض النووي هي تفاعل البلمرة المتسلسل محددة الأليل ASA – PCR [37] .

في هذه التقنية، يتم استخدام ثلاثة بادئات لتضخيم جزء من جين حيوي وتحديد في الوقت نفسه تغيير في تسلسل الحمض النووي. واحدة من بادئ العكسي مكملة للأليل نوع البرية والثانية للأليل الطافر. البادئ الأمامي هو نفسه لكل من الأليلات[38] . يكون الفرق بين البادئات العكسيّة في نهاية 3 ، حيث يقع تعدد أشكال النوكليوتيدات الحرجة (SNP) أو الطفرة. نظراً للظروف الفريدة للتفاعل ، فإن تضخيم الألائل البرية والأليل المتحولة يكون ممكناً فقط بين البادئات المعكوسة والموجهة للأمام. من أجل الوصول إلى مثل هذا التقارب المرتفع لكل من البادئات العكسية ، يجب أن تكون شروط التفاعل محددة بدقة ومقيدة بها. لأن أحد البادئات العكسية مكملاً لتسلسل DNA حوالي 20 نيوكليوتيدات في المنبع وينتج منتجاً أطول ، فإن الفرق في أطوال منتجات PCR ، المرئي على هلام agarose ، يسمح بالتمييز بين الأليلات المتحولة والبرية. الفرقة ل homozygotes واثنين من الحزم ل heterozygotes موجودة [38] .

يعتمد أسلوب ARMS على استخدام متسلسلات محددة من تفاعل البلمرة التسلسلي (PCR) تسمح بتضخيم الحمض النووي المستهدف فقط عند احتواء الأليل المستهدف داخل العينة ولن يقوم بتضخيم الأليل غير المستهدف. بعد رد فعل ARMS ، فإن وجود

أو عدم وجود منتج PCR هو تشخيص لوجود الأليل أو غياب الهدف. ويستند هذا الأسلوب ARMS على ملاحظة أن ligonucleotides، (النيكلوتيدات المفردة) التي هي لتعطى سلسلة مكملة لسلسلة DNA باستثناء نهاية 3 لا تكون متطابقة لن تعمل كبادئ PCR في ظل ظروف مناسبة. ويرد مثال في الشكل 2 أدنا .(39)



شكل 3 يوضح امثلة للبادئات المستخدمة في ARMS

في الشكل أعلاه ، بالنسبة إلى البادئ النوعي الطافر (A) ،يجب أن تكون القاعدة الطرفية الثلاثة للقاعدة البادئ لـــ ARMS مكملة للطفرة ، من أجل البادئ المحدد الطبيعي (أ) ، يجب أن تكون القاعدة الطرفية الثلاثة مكملة للتسلسل الطبيعي المناظر و يشار للقاعدة التي يتم تبديلها في تسلسل الحمض النووي الطبيعي والطافر بالمربع ، يشير وجود سهم إلى أن تركيبة البادئ / التسلسل الهدف يمكن تمديده بواسطة بوليميراز DNA Taq يشير X إلى عدم الامتداد التسلسل . يتم إظهار القواعد في البادئ ARMS غير المكمل للهدف النازحين من التسلسل الهدف ، إن عدم التطابق الفردي (في هذه الحالة C / C) عند الطرف 3 " ليس كافيًا لمنع التمديد في حين أن عدم تطابق البادئ مع منطقة التسلسل يمنع الامتداد.

في دراسة في فلسطين، تم تصميم ثلاثة بادئات (واحد مشترك ، واحد محدد للطفرة ، وواحد محدد للأليل من النوع البري) الواردة في الجدول (3) لكل طفرة. اختلفت البرايمرات الطافرة والبرية من الحجم 20 bp ، لذا اختلف حجم الطافرة المتضخمة و النوع الطبيعي في 20bp .

3.4 طريقة سلسلة تفاعل إنزيم متعدد البلمرة مفصولة الطفرات MS-PCR

Multiplex Mutagenically Separated PCR method (MS-PCR)

تستخدم طريقة تفاعل إنزيم متعدد البلمرة متعدد الطفرات MS-PCR)) للكشف عن الطفرات في الجينات في وقت واحد(40) .

إن MS-PCR هو تقنية تعتمد على تقنية PCR أحادية الا بوب ، وذلك باستخدام بادئات خاصة بالأليل تختلف في الطول بمقدار 5 –10 bp . يؤدي عدم التطابق الأساسي في المواد الأولية الخاصة بالأليل إلى وجود اختلافات متعمدة في منتجات PCR الأليلية التي تقلل من التفاعلات المتبادلة لمنتجات PCR في الدورات اللاحقة. الأليلات يمكن تمييز بسهولة من قبل الترحيل الكهربائي على مواد الجل (هلام الأجاروز) ذات الدقة العاليا(10) .

بشكل عام ، تم تصميم ثلاثة بادئات للطفرة (واحد مشترك ، واحد محدد للطفرة ، وواحد محدد للأليل من النوع البري). تم تصميم الطافرة المتنافسة والبادئ من النوع البري لتختلف بنحو 20bp في الحجم ، من أجل السماح بالكشف السهل عن منتجات PCR عن طريق الترحيل الكهربائي الروتيني والإشعة فوق البنفسجية بعد صبغها بصبغة الإيثيديوم بروميد ؛ تم تصميم تسلسلات البادئات كما هو موضح في الجدول (2).

