جامعة الموصل
كلية العلوم

تحديد الطفرات الوراثية للجين الكابح للورم ***P53*** في النساء المصابات بسرطان الثدي في مدينة الموصل

محمد عبد الرزاق حميد حمودي الدليميّ

رسالة ماجستير

علوم الحياة / علم الحيوان

بإشراف
الأستاذ المساعد
الدكتور اويس موفق حامد الحسني

١٤٤٤هـ ٢٠٢٢ م

تحديد الطفرات الوراثية للجين الكابح للورم ***P53*** في النساء المصابات بسرطان الثدي في مدينة الموصل

رسالة ماجستير

تقدّم بها

محمد عبد الرزاق حميد حمودي الدليميّ

إلى

مجلس كلية العلوم في جامعة الموصل وهي جزء من متطلبات

نيل شهادة الماجستير في

علوم الحياة / علم الحيوان

بإشراف

الأستاذ المساعد

الدكتور اويس موفق حامد الحسنيّ

١٤٤٤هـ ٢٠٢٢م

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَٰنِ الرَّحِيمِ

﴿ نَرْفَعُ دَرَجَاتٍ مَّن نَّشَاءُ وَفَوْقَ كُلِّ ذِي عِلْمٍ عَلِيمٌ ﴾

صَدَقَ اللهُ العَظِيمُ

سورة يوسف – الآية (٧٦)

إقرار المشرف

أشهد أنّ إعداد هذه الرسالة قد جرى تحت إشرافي في جامعة الموصل، وهي جزء من متطلبات شهادة الماجستير في علوم الحياة/ علم الحيوان.

التوقيع:

المشرف: **د.اويس موفق حامد الحسني**

المرتبة العلمية: **أستاذ مساعد**

التاريخ: / / 2022

إقرار المقوم اللغوي

أشهد أنَّ هذه الرسالة الموسومة " **تحديد الطفرات الوراثية للجين الكابح للورم *P53* في النساء المصابات بسرطان الثدي في مدينة الموصل** " تمت مراجعتها من الناحية اللغوية وتصحيح ماورد فيها من أخطاء لغوية وتعبيرية وبذلك أصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة بقدر تعلق ألامر بسلامة ألاسلوب وصحة التعبير.

التوقيع:

المشرف: **د.معن يحيى محمد العبادي**

المرتبة العلمية: **استاذ**

التاريخ: / / ٢٠٢٢

إقرار رئيس لجنة الدراسات العليا

بناءً على التوصيات المقدمة من قبل المشرف والمقوم اللغوي ، أرشح هذه الرسالة للمناقشة .

التوقيع:

المشرف: **د.رائد سالم الصفار**

المرتبة العلمية: **استاذ مساعد**

التاريخ: / / ٢٠٢٢

إقرار رئيس القسم

بناءً على التوصيات المقدمة من قبل رئيس لجنة الدراسات العليا، أرشح هذه الرسالة للمناقشة

التوقيع:

المشرف: **د.رائد سالم الصفار**

المرتبة العلمية: **استاذ مساعد**

التاريخ: / / ٢٠٢٢

قرار لجنة المناقشة

نَشـهد بأننـا أعضـاء لجنـة التقـويم والمناقشـة قـد اطلعنـا علـى هـذه الرسـالة وناقشـنا الطالـب **محمد عبد الرزاق حميد حمودي** في محتوياتها وفيما له علاقة بها بتاريخ / /٢٠٢٢ وأنَّها جديرة لنيل شهادة الماجستير في اختصاص علوم الحياة /علم الحيوان

التوقيع التوقيع

رئيس اللجنة عضو

التوقيع التوقيع

عضو عضو (المشرف)

قرار مجلس الكلية

اجتمـع مجلـس كليـة العلـوم بجلسـته..... المنعقـدة فـي / / ٢٠٢٢ م وقـرر التوصية بمنحها شهادة الماجستير في علوم الحياة / علم الحيوان.

التوقيع التوقيع

مقرر مجلس الكلية **عميد كلية العلوم**

أ.م.د. محمد صبحي حميد **أ.د. هيام عادل ابراهيم**

/ / ٢٠٢٢ / / ٢٠٢٢

شكر وثناء

قال الله تعالى في كتابه الكريم : "ومن يشكر فإنما يشكر لنفسه" من هنا استهل كلماتي اولاً بالشكر لله عزّ وجلّ الذي وفقني للوصول إلى هذه المرحلة العلمية العالية، ومهد لي الطريق لأن أكون بينكم اليوم لأناقش رسالتي في الماجستير, والصلاة والسلام على أفضل الخلق نبينا محمد (صلى الله عليه وسلم).

أماّ بعد...

فلا يسعني وأنا أَضع اللمسات الأَخيرة في هذه الرسالة إلا أنْ أَتقدم بجزيل الشكر والإمتنان إلى أستاذي المشرف الدكتور اويس موفق حامد على التوجيه والإشراف والنصح والمتابعة طيلة مدة الدراسة، داعياَ الله له بدوام الصحة والعافية والعطاء العلمي والتوفيق في مسيرته العلمية والبحثية وجزاه الله خير الجزاء.

كما أَتقدمُ بجزيل الشكل والعرفان إلى رئاسة جامعة الموصل وإلى عمادة كلية العلوم متمثلة بالسيدة عميدة كلية العلوم الاستاذ الدكتورة هيام عادل الطائي، ورئاسة قسم علوم الحياة متمثلة بالسيد رئيس القسم الأستاذ المساعد الدكتور رائد سالم الصفار وجميع أساتذة ومنتسبي قسم علوم الحياة وزملائي وزميلاتي طلاب الدراسات العليا, لما أَبدوه من تعاون وتشجيع بناء طيلة مدة الدراسة، أُسأل الله سبحانه وتعالى لهم التوفيق والنجاح.

كما أَتقدم بشكري الجزيل للأستاذ مصطفى طه وزملائي في الدراسة سماء مشرف وأشرف محمد ومصطفى محمود وحقي يزن, لما قدموه لي من دعم ومساندة في إعداد هذه الرسالة.

ومن واجبي أنْ أُقدم شكري وامتناني إلى من ساندني ووقف بجانبي، إلى من وهبوني الحياة والأَمل، أبي الغالي قدوتي وأعظم أسباب وصولي الى منتهى طموحي من بعد الله كل كلمات الشكر قليلة بحقك, والدتي الغالية صاحبة اكبر معروف علي في دعواتها وسندها وتعبها وسهرها علي منذ الصغر حتى وصولي اليوم الى ما أنا عليه بفضلها وتعبها.

إلى من وهبني الله نعمة وجودهم في حياتي إخوتي واخواتي الأعزاء, لما قدموه لي من دعم طيلة مدة الدراسة حفظكم الله تعالى.

الباحث

محمد عبد الرزاق حميد الدليمي

الخلاصة:

ارتبط الخلل الوظيفي للجين *TP53* بحوالي 75٪ من السرطانات المختلفة, وغالبًا ما يؤدي هذا الخلل الى فقدان الوظيفة الذي يكون ناتجاً عن الطفرات في هذا الجين اذ يتم تنشيط البروتين P53 كاستجابة لتلف الحمض النووي(Deoxyribonucleic acid (DNA، ونقص الأوكسجين ويقوم بإصلاح الحمض النووي DNA التالف ، وموت الخلايا المبرمج. هذه الأنشطة مهمة لكبح تكوين الورم وكذلك للتوسط في الاستجابات الخلوية المتعلقة بالتحكم في دورة الخلية كونها عنصرًا رئيساً أمام قمع الورم.

شملت الدراسة الحالية 95 امرأة بأعمار تراوحت بين (35-45) سنة من المراجعات إلى مستشفى الأورام والطب النووي البديل في مدينة الموصل في مدة زمنية تراوحت من شهر أيلول الى شهر تشرين الثاني من عام 2021. قسمت العينات الى مجموعتين الأولى تضمنت 21 امرأة من النساء كمجموعة سيطرة والثانية تضمنت 74 امرأة من النساء المصابات بسرطان الثدي, تم سحب 5.0 مل من الدم الوريدي من النساء وتم تقسيمه على جزءَين، وضع الاول في أنابيب تحتوي على مادة مانعة للتخثر Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) والتي استخدمت في استخلاص الـDNA المجيني، ووضع الجزء الثاني في أنابيب خالية من أي مادة مانعة للتخثر للحصول على مصل الدم الذي اجريت عليه الاختبارات الكيموحيوية المختلفة.

تم الكشف عن وجود الطفرة (codon 249) للجين *TP53* في الاكسون 7 , كما تم تحديد التباين الوراثي للجين *TP53* في الموقع (rs1042522) في الاكسون 4 , ايضاً تم تحديد تتابع النيوكليوتيدات للقطع المضخمة بالاعتماد على تقنية الـDNA Sequencing وتم تقدير عدد من المتغيرات الكيموحيوية مثل تقدير CA 15-3 وتقدير اليوريا والكرياتنين كما تم تقدير عدد من متغيرات الدم وهي كريات الدم الحمر وخلايا الدم البيض والصفائح الدموية وتركيز الهيموكلوبين.

أظهرت النتائج للتباين الوراثي في الموقع (rs1042522) في الاكسون 4 لدى النساء المصابات بسرطان الثدي بأن نسبة تكرار النمط الوراثي الطافر GG هي الأعلى لدى النساء المصابات بسرطان الثدي بنسبة 19% مقارنة بالنمط الوراثي الطافر لدى مجموعة السيطرة بنسبة 10% في حين ان نسبة النمط الوراثي الطبيعي CC كانت هي الأقل لدى النساء المصابات بسرطان الثدي بنسبة 35% مقارنة مع مجموعة السيطرة التي كان فيها نسبة النمط الوراثي الطبيعي عالية 70% اما بالنسبة للنمط الوراثي المتباين CG فكانت نسبة المشاهدة له عالية في مجموعة المرضى 56% مقارنة بمجموعة السيطرة 20%. اما بالنسبة للتكرار الاليلي فقد اظهرت النتائج بأن نسبة المشاهدة للاليل الطافر G كانت عالية في مجموعة المرضى 42% مقارنة بمجموعة السيطرة 20% اما بالنسبة للاليل الطبيعي فقد كانت نسبته لدى المرضى 58% مقارنة مع مجموعة السيطرة 80%. كذلك بينت نتائج الدراسة بأن قيمة مستوى الارجحية للنمط الوراثي الطافر GG كانت O.R=4.038 عند مستوى احتمالية P=0.089, وللاليل

الطافر كان مستوى الارجحية O.R=3.06 عند مستوى احتمالية P=0.008, كذلك بينت النتائج بأن نسبة التكرار الاليلي للاليل الطبيعي C كانت هي الأعلى 0.58 مقارنة بتكرار الاليل الطافر G 0.42 في مجاميع الدراسة.

كما أظهرت نتائج الدراسة بالنسبة للتباين الوراثي في الموقع (codon 249) للجين *TP53* في الاكسون 7 لمجموعة المرضى بأن نسبة المشاهدة للنمط الوراثي الطافر CC كانت هي الأعلى 69% ونسبة المشاهدة للنمط الوراثي الطبيعي GG كانت هي الأقل 11% اما بالنسبة للنمط الوراثي المتباين CG فكانت نسبة المشاهدة له 20% مقارنة مع مجموعة السيطرة إذ كانت نسبة المشاهدة للنمط الوراثي الطافر CC هي الاقل 5% ونسبة المشاهدة للنمط الوراثي الطبيعي GG كانت هي الأعلى 61% اما بالنسبة للنمط الوراثي المتباين CG فكانت نسبة المشاهدة هي 34% اما نسبة المشاهدة الاليلية فقد كانت 61% للاليل الطافر C و 39% للاليل الطبيعي G لدى النساء المصابات بسرطان الثدي مقارنة مع مجموعة السيطرة اذ كانت نسبة المشاهدة للاليل الطافر 22% مقارنة بالاليل الطبيعي 78%. كما أظهرت نتائج الدراسة بأن قيمة مستوى الارجحية للنمط الوراثي الطافر كانت عالية جدا O.R=84.5 عند مستوى احتمالية P=0.0001, وكانت قيمة مستوى الارجحية للاليل الطافر هي O.R=14.2 عند مستوى احتمالية P < 0.0001. كذلك أظهرت الدراسة ان نسبة التكرار الاليلي للاليل الطافر كانت 0.79 مقارنة مع نسبة تكرار الاليل الطبيعي 0.21.

وبعد اجراء اختبار تحديد تسلسلات النيوكليوتيدات لاكسونات الجين المضخمة أظهرت النتائج أن هناك تبايناً في عدد من النيوكليتيدات في الاكسونات 3 و 4 و 6 في حين لم تظهر نتائج التسلسل اي تباين للنيوكليتيدات في الاكسون 5. كذلك من خلال هذه الدراسة تم تسجيل نمط وراثي جديد للجين *TP53* في مدينة الموصل في موقع الجينات العالمي NCBI وقد اعطي الرقم التعريفي GenBank: LC682536.1 فضلاً عن ذلك تم تسجيل نمط مظهري جديد للبروتين الكابح للورم P53 في مدينة الموصل في موقع الجينات العالمي NCBI وقد اعطي الرقم التعريفي GenBank:BDF83325.1.

كما أظهرت نتائج الدراسة وجود ارتفاع معنوي في مستويات CA15-3 في بلازما الدم لدى المرضى المصابين بسرطان الثدي مقارنة مع مجموعة السيطرة وايضاً أظهرت وجود نقص معنوي في مستويات اليوريا و الكرياتنين مقارنة مع مجموعة السيطرة إذ بينت الدراسة ان مستويات CA15-3 لدى المرضى هي (U/ml) 125,82 مقارنة بمجموعة السيطرة اذ كانت النسبة هي (U/ml) 23 ومستويات اليوريا لدى المرضى هي (mg/dl) 38,2 و الكرياتنين (mg/dl) 0,6 مقارنة مع مجموعة السيطرة إذ كانت (mg/dl) 41 و(mg/dl) 1.4 على التوالي. وقد أظهرت نتائج الدراسة الحالية انخفاضا معنويا في العدد الكلي لخلايا الدم البيض وكريات الدم الحمر والصفيحات الدموية ومستوى الهيموغلوبين في دم المرضى المصابين بسرطان الثدي.

ثبت المحتويات

الفقرة	الموضوع	الصفحة
	الخلاصة	I
	ثبت المحتويات	III
	ثبت الجداول	VI
	ثبت الاشكال	VII
	ثبت الملاحق	IX
	ثبت المختصرات	X
	الفصل الاول:المقدمة	١-٣
١.١	المقدمة	١
١.٢	الهدف من الدراسة	٣
	الفصل الثاني: استعراض المراجع	٤-٢٢
1.2	سرطان الثدي	٤
1.1.2	التغيرات الوراثية في سرطان الثدي	٥
2.1.2	مناطق بدأ وانتشار سرطان الثدي	٥
2.2	دورة الخلية وحدوث السرطان	٦
3.2	موت الخلايا المبرمج	٧
4.2	مؤشرات الاورام	٨
1.4.2	انواع المؤشرات الورمية المرتبطة بسرطان الثدي	٨
2.4.2	Carcinoembryonic antigen (CEA)	٨
3.4.2	Cancer antigen (CA) 15-3	٩
4.4.2	CA 27-29	٩
5.4.2	Estrogen receptor (ER)	٩
6.4.2	Progesterone receptor (PR)	١٠
5.2	الجينات الورمية والجينات الكابحة للورم	١٠
1.5.2	الجينات الورمية	١٠
2.5.2	الجين الورمي الاولي	١١
3.5.2	الجينات الكابحة للورم	١١
4.5.2	وظائف الجينات الكابحة للورم	١٢

الفقرة	الموضوع	الصفحة
5.5.2	آليات عمل الجينات الكابحة للورم	١٢
6.2	الجين *TP53*	١٣
1.6.2	السيطرة على تعبير P53	١٦
2.6.2	تنشيط *TP53*	١٧
3.6.2	تثبيط عمل *TP53*	١٨
4.6.2	الطفرات في الجين *TP53*	١٩
5.6.2	تعدد أشكال *TP53* في سرطان الثدي	٢٠
7.2	بروتين P53	٢١
1.7.2	الوظائف الخلوية لـ P53	٢١
	الفصل الثالث: مواد وطرائق العمل	٢٣-٣١
1.3	الاجهزة المستخدمة	٢٣
2.3	عينات البحث Case Study	٢٣
3.3	جمع وحفظ نماذج الدمCollection of Blood sample	٢٤
4.3	الاختبارات الجزيئية	٢٤
1.4.3	استخلاص الدنا DNA extraction	٢٤
١.١.٤.٣	المحاليل المستخدمة في استخلاص الـ DNA	٢٤
2.1.4.3	طريقة الاستخلاص للحامض النووي (DNA)	٢٥
3.1.4.3	تقدير نقاوة وتركيز الـDNA المستخلص	٢٦
4.1.4.3	المحاليل المستخدمة في عملية الترحيل	٢٦
5.1.4.3	تحضير هلام الاكاروز وعملية الترحيل الكهربائي لـ DNA	٢٦
5.3	تفاعلات الـ PCR-RFLP	٢٧
1.5.3	الكشف عن وجود الطفرة (codon 249) للجين *TP53* في الاكسون (7)	٢٧
6.3	تفاعلات الـ ARMS	٢٨
1.6.3	تحديد التباين الوراثي للجين *TP53* في الموقع (rs1042522) في الاكسون (4) باستخدام تقنية Tetra–ARMS - PCR	٢٩
7.3	تحديد تتابع النيوكليوتيدات للقطع المضخمة بالاعتماد على تقنية الـ DNA Sequencing	٣٠
8.3	الاختبارات الكيموحيوية Biochemical Test	٣٠

الفقرة	الموضوع	الصفحة
1.8.3	اختبارات قياس CA 15-3 باستخدام جهاز ال VIDAS	٣١
2.8.3	تقدير اليوريا والكرياتنين	٣٠
3.8.3	تقدير عدد من مكونات الدم	٣٠
الفصل الرابع: النتائج والمناقشة		٤٧-٣٢
1.4	الاختبارات الجزيئية	٣٢
1.1.4	استخلاص الحامض النووي DNA من عينات الدم	٣٢
2.1.4	تحديد التباين الوراثي للجين *TP53* في الموقع (rs1042522) في الاكسون (4) باستخدام تقنية Tetra–ARMS –PCR	٣٢
3.1.4	الكشف عن وجود الطفرة (codon 249) للجين *TP53* في الاكسون (7)	٣٥
4.1.4	تحليل نتائج الـ Haplotype	٣٨
5.1.4	تحديد تتابع النيوكليوتيدات للقطع المضخمة بالاعتماد على تقنية الـ DNA Sequencing	٣٩
2.4	تسجيل الانماط الوراثية والمظهرية للجين*TP53* في موقع الجينات العالمي NCBI	٤٤
3.4	الاختبارات الكيموحيوية	٤٥
4.4	الاختبارات الدموية	٤٦
الاستنتاجات والتوصيات		٤٩-٤٨
المصادر		٥٠-
الملاحق		II-I
Abstract		C-A

ثبت الجداول

الجدول	العنوان	الصفحة
(1-2)	انواع ومواقع ووظيفة عدد من الجينات الكابحة للورم	١٣
(1-3)	الاجهزة المستخدمة في هذه الدراسة	٢٣
(2-3)	البوادئ المستخدمة في تحديد التباين الوراثي في الموقع (codon 249) باستخدام تقنية الـ PCR	٢٧
(٣-٣)	البرنامج المعتمد في تقنية الـPCR لتحديد الطفرة (codon 249)	
(4-3)	البوادئ المستخدمة في تحديد التباين الوراثي في الموقع (rs1042522) باستخدام تقنية الـ PCR	٢٩
(5-3)	البرنامج المعتمد في تقنية الـPCR لتحديد الطفرة (rs1042522)	٢٩
(6-3)	البوادئ الخاصة بالاكسونات التابعة للجين *TP53* والتي اجري عليها اختبار الـ DNA Sequencing	٣٠
(1-4)	توزيع نسبة المشاهدة الاليلية والنمط الوراثي للجين *TP53* في الموقع (rs1042522) في الاكسون(٤) بين مجموعة النساء السليمات والنساء اللواتي يعانون من الاصابة بسرطان الثدي علما ان الاليل C هو الاليل الطبيعي والاليل G هو الاليل الطافر	٣٣
(2-4)	نسبة التكرار الاليلي في عينات الدراسة	٣٤
(3-4)	نسبة المشاهدة الاليلية والانماط الوراثية المختلفة للجين *TP53* في الموقع (codon 249) في الاكسون (7)	٣٦
(4-4)	نسبة التكرار الاليلي في عينات الدراسة	٣٧
(5-4)	الانماط الوراثية وتكراراتها الناتجة من اختبار الـ Haplotype	٣٨
(6-4)	مواقع وانواع الطفرات المختلفة في جين *TP53* لدى النساء المصابات بسرطان الثدي	٤٣
(7-4)	مستويات المتغيرات الكيموحيوية في مصل دم النساء المصابات بسرطان الثدي مقارنة مع مجموعة السيطرة	٤٦
(8-4)	مستويات مكونات الدم لدى النساء المصابات بسرطان الثدي مقارنة مع مجموعة السيطرة	٤٧

ثبت الأَشكال

الشكل	العنوان	الصفحة
(1-2)	موقع الجين *TP53* في الكروموسوم ومواقع الإكسونات التابعة له	١٤
(2-2)	وظائف الجين *TP53*	١٦
(1-4)	الجينوم المستخلص من عينات الدم والمرحل بهلام الاكاروز بتركيز 1%	٣٢
(2-4)	تفاعل الـ PCR الخاص بالتباين الوراثي (rs1042522) التابع للاكسون (4) للجين *TP53* اذ كان الناتج تفاعل يحتوي على ٣ حزم الاولى بحجم 493 bp للجين الرئيسي والثانية بحجم 247 bp للاليل الطبيعي والحزمة الثالثة بحجم 200 bp للاليل الطافر, M هو الدليل الحجمي بحجم 100 BP والمجهز من شركة Biolabs وتم الفصل بهلام الاكاروز بتركيز 2%	٣٣
(3-4)	تفاعل الـ PCR الخاص بالتباين الوراثي (codon 249) التابع للاكسون (7) للجين *TP53* وبناتج تفاعل 309 bp, M هو الدليل الحجمي بحجم 100 BP والمجهز من شركة Biolabs وتم الفصل بهلام الاكاروز بتركيز 2%	٣٥
(4-4)	تفاعل الـ RFLP-PCR الخاص بالتباين الوراثي (codon 249) التابع للاكسون (7) للجين *TP53* اذ كان الناتج تفاعل يحتوي على ٣ حزم الاولى بحجم 309 bp للجين الرئيسي والثانية بحجم 158 bp للاليل الطبيعي والحزمة الثالثة بحجم 249 bp للاليل الطافر, M هو الدليل الحجمي بحجم 100 BP والمجهز من شركة Biolabs وتم الفصل بهلام الاكاروز بتركيز 2%	٣٦
(5-4)	التداخل بين التباينات التابعة للجين *TP53* حسب تحليل الـ Haplotype	٣٨
(6-4)	تفاعل الـ PCR التابع للاكسونين (3,4) للجين *TP53* وبناتج تفاعل 493 bp, M هو الدليل الحجمي بحجم 100 BP والمجهز من شركة Biolabs وتم الفصل بهلام الاكاروز بتركيز 2%	٣٩
(7-4)	تفاعل الـ PCR التابع للاكسون (5) للجين *TP53* وبناتج تفاعل 230 bp, M هو الدليل الحجمي بحجم 100 BP والمجهز من شركة Biolabs وتم الفصل بهلام الاكاروز بتركيز 2%	٤٠

الشكل	العنوان	الصفحة
(8-4)	تفاعل الـ PCR التابع للاكسون (6) للجين *TP53* وبناتج تفاعل 180 bp, M هو الدليل الحجمي بحجم 100 BP والمجهز من شركة Biolabs وتم الفصل بهلام الاكاروز بتركيز 2%	٤٠
(9-4)	المطابقة مع تسلسل النيوكليوتيدات للإكسون (3) التابع للجين *TP53* التي تم مقارنتها مع تسلسلات الجين الاصلي في موقع الـ NCBI	٤١
(10-4)	المطابقة مع تسلسل النيوكليوتيدات للإكسون (4) التابع للجين *TP53* التي تم مقارنتها مع تسلسلات الجين الاصلي في موقع الـ NCBI	٤١
(11-4)	المطابقة مع تسلسل النيوكليوتيدات للإكسون (5) التابع للجين *TP53* التي تم مقارنتها مع تسلسلات الجين الاصلي في موقع الـ NCBI	٤٢
(12-4)	المطابقة مع تسلسل النيوكليوتيدات للإكسون (6) التابع للجين *TP53* التي تم مقارنتها مع تسلسلات الجين الاصلي في موقع الـ NCBI	٤٢

ثبت الملاحق

الملحق	الموضوع	الصفحة
1	تسجيل البروتين P53 في موقع NCBI العالمي	I
2	تسجيل الجين *TP53* في موقع NCBI العالمي	II

ثبت المختصرات

المختصر	المصطلح
A	Adenine
APC	Adenomatous Polyposis coli
Arg	Arginine
ARMS	Amplification Refractory Mutation System
bp	Base Pair
BRCA	Breast Cancer Gene
C	Cytosine
CA	Cancer Antigene
CADM1	Cell Adhesion Molecule 1
CDH1	Cadherin 1
CDK	Cyclin-Dependent Kinase
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FAS	FS-7-Associated Surface Antigen
G	Guanine
G1	Gap 1 Phase
G2	Gap 2 Phase
IHC	Immunohistochemistry
LFS	Li - Fraumeni Syndrome
MDM2	Mouse Double Minute 2
MSH2	DNA Mismatch Repair Protein
MUC	Mucine
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NF1	Neurofibromin 1
NOTCH	Neurogenic Locus Notch Homolog Protein
PCR	Polymerase Chain Reaction
Pro	Proline
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog
RB1	Retinoblastoma Susceptibility Gene
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
S	Synthesis Phase
SNP	Single Nucleotide Polymorphisms
T	Thymine
TGF-β	Transforming Growth Factor
TP53	Tumor Protein 53
TSC1	Tuberous sclerosis 1

الفصل الأول

المقدمة

Introduction

1.1 المقدمة Introduction

يعدّ السرطان من الأمراض التي تتميز بتكاثر الخلايا ذات القدرة على غزو وتدمير النسج القريبة، أو الانتقال إلى النسج البعيدة في عملية تسمّى انتشار الورم الخبيث. هذه الصفات هي من سمات الأورام الخبيثة، على عكس الأورام الحميدة، والتي تتميز بنمو معين ولا يمكن أن تنتشر (Mattiuzzi and Lippi, 2019). ومع ذلك يمكن أن تتطور الأورام الحميدة أحيانًا إلى أورام خبيثة. ويقدر ما يقرب من ٥-١٠٪ من السرطانات ناتجة عن طفرات وراثية (Ferlay *et al*., 2021).

يعدّ سرطان الثدي من أكثر أنواع السرطانات شيوعاً بين النساء في العالم، وهو سبب وفاة ما يقارب من ٢٠٪ من النساء اللواتي يتوفين بسبب السرطان في العالم (Ahmad, 2019). يشير مصطلح سرطان الثدي إلى ورم خبيث ينشأ من خلايا الثدي وعادة ما يبدأ سرطان الثدي في خلايا الفصيصات وهي الغدد المنتجة للحليب أو القنوات وهي الممرات التي تصرف الحليب من الفصيصات إلى الحلمة ويوجد نوع آخر أقل شيوعاً حيث يمكن أن يبدأ سرطان الثدي في النسج اللحمية, والتي تشمل النسج الضامة الدهنية والليفية للثدي (Momenimovahed and Salehiniya, 2019).

يتم تنظيم انقسام الخلية بإحكام عِبْر آليات التحكم في دورة الخلية لضمان إنتاج خليتين متطابقتين وراثيًا. تعمل نقاط فحص دورة الخلية كآليات مراقبة للحمض النووي DNA التي تمنع تراكم وانتشار الأخطاء الوراثية أثناء انقسام الخلية. يمكن أن تؤدي نقاط التفتيش إلى تأخير تقدم دورة الخلية أو تحفيز موت الخلية استجابةً لتلف الحمض النووي DNA الذي لا يمكن إصلاحه (Takahashi and Kato, 2022)، ولكن في الخلايا السرطانية وبسبب وجود الطفرات الوراثية المرتبطة بدورة الخلية فإن دورة الخلية تستمر بالانقسام بشكل مستمر وغير اعتيادي (Liu *et al*., 2021).

يعدّ موت الخلايا المبرمج عملية خلوية منظمة ومنسقة تحدث في ظروف فسيولوجية ومرضية, ويجب فهم الآلية الكامنة وراء موت الخلايا المبرمج لأنها تلعب دورًا محوريًا في التسبب في العديد من الأمراض (Koff *et al*., 2015). يوجد حالتان من موت الخلايا المبرمج الاولى تحدث فيها زيادة في موت الخلايا كما هي الحال في الأمراض التنكسية, بينما في الحالة الثانية تحدث فيها قلة في موت الخلايا كما هي الحال في السرطان (Mohammad *et al*., 2015).

تعدّ علامات الورم مؤشراً على أي شيء ينتج عن الخلايا السرطانية أو خلايا الجسم الأخرى استجابةً للسرطان أو بعض الحالات الحميدة (غير السرطانية) التي توفر معلومات حول السرطان مثل مدى عدوانيته ونوع العلاج الذي قد يستجيب له حيث يمكن قياسها في الدم أو البول أو الأورام أو النسج الأخرى (Sokoll and Chan, 2020). تم وصف العديد من علامات الورم المختلفة ويرتبط بعضها بنوع واحد فقط من السرطان بينما يرتبط البعض الآخر بأنواع مختلفة من السرطان وهي عبارة عن

بروتينات أو مواد أخرى تكونها الخلايا السرطانية بكميات أعلى من الخلايا الطبيعية (Nagpal *et al*., 2016).

تم االكتشاف نوعين مهمين من الجينات المرتبطة بالسرطان (Levine and Puzio-Kuter, 2010) وهي:

الجينات الورمية هي الجينات التي لديها القدرة على بناء بروتينات يعتقد أنها تساهم في تكوين السرطانات. هذه الجينات مشتقة من جينات تسمى الجينات الورمية الأولية التي تلعب دورًا في تنظيم الانقسام الطبيعي للخلايا. يمكن أن ينشأ السرطان عندما يتحور الجين الورمي الأولي بسبب الطفرات الوراثية إلى جين ورمي يتسبب في انقسام الخلية وتكاثرها من دون رقابة (Shortt and Johnstone, 2012).

الجينات الكابحة للورم هي جينات مهمة تعمل على تنظيم العديد من الوظائف الخلوية. يمكن تصنيف هذه الجينات على نطاق واسع بناءً على دورها في نمو وتقدم دورة الخلية وتكاثر الخلايا وآليات إصلاح الحمض النووي DNA، وغيرها من وظائف الإشارات الخلوية مثل تحفيز موت الخلايا المبرمج. من دون وجود هذه الجينات هناك مخاطر عالية لنمو الخلايا غير المنتظم وهي آلية معروفة لتطوير السرطانات (Zhao *et al*., 2013).

ان جين *TP53* (*Tumor Protein 53*) هو جين مثبط للورم موجود على الكروموسوم 17 (17p13.1) ويشفر البروتين P53 يعمل هذا البروتين بوصفهِ مثبطاً للورم مما يعني أنه ينظم انقسام الخلايا عن طريق منع الخلايا من النمو والتكاثر بسرعة كبيرة أو بطريقة لا يمكن السيطرة عليها (Aubrey *et al*., 2016). يعمل البروتين P53 في نواة الخلايا في جميع أنحاء الجسم حيث يرتبط مباشرة بالحمض النووي DNA وعندما يتلف هذا الحمض النووي DNA في الخلية يلعب دوراً مهماً في تحديد ما إذا كان سيتم إصلاح الحمض النووي DNA أو تدمير الخلية التالفة ذاتيًا, عِبْر منع الخلايا ذات الحمض النووي التالف DNA من الانقسام يساعد البروتين P53 في منع تطور الأورام (Olivier *et al*., 2010).

2.1 الهدف من الدراسة The aim of the study

تكمن أهمية هذه الدراسة في ازدياد عدد حالات الاصابة بسرطان الثدي وانتشارها لدى النساء والتاخر في تشخيص هذه الحالة, لذلك اقترحت هذه الدراسة لالقاء الضوء على المسببات الوراثية لهذا المرض لذلك تهدف هذه الدراسة الى:

١. تحديد العلاقة بين التباين الوراثي للجين *TP53* وحالات الاصابة بسرطان الثدي لدى النساء في مدينة الموصل.
٢. امكانية اعتماد الطفرات في الجين *TP53* كمسبب لسرطان الثدي واستخدامها مع المؤشرات الورمية للتشخيص المبكر للاصابة بهذا المرض.
٣. الكشف عن الطفرات الوراثية غير المسجلة في الجين *TP53* لدى المرضى في مدينة الموصل وتحديد النمط الوراثي للجين *TP53* والبروتين P53 لدى المرضى في مدينة الموصل.
٤. دراسة بعض المؤشرات الورمية وعلاقتها مع سرطان الثدي.

الفصل الثاني

استعراض المراجع

Literature Review

1.2 سرطان الثدي

سرطان الثدي هو نوع من أنواع السرطانات الخبيثة يظهر في نسج الثدي, من علاماته تغير في شكل الثدي، وظهور كتلة نسيجية في الثدي، تقشير الجلد، سائل قادم من الحلمة، أو بقع حمراء أو متقشرة. في حالة انتشار المرض في الجسم تظهر بعض العلامات منها: آلام العظم، انتفاخ في الغدد اللمفية، ضيق في التنفس أو اصفرار في الجلد (Kerr *et al*., 2022).

من العوامل التي تزيد من احتمالية الإصابة بسرطان الثدي هي: نوع الجنس, إذ إن النساء أكثر عرضة للإصابة بسرطان الثدي من الرجال، السمنة وعدم ممارسة الرياضة، شرب الكحول، العلاج بالهرمونات البديلة في فترة انقطاع الطمث، التعرض لإشعاع مؤين، البلوغ المبكر للفتاة، إنجاب الأطفال في عمر متأخر أو عدم إنجاب الأطفال، والتقدم في العمر, التاريخ العائلي لسرطان الثدي وتباينات وراثية (Guha *et al*., 2022). عادة ما يتطور سرطان الثدي في الخلايا من بطانة القناة اللبنية والفصوص التي تزود القنوات بالحليب. تُعرف السرطانات الناشئة من القنوات باسم سرطان القنوات الغازية، بينما تُعرف السرطانات النامية من الفصوص بأنها سرطانات مفصصة. فضلاً عن ذلك، هناك أكثر من ١٨ نوعًا آخر من أنواع سرطان الثدي(Matikas *et al*., 2022). يتم تأكيد تشخيص سرطان الثدي عن طريق أخذ خزعة من الورم المعني وبمجرد إجراء التشخيص، يتم إجراء مزيد من الاختبارات لتحديد ما إذا كان السرطان قد انتشر إلى ما بعد الثدي وما هي العلاجات التي من المرجح أن تكون فعالة (Mann *et al*., 2022).

يعد سرطان الثدي من أكثر السرطانات شيوعًا بين النساء في البلدان المتقدمة في العالم، وهو سبب الوفاة في ما يقارب من ٢٠٪ من جميع الإناث اللواتي يتوفين بسبب السرطان في هذه البلدان (Kabel and Baali, 2015). هناك اختلافات ملحوظة في الإصابة بسرطان الثدي في أماكن مختلفة، والانطباع السائد هو أن المرض أكثر شيوعًا بين القوقازيين الذين يعيشون في المناخات الباردة والدول الأكثر تصنيعًا في نصف الكرة الغربي. إن معدلات الإصابة العالية بسرطان الثدي في معظم البلدان الغربية مقارنة بالعديد من البلدان النامية تُعزى جزئيًا (وربما إلى حد كبير) إلى التأثيرات الغذائية المقترنة بالولادة الأولى المتأخرة وأقصر فترة إرضاع من الثدي (Azamjah *et al*., 2019). وقد اشارت بعض الدراسات أنه، باستثناء الصين، كانت معدلات الإصابة بسرطان الثدي تتزايد في العشرين عامًا الماضية في جميع الفئات العمرية في جميع دول العالم. على الرغم من ذلك، فإنه من المشجع أن نتمكن من الحصول على الإحصائيات العالمية الحديثة لسرطان الثدي والتي تشير إلى أن معدل الوفيات آخذ في الانخفاض حاليًا في الولايات المتحدة والدول الأخرى حيث كان المرض سببًا رئيساً للوفاة (Yedjou *et al*., 2019). ويرجع ذلك إلى استخدام علاج الغدد الصم الذي يقلل من مستويات هرمون الاستروجين المنتشر أو يتنافس مع هرمون الاستروجين على الارتباط بمستقبلاته (Van Hellemond *et al*., 2018).

تصنف أورام الثدي على أنها اجتياحية (غازية) وغير اجتياحية (غير غازية)، تنتمي غالبيتها (76٪) إلى مجموعة سرطانات الثدي القنوية الاجتياحية (الغازية) (Mouabbi *et al*., 2022).

1.1.2 التغيرات الوراثية في سرطان الثدي

على الرغم من أنه لا يُعرف سوى القليل نسبياً عن الآليات الجزيئية التي تؤدي إلى تطور سرطان الثدي، فمن المحتمل أن تكون سرطانات الثدي قد تمت دراستها أكثر من أي نوع ورم آخر فيما يتعلق بتعبير الجين الورمي. تشير التقديرات إلى أن الطفرات في الجينات هي أساس(٥-١٠٪) فقط من مسببات سرطانات الثدي، ومع ذلك فهي مهمة, لأن الأفراد الذين يحملون مثل هذه الطفرات معرضون لخطر كبير للإصابة بسرطان الثدي ولتوارث هذه الطفرات الى الاجيال اللاحقة (Waks *et al*., 2022).

2.1.2 مناطق بدأ وانتشار سرطان الثدي

يمكن أن تبدأ سرطانات الثدي من أجزاء مختلفة من الثدي حيث تقسم الى عدة أنواع حسب منطقة الإصابة (Feng *et al*., 2018):

١. الفصيصات Lobules: هي الغدد التي تنتج حليب الثدي, تسمى السرطانات التي تنشأ هنا بالسرطانات المفصصة Lobular cancers.
٢. القنوات Ducts: هي قنوات صغيرة تخرج من الفصيصات وتحمل الحليب إلى الحلمة. هذا هو المكان الأكثر شيوعًا لبدء أو نشوء سرطان الثدي. تسمى السرطانات التي تبدأ هنا سرطانات الأقنية Ductal cancers.
٣. الحلمة Nipple: هي الفتحة الموجودة في جلد الثدي حيث تتجمع القنوات وتتحول إلى قناة أكبر حتى يتمكن الحليب من مغادرة الثدي. يمكن أن يبدأ نوع أقل شيوعًا من سرطان الثدي يسمى مرض باجيت Paget disease في الحلمة.

تحيط النسج الدهنية والنسيج الضام Stroma بالقنوات والفُصيصات وتساعد في إبقائها في مكانها. ينشأ هنا نوع أقل شيوعًا من سرطان الثدي يسمى ورم فيلوديس او الورم الورقي Phyllodes tumor.

يوجد أيضًا في كل ثدي أوعية دموية وأوعية لمفاوية, اذ يعدّ مرض الساركوما الوعائية Angiosarcoma من الانواع الأقل شيوعًا من سرطان الثدي الذي يمكن أن ينشأ في بطانة هذه الأوعية.

يمكن ان ينشأ عدد قليل من السرطانات في نسج أخرى من الثدي. تسمى هذه السرطانات الأورام اللحمية sarcomas والأورام اللمفاوية lymphomas ولا يُعتقد حقًا أنها سرطانات الثدي. يمكن أن

ينتشر سرطان الثدي عندما تدخل الخلايا السرطانية إلى الدم أو الجهاز اللمفاوي ثم تنتقل إلى أجزاء أخرى من الجسم.

تحمل الأوعية اللمفاوية السائل اللمفي بعيدًا عن الثدي. في حالة سرطان الثدي يمكن للخلايا السرطانية أن تدخل تلك الأوعية الليمفاوية وتبدأ في النمو في الغدد اللمفاوية, وإذا انتشرت الخلايا السرطانية إلى العقد الليمفاوية فإن هذه الخلايا لديها فرصة أكبر أنْ تنتقل عبر الجهاز اللمفاوي وتنتشر إلى أجزاء أخرى من الجسم. ومع ذلك لا تُصاب جميع النساء اللواتي يملكن خلايا سرطانية في العقد الليمفاوية بنمو ثانوي للورم الخبيث (الانتشار) وبعض النساء اللواتي لا توجد خلايا سرطانية في العقد الليمفاوية لديهن قد يصبن بالنمو الثانوي لاحقًا (Kontomanolis *et al*., 2018).

2.2 دورة الخلية وحدوث السرطان

تتضمن دورة الخلية سلسلة من الأحداث التي تؤدي إلى تضاعف الحمض النووي DNA وانقسام الخلايا. في الخلايا الطبيعية يتم التحكم في هذه العملية بعناية ولكن في الخلايا السرطانية تؤدي الطفرات في الجينات المرتبطة بدورة الخلية إلى تقدم الخلايا ذات الحمض النووي DNA التالف في دورة الخلية. عرفت مراحل دورة الخلية منذ ٤٠ عام تقريباً، ولكن في السنوات القليلة الماضية فقط تم تحديد الجينات التي تشارك في التحكم في دورة الخلية (Witkiewicz *et al*., 2022).

تنقسم دورة الخلية إلى أربع مراحل متميزة. تشكل مرحلة الفجوة الأولى (G1) وتضاعف الحمض النووي DNA (S) ومرحلة الفجوة الثانية (G2) معًا الطور البيني Interphase غالبا ما تحدث الطفرات في هذا الطور وهي الفترة من نهاية الانقسام النووي إلى بداية المرحلة التالية (Wenzel and Singh, 2018). يتبع ذلك عملية الانقسام Mitosis (M). في دورة الخلية للتقدم من الطور G1 إلى S يتطلب الأمر معقدات G1 cyclin / CDK النشطة (كيناز المعتمد على Cyclin) (Bertoli *et al*., 2013).

ان معقدات Cyclin/CDK تعمل أيضًا على فسفرة مثبط الورم Retinoblastoma susceptibility gene (RB1) مما يؤدي إلى الانفصال عن عوامل النسخ لعائلة E2F والتقدم في عملية تكوين الحمض النووي DNA (Weinberg, 1995). في الحالة الاعتيادية عند حدوث سرطان تعمل بعض الجينات على تثبيط cyclin D / CDK4 و cyclin E / CDK2 وبالتالي تمنع فسفرة ركائز البروتين اللازمة لبداية المرحلة S وبالتالي تمنع تشكيل السرطان. اما عند حدوث طفرة في الجينات المنظمة لمعقدات G1 cyclin / CDK فإن الخلايا تستمر بالانقسام غير الطبيعي, وبالتالي تكوين السرطان (Xiong *et al*., 1993).

كان يعتقد سابقا أن آلية دورة الخلية الأساسية لن تشارك في تكوين الأورام ولكن من الواضح الآن أن هذا خطأ, إذ تحدث طفرات في الجينات المشاركة في مكونات دورة الخلية، مما يؤدي إلى عدم الاستقرار الجيني وبالتالي تكوين السرطان (Engeland, 2022).

3.2 موت الخلايا المبرمج

تم وصف موت الخلايا المبرمج لأول مرة في عام 1972 من قبل العالم الاسترالي كير، وهو عبارة عن سلسلة من الأحداث الخاضعة للرقابة الجينية والتي تؤدي إلى إزالة الخلايا غير المرغوب فيها, يعد موت الخلايا المبرمج طريقة مهمة للتحكم الخلوي وأي اضطراب في هذه العملية يؤدي إلى نمو غير طبيعي (Burke, 2017).

يختلف موت الخلايا المبرمج عن التنخر أو الموت العرضي للخلايا في عدد من الطرائق المهمة منها:

أولاً، إنها عملية نشطة ومخطط لها بدلاً من كونها عملية غير مخطط لها ناتجة عن إصابة الخلية.

ثانيًا، يتم التعرف على الخلايا بوساطة الخلايا البلعمية ويتم إزالتها قبل أن تتفكك. نتيجة لذلك، لا يوجد تلف في النسج المحيطة أو اية التهابات. على النقيض من ذلك، في حالة التنخر، تصبح الخلايا متسربة وتطلق جزيئات كبيرة وتتفكك بسرعة مما يؤدي إلى حدوث تلف في النسج المحيطة او حدوث التهابات (Cetraro *et al*., 2022).

تظهر خلايا الموت المبرمج شكلًا مميزًا للغاية حيث تظهر تكاثف الكروماتين النووي وانكماش الخلية وفقدان التنظيم الموضعي للعضيات في السايتوبلازم. يُظهر الترحيل الكهربائي للحمض النووي DNA المستخرج من خلايا الموت المبرمج نمطًا مميزًا للتسلسل النيوكليوتيدي ناتج عن انقسام الكروماتين بين النواة بوساطة انزيمات القطع الداخلي Endonucleases, وهذا يختلف عن مسحة الحمض النووي DNA المتحلل التي تظهر عادة في الخلايا الميتة او المتنخرة (Haimovici *et al*., 2022).

وقد ثبت أن كل من الجينات المسببة للورم والجينات الكابحة للورم لها علاقة في السيطرة على موت الخلايا المبرمج. اذ يمارس عدد من الجينات الكابحة للورم مثل *TP53* نشاطًا مثبطًا للورم عن طريق إحداث موت الخلايا المبرمج ومع فقدان وظيفة *TP53* الكابحة للورم يؤدي إلى تقليل موت الخلايا المبرمج ونمو الورم. يعمل *TP53* عن طريق دفع الخلايا ذات الحمض النووي DNA التالف على طول مسار موت الخلايا المبرمج بدلاً من السماح لها بالاستمرار في دورة الخلية (Aubrey *et al*., 2018).

إن تثبيط عملية موت الخلايا إما عن طريق كبح تلك الجينات التي تحفز موت الخلايا المبرمج أو عن طريق تنشيط تلك الجينات التي تسبب بقاء الخلية، يساهم بالتالي في تطور الأورام. هناك اهتمام كبير في هذا المجال ليس فقط لاكتساب فهم أفضل لتكوين الأورام ولكن أيضًا لأنها قد تكون أهدافًا مناسبة للعلاج, وفي الآونة الأخيرة بدأ التحقيق في الاستراتيجيات التي تهدف إلى إحداث موت الخلايا المبرمج كبدائل للأشكال الأكثر شيوعًا من العلاج الكيميائي (Nepomuceno *et al*., 2018).