جدول 2 يوضح تسلسل البادئات و حجم التضخيم في BRCA1 و BRCA2

Primer name	Sequence of the Primers	Size(bp)
BRCA1 185delAG		
CommonForward(P1)	5’GGTTGGCAGCAATATGTGAA3’	
WildType reverse (P2)	5’GCTGACTTACCAGATGGGACTCTC3’	335
Mutant Reverse (P3)	5’CCCAAATTAATACACTCTTGTCGTGACTTACCAGATGGGACAGTA3	354
BRCA1 5382insC		
Common Reverse (P4)	5’GACGGGAATCCAAATTACACAG3’	
Wild Type Forward (P5)	5’AAAGCGAGCAAGAGAATCGCA3’	271
Mutant Forward (P6)	5’AATCGAAGAAACCACCAAAGTCCTTAGCGAGCAAGAGAATCACC3’	295
BRCA2 6174delT		
Common Revers(P7)	5’AGCTGGTCTGAATGTTCGTTACT3’	
Wild Type Forward (P8)	5’GTGGGATTTTTAGCACAGCTAGT3’	151
Mutant Forward (P9)	5’CAGTCTCATCTGCAAATACTTCAGGGATTTTTAGCACAGCATGG3’	171

الحجم النهائي المستخدم لاختبارµL 25 PCR حيث تم تضخيم 25ng من genomic DNA ، مع X1 مزيج PCR (20 ملي Tris-HCl ،pH=8.3 50 ملي مولارKCl ، 1.5 ملي مولاري MgCl2 ، 0.3 mN dNTPs و2 Taq DNA polymerase U) و 2 ميكرومتر ل P1 و P3 ، 0.4 ميكرومتر ل P2 ، 0.12

ميكرومتر ل P4 ، P5 و P6 ، 0.3 ميكرومتر ل P7 و P9 ، و 0.24 ميكرومتر للبادئات P8 .

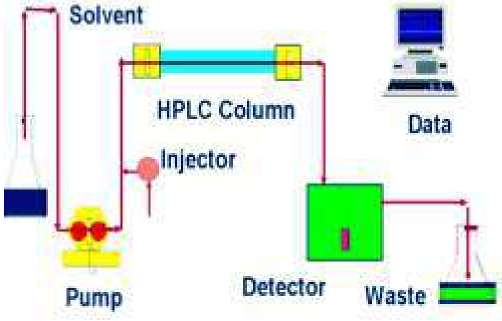
تم تسخين مخاليط التفاعل عند 94 درجة مئوية لمدة 5 دقائق متبوعة بـــ 35 دورة من التضخيم ، كل منها يتكون من 40 ثانية من تمسخ عند 94 C 0 ، 40 ثانية ، من التلدين عند 55 درجة مئوية ، و 60 ثانية للتمديد عند 72 درجة مئوية ، متبوعة بالنهاية تمديد لمدة 5 دقائق في 72 درجة مئوية تم حل المنتجات عن طريق الرحلان الكهربائي في هلام 3 agarose ٪ ، تصور باستخدام نظام توثيق هلام وتحليل بصريا لوجود أو عدم وجود نطاقات محددة.

4.4 كروماتوغرافيا السوائل عالية الأداء (HPLC)

High performance liquid chromatography

الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء هي الآن واحدة من أقوى الأدوات في الكيمياء التحليلية. لديه القدرة على فصل ، وتحديد المركبات الموجودة في أي عينة يمكن حلها في سائل.

ويستند فصل العينة إلى الاختلافات في معدلات الهجرة عبر العمود الناتج عن التقسيم المختلف للعينة بين الطور الثابت والمتحرك. اعتمادا على سلوك التقسيم للمكونات المختلفة (الشكل4) [141] ،وهي من الطرق التحليلية الأكثر دقة المستخدمة على نطاق واسع للتحليل الكمي والنوعي[142] .



شكل 4 يوضح مخطط تدفق DHPLC [143]

تم تطوير العديد من الطرق لفحص الحمض النووي من أجل تعدد الأشكال الطفرات ، وقد تم استعراض تقنية الكروماتوجرافيا السائل عالي الأداء DHPLC في عدد من الحالات [144،145] ،فهي تعتبر إضافة جديدة بالنسبة إلى طرق فحص الحمض النووي (DNA) و الدنترة بطريقة الكروماتوجرافيا السائل عالي الأداء DHPLC[146،147] .

أظهرت HPLC بإنها وسيلة فعالة لفصل النيكولوتيدات المفردة oligonucleotides ، و شظايا PCR[148] ،ولتحليل المنتجات المتكونة في تفاعلات RT-PCR لتحديد المستويات النسبية للتعبير الجيني[149] . وتشمل المزايا الرئيسية لهذه الطريقة استخدام الأجهزة الآلية وسرعة التحليل (~ 5 دقائق لكل عينة)و الدقة العالية وحجم جزء الحمض النووي الذي يمكن تحديد (1.5 كيلو بايت)[150] .

مبدأ HPLC

يتم حقن محلول العينة في عمود من المواد المسامية (المرحلة الثابتة) ويتم ضخ المرحلة السائلة (المرحلة المتنقلة) عند ضغط أعلى من خلال العمود و ايضا مبدأ الانفصال امتزاز المذاب في المرحلة الثابتة بناء على تقاربه نحو الطور الثابت[151] .

الية العمل و المواد المستخدمة

يتم عزل DNA ثم تجميده عن طريق الغمر في النيتروجين السائل [150] .

و حجم العينات التي يتم استخدامها للكشف عن الطفــرات و تحليل التسلسل 50 ملي تحتوي على10-00 نانوغرام من الحمض النووي الجيني و 20 pmol من البادئات الأمامية والعكسيّة و dNTPs من200 mM و 1.25 U من Taq polymerase و X من Buffer (حسب الشركة المستخدمة) [152] .

ويتم مضاعفة PCR لمدة 35 دورة : 95 درجة مئوية لمدة 30 ثانية ، 60 درجة مئوية لمدة 30 ثانيه ، و 72 درجة مئوية لمدة 1 دقيقة (التمديد النهائي في 72 درجة مئوية لمدة 10 دقيقة) بعد تمسخ عينة في 95 درجة مئوية لمدة 9 دقائق. يتم تأكيد منتجات تفاعل PCR بواسطة الترحيل الكهربائي على هلام الاجاروز.