4.2 مؤشرات الأورام

مؤشرات الورم هي مؤشرات بايولوجية توجد في الدم أو البول أو نسج الجسم, والتي يمكن ان ترتفع بسبب وجود نوع واحد او اكثر من انواع السرطانات. ينتج اما عن طريق الورم نفسه او عن طريق المضيف استجابة للورم. يجب ان تكون علامة الورم المثالية محددة وحساسة على حد سواء للكشف عن الاورام الصغيرة للسماح بالتشخيص المبكر او المساعدة في الفحص. هناك قليل من العلامات تكون محددة لورم واحد. توجد علامات الاورام بكميات اعلى في نسج السرطان او في دم مرضى السرطان اكثر من دم الاشخاص الاصحاء. مؤشرات الورم مفيدة في الغالب في تقييم تقدم حالة المرض بعد العلاج الكيميائي الاولي والعلاج الاشعاعي لمراقبة استراتيجيات العلاج اللاحقة (Kabel, 2017).

ان الكشف المبكر عن السرطان سواء الاولي او المتكرر له اهمية سرسرية كبيرة, ويمكن استخدامه لاتخاذ قرارات العلاج عندما يكون حجم الورم منخفضا, وعندما يكون المرضى اكثر استعدادا للاستجابة للعلاج المساعد. في العقود الاخيرة تم الاعتماد على تقدير تراكيز المؤشرات الورمية في المصل للكشف عن نشاط الورم. توفر المؤشرات الورمية مصدرا فعالا من حيث التكلفة باقل تدخل جراحي لمراقبة مسار المرض, التنبؤ بالمرض, والمساعدة في تخطيط العلاج (Shah *et al*., 2014).

الجمعية الامريكية لعلم الاورام السريري American Society of Clinical Oncology (ASCO) قامت بتحديث توصياتها بشأن استخدام مؤشرات الاورام في الوقاية من السرطان وفحصه وعلاجه ومراقبته, حيث اوصت الجمعية باستخدام 12 فئة من علامات ورم الثدي التي اظهرت دلائل على الفائدة السريرية, تشمل: CA 15-3, CA 27-29, Carcinoembryonic antigen (CEA), Estrogen receptor (ER), Progesterone receptor (PR), Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), Urokinase plasminogen activator (Upa), Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1), P53, Cathepsin D, Cyclin E, Nestin (Maric *et al*., 2011).

1.4.2 انواع المؤشرات الورمية المرتبطة بسرطان الثدي

Carcinoembryonic antigen (CEA) 2.4.2

ينتمي الى عائلة من البروتينات السكرية السطحية يقع على الكروموسوم 19q13.2 وهو مؤشر الورم الأكثر استخداماً في الممارسات السريرية. وهو مؤشر ورم لسرطان القولون والمستقيم (الجهاز الهضمي) , الرئة والثدي (Shao *et al*., 2015).

Cancer antigen (CA) 15-3 .3.4.2

اسم هذا المؤشر مشتق من مزيج من التركيب الجزيئي والمقاييس التي تم تطويرها للكشف عن هذه العلامة. تشير الارقام 3-15 الى الاجسام المضادة المستخدمة في الاختبارات المناعية لهذه المستضدات (Shao *et al*., 2015).

CA 15-3 هو مستضد بروتيني يحتوي على كربوهيدرات تسمى الميوسين Mucine (MUC). وهو عبارة عن بروتينات سكرية كبيرة عابرة للغشاء تتكون من نواة بروتين كلايكوسيلاتيد عالية الارتباط بالأوكسجين التي تتكون من عدد متغير من وحدات متكررة من الـ٢٠ حامضاً امينياً عالية الحفظ, مصنفة الى ٧ عائلات MUC1 الى MUC7, طبقا لخصائصهم الوراثية والجزيئية الحيوية (Manuali *et al*., 2012).

CA15-3 تنتمي الى عائلة MUC1. الاختلاف في مدى الارتباط بالكلايكوسيل (محتوى الكربوهيدرات) هو الصفة المميزة بين مصادر النسج المختلفة. محتوى الكربوهيدرات في نسج الثدي يبلغ ٥٠٪ تقريباً. الوظائف الفسيولوجية الدقيقة لبروتينات MUC1 غير معروفة تماما, ولكن يبدو انه يقلل من التفاعل بين خلية وخلية وقد يمنع ايضا تحلل الخلايا السرطانية (David *et al*., 2016).

يظهر الجين MUC1 بشكل مفرط في اورام الثدي الخبيثة مما يسمح باستخدام CA 15-3 كعلامة ورم لسرطان الثدي (Manuali *et al*., 2012). يمكن استخدام تراكيز CA 15-3 في الدم للفحص, ليس فقط لسرطان الثدي ولكن ايضا للاورام الخبيثة الاخرى, بما في ذلك سرطان البنكرياس ,الرئة ,المبيض ,القولون والكبد. ومع ذلك تم تسجيل ارتفاع ايضا في امراض الكبد الحميدة والثدي الحميدة (نتائج ايجابية كاذبة)(Bahrami-Ahmadi *et al*., 2012).

هذا المؤشر له فائدة اكبر في تحديد تشخيص سرطان الثدي ومراقبة فعالية العلاج حيث تبين ان تركيزه في المصل ونسبة المرضى ذوي النسب المرتفعة لهذه العلامة تميل الى الزيادة مع شدة(مرحلة) المرض و/او حجم الورم (Shao *et al*., 2015).

CA 27-29 .4.4.2

هو مستضد بروتيني يحتوي على الكربوهيدرات ويعمل كعلامة لسرطان الثدي ويسمى ايضا بالمستضد المرتبط بسرطان الثدي (Breast carcinoma-associated antigen) (Rack *et al*., 2010). يتم انتاجه بوساطة جين MUC1. يرتبط CA 27-29 ارتباطا وثيقا بسرطان الثدي حيث إن ٨٠٪ من النساء المصابات بسرطان الثدي لديهن زيادة في مستويات CA 27-29.

Estrogen receptor (ER) .5.4.2

هي واحدة من مؤشرات الورم الناجحة في سرطان الثدي حيث لها دور في نمو الخلايا وتكاثرها وتمايزها (Kabel And Elkhoely, 2016). فضلاً عن القيمة الإنذارية فان ER هي اهم علامة

بايولوجية للاستجابة للعلاج في سرطان الثدي. وهي عضو في عائلة مستقبلات الستيرويد النووية وتعمل كمنظم للنسخ في التعبير الجيني الذي يتحكم فيه هرمون (E2) estrogen Estradiol 17P (Zwart *et al*., 2011).

Progesterone receptor (PR) .6.4.2

هي واحدة من مؤشرات الورم الناجحة في سرطان الثدي والتي تتنبأ بفعالية الاستجابة الهرمونية. وهي عضو في عائلة مستقبلات الهرمون النووية التي ترتبط على وجه التحديد بالبروجستيرون. يتم ترميز PR بوساطة جين واحد *PGR* موجود على الكروموسوم 1q22. تتكون بروتينات PR البشرية من شكلين يطلق عليهما PR-A و PR-B, يتم نسخهما من جين معين تحت سيطرة محفزات منفصلة (Jacobsen and Horwitz, 2012).

5.2 الجينات الورمية والجينات الكابحة للورم

اكتشف العلماء في سبعينيات القرن الماضي عائلتين مهمتين بشكل خاص من الجينات المرتبطة بالسرطان: الجينات الورمية والجينات الكابحة للورم (Lever *et al*., 2019).

تعرف علماء الطب ببطء على الجينات الورمية والجينات الكابحة للورم التي تضررت بسبب المواد الكيميائية أو الإشعاع وتلك التي يمكن أن تؤدي إلى الإصابة بالسرطان عند توراثها. على سبيل المثال يعد اكتشاف جينين لهما ارتباط مع سرطان الثدي في التسعينيات وهما *BRCA1* و *BRCA2* خطوة إلى الأمام لأنه يمكن استخدام هذه الجينات لتحديد الأشخاص المعرضين لخطر الإصابة بسرطان الثدي (Lee and Muller, 2010).

1.5.2 الجينات الورمية

هي جينات تقوم بتشفير بناء البروتين الذي يعتقد أنه مسبب للسرطان. تنشأ هذه الجينات من جينات تعرف بـ بادئات الجينات الورمية Proto-Oncogene وظيفتها الأساسية التحكم بدورة الخلية وتمايزها. يؤدي حدوث طفرات وراثية في هذه الجينات إلى خلل في التحكم بنمو الخلية وبالتالي تحولها لخلية سرطانية (Croce, 2008).

تخضع معظم الخلايا الطبيعية للموت الخلوي المبرمج عندما تتغير الوظائف الحيوية وتتوقف. يمكن أن تتسبب الجينات الورمية المنشطة في بقاء الخلايا التي يجب ان تخضع للموت الخلوي المبرمج على قيد الحياة واستمرار تكاثرها(Yokota, 2000). بدأت معظم الجينات الورمية كجينات بدائية ورمية Proto-Oncogene وهي جينات طبيعية تشارك في نمو الخلايا وتكاثرها أو تثبيط موت الخلايا المبرمج. إذا خضعت هذه الجينات الطبيعية التي تعزز النمو الخلوي الى طفرة تؤدي الى فقدان وظيفة البروتين، فإنها ستؤهب الخلية للإصابة بالسرطان وبالتالي يطلق عليهم اسم الجينات الورمية. عادة ما

تعمل الجينات الورمية جنبًا إلى جنب مع الطفرات الجينية أو الجينات الكابحة للورم للتسبب في الإصابة بالسرطان. حُددت عشرات الجينات الورمية عند الإنسان منذ سبعينيات القرن الماضي (Bishop, 1990).

يسمى البروتين الناتج المشفر بواسطة أحد الجينات الورمية بالبروتين الورمي حيث تلعب الجينات الورمية دورًا مهمًا في تنظيم البروتينات المرتبطة بنمو الخلايا السرطانية وتُستخدم بعض هذه البروتينات الورمية كمؤشرات ورمية (Shen *et al*., 2018).

2.5.2 الجين الورمي الاولي

هو جين طبيعي يمكن أن يصبح أحد مسببات الأورام بسبب حدوث طفرة أو زيادة في التعبير الجيني. الجينات الورمية الاولية تشفر البروتينات التي تساعد في تنظيم نمو الخلايا وتمايزها. غالبًا ما تشارك الجينات الورمية الاولية في نقل الإشارات وتنفيذ عملية الانقسام عادةً عِبْر منتجاتها البروتينية. عند حدوث طفرة في هذه الجينات يصبح الجين الورمي البدئي عاملًا محفزًا للورم وبالتالي أحد مكونات الورم (Brown, 2021).

3.5.2 الجينات الكابحة للورم

هي جينات طبيعية تعمل على إبطاء انقسام الخلايا وإصلاح أخطاء الحمض النووي DNA وإخبار الخلايا متى تموت (وهي عملية تُعرف باسم موت الخلايا المبرمج). عندما لا تعمل الجينات الكابحة للورم بشكل صحيح يمكن أن تنمو الخلايا خارج نطاق السيطرة مما قد يؤدي إلى الإصابة بالسرطان. وايضا لها دور في تنيظم الخلية خلال انقسامها وتكاثرها (Gao *et al*., 2021). إذا ان نمو الخلية دون سيطرة أو مراقبة يؤدي الى تحولها الى خلايا سرطانية. حين تطرأ طفرة على الجين الكابح للورم وبالتالي تنخفض فعاليته الوظيفية أو يفقدها تمامًا وحين تجتمع هذه الطفرة مع طفرات جينية أخرى تتمكن الخلية من النمو بصورة غير طبيعية وقد يكون فقدان وظيفة هذه الجينات ذي دور أكثر أهمية في تطور السرطانات البشرية مقارنة بتنشيط الجينات الورمية (Wang *et al*., 2018).

يمكن تصنيف الجينات الكابحة للورم في الفئات الآتية: الجينات المراقبة Caretaker genes والجينات الحارسة Gatekeeper genes والجينات المنسقة Landscaper genes (Lee and Muller, 2010). تضمن الجينات المراقبة استقرار الجينوم عن طريق إصلاح الحمض النووي DNA وبالتالي يؤدي حدوث طفرة فيها إلى تراكم الطفرات في الجينوم. أما الجينات الحارسة تنظم نمو الخلايا تنظيمًا مباشرًا عن طريق تثبيط تقدم دورة الخلية أو تحفيز الموت الخلوي المبرمج. في حين تنظم الجينات المنسقة النمو عن طريق المساهمة في البيئة المحيطة وعند حدوث طفرة فيها قد تنشئ بيئة محفزة على التكاثر غير المنظم (Chen *et al*., 2020).

على عكس الجينات الورمية تتبع الجينات الكابحة للورم عمومًا فرضية الضربتين Two-hit hypothesis التي تنص على وجوب إصابة كل من الأليلين المشفرين لبروتين معين قبل أن يظهر التأثير. في حالة تلف أليل واحد فقط في الجين يبقى الأليل الآخر قادرًا على إنتاج ما يكفي من البروتين الصحيح لأداء الوظيفة المناسبة. بعبارة أخرى، تكون الأليلات الكابحة للورم الطافرة متنحية عادةً في حين أن أليلات الجينات الورمية الطافرة سائدة إجمالًا (Knudson, 1971).

4.5.2 وظائف الجينات الكابحة للورم

تمنع البروتينات المشفرة بوساطة معظم الجينات الكابحة للورم تكاثر الخلايا أو بقائها على قيد الحياة. وبالتالي فإن تعطيل الجينات الكابحة للورم يؤدي إلى تطور الورم عن طريق القضاء على البروتينات التنظيمية. في معظم الحالات تثبط البروتينات الكابحة للورم نفس المسارات التنظيمية للخلايا التي يتم تحفيزها بوساطة الجينات المسرطنة (Cooper *et al*., 2007).

5.5.2 آليات عمل الجينات الكابحة للورم

تقوم الجينات الكابحة للورم بتشفير العديد من البروتينات الكابحة للورم منها:

١. البروتينات الداخل خلوية التي تتحكم في التعبير الجيني لمرحلة معينة من دورة الخلية. إذا لم يتم التعبير عن هذه الجينات فإن دورة الخلية لا تستمر مما يثبط انقسام الخلية بشكل فعال. (مثل pRB و P16) (Bryant *et al*., 2018).
٢. مستقبلات أو محولات الإشارة للهرمونات المفرزة أو إشارات النمو التي تمنع تكاثر الخلايا (مثل تحويل عامل النمو β−(TGF) وداء البوليبات الغدي القولوني (APC) (Morris and Chan, 2015).
٣. بروتينات التحكم في نقاط التفتيش التي تؤدي إلى توقف دورة الخلية استجابة لتلف الحمض النووي DNA أو عيوب الكروموسومات (مثل بروتين الحساسية من النوع الأول لسرطان الثدي BRCA1، P16، P14) (Takaoka and Miki, 2018).
٤. البروتينات التي تسبب موت الخلايا المبرمج. إذا تعذر إصلاح الضرر تبدأ الخلية في موت الخلية المبرمج لإزالة التهديد الذي تشكله على الكائن الحي ككل. (على سبيل المثال، P53). (Cao *et al*., 2020).
٥. الالتصاق الخلوي حيث تمنع بعض البروتينات المشاركة في الالتصاق الخلوي الخلايا السرطانية من التشتت وتمنع فقدان التلامس وتثبيط الانتشار. تُعرف هذه البروتينات باسم مثبطات الانتشار Metastasis suppressors (مثل CADM1) (Saito *et al*., 2018).

٦. البروتينات المشاركة في إصلاح أخطاء الحمض النووي DNA. تقوم جينات المراقبة بتشفير البروتينات التي تعمل على إصلاح الطفرات في الجينوم مما يمنع الخلايا من التضاعف مع طفراتها (مثل P53 وبروتين إصلاح عدم تطابق الحمض النووي 2 (MSH2) (Edelbrock *et al.*, 2013).

٧. يمكن أن تعمل بعض الجينات أيضًا كمثبطات للورم وجينات مسرطنة في الوقت نفسه. يطلق على هذه الجينات اسم الجينات الورمية البدئية ذات الوظيفة الكابحة للأورام وتعمل هذه الجينات بمثابة "عوامل مزدوجة" حيث تقوم بتنظيم النسخ بشكل إيجابي وسلبي (مثل مستقبلات *NOTCH*، *TP53,FAS*) (Shen *et al.*, 2018).

الجدول (2-1): انواع ومواقع ووظيفة عدد من الجينات الكابحة للورم (Friend et al., 1988)

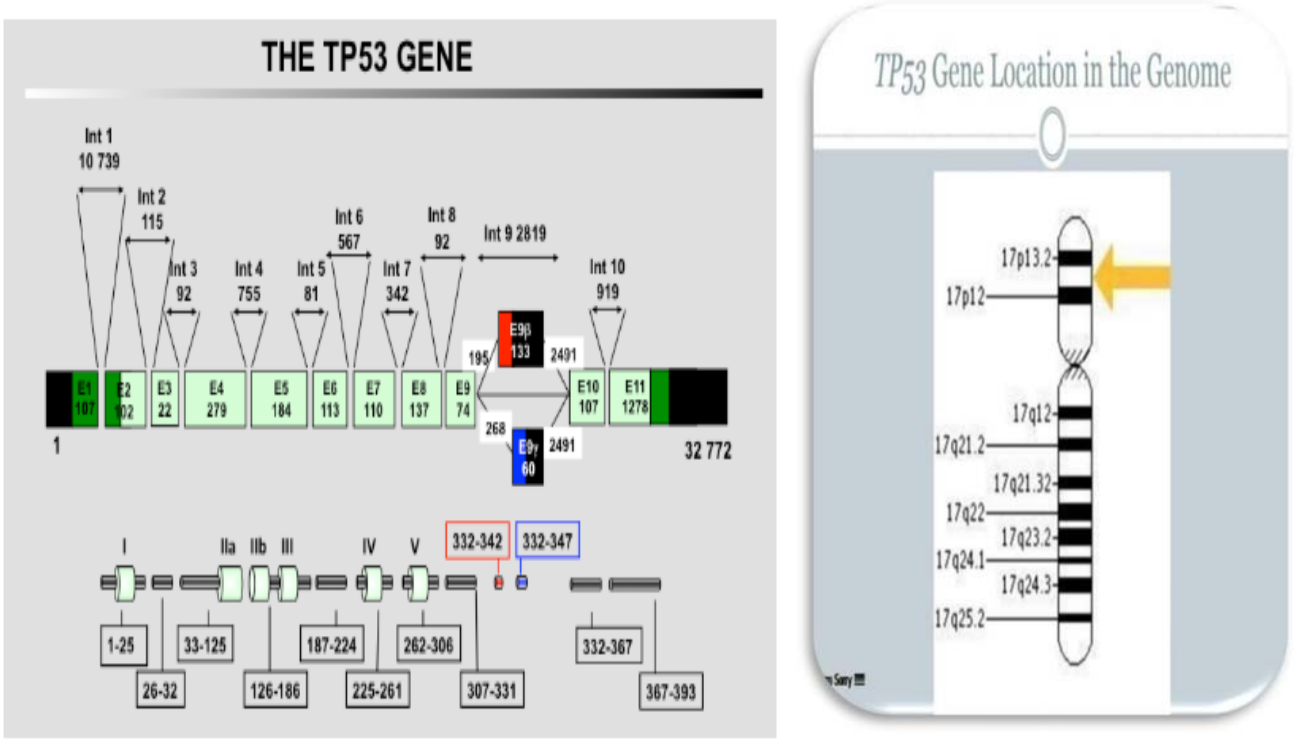
الجينات	الموقع	الورم المصاحب	الوظيفة
TP53	17p13.1	الثدي والدماغ والقولون والمستقيم وأورام اخرى	منظم للنسخ في التعبير الجيني
RB1	13q14	سرطان العظام	مثبط دورة الخلية
BRCA1	17q21	سرطان الثدي والمبيض	إصلاح الحمض النووي DNA
BRCA2	13q12.3	الثدي وبعض سرطانات المبيض	إصلاح الحمض النووي DNA
PTEN	10q23	الأورام الوعائية، البروستاتا، سرطان الثدي و بطانة الرحم	ناقل اشارة خلوي
APC	5q21	سرطانات القولون والمستقيم	تثبيط نقل الإشارة
NF1	17q11	الأورام الليفية العصبية والأورام الدبقية	تحفيز تعطيل RAS (وهي بروتينات ناقلة للإشارة)
MSH2	2p22	سرطانات القولون والمستقيم	إصلاح عدم تطابق الحمض النووي DNA
CDH1	17q22.1	سرطانات الثدي والقولون والرئة والمعدة	الالتصاق الخلوي
TSC1	9q34	سرطانات الدماغ والكلى	الحفاظ على الهيكل الخلوي

6.2 الجين *TP53*

تم اكتشاف هذا الجين من قبل أرنولد ليفين وديفيد لين ووليام أولد في عام 1979 (Hofseth *et al.*, 2004) وهو الجين الأكثر شيوعًا في السرطانات البشرية وتحتوي أكثر من 50٪ من مجموع السرطانات على طفرات في جين *TP53* وكان يُعتقد في البداية أنه أحد مسببات الأورام ولكن بعد

10 سنوات قام فريق مكون من بيرت فوغلشتاين وراي وايت بدراسة سرطان القولون فأظهرت النتائج أن الجين *TP53* هو جين مثبط للورم (Bargonetti and Prives, 2019).

TP53 هو جين كابح للورم يقع على الكروموسوم 17 (17p13.1) ويشفر البروتين P53 اذ يتكون من 393 حمضاً أمينياً. ويقع البروتين P53 في نواة الخلية ويرتبط مباشرة بالحمض النووي DNA حيث يشارك هذا البروتين (P53) في تنظيم دورة الخلية وإصلاح الحمض النووي DNA والموت الخلوي المبرمج حيث ينظم عملية الإصلاح استجابةً للعوامل الضارة بما في ذلك المواد الكيميائية والأشعة فوق البنفسجية من ضوء الشمس. إذا كان الحمض النووي DNA متطفراً أو تالفاً ولا يمكن إصلاحه فإن P53 ينقل إشارة تؤدي إلى موت الخلايا المبرمج ويمنع الخلايا من الانقسام والتطور إلى أورام (Feroz and Sheikh , 2020).



الشكل (2-1): موقع الجين *TP53* في الكروموسوم ومواقع الإكسونات التابعة له (Ismaeel, 2013).

إلى جانب ذلك فإن جين *TP53* هو أيضًا جين متعدد الأشكال إذ يحدث تعدد أشكال النيوكليوتيدات المفردة Single nucleotide polymorphisms (SNPs) عندما يتم استبدال نيوكليوتيد مفرد بآخر وهو النوع الأكثر شيوعًا للتغيير في الحمض النووي DNA وقد تؤثر هذه التغييرات على وظيفة بروتين P53 وبالتالي تزيد من خطر الإصابة بالسرطان أو تطوره أو الاستجابة للعلاج (Huszno and Grzybowska, 2018).

أَظهرت العديد من الدراسات أهمية الجين *TP53* الكابح للورم في السرطان بما في ذلك سرطان الثدي (Varna *et al*., 2011). فضلاً عن الطفرات يعتقد أن آلية ثانية تعمل على تعطيل *TP53*, حيث في بعض أنواع سرطان الثدي يمكن أن تعطل وظيفة *TP53* المثبطة للورم عن طريق عزله في السايتوبلازم ومنع دخوله إلى النواة (موقع عمله الطبيعي) (Woods *et al*., 2015). وقد تم اقتراح هذا كتفسير محتمل لتطور سرطان الثدي في الحالات التي لا تظهر أي طفرات *TP53*.