تغيير طبيعة تحليل HPLC

تم إجراء تحليل DHPLC باستخدام أجهزة آلية مماثلة لتلك التي وصفهاUnderhill. [123] حيث يتم استخدام 4 إلى 7 ملي من كل منتج PCR ، تحتوي على 50 – 100 نانوغرام من الحمض النووي ، تم دنترته لمدة 3 دقائق عند 95 درجة مئوية ، ثم يعاد تدويره تدريجيا من خلال خفض درجة حرارة العينة من 95 إلى 65 درجة مئوية على مدى 30 دقيقة ثم يتم فصل منتجات PCR (معدل تدفق 0.9 مل / دقيقة) على مدى فترة زمنية ومن خلال تدرج خطي أسيتونتريل acetonitrile ، ويتم تحديد القيم الخاصة به من خلال الحجم ومحتوى G-G من الأمبليكون(الجين المضعف)[153] .

تتكون المرحلة المتنقلة للعمود من خليط من 0.1 م خلات ثلاثي إيثيل أمين (pH 7.0) مع (Buffer A) أو بدون (Buffer B) 25 ٪ acetonitrile درجات حرارة الطور المتحرك مطلوبة من أجل الدقة المثلى للـــمتماثل homoduplex DNA و المتغاير heteroduplex DNA يتم تحديدها تجريبيا عن طريق حقن منتج PCR واحد لكل اكسون في درجات حرارة متزايدة حتى لوحظ انخفاض كبير في وقت الاحتفاظ العينة[153] .

[14]- DGHS & MOH & FW (2012) Health Bulletin, Dhaka: DGHS, MOH&FW.

[15]- Kumar GL, Badve SS (2008) Milestone in the discovery of HER2 Proto-Oncogene and Trastuzumab (HerceptinTM)Connection 9.14.

[16]- Ross JS, Slodkowska EA, Symmans WF, Pusztai L, Ravdin PM, et al. (2009) The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. Oncologist 14: 320-368.

[17]- Dooley WC, Ljung BM, Veronesi U, Cazzaniga M, Elledge RM, O'Shaughnessy JA, et al. (2001). Ductal lavage for detection of cellular atypia in women at high risk for breast cancer. Journal of the National Cancer Institute 93(21): 1624-1632.

[18]- Hall, J.M., Lee, M.K., Newman, B., Morrow, J.E., Anderson, L.A., Huey, B. and King, M.C.:Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. Science 1990.

[19]- Wooster, R., Bignell, G., Lancaster, J. et al.:Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. Nature 1995.43

[20]- Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-Eidens, D.,Futreal, P.A., Harshman, K., Tavtigian, S., Liu,Q., Cochran, C., Bennett, L.M., Ding, W. et al.:A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. Science 1994.

[21]- Goggins, M., Schutte, M., Lu, J., Moskaluk, C. A., Weinstein, C. L., Petersen, G. M., Yeo, C. J., Jackson, C. E., Lynch, H. T., Hruban, R. H., and Kern, S. E. Germline BRCA2 gene mutations in patients with apparently sporadic pancreatic carcinomas Cancer Res., 56: 5360–5364, 1996.

[22]- Thorlacius, S., Olafsdottir, G., Tryggvadottir, L., Neuhausen, S., Jonasson, J. G., Tavtigian, S. V., Tulinius, H., Ogmundsdottir, H. M., and Eyfjord, J. E. A single BRCA2 mutation in male and female breast cancer families from Iceland with varied cancer phenotypes. Nat. Genet., 13: 117–119, 1996.

[23]- Scully, R., Chen, J., Plug, A., Xiao, Y., Weaver, D., Feunteun, J., Ashley, T., and Livingston, D. M. Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells. Cell, 88: 265–275, 1997.

[24]- Wong, A. K. C., Pero, R., Ormonde, P. A., Tavtigian, S. V., and Bartel, P. L. RAD51 interacts with the evolutionarily conserved BRC motifs in the human breast cancer susceptibility gene brca2. J. Biol. Chem., 272: 31941–31944, 1997.

[25]- Rahman N, Stratton MR. The genetics of breast cancer susceptibility. Annu Rev Genet. 1998;32:95-121.

[26]- Easton, D. F. (1999). How many more breast cancer predisposition genes are there Breast Cancer Res. 1, 14-17

[27]- Nathanson, K. N., Wooster, R. and Weber, B. L. (2001). Breast cancer genetics: what we know and what we need. Nat. Med. 7, 552-556.

[28]- Zanetti R, Tazi MA, Rosso S. New data tells us more about cancer incidence in NorthAfrica. Eur J Cancer 2010; 46(3): 462-6

[29]- Al sarbot Amal ,Marwan Mahomed ,Ereebe nor eldeen (2011) Mutations of BRCA1 Gene

المراجع

[1]- Harris J, Lippman M, Veronesi U, et al. Breast Cancer (3 parts). N Engl J Med. 1992:327:319–479.

[2]- Costanza ME. Epidemiology and risk factors for breast cancer. In: UpToDate. 2001:9:2–3.

[3]- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, et al. (2011) Global cancer statistics. CA Cancer J Clin 61: 69-90.

[4]- Antoniou, A., P.D. Pharoah, H.A. Risch, J.E. Eyfjord and J.L. Hopper et al., 2003. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case series unselected for family history: A combined analysis of 22 studies. Am. J. Hum. Genet., 72: 1117-1130. DOI: 10.1086/375033

[5]- Butcher, D.T., D.N. Mancini-DiNardo, T.K. Archer and D.I. Rodenhiser, 2004. D.N.A. binding, sites for putative methylation boundaries in the unmethylated region of the BRCA1 promoter, Int. J. Cancer, 111: 669-678. DOI: 10.1002/ijc.20324.

[6]- Wijdan, A., 2009. Screening of breast mass in iraqi females: al-kindy hospital breast clinic. Am. J. Inf Dis., 5: 320-323. DOI: 10.3844/ajidsp.2009.320.323.

[7]- Pickl, M. and C.H. Ries, 2009. Comparison of 3D and 2D tumor models reveals enhanced HER2 activation in 3D associated with an increased response to trastuzumab trastuzumabActivation of HER2 in 3D. Oncogene, 28: 461-468. DOI: 10.1038/onc.2008.394.38

[8]- Diermeier-Daucher, S., M. Hasmann and G. Brockhoff, 2008. Flow cytometric FRET analysis of erbB receptor interaction on a cell-by-cell basis. Ann. N Y. Acad Sci., 1130: 280-286. DOI: 10.1196/annals.1430.003

[9]- Hollmen, M., J.A. Maatta, L. Bald, M.X. Sliwkowski and K. Elenius, 2009. Suppression of breast cancer cell growth by a monoclonal antibodytargeting cleavable ErbB4 isoforms. Oncogene, 28: 1309-1319. PMID: 19151766

[10]- Tovey, S.M., B. Dunne, C.J. Witton, T.G. Cooke and J.M. Bartlett, 2006. HER4 in breast cancer: comparison of antibodies against intra- and extracellular domains of HER4. Breast Cancer Res., 8: 1-8. DOI: 10.1186/bcr1394

[11]- Mufti, M.M.R., M.P. Mostari, G.K. Deb, K. Nahar and K.S. Huque, 2009. Genetic diversity of red chittagong cattle using randomly amplified polymorphic DNA markers. Am. J. Animal Vet. Sci., 4: 1-5. DOI: 10.3844/ajavsp.2009.1.5.37

[12]- Jones, F.E., 2008. HER4 Intracellular Domain (4ICD) Activity in the Developing Mammary Gland and Breast Cancer. J. Mammary Gland Biol. Neoplasia, 13: 247-258. DOI: 10.1007/s10911-008-9076-6.

[13]- Naresh, A., W. Long, G.A. Vidal, W.C. Wimley and L. Marrero et al., 2006. The ERBB4/HER4 intracellular domain 4ICD is a BH3-only protein promoting apoptosis of breast cancer cells. Cancer Res., 66: 6412-6420. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2368.

iarc.fr/Default.aspx. [Last accessed on 2018 Feb 20].
[44]- Elzouki AN, Alkomsi S. Pattern of gastrointestinal tract cancer in the Eastern part of Libya. Garyounis Med J 2005;22:27-31.
[45]- El-Mistiri M, El-Mangush M, El-Sahli N, El-Hamri F, Habil S, Bugrara F, et al. Cancer incidence in Eastern Libya: Preliminary result of the year 2003. Tunis Med 2005;83 Suppl 12:18-9.
[46]- El Mistiri M, Pirani M, El Sahli N, El Mangoush M, Attia A, Shembesh R, et al. Cancer profile in Eastern Libya: Incidence and mortality in the year 2004. Ann Oncol 2010;21:1924-6.
[47]- Elzouki AN, Buhjab SI, Alkialani A, Habel S, Sasco AJ. Gastric cancer and Helicobacter pylori infection in the Eastern Libya: A descriptive epidemiological study. Arab J Gastroenterol 2012;13:85-8.
[48]- El Mistiri M, Verdecchia A, Rashid I, El Sahli N, El Mangush M, Federico M, et al. Cancer incidence in Eastern Libya: The first report from the Benghazi cancer registry, 2003. Int J Cancer 2007;120:392-7.
[49]- Martin LJ, Melnichouk O, Guo H, Chiarelli AM, Hislop TG, Yaffe MJ, et al., 2010. Family history, mammographic density, and risk of breast cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev; 19(2):456-63.
[50]- Tazzite A, Jouhadi H, Saiss K, Benider A, Nadifi S, 2013. Relationship Between Family History of Breast Cancer and Clinicopathological Features in Moroccan Patients. Ethiopian Journal of Health Sciences; 23(2):150-157.
[51]- Chouchane, L., Boussen, H. & Sastry, K. S. R. 2013. Breast cancer in arab populations: Molecular characteristics and disease management implications. The Lancet Oncology, 14, e417-e424.
[52]- EL-HARITH, E. H. A., ABDEL-HADI, M. S., STEINMANN, D. & DORK, T. 2002. BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer patients from Saudi Arabia. Saudi Medical Journal, 23, 700-704.
[53]- Saslow D, Hannan J, Osuch J, Alciati MH, Baines C, Barton M, et al., 2004. Clinical breast examination: practical recommendations for optimizing performance and reporting. CA: a cancer journal for clinicians 54 (6): 327-344.
[54]- El Mistiri M, Pirani M, El Sahli N, El Mangoush M, Attia A, Shembesh R, et al. Cancer profile in Eastern Libya: Incidence and mortality in the year 2004. Ann Oncol 2010;21:1924-6.
[55]- Anderson I, Aspergren K, Janson L, et al. Mammographic screening and mortality from breast cancer: the Malmö mammographic screening trial. BMJ 1988; 297: 943-948.
[56]- Sydney: NHMRC National Breast Cancer Centre, 1999
[57]- Thomas DB, Gao DL, Ray RM, et al. Randomized trial of breast self-examination in Shanghai: final results. J Natl Cancer Inst 2002; 94: 1445-1457.
and Its Detection Among Libyan Women with Breast Cancer. Abstracts of postgraduate studies (Master-PhD) University of Tripoli .
[30]- Siegel R, Naishadham D, Jemal A (2012) Cancer statistics, 2012. CA Cancer J Clin 62: 10-29.
[31]- Thomson AK, Heyworth JS, Girschik J, Slevin T, Saunders C, et al. (2014) Beliefs and perceptions about the causes of breast cancer: a case-control study. BMC Res Notes 7: 558.
[32]- Wei L. (2007). Genetic Analysis of the BRCA1 and BRCA2 Genes in Breast Cancer of Hong Kong Chinese. Abstract of thesis for the degree of Doctor of Philosophy at the University of Hong Kong.
[33]- Acharya UR, Ng UE, Chang YH, Yang J, and Kaw GJ. Computer-based identification of breast cancer using digitized mammograms. J Med Syst. 2008;32(6):499-507.
[34]- Baltzer PA, Freiberg C, Beger S, Vag T, Dietzel M, Herzog AB, Gajda M, Camara O, and Kaiser WA. Clinical MR-mammography: are computer-assisted methods superior to visual or manual measurements for curve type analysis? a systematic approach. Acad Radiol. 2009;16(9):1070-6.
[35]- Baeten SA, Baltussen RM, Uyl-de Groot CA, Bridges J, and Niessen LW. Incorporating equity-efficiency interactions in cost-effectiveness analysis-three approaches applied to breast cancer control. Value Health. 2010;13(5):573-9.
[36]- PHIPPS, A. & LI, C. 2010. Breast Cancer Biology and Clinical Characteristics.In: LI, C. (ed.) Breast Cancer Epidemiology. Springer New York.
[37]- COMPTON, C., BYRD, D., GARCIA-AGUILAR, J., KURTZMAN, S.,OLAWAIYE, A. & WASHINGTON, M. 2012. Breast. In: COMPTON, C. C., BYRD, D. R., GARCIA-AGUILAR, J., KURTZMAN, S. H., OLAWAIYE, A. & WASHINGTON, M. K. (eds.) AJCC Cancer Staging Atlas. Springer New York.
[38]- FABBRI, A., CARCANGIU, M. & CARBONE, A. 2008. Histological Classification of Breast Cancer. In: BOMBARDIERI, E., GIANNI, L. & BONADONNA, G. (eds.) Breast Cancer. Springer Berlin Heidelberg.
[39]- American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2014. Atlanta: American Cancer Society; 2014.
[40]- Singh H, Nugent Z, Decker K, Demers A, Samadder J, Torabi M, et al.Geographic variation and factors associated with colorectal cancer incidence in Manitoba. Can J Public Health 2018;108:e558-64.
[41]- Sabour R, Fard ZT. The relationship of age and serum prostate-specific antigen with FAS 1377 G/A in prostate cancer. Libyan J Med Sci 2018;2:8-11.
[42]- Akhtar SS, Abu Bakr MA, Dawi SA, Huq IU. Cancer in Libya – A retrospective study (1981-1985). Afr J Med Med Sci 1993;22:17-24.
[43]- WHO-Globocan 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. Available from: http://www.globocan.