على الرغم من أن طفرات الجين *TP53* ترتبط ارتباطًا وثيقًا بتطور سرطان الثدي الا انه يمكن أن تلعب عدة عوامل أخرى دورًا في عملية الاصابة بالسرطان وتشمل هذه حالة مستقبلات هرمون الاستروجين، وتراكم البروتين P53 ومنتج MDM2 (Mouse double minute 2) المرتبط بـ *TP53* والذي تم تحديده على أنه منظم سلبي لـ *TP53* وقد يكون الإفراط في التعبير عن MDM2 آلية أخرى تتغلب بها الخلايا السرطانية على التحكم في النمو المنظم لـ *TP53* (Koo *et al*., 2022).

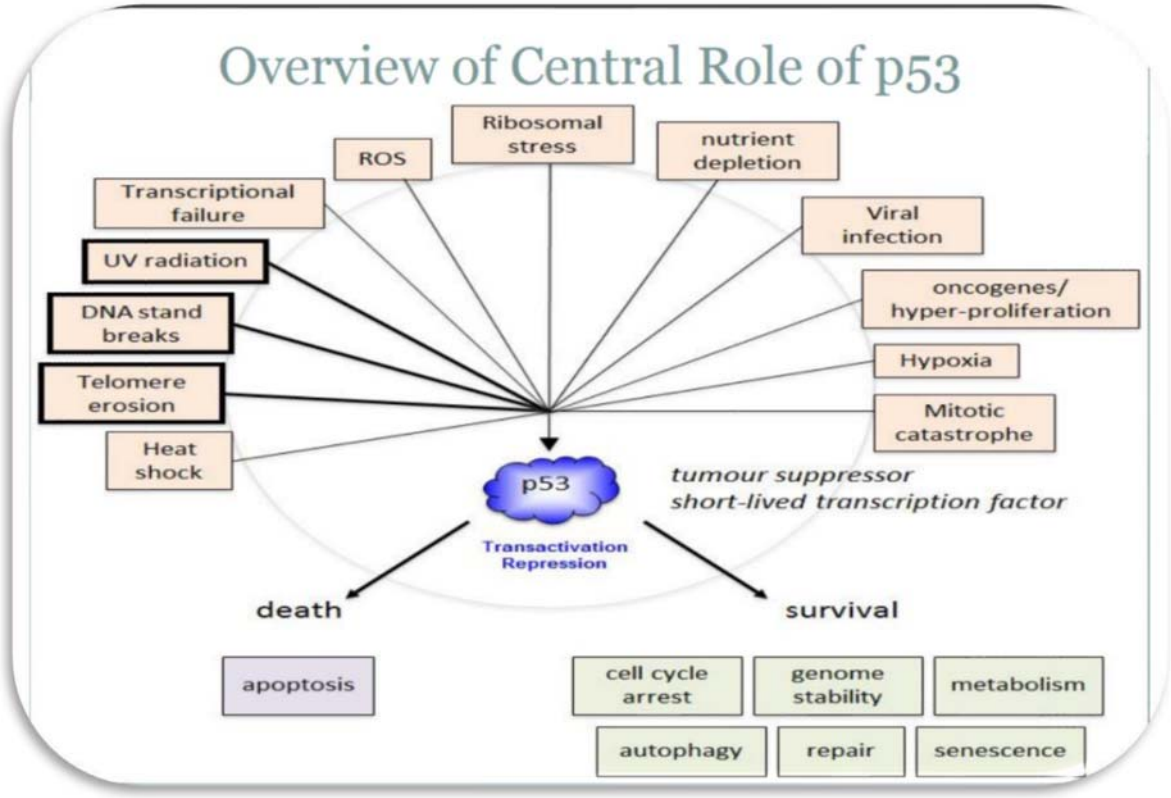
أدى الاكتشاف الأخير لاثنين من نظائر *TP53* (Paralogs) (P63 و P73) إلى تعقيد تفسير وظيفة *TP53* (Osterburg and Dötsch, 2022) حيث يتعرض بروتين P53 الوظيفي للخطر بشكل مباشر أو غير مباشر في معظم السرطانات في المقابل نادرًا ما يتم تحور P63 و P73 في الأورام البشرية.

ارتبط الخلل الوظيفي للبروتين P53 بما يقارب من 75٪ من السرطانات المختلفة وغالبًا ما يؤدي هذا الخلل بفقدان الوظيفة أو حدوث طفرات في الجين *TP53* (Muller and Vousden, 2013 ؛ Bouaoun *et al*., 2016). يتم تنشيط الجين *TP53* استجابة لتلف الحمض النووي DNA، ونقص الأوكسجين ويقوم بإصلاح الحمض النووي DNA التالف، والعمل على شيخوخة الخلايا وموت الخلايا المبرمج (Gurpinar and Vousden, 2015). هذه الأنشطة مهمة لكبح تكوين الورم وكذلك للتوسط في الاستجابات الخلوية المتعلقة بالتحكم في دورة الخلية كونها عنصرًا رئيساً أمام قمع الورم (Gurpinar and Vousden, 2015).

يتضمن أحد أكثر المجالات التي تمت دراستها هو قدرة هذا البروتين على تنظيم موت الخلايا المبرمج (Cunha *et al*., 2014 ؛ Green *et al*., 2014). حيث إن بروتين P53 يمكن أن يؤدي إلى موت الخلايا المبرمج عن طريق أعادة إدخال البروتين P53 في الخلايا النخاعية التي تعاني من نقص في بناء البروتين P53.

إلى جانب دوره في كبح الورم يساهم موت الخلايا المبرمج المعتمد على البروتين P53 في موت الخلايا الناجم عن العلاج الكيميائي (Carneiro and El-Deiry, 2020). اكدت دراسات ان الموت الخلوي المبرمج يساهم في عمل العلاج الكيميائي مما يزيد من حساسية الخلايا السرطانية

ويقلل بشكل كبير من جرعات العلاج الكيميائي وربما يقلل من آثاره الجانبية الضارة (Carneiro and El-Deiry, 2020).



الشكل (2-2): يبيّن وظائف الجين *TP53* داخل الخلايا (Talib *et al*., 2018).

1.6.2 السيطرة على تعبير P53

P53 هو بروتين مهم جدًا للحفاظ على وظائف الخلية. نظرًا لأنه بروتين يتمتع بإمكانية التحكم العالي في الخلايا ولديه القدرة على إحداث تغييرات مهمة في الأداء الخلوي يجب أن تكون آلية التحكم في تعبيره فعالة, لذلك فإن العمليات المستخدمة لتنظيم تعبير P53 يجب ان تشمل تحلله ومنع تنشيطه ومنع تكوين رباعياتP53 (Cunha *et al*., 2014).

لقد ثبت بالفعل أن تراكم P53 في خلايا عضلة القلب تسبب في موت الخلايا المبرمج للألياف وبالتالي تطور عملية قصور القلب (Mazelin *et al*., 2016).

ان الجين الورمي Mouse double minute 2 (MDM2) له أهمية كبيرة في قمع P53 ويمارس وظيفة مماثلة لبروتين Ubiquitin ligase E3 (Zhao *et al*., 2018) حيث ان MDM2 قادر على تثبيط نشاط البروتين P53 عِبْر ثلاثة مسارات, الأول هو قمع P53 حيث يرتبط معه ويشكل معقد P53 / MDM2 ويمنع تنشيط التعبير الجيني وتتمثل العملية الثانية في نقل P53 إلى العصارة الخلوية او السايتوبلازم من خلال تنظيم تركيز P53 داخل النواة أي يقوم بتقليل تركيزه داخل النواة (موقع فعالية P53)عن طريق التغذية المرتدة السلبية. تحدث العملية الثالثة في السايتوبلازم الخلوي حيث يلعب

MDM2 دوره في تحلل البروتينات (Pant and Lozano, 2014). وأظهرت تجارب التحكم بـ MDM2 أنه المنظم السلبي الرئيس لـ P53 نظرًا لأن الزيادة في تعبيره يحجب او يقمع P53 ويعزز التقدم في دورة الخلية.

لا يتفاعل الجين *TP53* في الخلايا التي لا يتضرر فيها الحمض النووي DNA, وعندما يكون هناك تلف في الحمض النووي DNA يوقف الجين دورة الخلية حتى يتمكن من إصلاح الضرر. إذا كانت هناك طفرة في *TP53* فإن دورة الخلية تستمر دون قيود وتعيد إنتاج الحمض النووي DNA التالف مما يؤدي إلى تكاثر خلايا غير مسيطر عليه وتكوين الأورام السرطانية. ينتج السرطان عندما تنقسم الخلية ذات الحمض النووي DNA التالف (Berke *et al*., 2022).

تحتوي جميع الخلايا السرطانية على طفرات في مجموعة من مثبطات الأورام والجينات المسرطنة. تسمح إزالة P53 الوظيفي من الخلية بتراكم المزيد من الحمض النووي DNA التالف وانقسام اكثر للخلايا التي تحتوي على هذا الحمض النووي DNA التالف. تعد طفرة البروتين P53 واحدة من أكثر التباينات الوراثية شيوعًا في الخلايا السرطانية, فضلاً عن الطفرات التي تظهر أثناء نمو الأفراد وتطورهم (الطفرات المتفرقة) هناك أشكال من السرطانات مرتبطة بوراثة نسخة تالفة من الجين *TP53* (Timofeev, 2021).

2.6.2 تنشيط الجين *TP53*

تحت الظروف العادية يكون الجين *TP53* ساكن لا يتداخل مع تقدم دورة الخلية حيث يعد *TP53* ليس ضروريًا للأداء الطبيعي للخلايا داخل الجسم, ويمكن أن تؤدي مجموعة متنوعة من الحالات إلى تحفيز سريع لنشاط البروتين P53 والذي يمثل 5 أنواع من الإجهاد. تتضمن هذه الحالات تلفًا للحمض النووي DNA علاوة على تلف المكونات المشاركة في فصل المادة الوراثية الخلوية (على سبيل المثال المغزل الانقسامي ونقص الأكسجة والصدمة الحرارية والتعرض لأوكسيد النتريك (NO) (Bargonetti and Prives, 2019).

يعدّ تراكم التباينات الوراثية في الجينات من أهم الآليات المسببة للسرطان وبالتالي فإن الحث السريع لنشاط *TP53* استجابةً للضرر الجيني يعمل على ضمان العناية الفعالة للخلايا التي تحمل مثل هذا الضرر علاوة على ذلك قد يساهم *TP53* أيضًا بشكل مباشر أو غير مباشر في عمليات إصلاح جزيئات DNA معينة. فضلاً عن ذلك يتم تحفيز نشاط *TP53* بوساطة مجموعة متنوعة من البروتينات المسببة للأورام مثل Myc و Ras و Adenovirus E1A و β - catenin وقد يتضمن تنشيط *TP53* أيضًا تغيير في الموقع الخلوي, في حين أن *TP53* الساكن او الخامل قد يكون في السايتوبلازم على الأقل في جزء من دورة الخلية فإن التعرض للإجهاد يؤدي إلى تراكمه في النواة التي تعدّ مكان اداء أنشطته الكيميائية الحيوية (Zhang *et al*., 2020).

3.6.2 تثبيط عمل الجين *TP53*

قد يحدث تثبيط عمل بروتين P53 في الحالات الآتية: التباينات الوراثية، تفاعلات بروتين P53 مع البروتينات الكابحة الاخرى وتفاعل P53 مع البروتينات الفيروسية. من بين الحالات المذكورة فإن أكثر الحالات التي تمت دراستها هي التباين الوراثي بسبب الطفرات الجينية (Muller and Vousden, 2014).

تعد الطفرات النقطية وتبادل واحد أو أكثر من النيوكليوتيدات أكثر أنواع التباينات الوراثية شيوعًا الموجودة في الأورام مما يؤدي إلى تكوين بروتين غير وظيفي. تؤدي هذه الطفرات إلى حدوث تغييرات أيضية في الخلية، تمنع توقف دورة الخلية، وتمنع فحص الحمض النووي DNA وإصلاحه (Hientz *et al*., 2017).

اشار العديد من الباحثين الى أهمية الجين *TP53* في تقييم الأورام التي يوجد بها نقص *TP53*. في حالة متلازمة Li-Fraumeni يرث المرضى الجين الطافر في أليل *TP53* مما يجعلهم عرضة للإصابة بالسرطان في سن مبكرة مثل الأورام اللحمية, سرطان الثدي, سرطان الدم, الأورام اللمفاوية وأورام الدماغ (Macedo *et al*., 2016).

في الخلية الطبيعية يتمتع البروتين P53 بنصف عمر قصير والذي قد يستمر لدقائق قبل تحلله ولا يمكن اكتشافه بوساطة اختبارات الكيمياء النسجية المناعية (IHC) Immunohistochemistry. بينما تعبر بعض طفرات الجين *TP53* بشكل عام عن بروتينات متغيرة ذات عمر نصف أطول وهو ما يفسر سبب اكتشافها بوساطة IHC (Raffone *et al*., 2020).

تشير هذه الطبيعة المزدوجة لـ P53 (الحماية وموت الخلايا) إلى احتمال أن يعمل P53 أيضًا كمحفز للورم. قد تؤدي الوظيفة المضادة للموت المبرمج للبروتين P53 إلى بقاء الخلايا التالفة في ظل ظروف متطفرة, مما قد يزيد من احتمالية تحول الخلايا الى خلايا مسرطنة (Datta *et al*., 2020).

البروتين الرئيس في تنظيم *TP53* هو بروتين Mdm2 وهو ناتج أحد الجينات الورمية والذي يؤدي نشاطه الزائد إلى تسهيل ظهور عدة أنواع من السرطانات البشرية. يظهر Mdm2 علاقة فريدة مع P53 حيث يرتبط بروتين Mdm2 بالجين *TP53* ويثبطه (Jiang and Zawacka-Pankau, 2020).

يمكن لـ Mdm2 بقمع عملية النسخ عند ربطه بـ *TP53* والأهم من ذلك يمكن أن يؤدي ارتباط Mdm2 أيضًا إلى القضاء التام على *TP53* عِبْر التحلل البروتيني. من ناحية أخرى يرتبط *TP53* على وجه التحديد بجين Mdm2 ويحفز نسخه. في بعض أنواع السرطانات التي تصيب الإنسان يمكن أن يؤدي التعبير المفرط عن Mdm2 الذي يتحقق عن طريق تضخيم الجين Mdm2 أو آليات أخرى إلى

تثبيط البروتين P53 وبالتالي تعزيز السرطان دون الحاجة إلى تغيير الجين *TP53* نفسه ويمكن للتعبير الزائد لـ Mdm2 ان يحفز أيضًا السرطان بشكل مستقل عن *TP53* (Wang *et al*., 2017).

4.6.2 الطفرات في الجين *TP53*

يؤدي فقدان نشاط الجين *TP53* إلى استعداد الخلايا لاكتساب الطفرات التي تؤدي الى حدوث السرطان وقد يؤدي إلى عدم الاستقرار الجيني حيث يحدث تثبيط البروتين P53 بشكل رئيس عِبْر الطفرات النقطية على الرغم من اكتشاف عمليات حذف او إدخال نيوكليوتيدات في الجين أيضًا (Pitolli *et al*., 2019).

يمكن التمييز بين عدة فئات من طفرات P53 عن طريق مراعاة تأثير الطفرة على تركيب واستقرار البروتين أو التفاعل مع الحمض النووي DNA ومنها: (أ) النوع الأول: الطفرات الخاطئة Missense mutations التي تؤثر على بقايا السطح المرتبط بالحمض النووي DNA وتعطيل نقاط اتصال الحمض النووي DNA بالبروتين (مثل p53-Trp248 و p53-His273)؛ (ب) النوع الثاني: الطفرات الخاطئة التي تعطل تكوين او تشكيل البروتين (مثل p53-Ala143، p53- His175، p53-His179، و p53-Gly281) و(ج) النوع الثالث: الطفرات الفارغة Null mutations التي تدمر تمامًا وظائف البروتين [insertions/deletions mutations, nonsense mutations, and splicing junction mutations] (Rivlin *et al*., 2011).

من المعتقد عمومًا أن بروتين P53 يفقد وظيفته المثبطة للورم نتيجة لطفرة في الجين *TP53*, مما يعني انه لن يحدث توقف لدورة الخلية أو موت الخلايا المبرمج بعد تلف الحمض النووي DNA. ومع ذلك تشير العديد من الدراسات إلى أن أنواعًا معينة من طفرات البروتين P53 والتي تسمى طفرات اكتساب الوظيفة تؤدي وظائف لا يمارسها النوع الطبيعي لـP53 (Liu *et al*., 2014).

تحدث طفرات الجين *TP53* الكابح للورم في 50٪ من كل الأورام, ويلعب دورًا مهماً في تسرطن العديد من الأورام الخبيثة المختلفة (Duffy *et al*., 2022). ويتطفر الجين في أكثر من 90٪ من حالات سرطان الخلايا الحرشفية في الرأس والرقبة (De Bakker *et al*., 2021). في المقابل فإن حدوث طفرات *TP53* منخفض جدًا في أورام الدم الخبيثة (Saxena and Konopleva, 2020).

للتغييرات في الجين *TP53* تأثيرات مختلفة عديدة على نشاط الجين اعتمادًا على موقع التغيير. يمكن أن تؤدي الطفرة في منطقة المحفز Promoter إلى نقص أو غياب بروتين P53 في الخلية. او يمكن أن يكون للطفرات التي تحدث في منطقة تشفير البروتين في الجين تأثير في التعبير عن الجين (نشاط البروتين) (Moxley and Reisman, 2021).

اشارت الدراسات ان طفرات *TP53* الجينية الموروثة تزيد من خطر الإصابة بأنواع عديدة من السرطان بما في ذلك سرطان الثدي وسرطان الدم وأورام الجهاز العصبي المركزي

(CNS) وسرطان قشرة الغدة الكظرية كجزء من متلازمة Li - Fraumeni Syndrome (LFS) (Tang *et al.*, 2020). في دراسة سابقة لوحظت طفرات الجين *TP53* في (2-3 ٪) من المرضى الذين يعانون من سرطان الثدي المبكر (Waks *et al.*, 2022).

الطفرات في جين *TP53* تحدث في 40٪ تقريباً من جميع حالات سرطان الثدي وتحدث بشكل متكرر ومن المرجح أن تكون الأورام التي تحتوي على طفرات الجين *TP53* خطرة اكثر (Hainaut and Pfeifer, 2016).

ترتبط أورام الثدي من مرضى متلازمة Li-Fraumeni بطفرات وراثية داخل exon 7 من الجين *TP53*. هذه الطفرات هي في المقام الأول تحولات CG-TA في ثنائي النوكليوتيداتCG (Frebourg *et al.*, 2020). ترتبط أورام الثدي المتفرقة (غير الموروثة) بطفرات متجمعة داخل الاكسونات5 و 6 و 7 و 8. أظهرت العديد من الدراسات المشاركة المحتملة لعدد من الجينات الأخرى المثبطة للورم والعديد من الجينات المسرطنة في تطور المرض (Mueller and Roskelley, 2002).

ففي الانسان، ما يقرب من 75٪ من الطفرات الموجودة في البروتين P53 هي الطفرات الخاطئة Missense mutation والتي تتكون من استبدال النوكليوتيدات التي تؤدي إلى تبادل الأحماض الأمينية. هذه التغييرات حتى لو كانت صغيرة يمكن أن تعزز تكوين بروتين متغير مما يولد ميزة انتقائية بدلاً من فقدان وظيفة البروتين تمامًا (Brosh and Rotter, 2009).

5.6.2 تعدد أشكال *TP53* في سرطان الثدي

يُعرَّف تعدد اشكال النيوكليوتيد المفرد (SNP) Single nucleotide polymorphisms بأنه تغيير نيوكليوتيد مفرد في تسلسل الحمض النووي DNA ويحدث في 1٪ من السكان ويعد الـSNP هو النوع الأكثر شيوعًا للتغيير في الحمض النووي DNA (Brentnall *et al.*, 2020).

إن الـSNP الأكثر شيوعًا (SNP72؛ rs1042522) هو تباين G / C في الموقع الثاني من كودون 72 في إكسون 4 مما يؤدي إلى تغيرات بروتينية (Arg72 أو Pro72) وهذه التغييرات تلعب أدوارًا في أنواع عديدة من السرطانات (Basabaeen *et al.*, 2019).

وجد أن تكرر او تردد SNP72 يختلف بين المرضى القوقازيين والصينيين والأمريكيين من أصل أفريقي حيث يعدّ متغير Arg72 أكثر شيوعًا في المرضى القوقازيين، بينما تم اكتشاف ان متغير Pro72 هو الاكثر شيوعا في المرضى الصينيين والأمريكيين من اصل افريقي (Hebert-Magee *et al.*, 2019). ويقع متغير Pro72 داخل منطقة غنية بالبرولين وقد يتسبب في إيقاف دورة الخلية وإصلاح الحمض النووي DNA بينما وجد أن متغير Arg72 أكثر كفاءة في إحداث موت الخلايا المبرمج نظرًا لقدرته الأكبر على التفاعل مع MDM2 من متغير Pro72 (Basabaeen *et al.*, 2019).

7.2 بروتين P53

البروتين P53 هو عبارة عن بولي ببتيد يتكون من 393 حامض اميني, ويحتوي على خمسة مجالات وظيفية (Vieler and Sanyal, 2018):

١. المجال الطرفي النتروجيني N-terminal domain (residues ١-٤٣) هذا المجال متضمن في عملية تفعيل النسخ.
٢. المجال الغني بالبرولين Proline rich domain (residues ٦٣–٩٧) يرتبط Mdm2 بهذين المجالين (المجال الاول والثاني).
٣. المجال المركزي الكبير Central domain (residues ١٠٠–٣٠٠) الذي يتضمن ربط الحمض النووي DNA، وهو موقع كل طفرات الجين *TP53* السرطانية تقريبًا.
٤. مجال القلة المتجانسة Homo-oligomerisation domain: [residues ٣٠٧–٣٥٥] رباعي الوحدات ضروري لنشاط P53 في الجسم الحي.
٥. المجال الطرفي الكربوني C-terminal domain (residues ٣٦٤–٣٩٣) هو مجال تنظيمي سلبي يشارك في تنظيم ربط الحمض النووي DNA في المجال المركزي.

1.7.2 الوظائف الخلوية لـ P53

يوجد عدة وظائف للبروتين P53 (Chen, 2016) أهمها:

١. يمنع التقدم اثناء دورة الخلية استجابةً لتلف الحمض النووي DNA مما يسمح بإصلاح الحمض النووي DNA قبل تضاعف الجينوم, ومن ثم يمنع P53 نقل المعلومات الوراثية التالفة من جيل إلى آخر حيث يقوم بذلك عن طريق الارتباط بعامل نسخ يسمى E2F.
٢. تبدأ عملية الموت الخلوي المبرمج إذا كان الضرر الذي يلحق بالخلية شديدًا ويعمل بمثابة كبح طارئ لتطور السرطان عن طريق قتل الخلايا التي تحاول التكاثر في مناطق الأورام التي تعاني من نقص الأوكسجين.
٣. غالبًا ما يكون بمثابة مثبط للورم حيث يمكن أن تتسبب الطفرات في البروتين P53 في تشكيل الخلايا السرطانية.
٤. P53 هو عامل نسخ فعال وبمجرد تنشيطه فإنه يمنع نسخ مجموعة من الجينات (العديد منها يشارك في تحفيز نمو الخلايا), بينما يحفز التعبير عن جينات أخرى مشاركة في التحكم في دورة الخلية, إذ يعد *P21* واحدة من أهمها وهو منظم سلبي للكينازات المعتمدة على السايكلين CDK والإنزيمات التي تعدّ حاسمة في تقدم دورة الخلية وفي النهاية انقسام الخلية. عن طريق تحفيز نسخ الجين *P21* يمنع P53 تكاثر الخلايا ويتيح هذا التوقف الفرصة للخلية لإجراء بعض الإصلاحات, اما إذا حدث تلف كبير في الحمض النووي DNA فيمكن أن يساعد في تحفيز موت الخلايا.