and GPNMB expression with CDX-011 (CR011-vcMMAE), an antibody-drug conjugate (ADC), in patients with advanced melanoma. Journal of Clinical Oncology (Meeting Abstracts) 28(15_suppl): 8525.
[73]- Rubanyi GM. The future of human gene therapy. Mol Aspects Med 22:113-42, 2001.
[74]- Zhao M, Ramaswamy B (2014) Mechanisms and therapeutic advances in the management of endocrine-resistant breast cancer. World J Clin Oncol 5: 248-262.
[75]- Kay MA, Glorioso JC, Naldini L. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. Nat Med 7:33-40, 2001
[76]- Robbins PD, Ghivizzani SC. Viral vectors for gene therapy. Pharmacol Ther 80:35-47, 1998.
[77]- Brown MD, Sch.tzlein AG, Uchegbu IF. Gene delivery with synthetic (non-viral) carriers. Int J Pharm 229:1-21, 2001.
[78]- Pouton CW, Seymour LW. Key issues in non-viral gene delivery. Adv Drug Deliv Rev 34:3-19, 1998.
[79]- Chen J, Reeves L, Cornetta K. Safety testing for replication-competent retrovirus associated with gibbon ape leukemia virus-pseudotyped retroviral vectors. Hum Gene Ther 12:61-70,2001
[80]- Kochanek S, Schiedner G, Volpers C. High-capacity ÔgutlessÕ adenoviral vectors. Curr Opin Mol Ther 3:454-63,2001.
[81]- Chen QR, Zhang L, Gasper W, Mixon AJ. Targeting tumor angiogenesis with gene therapy. Mol Genet Metab74:120-7, 2001
[82]- NPTEL – Bio Technology – Genetic Engineering & Applications Joint initiative of IITs and IISc – Funded by MHRD Page (1 of 69) ,MODULE 8- LECTURE 1 GENE THERAPY: INTRODUCTION AND METHODS, Joint initiative of IITs and IISc – Funded by MHRD
[83]- Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, Zhang HS, Gregory PD. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. Nat Rev Genet. 2010;11(9):636-646. doi:10.1038/nrg2842
[84]- Marais R, Spooner RA, Light Y, Martin J, Springer CJ. Gene-directed enzyme prodrug therapy with a mustard prodrug/carboxypeptidase G2 combination. Cancer Res. 1996;56:4735–4742. [PubMed] [Google Scholar]
[85]- Bridgewater JA, et al. Expression of the bacterial nitroreductase enzyme in mammalian cells renders them selectively sensitive to killing by the prodrug CB1954. Eur J Cancer. 1995;31A:2362–2370. [PubMed] [Google Scholar]
[86]- Huber BE, Richards CA, Austin EA. VDEPT: an enzyme/prodrug gene therapy approach for the treatment of metastatic colorectal cancer. Advanced Drug Delivery Reviews. 1995;17:279–292. [Google Scholar]
[87]- Huber BE, Austin EA, Richards CA, Davis ST, Good SS. Metabolism of 5-fluorocytidine to fluorouracil in human colorectal tumor cells transduced with the cytosine deaminase gene: significant antitumor effects when only a small percentage of tumor cells express cytosine
[58]- Semiglazov VF, Sagaidak VN, Moiseyenko VM, Mikhailov EA. Study of the role of breast cancer self-examination in the reduction of mortality from breast cancer.The Russian Federation/World Health Organization study. Eur J Cancer 1993;29A: 2039-2046.
[59]- Watson M, 2008. Assessment of suspected cancer. InnoAiT 1 (2): 94-107.
[60]- Tabar L, Gad A. Screening for breast cancer: the Swedish trial. Radiology 1981; 138: 219-222.
[61]- World Health Organization, International Agency for Research on Cancer. IARC handbooks of cancer prevention: breast cancer screening. Vol 7. Lyon: IARC Press, 2002.
[62]- Shah R, Rosso K, Nathanson SD (2014) Pathogenesis, prevention, diagnosis and treatment of breast cancer. World J Clin Oncol 5: 283-298.
[63]- Saini KS, Taylor C, Ramirez AJ, Palmieri C, Gunnarsson U, Schmoll HJ, et al., 2011. Role of the multidisciplinary team in breast cancer management: results from a large international survey involving 39 countries. Annals of Oncology 23 (4): 853-9
[64]- Sparano JA (2006) The TAILORx trial: individualized options for treatment. Community oncology 3: 494-496.
[65]- Nelson JC, Beitsch PD, Vicini FA, Quiet CA, Garcia D, Snider HC,et al., 2009. Four-year clinical update from the American Society of Breast Surgeons MammoSite brachytherapy trial. The American Journal of Surgery 198 (1): 83-91
[66]- Yashar CM, Blair S, Wallace A, Scanderbeg D, 2009. Initial clinical experience with the Strut-Adjusted Volume Implant brachytherapy applicator for accelerated partial breast irradiation. Brachytherapy 8 (4): 367-72.
[67]- Kelly K, Dean J, Comulada W, Lee S. Breast cancer detection using automated whole breast ultrasound and mammography in radiographically dense breasts. Eur Radiol. 2010;20:734–42.
[68]- Ahmed B. Awareness and practice of breast cancer and breast self examination among university students in Yemen. Asian Pac J Cancer Prev. 2010;11:101–6.
[69]- Cam O, Gvmvs A. Breast cancer screening behavior in Turkish women: relationships with health beliefs and self-esteem, body, perception and hopelessness. Asian Pac J Cancer Prev. 2009;10:49–56.
[70]- Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V. Bajamonde A, et al., 2001. Use of Chemotherapy plus a Monoclonal Antibody against HER2 for Metastatic Breast Cancer That Overexpresses HER2. New England Journal of Medicine 344 (11): 783-792.
[71]- Boughey J, Nguyen T. Axillary staging after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer: a pilot study combining sentinel lymph node biopsy with radioactive seed localization of pre-treatment positive axillary lymph bodes. Breast Dis YB Quart. 2016;27:282–4.
[72]- Hamid O,Sznol M,Pavlick AC,Kluger HM, Kim KB, Boasberg PD,et al., 2010. Frequent dosing

heterogeneous mutations in the neurofibromatosis type 1 (NF1) tumoursuppressor gene. Mutat. Res. 373, 185-195(1997)

[105]- Turnbull C, Rahman N (2008) Genetic predisposition to breast cancer: past, present, and future. Annu Rev Genomics Hum Genet 9: 321-345.

[106]- Crook, T. et al. p53 mutation with frequent novel condons but not a mutator phenotype in BRCA1- and BRCA2- associated breast tumours. Oncogene 17, 1681–1689 (1998).

[107]- Greenblatt, M. S., Chappuis, P. O., Bond, J. P., Hamel, N. & Foulkes, W. P. TP53 mutations in breast cancer associated with BRCA1 orBRCA2 germ-line mutations: Distinctive spectrum and structural distribution. Cancer Res. 61, 4092–4097 (2001).

[108]- Moynahan,M.E.:The cancer connection: BRCA1 and BRCA2 tumor suppression in mice and humans. Oncogene21, 8994-9007(2002).

[109]- Arizti,P., L.Fang,I. Park,Y. Yin,E. Solomon, T.Ouchi, S.A. Aaronson & S.W. Lee: Tumor suppressor p53 is required to modulate BRCA1 expression. Mol. Cell Biol.20, 7450-7459(2000).

[110]- van der Poel S, Jansen J, van der Rejiden B, Löwenberg B. Rapid simultaneous screening of factor V Leiden and G20210A prothrombin variant by multiplex polymerase chain reaction of whole blood. Blood1998;91:2208-2211

[111]- Wittersheim M, Büttner R, Markiefka B (2015) Genotype/Phenotype correlations in patients with hereditary breast cancer. Breast Care(Basel) 10: 22-26.

[112]- Anders CK, Johnson R, Litton J, Phillips M, Bleyer A (2009) Breast cancer before age 40 years. Semin Oncol 36: 237-249

[113]- American Cancer Society. (2013, October 24). How is breast cancer staged.

[114]- Claus ,E.B., Risch ,N.& Thompson ,W.D.(1991).Genetic analysis of breast cancer in the cancer and steroid hormone study. Am J Hum Genet,48,232-42.

[115]- Schubert,E.L.,Mefford ,H, C., Dann, J, L., Argonza,R.H.,Hull,j.&King,M. C. (1997).BRCA1 and BRCA2 mutation in Ashkenazi Jewsfamilies with breast and ovarian cancer . Genet Test, 1,41-6.

[116]- Reece, J,B., Urry, A.L.Cain, M.L., Wasserman, S.A., Minorsky,P.V.& Jackson ,R.B.(2011). Campbell biology book(9thEd.).Pearson Education.Inc.