٥. تعدّ وظيفة P53 مهمة للطريقة التي تقتل بها الخلايا من قبل العديد من علاجات السرطان, حيث يعمل العلاج الإشعاعي والعلاج الكيميائي جزئيًا عن طريق تحفيز موت الخلايا استجابة لتلف الحمض النووي DNA.

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل

Materials and Methods

المواد وطرائق العمل

1.3 الأجهزة المستخدمة

استخدمت في الدراسة الحالية اجهزة مختلفة لغرض اجراء الاختبارات الجزيئية والكيموحيوية في دم المرضى المصابين بسرطان الثدي والاصحاء وكما مبين في الجدول (٣-١).

الجدول (3-1): الأجهزة المستخدمة في طرائق العمل للدراسة الحالية

الاجهزة المستخدمة	
المحرك المغناطيسي المزود بوحدة تسخين	Heating Magnetic stirrer
الترحيل الكهربائي	Electrophoresis EFD- 300
هزاز الانابيب	Test tube shaker (Vortex)
التعقيم (المؤصدة)	Portable
المبلمر الحراري	Thermo cyclers
جهاز تفاعل البلمرة المتسلسل	Polymerase chain reaction
الطرد المركزي	Centrifuge
الطرد المركزي الدقيق	Microfuge
حاضنة	Incubator
ماصات دقيقة	Micropipettes
مجهز القوة للهجرة الكهربائية	Electrophoresis- power supply
مطياف الاشعة الفوق البنفسجية والمرئية الضوئي	UV-visible spectrophotometer
مقياس الدالة الحامضية	pH-meter
ميزان حساس	Analytical balance
الامتزاز المناعي المرتبط بالانزيم	Labtech LT-4000 Micro plate Reader
الغسل	Labtech LT-3000 Micro plate Washer
مقياس الطيف النانوي	Nano Drop 2000 Spectrophotometer
المحلل الجيني	Genetic Analyzer
التصوير الهلامي	Gel Documentation Wise UV-M 20

2.3 عينات الدراسة Study Case

شملت الدراسة الحالية 95 امرأة بأعمار تراوحت بين (35-45) سنة من المراجعات الى مستشفى الاورام والطب النووي البديل في مدينة الموصل في مدة زمنية تراوحت من شهر ايلول الى شهر تشرين

الثاني من عام 2021، وتم الاعتماد على الحالات السريرية للمرض في اختيار العينات، وتم تقسيم العينات الى مجموعتين بالاعتماد على الاختبارات الكيموحيوية:

المجموعة الاولى: شملت هذه المجموعة 21 امرأة من النساء اللواتي لايعانون من اي مشاكل وعدت كمجموعة سيطرة.

المجموعة الثانية: شملت هذه المجموعة 74 امرأة من النساء المصابات بسرطان الثدي بالاعتماد على الفحوصات الكيموحيوية.

3.3 جمع نماذج الدم وحفظها Collection of Blood sample

تم سحب 5.0 مل من الدم الوريدي من النساء وتم تقسيمه على جزءَين، الاول وضع في انابيب تحتوي على مادة مانعة للتخثر EDTA والتي استخدمت في استخلاص الدنا المجيني، والجزء الثاني وضع في انابيب خالية من أي مادة مانعة للتخثر وتركت لمدة ساعة واحدة لحين تخثر الدم، ثم اجري لها عملية طرد مركزي لمدة 10 عشر دقائق بسرعة 3000 دورة / دقيقة للحصول على مصل الدم لغرض اجراء الاختبارات الكيموحيوية المختلفة.

4.3 الاختبارات الجزيئية

1.4.3 استخلاص الحمض النووي الرايبوزي منقوص الاوكسجين DNA extraction

تم عزل الـ DNA من الدم لجميع العينات التي شملتها الدراسة وهي 95 عينة بالاعتماد على الطريقة المحورة من قبل (Iranpur and Esmailizadeh, 2010).

١.١.٤.٣ المحاليل المستخدمة في استخلاص الـ DNA

١. محلول EDTA pH 8.0 بتركيز (0.5M)

اضيف 186.1 غم من مادة الاثيلين ثنائي الامين رباعي حامض الخليك EDTA الجافة الى 800 مل من الماء المقطر وضبطت الدالة الحامضية عند pH 8.0 باستخدام هيدروكسيد الصوديوم NaOH، واكمل الحجم الى 1 لتر بالماء المقطر, تم تعقيم المحلول المنظم بالموصدة بدرجة 121 مْ وضغط 15 p.s.i لمدة 15 دقيقة.

2. محلول Tris-Hcl pH 7.6 بتركيز (1M)

ذوب 121.1 غم من مادة Tris base في 800 مل من الماء المقطر وضبطت الدالة الحامضية عند PH 7.6 باستخدام حامض HCl واكمل الحجم الى 1 لتر بالماء المقطر، وعقم المحلول المنظم بالموصدة بدرجة 121 مْ وضغط 15 p.s.i لمدة 15 دقيقة.

3. محلول Red Blood Cell Lysis Buffer يتكون هذا المحلول من:

(0.01 M) Tris-HCl

(320 mM) sucrose
(5 mM) $MgCl_2$
(%1) Triton-100X

حضر هذا المحلول باضافة 10 مل من 1M Tris و 109.54 غم من السكروز و1.01 غم من كلوريد المغنيسيوم و10 مل من Triton-100X الى 800 من الماء المقطر، وضبطت الدالة الحامضية عند pH 8.0 ومن ثم اكمل الحجم الى 1 لتر بالماء المقطر، وعقم المحلول باستخدام الموصدة بدرجة 121 مْ وضغط 15 p.s.i لمدة 10 دقائق.

٤. **محلول Nucleic Lysis Buffer** يتكون هذا المحلول من:

(0.01M)Tris-HCl
(11.4 mM) Sodium citrate
(1mM) EDTA
(1%) Sodium Dodecyl Sulphate

حضر هذا المحلول باضافة 10 مل من 1M Tris-HCl ذو الدالة الحامضية pH 7.6 و3.75 غم من EDTA و10 غم من مادة SDS و 2.94 غم من سترات الصوديوم الى 800 مل من الماء المقطر وضبطت الدالة الحامضية عند pH 8.0، واكمل الحجم الى 1 لتر بالماء المقطر واخيرا عقم المحلول بالموصدة بدرجة 121 مْ وضغط 15 p.s.i لمدة 15 دقيقة.

5. محلول TE Buffer

حضر هذا المحلول بأخذ5 مل من (1M Tris-HCl (pH 7,6 و 2 مل من 0.5M EDTA (pH 8.0) واكمل الحجم الى 1 لتر بالماء المقطر وضبطت الدالة الحامضية عند pH 8.0 بالموصدة بدرجة 121 مْ وضغط 15 p.s.i لمدة 15 دقيقة.

6. كلوروفورم Chloroform

7. ايثانول مبرد بتركيز (100%) بدرجة (20-) مْ

2.1.4.3 طريقة الاستخلاص للحمض النووي DNA

١. سحب 500 مايكروليتر من عينة الدم، ووضعت في انبوبة الابندروف بحجم 1.5 مل، ثم اضيف اليها 1 مل من محلول RBC lysis ومزجت بهدوء باستخدام جهاز هزاز الانابيب Vortex.
٢. وضعت الانبوبة في جهاز الـ microfuge بسرعة 7000 دورة لمدة دقيقتين، واهمل الراشح، واعيدت الخطوات السابقة من (1−3) مرات للتخلص من الهيموكلوبين. ووضعت انبوبة الابندروف على ورقة نشاف بشكل مقلوب لعدة ثوان.
٣. اضيف 400 مايكروليتر من محلول Nucleic lysis الى انبوبة الابندروف ومزجت بهدوء.

٤. اضيف ١٠٠ مايكروليتر من محلول 1M NaCl المشبع، ثم اضيف 600 مايكروليتر من الكلوروفورم الى انبوبة الابندروف ومزجت المحتويات بهدوء، ومن ثم توضع في جهاز الـmicrofuge بسرعة 7000 دورة لمدة دقيقتين.

٥. أخذ 400 مايكروليتر من الراشح ووضع في انبوبة ابندروف جافة ونظيفة واضيف اليها 800 مايكروليتر من الايثانول البارد ومزجت محتويات الانبوبة بهدوء، في هذه المرحلة تظهر حزم الـDNA بشكل خيوط بيضاء.

٦. توضع الانبوبة في جهاز الـ microfuge بسرعة 12000 دورة لمدة دقيقة واحدة، ومن ثم تم التخلص من الراشح وتركت الانبوبة لتجف في درجة حرارة الغرفة.

٧. اضيف 50 مايكروليتر من محلول TE الى الـDNA المستخلص ومزج بهدوء وحفظت العينة بدرجة (−20)°م لحين استخدامها.

3.1.4.3 تقدير نقاوة وتركيز الـDNA المستخلص

تم تقدير نقاوة وتركيز الـ DNA المستخلص من العينات التي شملتها الدراسة باستخدام جهاز الـNanodrop.

4.1.4.3 المحاليل المستخدمة في عملية الترحيل

1. محلول SB بقوة 1X

تم وزن 0.4 غم من مادة NaOH واذيبت عند درجة حرارة خفيفة في 500 مل من الماء المقطر ثم اضيفت مادة Boric acid الى المحلول مع ضبط الدالة الحامضية الـ PH الى8 , ثم اكمل الحجم الى 1 لتر واستخدم المحلول مباشرة دون تخفيف.

2. محلول التحميل بقوة Loading buffer 10X

حضر باذابة 0.25 غم من صبغة البروموفينول الزرقاء في الكليسيرول بتركيز 50% واضيف EDTA بتركيز 60 mM بعد ضبط الدالة الحامضية pH= 8.0، واكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر.

5.1.4.3 تحضير هلام الاكاروز وعملية الترحيل الكهربائي لـ DNA

لترحيل الـ DNA المجيني والكشف عنه, تم تحضير هلام الاكاروز بتركيز 1% ولتحضيره تم اذابة 0.5 غم من مسحوق الاكاروز في 50 مل من 1X SB واضافة 3 مايكرون من صبغة Red safe باستخدام مصدر حراري مع التحريك المستمر حتى الغليان, وترك ليبرد الى درجة حرارة (50-60) °م.

وصب محلول الهلام في الحوض الخاص Tray بجهاز الترحيل بعد تثبيت المشط الخاص لتكوين الحفر Wells عند اطراف الهلام ويكون الصب بهدوء لتجنب تكون الفقاعات، وفي حالة تكون فقاعات

يجب ازالتها باستخدام الماصة، بعد ذلك ترك الهلام الى ان يتصلب, بعدها تم وضع الـ Tray في حوض الترحيل الكهربائي الحاوي على كمية مناسبة من محلول 1X SB بعدها تم رفع المشط بهدوء.

تم تحضير عينات الترحيل بمزج 5 مايكروليتر من عينة الـ DNA مع 3 مايكروليتر من محلول التحميل. تم بعدها تشغيل جهاز الترحيل بإمرار التيار الكهربائي بفرق جهد 5 فولت \ سم واستغرقت العملية من(٤٥-٦٠) دقيقة. بعدها تم تصوير الهلام تحت الاشعة فوق البنفسجية باستخدام جهاز التصوير الهلامي Gel Documentation للتمكن من رؤية حزم الـ DNA والبدء بإجراء اختبارات الـ PCR.

5.3 تفاعلات الـ PCR-RFLP

تم ضبط تركيز الـDNA في جميع العينات المدروسة بالتخفيف بوساطة محلول TE Buffer للحصول على التركيز المطلوب لاجراء تفاعلات الـ PCR وكان 25 نانوغرام \ مايكروليتر لكل عينة. تم تحضير خليط التفاعل الرئيس Master Reaction لكل تفاعل PCR وذلك بمزج عينة الـDNA والبادئ الخاص لكل طفرة مع مكونات الـ Master-mix داخل انبوبة الابندروف سعة 0.2 مل والمجهز من قبل شركة Promega الامريكية, واكمل حجم التفاعل الى 20 مايكروليتر بالماء المقطر، ويتم نبذ المزيج في جهاز Spin Microfuge لمدة (3-5) ثوانٍ لاتمام مزج مكونات التفاعل، بعد ذلك ادخلت انابيب التفاعل في جهاز المبلمر الحراري Thermocycler لاجراء التفاعل التضاعفي باستخدام البرنامج الخاص لكل تفاعل، بعد ذلك تم تحضين ناتج تفاعل الـ PCR مع الانزيم القاطع الخاص لكل طفرة لمدة 3 ساعات, تم تحميل العينة في حفر هلام الاكاروز المحضر مسبقا بتركيز 2% مع الدليل الحجمي Ladder DNA المجهز من شركة BioLaps، بعدها يتم ترحيل العينات وذلك بتشغيل جهاز الترحيل الكهربائي لمدة (75-90) دقيقة واخيرا تصوير الهلام باستخدام جهاز الـ Gel Documentation.

1.5.3 الكشف عن وجود الطفرة (codon 249) للجين *TP53* في الاكسون 7

تم الكشف عن وجود الطفرة **C** ⟶ **G** في الموقع (codon 249) Exon 7 اذ تمت اضافة 100 نانوغرام من الـDNA القالب و10 بيكومول من البادئ الخاص بالطفرة المجهز من قبل شركة Macrogen الى محتويات الـ Master mix (Vijayaraman *et al*., 2012).

الجدول (3-2): البوادئ المستخدمة في تحديد التباين الوراثي في الموقع (codon 249) باستخدام تقنية الـ PCR

primer	sequence	Band size	annealing
Forward	5’ GGCGACAGAGCGAGATTCCA 3’	286 bp	55
Reverse	5’ GGGTCAGCGGCAAGCAGAGG 3’		

ثم ادخال انابيب التفاعل في جهاز المبلمر الحراري لإجراء التفاعل التضاعفي وباستخدام البرنامج الخاص للتفاعل وكما موضح في الجدول (٣-٤).

الجدول (٣-٣): البرنامج المعتمد في تقنية الـPCR لتحديد الطفرة (codon 249)

No.	Stage	Temperature	Time	Cycle number
1.	Initial denaturation	95	5 min.	1
2.	denaturation	95	45 sec.	35
3.	Annealing	61	1 min.	
4.	Extension	72	1 min.	
5.	Final extension	72	7 min.	1
6.	Stop reaction	4	5 min	1

بعد انتهاء التفاعل رفعت الانابيب من جهاز المبلمر الحراري, وتم سحب 5 مايكروليتر وحضن مع الانزيم القاطع (*Hae-III*) بتركيز 5 وحدات المجهز من قبل شركة BioLaps لمدة 3 ساعات بدرجة حرارة (37) °م.

6.3 تفاعلات الـ Tetra-ARMS PCR

تم ضبط تركيز الـDNA في كافة عينات الدراسة بالتخفيف بوساطة المحلول المنظم TE Buffer للحصول على التركيز المطلوب لاجراء تفاعلات الـ PCR وبحجم 25 نانوغرام \ مايكروليتر لكل عينة. اذ يتم اضافة اربعة بوادئ اذ يكون ناتج تفاعل ثلاث حزم الاولى هي قطعة الجين الكامل والثانية للاليل الطبيعي والثالثة للاليل الطافر.

تم تحضير خليط التفاعل الرئيس Master Reaction لكل تفاعل PCR وذلك بمزج عينة الدنا والبادئ الخاص لكل طفرة مع مكونات الـ master-mix داخل انبوبة الابندروف سعة 0.2 مل والمجهز من قبل شركة Biolaps الانكليزية, واكمل حجم التفاعل الى 25 مايكروليتر بالماء المقطر، ويتم نبذ المزيج في جهاز Microfuge لمدة (3-5) ثوانٍ للتاكد من مزج مكونات التفاعل، ثم ادخلت انابيب التفاعل في جهاز المبلمر الحراري Thermocycler لغرض اجراء التفاعل التضاعفي باستخدام البرنامج الخاص لكل تفاعل، بعدها تم تحميل العينة في حفر هلام الاكاروز المحضر مسبقا بتركيز 2% مع اضافة الدليل الحجمي DNA Ladder المجهز من شركة Biolaps في احدى الحفر، بعد ذلك تم ترحيل العينات باستخدام جهاز الترحيل الكهربائي Electrophoresis لمدة تتراوح بين (60-70) دقيقة بعد ذلك تم تصوير الهلام باستخدام جهاز التصوير الهلامي الـ Gel Documentation.

1.6.3 تحديد التباين الوراثي للجين *TP53* في الموقع (rs1042522) في الاكسون 4 باستخدام تقنية Tetra–ARMS - PCR

تم الكشف عن وجود الطفرة **C ⟶G** في الموقع rs1042522 (pro72arg) اذ تمت اضافة 4 مايكروليتر (100 nanogram) من الـDNA القالب و 1 مايكروليتر (10 picomol) من كل بادئ خاص بالطفرة rs1042522 والمجهز من قبل شركة Macrogen الكورية الى محتويات الـ Master mix (Asadi *et al*., 2017).

الجدول (3-4): البوادئ المستخدمة في تحديد التباين الوراثي في الموقع (rs1042522) باستخدام تقنية الـ PCR

primer	sequence	Band size	annealing
F-outer	5′TGCAGGGGGATACGGCCAGGCATTGAAGTC3′	493 bp	59
R-outer	5′TGGGGGGCTGAGGACCTGGTCCTCT3′		
F-inner	5′ GCTGCTGGTGCAGGGGCCAGGG 3′	200bp	
R-inner	5′CCAGAATGCCAGAGGCTGCTCCGCG 3′	247 bp	

بعدها تم ادخال انابيب التفاعل في جهاز المبلمر الحراري لإجراء التفاعل التضاعفي وباستخدام البرنامج الخاص للتفاعل وكما هو موضح في الجدول (3-5):

الجدول (3-5): البرنامج المعتمد في تقنية الـPCR لتحديد الطفرة (rs1042522)

No.	Stage	Temperature	Time	Cycle number
1.	Initial denaturation	95	5 min.	1
2.	denaturation	95	45 sec.	35
3.	Annealing	59	1 min.	
4.	Extension	72	1 min.	
5.	Final extension	72	7 min.	1
6.	Stop reaction	4	5 min	1

وقد تم الاعتماد في هذا التفاعل على برنامج التدرج الحراري Gradient في جهاز المبلمر الحراري وذلك لتحديد الدرجة الحرارية المثلى لارتباط البادئ وكان التدرج الحراري (±5) مْ ودرجة الحرارة الوسطى

62 °م وقد تم الاعتماد على الدرجة الحرارية 59 °م لانها اعطت افضل نتيجة. ومن ثم ترحيل ناتج تفاعل الـ PCR بهلام الاكاروز بتركيز 2%.

7.3 تحديد تتابع النيوكليوتيدات للقطع المضخمة بالاعتماد على تقنية الـ DNA Sequencing

تم تحديد تسلسل القواعد النيتروجينية للاكسونات (3,4,5,6) التابعة للجين *TP53* قيد الدراسة اذ تم ارسال نواتج تفاعل الـ PCR للجينات المذكورة سلفا مع البوادئ الخاصة بالحزمة الناتجة وثم قراءة التسلسل للجينات بالاعتماد على جهاز المحلل الجيني 3130 Genetic Analyzer المجهز من شركة Hitachi اليابانية.

وتمت مطابقة التسلسلات الخاصة بالجينات مع تسلسلات الجينات الموثقة في المركز الوطني لمعلومات التقنيات الحياتية National Center Biotechnology Information NCBI وتم تحليل النتائج بالاعتماد على برنامج BLAST.

الجدول:(3-6) البوادئ الخاصة بالاكسونات التابعة للجين *TP53* والتي اجري عليها اختبار الـ DNA Sequencing

Exon	Primer	Sequence
Exon 3 and 4	Forward	5′TGCAGGGGGATACGGCCAGGCATTGAAGTC3′
	Reverse	5′TGGGGGGCTGAGGACCTGGTCCTCT3′
Exon 5	Forward	5′ TTCCTCTTCCTGCAGTACTC3′
	Reverse	5′ CAGCTGCTCACCATCGCTAT3′
Exon 6	Forward	5′ ATTCCTCACTGATTGCTCC3′
	Reverse	5′ TCCTCCCAGAGACCCCAGTT3′

8.3 الاختبارات الكيموحيوية Biochemical Test

تم تقدير عدد من المتغيرات الكيموحيوية المرتبطة مع حالات الاصابة بسرطان الثدي لدى النساء في مجاميع الدراسة.

1.8.3 تقدير مستضد السرطان Cancer Antigene 15-3 باستخدام جهاز ال VIDAS

المبدأ الاساس Principle

يعتمد المبدأ الاساس لتقنية الـ VIDAS على التداخل بين تقنيتين الاولى هي التفاعل المناعي الانزيمي والثانية الكشف النهائي بالتألق Fluorescent Detection ويتضمن التفاعل بين عنصرين الاول هو الطور الصلب المطلي بالمستقبلات الخاصة بالمتغير المراد تقديره وقد تكون هذه المستقبلات مستضدات او اجسام مضادة, والعنصر الثاني هو شريط الفحص الذي يحتوي على عدد من الحفر الدقيقة التي يضاف اليها مصل الدم الحاوي على المتغير المراد تقديره.

2.8.3 تقدير اليوريا والكرياتنين

تم تقدير عدد من المتغيرات الكيموحيوية لمتابعة وظائف الكلية وهي اليوريا والكرياتنين وذلك بالاعتماد على جهاز (FUJIFILM) المجهز من شركة FUJIFILM Europe Gmbh الالمانية.

3.8.3 تقدير عدد من مكونات الدم

تم تقدير عدد من مكونات الدم وهي كريات الدم الحمر وخلايا الدم البيض والصفائح الدموية وتركيز الهيموكلوبين بالاعتماد على جهاز الـ (HORIBA Medical) المجهز من قبل شركة HORIBA ABX SAS الفرنسية.

التحليل الاحصائي

اجري التحليل الاحصائي باستخدام اختبار T-test وكان مستوى التمييز الاحصائي المقبول هو ($P\leq0.05$). كما تم حساب قيمة CI, P value, Odd Ratio بالاعتماد على الرابط الالكتروني (https://WWW.medcalc.org/calc/odds_ratio.php) وتم حساب التكرار الاليلي بالاعتماد على المعادلة الاتية:

التكرار الاليلي للاليل الطبيعي = 2(عدد الأفراد متماثلي الزيگوت) + (عدد الأفراد متغايري الزيجوت) / 2(العدد الكلي)

التكرار الاليلي للاليل الطافر = 2(عدد الأفراد متماثلي الزيگوت) + (عدد الأفراد متغايري الزيجوت) / 2(العدد الكلي)

كما تم اجراء اختبار الـ Haplotype و Hardy-Weinberg equiliprium test بالاعتماد على الرابط الالكتروني (http://analysis.bio-x.cn/my Analysis.php).

الفصل الرابع

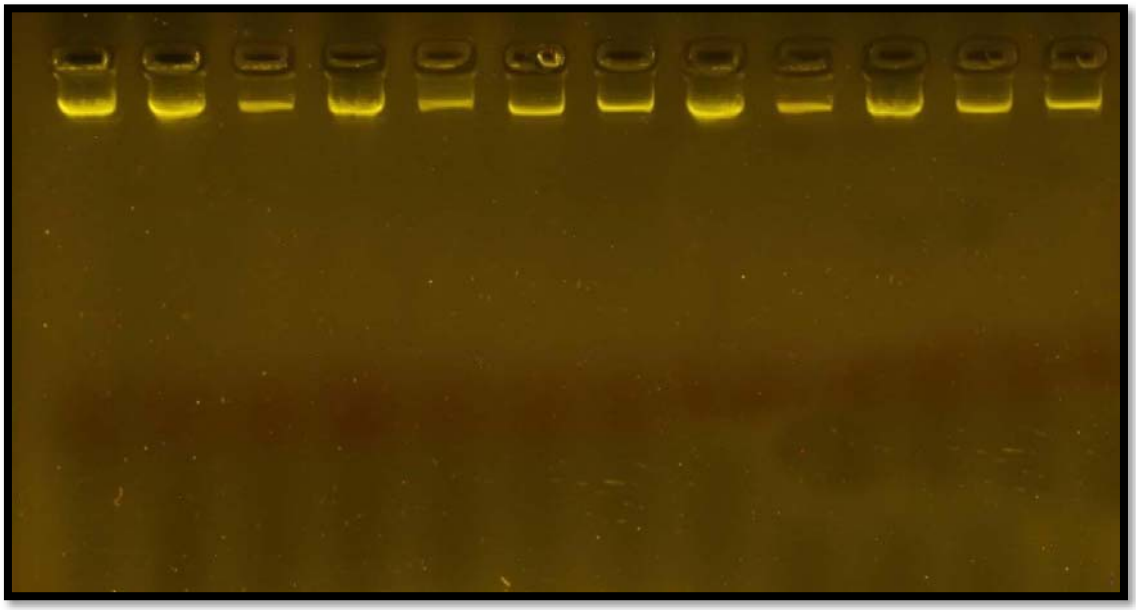
النتائج والمناقشة

Results and Discussion

1.4 الاختبارات الجزيئية

1.1.4 استخلاص الحامض النووي DNA من عينات الدم

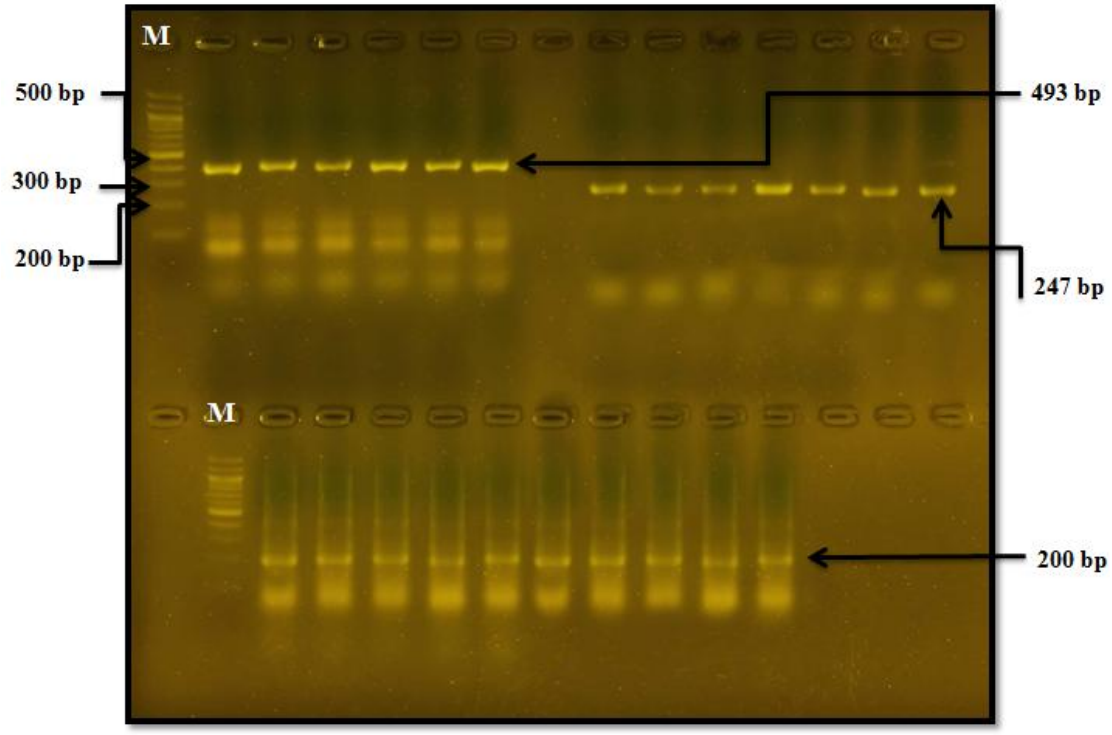
أظهرت النتائج, وكما هي مبيّنة في الشكل (4-1) حزم الجينوم الذي تم استخلاصه من عينات الدم, وكانت النقاوة لعينة الـ DNA تتراوح بين (1.5-1.7) والتركيز كان يتراوح من (50-125 ng\µl) وقد تم القياس باستخدام جهاز الـ Nanodrop



الشكل (4-1): الجينوم المستخلص من عينات الدم والمرحل بهلام الاكاروز بتركيز 1%

2.1.4 تحديد التباين الوراثي للجين *TP53* في الموقع (rs1042522) في الاكسون 4 باستخدام تقنية Tetra–ARMS –PCR

بينت النتائج في الشكل (4-2) وجود علاقة بين الاصابة بسرطان الثدي والتباين الوراثي في الجين *TP53* في الموقع (rs1042522) في الاكسون (4) اذ يتبين من ناتج تفاعل الـ PCR ظهور التباين الوراثي للجين بمختلف الانماط الوراثية الثلاثة CC, CG, GG وبنسب مئوية مختلفة كما هو موضح في الجدول (4-1).



الشكل (4-2): ناتج تفاعل الـ PCR الخاص بالتباين الوراثي (rs1042522) التابع للاكسون (4) للجين *TP53* اذ كان الناتج تفاعل يحتوي على ٣ حزم الاولى بحجم 493 bp للجين الرئيس والثانية بحجم 247 bp للاليل الطبيعي والحزمة الثالثة بحجم 200 bp للاليل الطافر, M هو الدليل الحجمي بحجم 100 BP والمجهز من شركة Biolabs وتم الفصل بهلام الاكاروز بتركيز 2%

الجدول(4-1): توزيع نسبة المشاهدة الاليلية والنمط الوراثي للجين *TP53* في الموقع (rs1042522) في الاكسون (4) بين مجموعة النساء السليمات والنساء اللواتي يعانون من الاصابة بسرطان الثدي مع العلم أن الاليل C هو الاليل الطبيعي والاليل G هو الاليل الطافر

Genotypes	Patients		Control		P Value	OR	(95%CI)
	NO.	%	NO.	%			
CC	26	35	15	70	P = 0.0897	4.0385	0.8055 to 20.2474
CG	34	56	4	٢٠			
GG	14	19	2	١٠			
Alleles	NO.	%	NO.	%	P Value	OR	(95%CI)
C	86	٥٨	34	٨٠	P = 0.0087	3.0640	1.3273 to 7.0728
G	62	٤٢	8	٢٠			

يظهر الجدول (4-1) نسبة المشاهدة الاليلية وتكرار الانماط الوراثية المختلفة للجين *TP53* في الموقع (rs1042522) في الاكسون (4) إذ أظهرت النتائج للنساء المصابات بسرطان الثدي بأن نسبة تكرار النمط الوراثي الطافر GG هي الاعلى لدى النساء المصابات بسرطان الثدي بنسبة 19% مقارنة بالنمط الوراثي الطافر لدى مجموعة السيطرة بنسبة 10% في حين ان نسبة النمط الوراثي الطبيعي CC كانت هي الاقل لدى النساء المصابات بسرطان الثدي بنسبة 35% مقارنة بمجموعة السيطرة التي كان فيها نسبة النمط الوراثي الطبيعي عالية 70% اما النمط الوراثي المتباين CG فكانت نسبة المشاهدة له عالية في مجموعة المرضى 56% مقارنة بمجموعة السيطرة 20%. اما التكرار الاليلي فقد بينت النتائج بان نسبة المشاهدة للاليل الطافر G كانت عالية في مجموعة المرضى 42% مقارنة بمجموعة السيطرة 20% اما الأليل الطبيعي فقد كانت نسبته لدى المرضى 58% مقارنة مع مجموعة السيطرة 80%.

وقد اشارت دراسات سابقة ان بروتين P53 يعدّ من البروتينات الداخل خلوية التي تتحكم في التعبير الجيني لمرحلة معينة من دورة الخلية. إذا لم يتم التعبير عن هذه الجينات فإن دورة الخلية لا تستمر مما يثبط انقسام الخلية بشكل فعال. وهو ايضا بروتين مسؤول عن عمليات اصلاح الحمض النووي DNA مما يمنع الخلايا من التضاعف مع طفراتها اما إذا كان الحمض النووي DNA متطفر أو تالف ولا يمكن إصلاحه فإن P53 ينقل إشارة تؤدي إلى موت الخلايا المبرمج ويمنع الخلايا من الانقسام والتطور إلى أورام (Mishra *et al.*, 2013). ومن الجدير بالذكر أن حدوث طفرات في جين *TP53* في الموقع (rs1042522) في الاكسون (4) يؤدي الى خلل في عمل البروتين P53 ومن ثم ستفقد الوظيفة البايولوجية لهذا البروتين مما يؤدي الى انتاج بروتين P53 فيه خلل بالوظيفة الرئيسة والتي تعد من مسببات السرطان (Dahabreh *et al.*, 2013).

كذلك بينت نتائج الدراسة بأن قيمة مستوى الارجحية للنمط الوراثي الطافر GG كانت O.R=4.038 عند مستوى احتمالية P=0.089, وللاليل الطافر كان مستوى الارجحية O.R=3.06 عند مستوى احتمالية P=0.008 وهذا بدوره يعدّ عامل خطورة كونه اعلى من (1) وبالتالي حدوث الاصابة بسرطان الثدي.

الجدول (4-2): نسبة التكرار الاليلي في عينات الدراسة

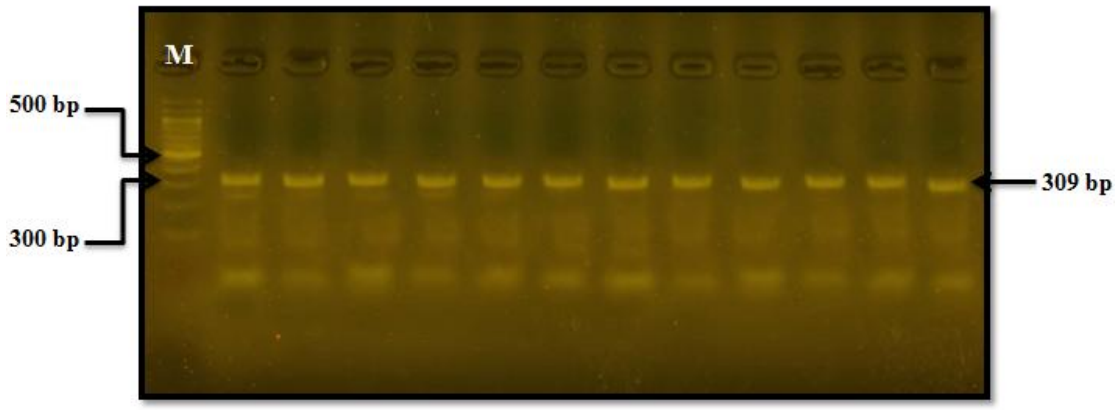
Type of allele	Allele Frequincy
C	0.58
G	0.42

كذلك بينت النتائج بان نسبة التكرار الاليلي للاليل الطبيعي C كانت هي الاعلى 0.58 مقارنة بتكرار الاليل الطافر G 0.42 في مجاميع الدراسة. مما يوضح سبب فقدان الوظيفة البايولوجية الاساسية للبروتين الـ P53 المشفر من قبل الجين وبالتالي زيادة في توطين الخلايا الورمية.

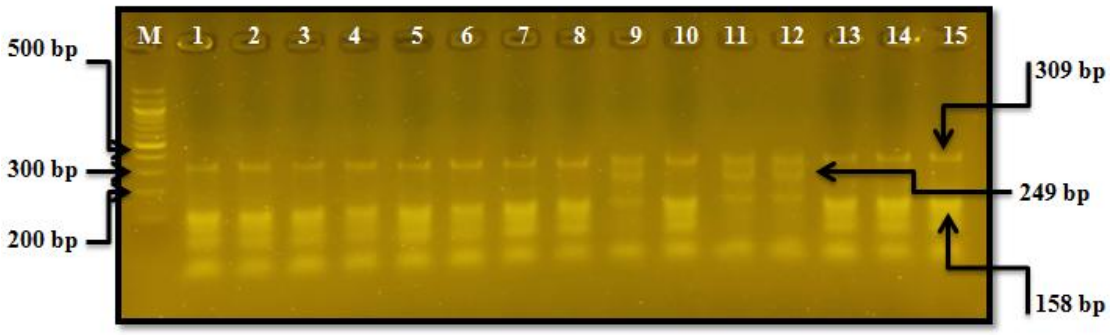
وقد اشارت دراسات سابقة ان الطفرات النقطية والتباينات الوراثية للجين *TP53* تؤدي الى تكوين بروتين اقل كفاءة وغير قادر على كبح الورم, كما هو في الحالة الطبيعية, وبالتالي حدوث احتمالية كبيرة لتحول الخلية الطبيعية الى خلية ورمية. من بين الحالات المذكورة فإن أكثر الحالات التي تمت دراستها هي التباين الوراثي بسبب الطفرات الجينية (Zhu *et al*., 2020). وتعد الطفرات النقطية وتبادل واحد أو أكثر من النيوكليوتيدات أكثر أنواع التباينات الوراثية شيوعًا الموجودة في الأورام مما يؤدي إلى تكوين بروتين غير وظيفي, إذ تعدّ التباينات الوراثية الأكثر شيوعًا (SNP72 ؛ rs1042522) هي تباينات G / C التي تقع في الكودون ٧٢ من الإكسون 4 مما يؤدي إلى تغيرات بروتينية (ارجنين ٧٢ أو برولين ٧٢). تؤدي هذه التباينات إلى حدوث خلل في أيض الخلية ، وتؤثر سلبياً على دورة الخلية ، وتوقف إصلاح الحمض النووي DNA (Akhter, 2019). وهذا يعد بدوره عامل خطورة ومتسبباً في حالات سرطان الثدي.

3.1.4 الكشف عن وجود الطفرة (codon 249) للجين *TP53* في الاكسون 7

بينت النتائج, وكما هي موضحة في الشكلين (4-3) و (4-4) أن هناك علاقة بين الاصابة بسرطان الثدي لدى النساء والطفرة الوراثية للجين *TP53* في الموقع (codon 249) في الاكسون (7) فعند ملاحظة الشكل (٤-4) بعد التقطيع بالانزيم القاطع *HaeIII* يكون ناتج تفاعل الـ PCR بثلاث حزم 309 و 158 للنمط الوراثي الطبيعي GG و 309 و249 للنمط الوراثي الطافر CC و 309 و249 و 158 للنمط الوراثي المتباين وهذه تدل على ظهور التباين الوراثي للجين *TP53* وبجميع الانماط الوراثية وبنسب مئوية مختلفة وكما موضح بالجدول (4-3)



الشكل (4-3): ناتج تفاعل الـ PCR الخاص بالتباين الوراثي (codon 249) التابع للاكسون (7) للجين *TP53* وبناتج تفاعل bp 309, M هو الدليل الحجمي بحجم BP 100 والمجهز من شركة Biolabs وتم الفصل بهلام الاكاروز بتركيز 2%.



الشكل (4-4): ناتج تفاعل الـ RFLP-PCR الخاص بالتباين الوراثي (codon 249) التابع للاكسون (7) للجين *TP53* اذ كان الناتج تفاعل يحتوي على ٣ حزم الاولى بحجم 309 bp للجين الرئيس والثانية بحجم 158 bp للاليل الطبيعي والحزمة الثالثة بحجم 249 bp للاليل الطافر, M هو الدليل الحجمي بحجم 100 BP وتم الفصل بهلام الاكاروز بتركيز 2%

الجدول (4-3): نسبة المشاهدة الاليلية والانماط الوراثية المختلفة للجين *TP53* في الموقع (codon 249) في الاكسون 7

Genotypes	Patients		Control		P Value	OR	(95%Cl)
	NO.	%	NO.	%			
GG	8	11	١٣	٦١	P = 0.0001	84.500	9.6875 to 737.057
GC	14	20	٧	٣٤			
CC	52	69	١	٥			
Alleles	NO.	%	NO.	%	P Value	OR	(95%Cl)
G	30	٣٩	٣٣	٧٨	P < 0.0001	14.422	6.2327 to 33.3727
C	118	٦١	٩	٢٢			

اذ اظهرت نتائج الدراسة لمجموعة المرضى بأن نسبة المشاهدة للنمط الوراثي الطافر CC كانت هي الاعلى 69% ونسبة المشاهدة للنمط الوراثي الطبيعي GG كانت هي الاقل 11% اما النمط الوراثي المتباين CG فكانت نسبة المشاهدة له 20% مقارنة مع مجموعة السيطرة اذ كانت نسبة المشاهدة للنمط الوراثي الطافر CC هي الاقل 5% ونسبة المشاهدة للنمط الوراثي الطبيعي GG كانت هي الاعلى 61% اما النمط الوراثي المتباين CG فكانت نسبة المشاهدة هي 34% اما نسبة المشاهدة الاليلية فقد كانت 61% للاليل الطافر C و 39% للاليل الطبيعي G لدى النساء المصابات بسرطان الثدي مقارنة بمجموعة السيطرة اذ كانت نسبة المشاهدة للاليل الطافر C 22% مقارنة بالاليل الطبيعي G 78%.

كما هو معلوم مسبقا فإن حدوث الطفرة في هذا الجين *TP53* يؤدي الى خلل في الية عمل البروتين الرئيس المشفر من قبل الجين(Vijayaraman *et al*., 2012), اذ يعمل البروتين P53 على اصلاح الحمض النووي DNA التالف نتيجة لمؤثرات بيئية خارجية او بسبب الجهد التأكسدي، ويزيد من فعالية عملية الموت الخلوي المبرمج وبذلك يكبح تكوين الورم بالقضاء على جميع الخلايا غير الطبيعية, كذلك له دور مهم في الاستجابة الخلوية, إذ يعدّ احد منظمات دورة الخلية (Wang *et al*., 2022). يساهم موت الخلايا المبرمج المعتمد على P53 في موت الخلايا الناجم عن العلاج الكيميائي. لقد وجد أن الموت الخلوي المبرمج يساهم في عمل العلاج الكيميائي مما يزيد من حساسية الخلايا السرطانية ويقلل بشكل كبير من جرعات العلاج الكيميائي وربما يقلل من آثاره الجانبية الضارة (Levine, 2019). اذ يرتبط سرطان الثدي بطفرات وراثية داخل exon 7 من الجين *TP53* هذه الطفرات هي في المقام الأول تحولات في ثنائي النوكليوتيدات GC لذلك فإن حدوث طفرات في جين *TP53* يؤدي الى خلل في عمل البروتين ومن ثم سيفقد وظيفته والتي تعد من مسببات السرطان (Bouaoun *et al*., 2016).

كما اظهرت نتائج الدراسة بأن قيمة مستوى الارجحية للنمط الوراثي الطافركانت عالية جدا O.R=84.5 عند مستوى احتمالية P=0.0001, وكانت قيمة مستوى الارجحية للاليل الطافر هي O.R=14.2 عند مستوى احتمالية 0.0001 > P وهذا بدوره يعدّ عامل خطورة وأحد اسباب سرطان الثدي الناتجة عن الخلل في عمل البروتين P53.

كذلك اظهرت الدراسة, وكما هو موضح في الجدول (4-4) ان نسبة التكرار الاليلي للاليل الطافر كانت 0.79 مقارنة مع نسبة تكرار الاليل الطبيعي 0.21

الجدول (4-4): نسبة التكرار الاليلي في عينات الدراسة

Type of allele	Allele Frequincy
G	0.21
C	0.79

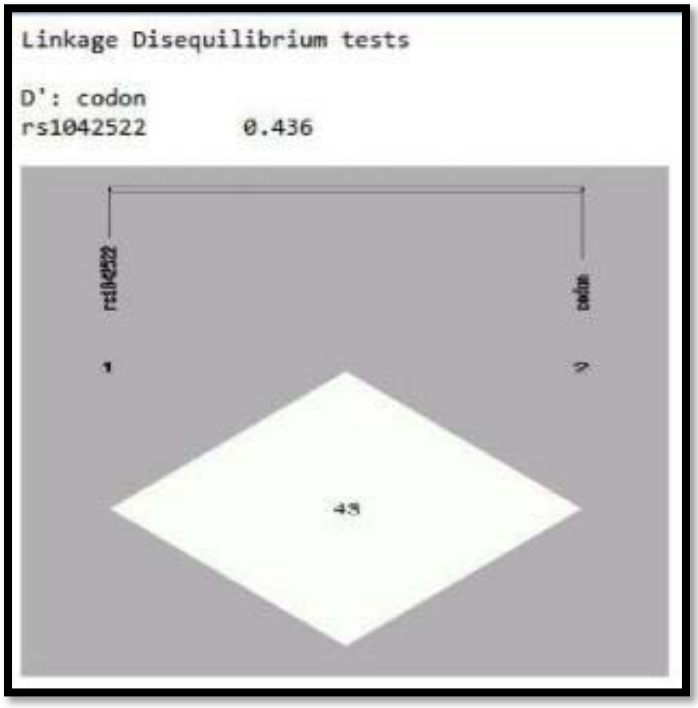
وقد أشارت دراسات أن بروتين P53 يفقد وظيفته المثبطة للورم نتيجة لطفرة في الجين *TP53* مما يعني انه لن يحدث توقف لدورة الخلية أو موت الخلايا المبرمج بعد تلف الحمض النووي DNA. وتؤدي التغييرات في الجين *TP53* الى تأثيرات مختلفة عديدة على نشاط الجين اعتمادًا على موقع التغيير, حيث يمكن أن تؤدي الطفرة في منطقة الـ promoter إلى نقص أو غياب بروتين P53 في الخلية. او يمكن أن يكون للطفرات التي تحدث في منطقة تشفير البروتين في الجين تأثير في نشاط البروتين. حيث اشارت الدراسات (Moxley and Reisman, 2021) إلى ان طفرات *TP53* الجينية الموروثة تزيد من خطر الإصابة في سرطان الثدي.

4.1.4 تحليل نتائج الـ Haplotype

يلعب تحليل نتائج الـ Haplotype دورا هاما في تحديد اقترانات وراثية جديدة بين اليلات التباينات الوراثية المختلفة لجين معين, فمن خلال هذه الدراسة تم تحديد 4 انماط وراثية محتملة ناتجة من الاقترانات الاليلية للطفرات الوراثية (rs1042522), (codon 249) , وكما هو موضح في الجدول (5-4).