[117]- Dulfoth,R.M.,Carvallo,S., Heinrich, J. K.,Shinato, J.Y., Dossantos,c.c. &Zeferino,L.C. (2005).Analysis of BRCA1 and BRCA2 mutation in Brarilian breast cancer patient with positive family history . soo paulo Med J, 123,192-197.

[118]- Pohlreich, P,Zikan, M., Stribrna, J., Kleib, Z., janatove, M .&Kotlas, J.(2005). Hihgh proportion of recurrent gremline mutations in area . breast cancer Research ,7,R728-R736.

[119]- Kadouri,L.,Hubert,A.,Rotenberg,Y.,Hamburger,T., et al.(2007).Cancer risker in carriers of the BRCA1/2 mutation in a hospital-based of

deaminase. Proc Natl Acad Sci USA. 1994;91:8302–8306. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]

[88]- https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC315452/figure/F1/

[89]- Bertram JS. The molecular biology of cancer. Mol Aspects Med 21:167-223, 2001.

[90]- Cheng EH, Pirollo KF, Bouker KB. Tp53 gene therapy: a key to modulating resistance to anticancer therapies? Mol Med Today 6:358-65, 2000.

[91]- . Wang TJ, Huang MS, Hong CY Tse V, Silverberg GD, Hsiao M. Comparison of tumor suppressor p53, p21, and p16 gene therapy effects on glioblastoma tumorigenicity in situ. Biochem Biophys Res Commun 287:173-80, 2001.

[92]- Schreiber M, Muller WJ, Singh G, Graham FL. Comparison of the effectiveness of adenovirus vectors expressing cyclin kinase inhibitors p16INK4A, p18INK4C, p19INK4D, p21WAF1/CIP1, and p27KIP1 in inducing cell cycle arrest, apoptosis and inhibition of tumorigenicity. Oncogene 18:1663-76, 1999.

[93]- Chen QR, Zhang L, Gasper W, Mixon AJ. Targeting tumor angiogenesis with gene therapy. Mol Genet Metab 74:120-7, 2001.

[94]- Nanni P, Forni G, Lollini PL. Cytokine gene therapy: hopes and pitfalls. Ann Oncol 10:261-6, 1999.

[95]- Goldsyby RA, Kindt TJ, Osborne BA. Cancer and the immune system. Kuby Immunology 4th edition. W.H. Freeman and Company. New York. 2000, pp:539-61

[96]- Norman KL, Farassati F, Lee PWK. Oncolytic viruses and cancer therapy. Cytokine & Growth Factor Rev 12:271- 82, 2001.

[97]- King RJB. Oncogenes, repressor genes and viruses. Cancer biology 2nd edition. Pearson Educational Limited. England, 2000, pp: 71-95.

[98]- Rothmann T, Hengstermann A, Whitaker NJ, Scheffner M, zur Hausen H. Replication of ONYX-015, a potential anticancer adenovirus, is independent of p53 status in tumor cells. J Virol72:9470-8, 1998.

[99]- Lewin AS, Hauswirth WW. Ribozyme gene therapy: applications for molecular medicine. Trends Mol Med 7:221-8, 2001.

[100]- David AD. Peptide nucleic acids: versatile tools for gene therapy strategies. Adv Drug Deliv Rev 44:81-95, 2000.

[101]- Futreal,P.A.,Q.Liu,D.Shattuck-Eidens, C. Cochran, K. Harshman,S. Tavtigian, L.M .Bennett, A. Haugen-Strano, J.Swensen, &Y., Miki, et al., BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas. Science 266, 120-122(1994)

[102]- Szabo,C.I. & M.C. King: Inherited breast and ovarian cancer. Hum. Mol. Genet. 4 Spec No, 1811-1817(1995)

[103]- LAloo,F.(2002).Genetics for Oncologists .RemedicaPubilishing Ltd.

[104]- Rodenhiser,D.I., J.D.Andrews,D.N.Mancini,J.H.Jung,& S.M., Singh: Homonucleotide tracts, short repeats and CpG/CpNpG motifs are frequent sites for