الجدول (4-5): الأنماط الوراثية وتكراراتها الناتجة من اختبار الـ Haplotype

Genotype	Frequency (patient)	Frequency (control)	Odd. Ratio	CI (95%)
CC	62.73(0.424)	20.38(0.162)	3.814	(2.145~6.781)
CG	23.27(0.157)	81.62(0.648)	0.101	(0.057~0.180)
GC	55.27(0.373)	6.62(0.053)	10.740	(4.589~25.136)
GG	6.73(0.045)	17.38(0.138)	0.298	(0.118~0.751)



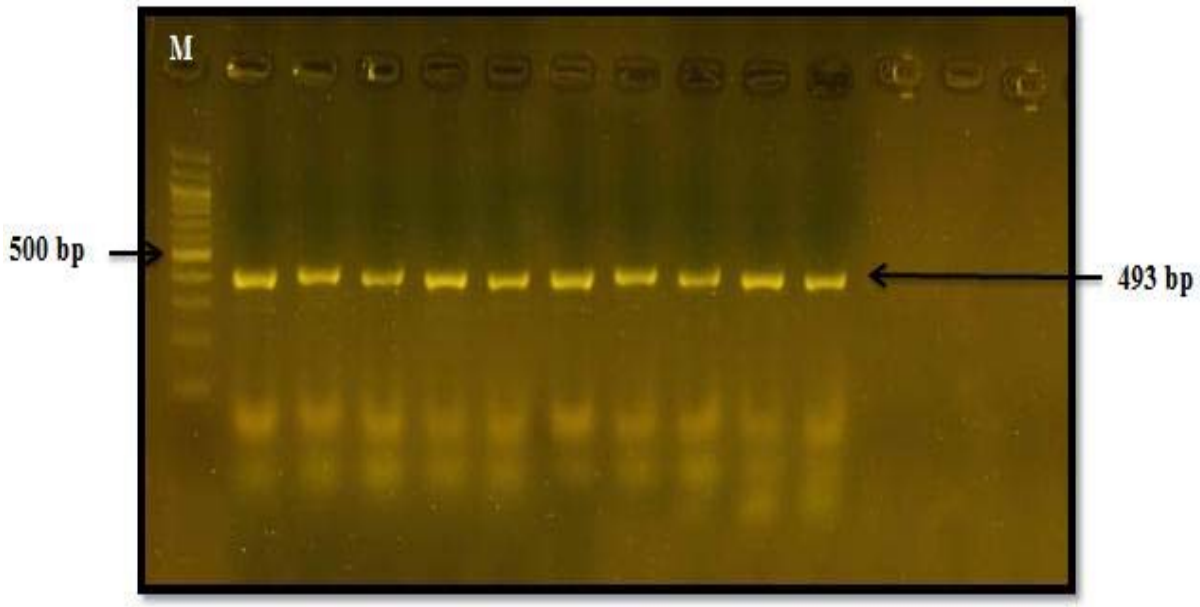
الشكل (4-5): التداخل بين التباينات التابعة للجين *TP53* حسب تحليل الـ Haplotype

ويتبين من الجدول أعلاه أن النمط الوراثي GC كان له اهمية اكبر من بقية الأنماط إذ إن تكراره لدى المرضى كان بنسبة 55.27(0.373) مقارنة بتكراره لدى مجموعة السيطرة 6.62(0.053) وعند

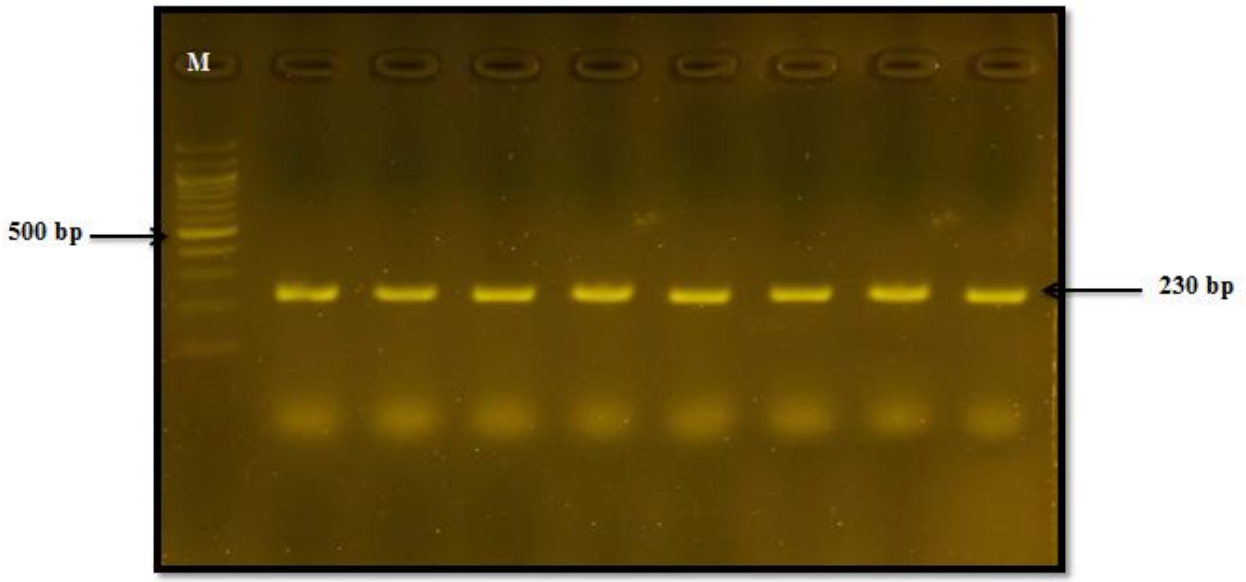
اجراء اختبار Hardy-Weinberg equiliprium test للتباين الوراثي في الموقع (rs1042522) تبين ان قيمة الـ P=0.234 وهي بذلك اقل من 0.5 وهذا يدل بان هذه المجموعة غير متزنة ولا تخضع لقانون HWE بسبب هذه الطفرة التي اصابت الجين *TP53*. في حين عند اجراء اختبار Hardy-Weinberg equiliprium test للتباين الوراثي في الموقع (Codon 249) تبين ان قيمة الـ P=12.7 وهي بذلك أعلى من 0.5 وهذا يدل بان هذه المجموعة متزنة وتخضع لقانون HWE.

5.1.4 تحديد تتابع النيوكليوتيدات للقطع المضخمة بالاعتماد على تقنية الـ DNA Sequencing

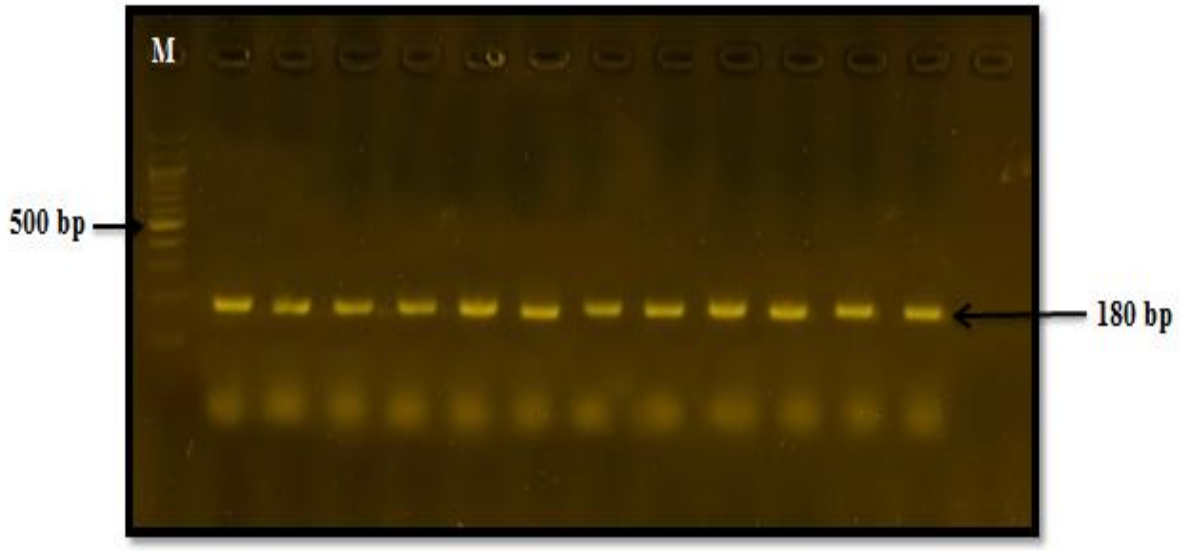
توضّح الأشكال (4-6) و(4-7) و (4-8) ناتج تفاعل الـ PCR 493 bp, 230 bp, 180bp للاكسونات 3,4,5,6 على التوالي والتي اجري عليها اختبار تحديد تتابع النيوكليوتيدات



الشكل (4-6): ناتج تفاعل الـ PCR التابع للإكسونين (3,4) للجين *TP53* وبناتج تفاعل 493 bp, M هو الدليل الحجمي بحجم 100 bp والمجهز من شركة Biolabs وتم الفصل بهلام الاكاروز بتركيز 2%

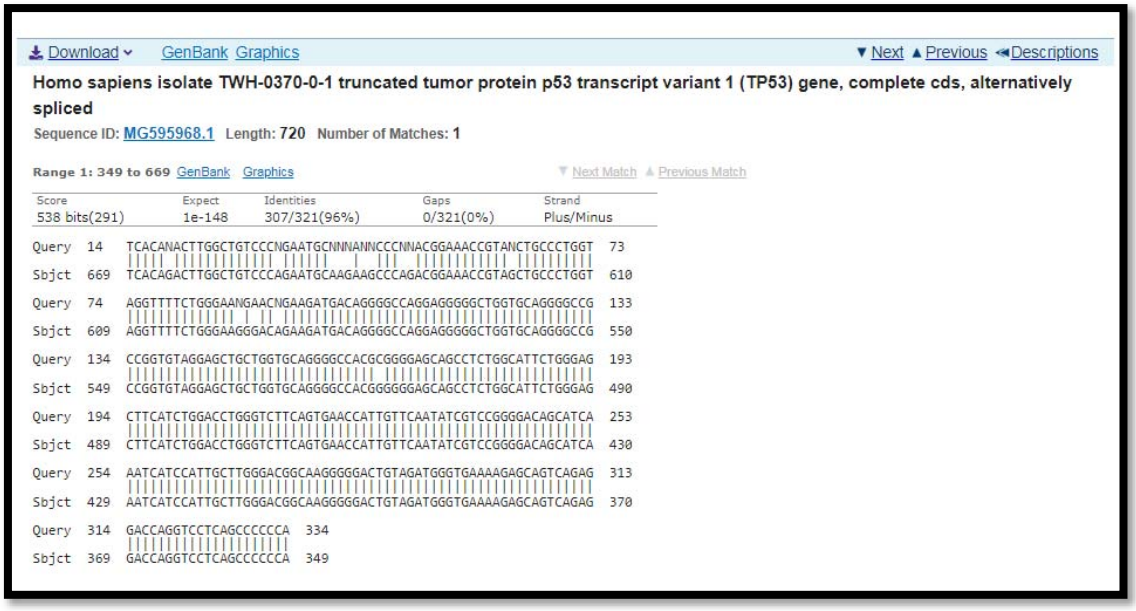


الشكل (4-7): ناتج تفاعل الـ PCR التابع للاكسون (5) للجين TP53 وبناتج تفاعل 230 bp , M هو الدليل الحجمي بحجم 100 BP والمجهز من شركة Biolabs وتم الفصل بهلام الاكاروز بتركيز 2%

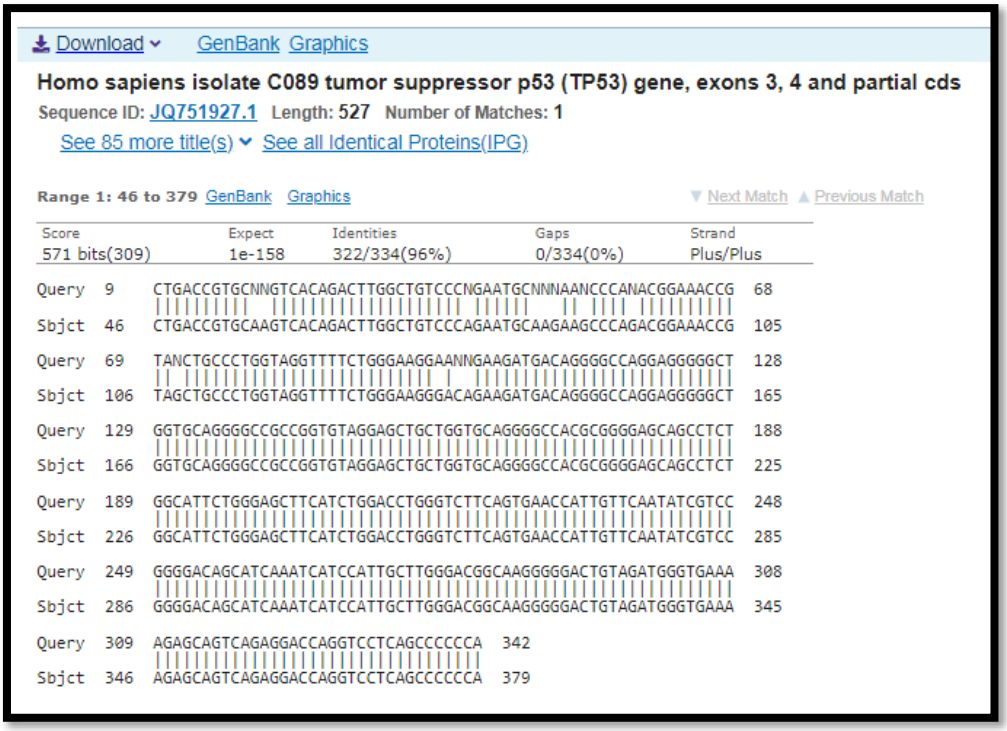


الشكل (4-8): ناتج تفاعل الـ PCR التابع للاكسون (6) للجين *TP53* وبناتج تفاعل 180 bp , M هو الدليل الحجمي بحجم 100 BP والمجهز من شركة Biolabs وتم الفصل بهلام الاكاروز بتركيز 2%

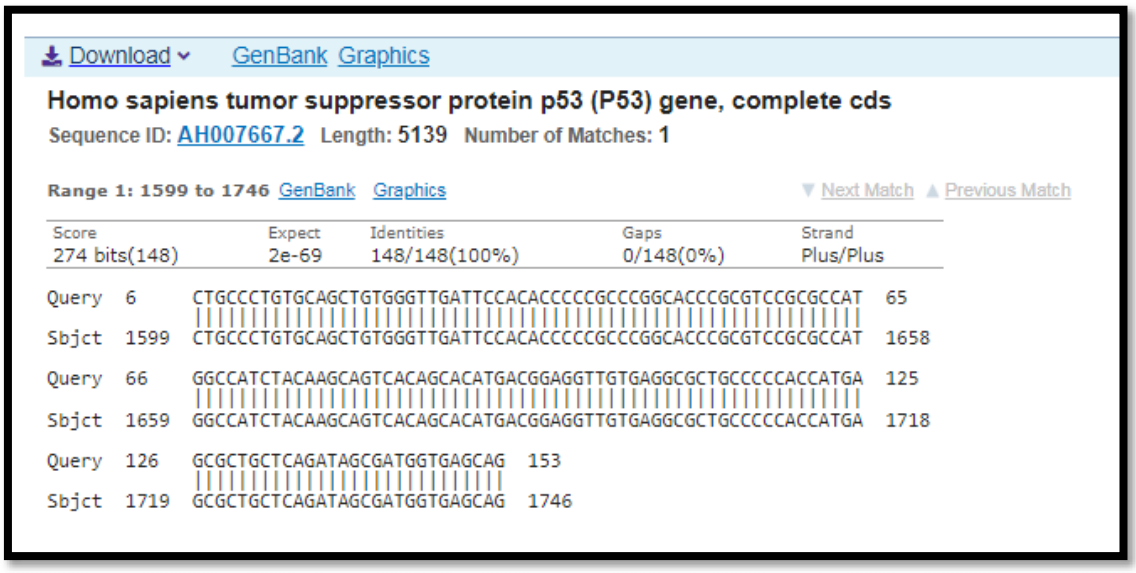
وبعد اجراء اختبار تحديد التسلسلات لاكسونات الجين المضخمة أظهرت النتائج أن هناك تبايناً في عدد من النيوكليوتيدات في الاكسونات (3 و 4 و 6) في حين لم تظهر نتائج التسلسل اي تباين للنيوكليوتيدات في الاكسون (5) وكما موضح في الاشكال التالية:



الشكل (4-9): نتيجة المطابقة مع تسلسل النيوكليوتيدات للاكسون (3) التابع للجين *TP53* التي تم مقارنتها مع تسلسلات الجين الاصلي في موقع الـ NCBI



الشكل (4-10): نتيجة المطابقة مع تسلسل النيوكليوتيدات للإكسون (4) التابع للجين *TP53* التي تم مقارنتها مع تسلسلات الجين الاصلي في موقع الـ NCBI


Download GenBank Graphics

Homo sapiens tumor suppressor protein p53 (P53) gene, complete cds

Sequence ID: AH007667.2 Length: 5139 Number of Matches: 1

Range 1: 1599 to 1746 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

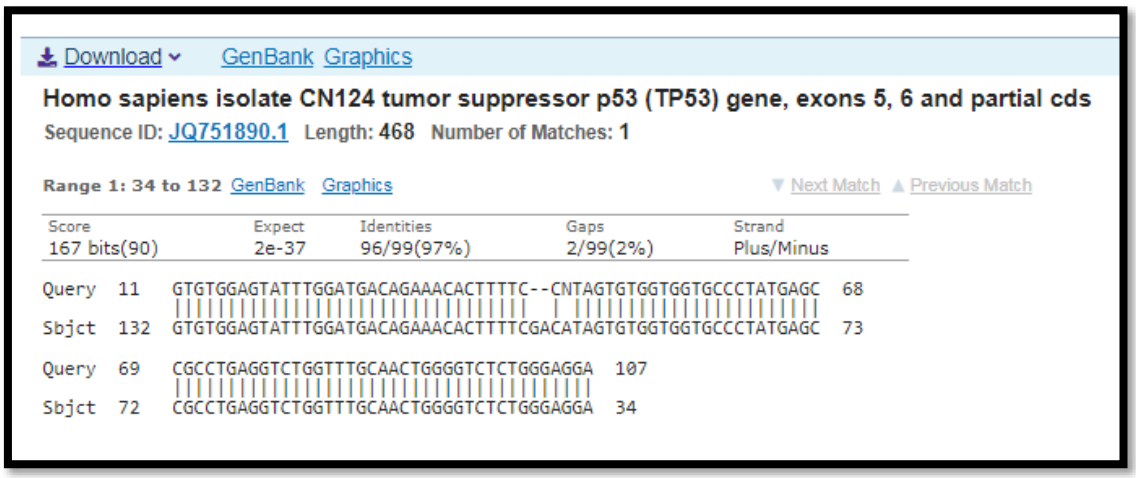
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
274 bits(148)	2e-69	148/148(100%)	0/148(0%)	Plus/Plus

```
Query  6     CTGCCCTGTGCAGCTGTGGGTTGATTCCACACCCCCGCCCGGCACCCGCGTCCGCGCCAT  65
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1599  CTGCCCTGTGCAGCTGTGGGTTGATTCCACACCCCCGCCCGGCACCCGCGTCCGCGCCAT  1658

Query  66    GGCCATCTACAAGCAGTCACAGCACATGACGGAGGTTGTGAGGCGCTGCCCCCACCATGA  125
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1659  GGCCATCTACAAGCAGTCACAGCACATGACGGAGGTTGTGAGGCGCTGCCCCCACCATGA  1718

Query  126   GCGCTGCTCAGATAGCGATGGTGAGCAG  153
             ||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1719  GCGCTGCTCAGATAGCGATGGTGAGCAG  1746
```

الشكل (4-11): نتيجة المطابقة مع تسلسل النيوكليوتيدات للإكسون (5) التابع للجين *TP53* التي تم مقارنتها مع تسلسلات الجين الاصلي في موقع الـ NCBI


Download GenBank Graphics

Homo sapiens isolate CN124 tumor suppressor p53 (TP53) gene, exons 5, 6 and partial cds

Sequence ID: JQ751890.1 Length: 468 Number of Matches: 1

Range 1: 34 to 132 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
167 bits(90)	2e-37	96/99(97%)	2/99(2%)	Plus/Minus

```
Query  11   GTGTGGAGTATTTGGATGACAGAAACACTTTTC--CNTAGTGTGGTGGTGCCCTATGAGC  68
            ||||||||||||||||||||||||||||||||  | ||||||||||||||||||||||||
Sbjct  132  GTGTGGAGTATTTGGATGACAGAAACACTTTTCGACATAGTGTGGTGGTGCCCTATGAGC  73

Query  69   CGCCTGAGGTCTGGTTTGCAACTGGGGTCTCTGGGAGGA  107
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  72   CGCCTGAGGTCTGGTTTGCAACTGGGGTCTCTGGGAGGA  34
```

الشكل (4-12): نتيجة المطابقة مع تسلسل النيوكليوتيدات للإكسون (6) التابع للجين *TP53* التي تم مقارنتها مع تسلسلات الجين الاصلي في موقع الـ NCBI

الجدول (4-6): مواقع وانواع الطفرات المختلفة في جين *TP53* لدى النساء المصابات بسرطان الثدي

Exon	ID sequince	Nucliotide	Location	Mutation type	Idendity	Gaps
3	JQ751927.1	A→G	135	Transition	96%	0
3	JQ752213.1	A→G	138	Transition	97%	0
4	JQ752208.1	G→ --	90	Deletion	98%	1
4	JQ752208.1	G→ C	216	Transversion	98%	1
4	MG595968.1	G→ A	623	Transition	96%	0
4	MG595968.1	G→ C	580	Transversion	96%	0
5	AH007665.2	C→ --	1615	Deletion	99%	1
5	JQ751838.1	T→ --	407	Deletion	99%	1
6	HM236157.1	.--→ N	354	Adition	99%	1
6	JQ751846.1	→ N	170	Adition	96%	1
6	JQ751890.1	G→ --	171	Deletion	97%	2
6	JQ751890.1	A→ --	172	Deletion	97%	2

يبين الجدول (4-6) انواع التباينات الوراثية المختلفة ومواقعها على اكسونات الجين *TP53* بعد اجراء اختبار التسلسل ومقارنتها مع تسلسلات الجين في موقع الـ NCBI

أظهرت الدراسات أن جين *TP53* متعدد الأشكال أيضًا ، مع النوع الأكثر شيوعًا من تغيير الحمض النووي DNA المعروف باسم تعدد أشكال النيوكليوتيدات المفردة (SNPs) ، يحدث عندما يتم تغيير أحد النيوكليوتيدات بآخر (Doffe *et al.*, 2021). يؤدي فقدان وظيفة P53 إلى زيادة احتمالية إصابة الخلايا بطفرات سرطانية, ويمكن أن يتسبب في عدم الاستقرار الجيني. على الرغم من العثور أيضًا على عمليات حذف وإدخال النيوكليوتيدات في الجين ايضاً ، إلا أن الطفرات النقطية هي الطريقة الرئيسة لتعطيل البروتين P53 (Kim and Lozano, 2018). يمكن أن تتداخل هذه التعديلات مع قدرة P53على أداء دوره ، مما يزيد من خطر الإصابة بالسرطان أو تغيير مدى استجابة المريض للعلاج.