[134]- D'argenio V, Frisso G, Precone V, et al. DNA sequence capture and next-generation sequencing for the molecular diagnosis of genetic cardiomyopathies. J Mol Diagn. 2014;16:32e44.
[135]- D'arenio V, Esposito MV, Telese A, et al. The molecular analysis of BRCA1 and BRCA2: next-generation sequencing supersedes conventional approaches. Clin Chim Acta. 2015; 446:221e225.
[136]- Li S, Yang C, Zhai L, et al. Deep sequencing reveals small RNA characterization of invasive micropapillary carcinomas of the breast. Breast Cancer Res Treat. 2012;136(1):77e87
[137]- Sommer SS, Groszbach AR, Bottema CD: PCR amplification of specific alleles (PASA) is a general method for rapidly detecting known single−base changes. Biotechniques 1992, 12, 82–87.
[138]- Okayama H, Curiel DT, Brantly ML, Holmes MD, Crystal RG: Rapid, nonradioactive detection of mutations in the human genome by allele−specific amplification. J Lab Clin Med 1989, 114, 105–113.
[139]- Stephen,L.(1995).Current protocol in human genetics, 9.8 .1-9.8 .12.john Wiley & Sons ,Inc.
[140]- Rust S, Funke H, Assmann G. Mutagenically separated PCR (MS-PCR): a highly specific one step procedure for easy mutation detection. Nucleic Acids Res 1993;21:3623-3629.
[141]- Lindholm J. Development and Validation of HPLC method for Analytical and Preparative Purpose. Acta Universities Upsaliensis Uppsala. 2004; 13-14.
[142]- Rao BV,Sowjanya GN,Ajitha A, Rao Uma MV. A review on stability indicating HPLC method development,World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences.2015; 4(8):405-423
[143]- Wanguo Liu, David I. Smith, Keri J. Rechtzigel, Stephen N. Thibodeau and C. David James 121- Denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) used in the detection of germline and somatic mutations . Nucleic Acids Research, 1998, Vol. 26, No. 6
[144]- Grompe, M. (1993) Nature Genet., 5, 111–117.
[145]- Cotton, R.G.H. (1997) Trends Genet., 13, 43–66.
[146]- Oefner, P.J. and Underhill, P.A. (1995) Am. J. Hum. Genet., 57 (Suppl.), A266.
[147]- Underhill, P.A., Jin, L., Lin, A.A., Mehdi, S.Q., Jenkins, T., Vollrath, D., Davis, R.W., Cavalli-Sforza, L.L. and Oefner, P.J. (1997) Genome Res., 7, 996–1005.
[148]- Huber, C.G., Oefner, P.J. and Bonn, G.K. (1993) Anal. Biochem., 212,351.35
[149]- Hayward-Lester, A., Oefner, P.J., Sabatini, S. and Doris, P.A. (1995) Genome Res., 5, 494–499.
[150]- James, C.D., Carlbom, E., Dumanski, J., Hansen, M., Nordenskjold, M., Collins, V.P. and Cavenee, W.K. (1988) Cancer Res., 48, 5546–5551.
[151]- Charde MS, Welankiwar AS and Kumar J. Method development by liquid chromatography with validation.International Journal of Pharmaceutical Chemistry.2014; 4(2):57-61.
unselected breast cancer cases. Chirurgia ,108,468,472.
[120]- Thompson,D.&Easton,D.F.(2002).The breast cancer linkage consortium(2002).cancer incidence in BRCA1 mutation carriers journal of the National cancer Institute,94(18),1358-1365
[121]- Sipe,H.J.Jr,Jordan,S.J. Hanna ,P.M&Mason,R.P.(1994).The metabolism of 17B-estradiol by lactoperxidase: a possible source of oxidative stress I breast cancer .Carcinogenesis, 15,2637-2643.
[122]- Hamada ,J.et al .(2001). Increased oxidative DNA damage in mammary tumor cells by continuous epidermal growth factor stimulation .J.Natl Cancer Inst.,93,214-219.
[123]- The breast cancer linkage consortium (1999).Cancer risk in BRCA2 mutation carriers journal of the National cancer Institute,91(15),1310-1316.
[124]- Couch,F.J.&Weber,B.L.(1996).Mutations and polymorphisms in the familial early –onset breast cancer(BRCA1)gen.Breast cancer Information Core. Hum Mutat,8,8-18.
[125]- Tonin,P.,Serova,O.,Lenoir,G.,Lynch,H.,Durocher,F.,Simard,J.,etal.(1995).BRCA1 mutations in Ashkenazi jewishwomen.Am J Hum Genet,57,189
[126]- Struewing,J.P.,Hartge,P.,Wacholder,S.,Baker,S.M.,Berlin,M.,M.,McAdams,M.,et al.(1997).The risk of cancer with specific mutation of BRCA1 an BRCA2 among
[127]- Loman N, Johannsson O, Kristoffersson U, Olsson H, Borg A. Family history of breast and ovarian cancers and BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based series of earlyonset breast cancer. J Natl Cancer Inst 2001; 93(16): 1215-23.
[128]- Neuhausen S, Gilewski T, Norton L, Tran T, McGuire P, Swensen J, et al. Recurrent BRCA2 6174delT mutations inAshkenazi Jewish women affected by breast cancer. Nat Genet 1996; 13(1):126-8.
[129]- Gal I, Gershoni Baruch R, Haber D, Dagan E, Eisenberg-Barzilai S, Zidan J, et al. The1100delAT BRCA1 and the 8765delAG BRCA2 mutations: occurrence in high-risk non-Ashkenazi Jews and haplotype comparison of Jewish and non-Jewish carriers. Fam Cancer 2004; 3(1): 11-4.
[130]- Olufunmilayo ,I. o ., Tatyana .A. G.,Rita N &Dezheng H. (2008). Advances in breast cancer: pathways to personalized medicine. Clinical cancer Research, 14, 7988-7999
[131]- Elfandi Lamia , Ghada Said , Saleh Suleiman Saleh , Mohamed Marwan , Nabil Enattah , (2016). Analysis of 6174delT Mutation in BRCA2 Gene by Mutagenically
[132]- Moorcraft SY, Gonzalez D, Walker BA. Understanding next generation sequencing in oncology: a guide for oncologists. Crit Rev Oncol Hematol. 2015;96(3):463e474.
[133]- Fan H, Ives AR, Surget-groba Y, et al. An assembly and alignment-free method of phylogeny reconstruction from nextgeneration sequencing data. BMC Genomics. 2015;16(1):522.

BRCA1:Breast cancer susceptibility gen1
BRCA2:Breast cancer susceptibility gen2
DCIS:Ductal carcinoma in situ
LCIS:lobular carcinoma in situ
ER:Estrogen receptor

PR :Progesterone receptor

HER2:Human Epidermal growth factor Receptor2
TP53:Tumor suppressor
TSG:Tumor suppressor gen
VEGF: vascular endothelial growth factor

[152]- Steck, P.A., Pershouse, M.A., Jasser, S.A., Yung, W.K.A, Lin, H., Lignon, A.H., Langford, L.A., Baumgard, M.L., Hattier, T., Davis, T., Frye, C., Hu, R., Swedlund, B., Teng, D.H.F. and Tavtigian, S.V. (1997) Nature Genet., 15, 356–362.

[153]- Wanguo Liu, David I. Smith, Keri J. Rechtzigel, Stephen N. Thibodeau and C. David James 121- Denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) used in the detection of germline and somatic mutations . Nucleic Acids Research, 1998, Vol. 26, No. 6

ملخص للمصطلحات المستخدمة