2.4 تسجيل الأنماط الوراثية والمظهرية للجين *TP53* في موقع الجينات العالمي NCBI

بناءً على ما اظهرتهُ نتائج هذه الدراسة, تم تسجيل نمط وراثي جديد للجين *TP53* في مدينة الموصل في موقع الجينات العالمي NCBI وقد اعطي الرقم التعريفي GenBank: LC682536.1

Homo sapiens P53 gene for tumor suppressor protein p53, partial cds

GenBank: LC682536.1

FASTA Graphics

Go to:

```
LOCUS       LC682536                335 bp    DNA     linear   PRI 08-FEB-2022
DEFINITION  Homo sapiens P53 gene for tumor suppressor protein p53, partial
            cds.
ACCESSION   LC682536
VERSION     LC682536.1
KEYWORDS    .
SOURCE      Homo sapiens (human)
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
            Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini;
            Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1
  AUTHORS   Hamead,M.
  TITLE     Detection of new Mutation in P53 gene in Iraqi population
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 335)
  AUTHORS   Hamead,M. and Hamed,O.M.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (04-FEB-2022) Contact:Mohammad Hamead University of
            Mosul, Department of Biology; Almajmoaa, Mosul, North of IRAQ
            09334, Iraq
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..335
                     /organism="Homo sapiens"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /db_xref="taxon:9606"
                     /cell_type="leukocyte"
                     /tissue_type="blood"
                     /country="Iraq: Mosul"
                     /collection_date="2021-10-07"
     gene            <52..>329
                     /gene="P53"
     CDS             <52..>329
                     /gene="P53"
                     /codon_start=1
```

وتم تحديد تسلسلات القواعد النتروجينية المختلفة لهذا النمط الوراثي

Homo sapiens P53 gene for tumor suppressor protein p53, partial cds

GenBank: LC682536.1

GenBank Graphics

```
>LC682536.1 Homo sapiens P53 gene for tumor suppressor protein p53, partial cds
GTGGGGGGCTGAGGACCTGGTCCTCTGACTGCTCTTTTCACCCATCTACAGTCCCCCTTGCCGTCCCAAG
CAATGGATGATTTGATGCTGTCCCCGGACGATATTGAACAATGGTTCACTGAAGACCCAGGTCCAGATGA
AGCTCCCAGAATGCCAGAGGCTGCTCCCCGCGTGGCCCCTGCACCAGCAGCTCCTACACCGGCGGCCCCT
GCACCAGCCCCCTCCTGGCCCCTGTCATCTTCGGTTCGTTCCCAGAAAACCTACCAGGGCAGGTACGGTT
TCCGTGGGGGGGTGGGGCATTCGGGGACAGCCAAGTGTGTGAGGGCACGGTCAGT
```

فضلاً عن ذلك تم تسجيل نمط مظهري جديد للبروتين الكابح للورم P53 في مدينة الموصل في موقع الجينات العالمي NCBI وقد اعطي الرقم التعريفي GenBank:BDF83325.1

Homo sapiens P53 gene for tumor suppressor protein p53, partial cds

GenBank: LC682536.1

FASTA Graphics

Go to:

```
LOCUS       LC682536                335 bp    DNA     linear   PRI 08-FEB-2022
DEFINITION  Homo sapiens P53 gene for tumor suppressor protein p53, partial
            cds.
ACCESSION   LC682536
VERSION     LC682536.1
KEYWORDS    .
SOURCE      Homo sapiens (human)
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
            Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini;
            Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1
  AUTHORS   Hamead,M.
  TITLE     Detection of new Mutation in P53 gene in Iraqi population
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 335)
  AUTHORS   Hamead,M. and Hamed,O.M.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (04-FEB-2022) Contact:Mohammad Hamead University of
            Mosul, Department of Biology; Almajmoaa, Mosul, North of IRAQ
            09334, Iraq
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..335
                     /organism="Homo sapiens"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /db_xref="taxon:9606"
                     /cell_type="leukocyte"
                     /tissue_type="blood"
                     /country="Iraq: Mosul"
                     /collection_date="2021-10-07"
     gene            <52..>329
                     /gene="P53"
     CDS             <52..>329
                     /gene="P53"
                     /codon_start=1
```

وتم تحديد تسلسلات الأحماض الأمينية الخاصة لهذا النمط الوراثي

FASTA

tumor suppressor protein p53, partial [Homo sapiens]

GenBank: BDF83325.1

GenPept Identical Proteins Graphics

```
>BDF83325.1 tumor suppressor protein p53, partial [Homo sapiens]
SPLPSQAMDDLMLSPDDIEQWFTEDPGPDEAPRMPEAAPRVAPAPAAPTPAAPAPAPSWPLSSSVRSQKT
YQGRYGFRGGVGHSGTAKCVRAR
```

3.4 الاختبارات الكيموحيوية

أظهرت نتائج الدراسة, كما هي موضحة في الجدول (4-6) وجود ارتفاع معنوي في مستوى CA15-3 في بلازما الدم لدى المرضى المصابين بسرطان الثدي مقارنة مع مجموعة السيطرة وايضا أظهرت وجود انخفاضاً معنوياً في مستويات الوريا و الكرياتنين مقارنة بمجموعة السيطرة, اذ بيّنت الدراسة

أن مستوى CA15-3 لدى المرضى هي (U/ml) 125,82 مقارنة مع مجموعة السيطرة اذ كانت النسبة هي (U/ml) 23 ومستويات اليوريا لدى المرضى هي (mg/dl) 38,2 و الكرياتنين (mg/dl) 0,6 مقارنة مع مجموعة السيطرة اذ كانت(mg/dl) 41 و(mg/dl) 1.4 على التوالي, وكما هو موضّح في الجدول (4-7).

الجدول (4-7): مستويات المتغيرات الكيموحيوية في مصل دم النساء المصابات بسرطان الثدي مقارنة مع مجموعة السيطرة

SAMPLE	CA 15-3 ± SE (U/ml)	Urea ± SE (mg/dl)	Creatinine ± SE (mg/dl)
CONTROL	23 ± 1.2	41 ± 3.4	1.4 ± 0.06
PATIENT	125,82 ± 13.4	38,2 ± 6.2	0,6 ± 0.01

وقد أشارت دراسات سابقة أن الجين MUC1 يعبر عنه بشكل كبير في سرطان الثدي , وهذا بدورهِ ادى الى استخدام الـ CA 15-3 كمؤشر ورمي لسرطان الثدي . ومن الممكن اعتماد تقدير تراكيز المؤشر الورمي CA 15-3 لعدد من الاورام الخبيثة وليس فقط سرطان الثدي وقد تم تسجيل نسب مرتفعة لهذا المؤشر في عدد من الاورام الحميدة (Hing *et al*., 2020).

وبذلك من الممكن متابعة الحالة المرضية والعلاجية للمرضى المصابين بسرطان الثدي عن طريق تقدير تراكيز هذا المؤشر الورمي (Saadati *et al*., 2019).

وقد أشارت دراسات عديدة الى ارتفاع مستوى اليوريا والكرياتنين لدى مرضى سرطان الثدي اذ يعدالسبب في ذلك هو تأثر الوظيفة البايولوجية للكلية نتيجة لانواع العلاجات المختلفة التي يتعاطاها المرضى, وقد تسبب بعض الاحيان الى تلف نسج الكلية (Nandhini *et al*., 2019), إلا أن الدراسة الحالية أشارت إلى انخفاض في مستوى اليوريا والكرياتنين وهذا يعزى لعدم تضرر الكلية بالاصابة اما كون الاصابة مبكرة او العلاجات المستخدمة ليس لها تاثير جانبي سلبي على وظيفة الكلية (Memon and Shah, 2019).

4.4 الاختبارات الدموية

أظهرت نتائج الدراسة الحالية انخفاضاً معنوياً في العدد الكلي لخلايا الدم البيض وكريات الدم الحمر والصفيحات الدموية ومستوى الهيموكلوبين في دم المرضى المصابين بسرطان الثدي

الجدول (4-8): مستويات مكونات الدم لدى النساء المصابات بسرطان الثدي مقارنة مع مجموعة السيطرة

SAMPLE	WBC ± SE no\ml^3	RBC ± SE no\ml^3	PL ± SE no\ml^3	Hb ± SE (mg/dl)
CONTROL	6 ± 0.5	4.5 ± 0.2	250 ± 11.1	13.5 ± 1.2
PATIENT	3.9 ± 0.05	3.6 ± 0.03	140 ± 17.2	11 ± 0.9

اذ تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما توصلت اليه العديد من الدراسات السابقة, حيث أظهرت إحدى الدراسات انخفاضاً معنوياً في عدد خلايا الدم البيض والصفيحات الدموية لدى النساء المصابات بسرطان الثدي (Ferrandina *et al*., 2003). كما اظهرت دراسة اخرى انخفاضاً في عدد كريات الدم الحمر ومستوى الهيموكلوبين في الدم (Sarkar *et al*., 1995)

يعزى سبب هذا الانخفاض في مكونات الدم الى تأثر نخاع العظم بفعل اورام الثدي, اذ يؤدي الى قصور في انتاج خلايا الدم (Johnson *et al*., 2018). كذلك فإن التعرض الى الجرعات العلاجية العالية سواء كانت اشعاعية آم كيميائية في معالجة سرطان الثدي لها تأثير سلبي في نخاع العظم مما يؤدي الى هبوط في تكوين خلايا الدم (Muralikrishman and Shyamaladevi, 1996), اذ يعزى السبب في هذا الانخفاض الى النمو الغير طبيعي الذي يحدث في العظام نتيجة العلاج الاشعاعي.

ايضا بعض العقاقير الكيمياوية المستخدمة في علاج الاورام السرطانية تمتلك تأثيرا في نخاع العظم بصورة مباشرة تعرف بإحباط نخاع العظم Bone marrow suppression (Koumakis *et al*., 1995), لذلك يجب اجراء التحليلات الدموية المختلفة للدم بشكل دائم عند تلقي الجرعات الكيميائية لدى المصابين بسرطان الثدي, وفي بعض الاحيان يتم هذا التحليل بشكل يومي لمتابعة التاثيرات الناتجة عن العقاقير في فعالية نخاع العظم والتغيرات في مكونات الدم.

الاستنتاجات والتوصيات

Conclusion and Recommendation

الاستنتاجات :

بناءً على ما توصلت اليه هذهِ الدراسة من نتائج, يمكننا التوصل الى الاستنتاجات الآتية :

اولا: تبين أن حالات سرطان الثدي لم تعتمد على عامل معين, إذ تبين ان هناك عدة عوامل منها وراثية تؤدي الى حالات الاصابة بسرطان الثدي التي تتطلب علاجاً اشعاعياً آو كيميائياً أو الى تدخل جراحي.

ثانيا: تواجد الاليل الطافر G في الاكسون 4 للجين *TP53* بنسبة 42% وهذا يدل على تأثير العامل الوراثي في حدوث الاصابة.

ثالثا: تواجد الاليل الطافر C في الاكسون 7 للجين *TP53* بنسبة 61% وهذا يدل على تأثير العامل الوراثي في حدوث الاصابة.

رابعا: أن هناك علاقة بين حالات سرطان الثدي لدى النساء والنمط الوراثي الطافر GG التي تصيب جين الـ (*TP53*) في الموقع (rs1042522).

خامسا: وجود علاقة بين حالات سرطان الثدي لدى النساء والنمط الوراثي الطافر CC التي تصيب جين الـ (*TP53*) في الموقع (codon 249).

سادسا: أن النمط الوراثي الحاوي على الحامض الاميني البرولين اعلى من النمط الوراثي الارجنين بالنسبة للتباين الوراثي (rs1042522) Pro72Arg.

سابعا: أن التباين الوراثي (Codon 249) في الاكسون 7 كان تكراره اكثر من التباين الوراثي (rs1042522) Pro72Arg في العينات المدروسة.

ثامنا: وجود نمط وراثي جديد تابع للجين *TP53* بسبب طفرات والتي تم تسجيلها في موقع الجينات العالمي NCBI.

تاسعا: وجود نمط ظاهري جديد للبروتين P53 تم تسجيله في موقع الجينات العالمي NCBI.

التوصيات:

توصي الدراسة الحالية بإجراء ما يلي :

١. دراسة موسعة للجين *TP53* وتحديد العلاقة بين التعبير الجيني والعلاج المستخدم للاورام.
٢. دراسة شاملة للمرضى المصابين بسرطان الثدي للطفرات (rs1042522) (codon 249) في الجين *TP53* واعتمادها بوصفها مؤشراً للكشف المبكر للاصابة بالورم.
٣. دراسة عامة للمصابين بسرطان الثدي في المجتمع العراقي للنمط الوراثي المسجل واعتماده للتشخيص المبكر للاصابة.
٤. دراسة التباينات الوراثية للجين *TP53* للعوائل التي لها تاريخ مرضي مع سرطان الثدي.
٥. دراسة الجينات الكابحة للورم والجينات الورمية ومدى تاثيرها في الإصابة بسرطان الثدي.

المصادر

References

المصادر

Ahmad, A. (2019). Breast cancer statistics: recent trends. **Breast Cancer Metastasis and Drug Resistance., 1-7.**

Akhter, N. (2019). The Variant Allele Frequency of *p53* Arg72Pro (rs1042522) Polymorphism: A Major Breast Cancer Susceptibility Factor in Saudi and Other Ethnic Groups. **Egyptian Academic Journal of Biological Sciences. C, Physiology and Molecular Biology., 11(1): 1-14.**

Asadi, M.; Shanehbandi, D.; Zarintan, A.; Pedram, N. and *et al*. (2017). *TP53* Gene Pro72Arg (rs1042522) single nucleotide polymorphism as not a risk factor for colorectal cancer in the Iranian Azari population. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP., 18(12): 3423.**

Aubrey, B. J.; Kelly, G. L.; Janic, A.; Herold, M. J. and Strasser, A. (2018). How does *p53* induce apoptosis and how does this relate to *p53*-mediated tumour suppression?. **Cell Death and Differentiation., 25(1): 104-113.**

Aubrey, B. J.; Strasser, A. and Kelly, G. L. (2016). Tumor-suppressor functions of the *TP53* pathway. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine., 6(5): 026062.**

Azamjah, N.; Soltan-Zadeh, Y. and Zayeri, F. (2019). Global trend of breast cancer mortality rate: a 25-year study. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP., 20(7): 2015.**

Bahrami-Ahmadi, A.; Makarian, F.; Mortazavizadeh, M. R. and *et al*. (2012). Symptomatic metastasis prediction with serial measurements of CA 15.3 in primary breast cancer patients. **Journal of Research in Medical Sciences: The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences., 17(9): 850.**

Bargonetti, J. and Prives, C. (2019). Gain-of-function mutant *p53*: history and speculation. **Journal of Molecular Cell Biology., 11(7): 605–609.**

Basabaeen, A. A. M.; Abdelgader, E. A.; Babekir, E. A.; Abdelrahim, S. O. and *et al*. (2019). *TP53* gene 72 arg/pro (rs1042522) single nucleotide polymorphism contribute to increase the risk of b-chronic lymphocytic leukemia in the Sudanese population. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP., 20(5): 1579.**

Berke, T. P.; Slight, S. H. and Hyder, S. M. (2022). Role of Reactivating Mutant p53 Protein in Suppressing Growth and Metastasis of Triple-Negative Breast Cancer. **OncoTargets and Therapy., 15: 23.**

Bertoli, C.; Skotheim, J. M. and De Bruin, R. A. (2013). Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. **Nature Reviews Molecular Cell Biology., 14(8): 518-528.**

Bishop, J. M. (1990). Retroviruses and oncogenes II (Nobel lecture). **Angewandte Chemie International Edition in English., 29(7): 716-724.**

Bouaoun, L.; Sonkin, D.; Ardin, M.; Hollstein, M. and *et al*. (2016). *TP53* variations in human cancers: new lessons from the IARC *TP53* database and genomics data. **Human Mutation., 37(9): 865-876.**

Brentnall, A. R.; van Veen, E. M.; Harkness, E. F.; Rafiq, S. and *et al*. (2020). A case–control evaluation of 143 single nucleotide polymorphisms for breast cancer risk stratification with classical factors and mammographic density. **International Journal of Cancer., 146(8): 2122-2129.**

Brosh, R. and Rotter, V. (2009). When mutants gain new powers: news from the mutant *p53* field. **Nature Reviews Cancer., 9(10): 701-713.**

Brown, G. (2021). Oncogenes, proto-oncogenes, and lineage restriction of cancer stem cells. **International Journal of Molecular Sciences., 22(18): 9667.**

Bryant, A. K.; Sojourner, E. J.; Vitzthum, L. K.; Zakeri, K. and *et al*. (2018). Prognostic role of p16 in nonoropharyngeal head and neck cancer. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute., 110(12): 1393-1399.**

Burke, P. J. (2017). Mitochondria, bioenergetics and apoptosis in cancer. **Trends in Cancer., 3(12): 857-870.**

Cao, X.; Hou, J.; An, Q.; Assaraf, Y. G. and Wang, X. (2020). Towards the overcoming of anticancer drug resistance mediated by *p53* mutations. **Drug Resistance Updates., 49: 100671.**

Carneiro, B. A. and El-Deiry, W. S. (2020). Targeting apoptosis in cancer therapy. **Nature reviews Clinical Oncology., 17(7): 395-417.**

Cetraro, P.; Plaza-Diaz, J.; MacKenzie, A. and Abadía-Molina, F. (2022). A Review of the Current Impact of Inhibitors of Apoptosis Proteins and Their Repression in Cancer. **Cancers., 14(7): 1671.**

Chen, J. (2016). The cell-cycle arrest and apoptotic functions of *p53* in tumor initiation and progression. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine., 6(3): 026104.**

Chen, L.; Liu, S. and Tao, Y. (2020). Regulating tumor suppressor genes: post-translational modifications. **Signal Transduction and Targeted Therapy., 5(1): 90.**

Cooper, G. M.; Hausman, R. E. and Hausman, R. E. (2007). The cell: a molecular approach Washington, DC, USA:: **ASM press., 4: 649-656.**

Croce, C. M. (2008). Oncogenes and cancer. **New England Journal of Medicine., 358(5): 502-511.**

Cunha, E. D. A.; Bourroul, S. and Cotrin, S. S. (2014). Atividade da *P53* no desenvolvimento do câncer. **Atas de Ciências da Saúde (ISSN 2448-3753)., 2(3).**

Dahabreh, I. J.; Schmid, C. H.; Lau, J.; Varvarigou, V. and *et al*. (2013). Genotype misclassification in genetic association studies of the rs1042522 *TP53* (Arg72Pro) polymorphism: a systematic review of studies of breast, lung, colorectal, ovarian, and endometrial cancer. **American Journal of Epidemiology., 177(12): 1317-1325.**

Datta, N.; Chakraborty, S.; Basu, M. and Ghosh, M. K. (2020). Tumor suppressors having oncogenic functions: the double agents. **Cells., 10(1): 46.**

David, J. M.; Hamilton, D. H. and Palena, C. (2016). MUC1 upregulation promotes immune resistance in tumor cells undergoing brachyury-mediated epithelial-mesenchymal transition. **Oncoimmunology., 5(4): 1117738.**

De Bakker, T.; Journe, F.; Descamps, G.; Saussez, S. and *et al*. (2021). Restoring *p53* function in head and neck squamous cell carcinoma to improve treatments. **Frontiers in Oncology., 11.**

Doffe, F.; Carbonnier, V.; Tissier, M.; Leroy, B. and *et al*. (2021). Identification and functional characterization of new missense SNPs in the coding region of the *TP53* gene. **Cell Death and Differentiation., 28(5): 1477-1492.**

Duffy, M. J.; Synnott, N. C.; O'Grady, S. and Crown, J. (2022). Targeting *p53* for the treatment of cancer. **Seminars in Cancer Biology., 79: 58–67.**

Edelbrock, M. A.; Kaliyaperumal, S. and Williams, K. J. (2013). Structural, molecular and cellular functions of MSH2 and MSH6 during DNA mismatch repair, damage signaling and other noncanonical activities. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 743: 53-66.**

Engeland, K. (2022). Cell cycle regulation: *p53-p21*-RB signaling. **Cell Death and Differentiation., 1-15.**

Feng, Y.; Spezia, M.; Huang, S.; Yuan, C. and *et al*. (2018). Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. **Genes and Diseases., 5(2): 77-106.**

Ferlay, J.; Colombet, M.; Soerjomataram, I.; Parkin, D. M. and *et al*. (2021). Cancer statistics for the year 2020: An overview. **International Journal of Cancer., 149(4): 778-789.**

Feroz, W. and Sheikh, A. M. A. (2020). Exploring the multiple roles of guardian of the genome: *P53*. **Egyptian Journal of Medical Human Genetics., 21(1): 1-23.**

Ferrandina, G.; Pierelli, L.; Perillo, A.; Rutella, S. and *et al*. (2003). Lymphocyte recovery in advanced ovarian cancer patients after high-dose chemotherapy and peripheral blood stem cell plus growth factor support: clinical implications. **Clinical Cancer Research., 9(1): 195-200.**

Frebourg, T.; Bajalica Lagercrantz, S.; Oliveira, C.; Magenheim, R. and Evans, D. G. (2020). Guidelines for the Li–Fraumeni and heritable *TP53*-related cancer syndromes. **European Journal of Human Genetics., 28(10): 1379-1386.**

Friend, S. H.; Dryja, T. P.; and Weinberg, R. A. (1988). Oncogenes and tumor-suppressing genes. **New England Journal of Medicine, 318(10), 618-622.**

Gao, L.; Wu, Z. X.; Assaraf, Y. G.; Chen, Z. S. and Wang, L. (2021). Overcoming anti-cancer drug resistance via restoration of tumor suppressor gene function. **Drug Resistance Updates., 57, 100770.**

Green, D. R.; Galluzzi, L. and Kroemer, G. (2014). Cell biology. Metabolic control of cell death. **Science (New York, N.Y.)., 345(6203): 1250256.**

Guha, A.; Fradley, M. G.; Dent, S. F.; Weintraub, N. L. and *et al*. (2022). Incidence, risk factors, and mortality of atrial fibrillation in breast cancer: a SEER-Medicare analysis. **European Heart Journal., 43(4): 300-312.**

Gurpinar, E. and Vousden, K. H. (2015). Hitting cancers' weak spots: vulnerabilities imposed by *p53* mutation. **Trends in Cell Biology., 25(8): 486–495.**

Haimovici, A.; Höfer, C.; Badr, M. T.; Bavafaye Haghighi, E. and *et al*. (2022). Spontaneous activity of the mitochondrial apoptosis pathway drives chromosomal defects, the appearance of micronuclei and cancer metastasis through the Caspase-Activated DNAse. **Cell Death and Disease., 13(4): 1-14.**

Hainaut, P. and Pfeifer, G. P. (2016). Somatic *TP53* Mutations in the Era of Genome Sequencing. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine., 6(11): 026179.**

Hebert-Magee, S.; Yu, H.; Behring, M.; Jadhav, T.; Shanmugam, C. and *et al*. (2019). The combined survival effect of codon 72 polymorphisms and *p53* somatic mutations in breast cancer depends on race and molecular subtype. **PloS one., 14(2): 0211734.**

Hientz, K.; Mohr, A.; Bhakta-Guha, D. and Efferth, T. (2017). The role of *p53* in cancer drug resistance and targeted chemotherapy. **Oncotarget., 8(5): 8921–8946.**

Hing, J. X.; Mok, C. W.; Tan, P. T.; Sudhakar, S. S. and *et al*. (2020). Clinical utility of tumour marker velocity of cancer antigen 15–3 (CA 15–3) and carcinoembryonic antigen (CEA) in breast cancer surveillance. **The Breast., 52: 95-101.**

Hofseth, L. J.; Hussain, S. P. and Harris, C. C. (2004). *p53*: 25 years after its discovery. **Trends in Pharmacological Sciences., 25(4): 177-181.**

Huszno, J. and Grzybowska, E. (2018). *TP53* mutations and SNPs as prognostic and predictive factors in patients with breast cancer. **Oncology letters., 16(1): 34–40.**

Iranpur, V. and Esmailizadeh, A. (2010). Rapid Extraction of High Quality DNA from Whole Blood Stored at 4ºC for Long Period. Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran. www. Protocol-online.org.

Ismaeel, A. G. (2013). New Approach for Prediction Pre-cancer via Detecting Mutated in Tumor Protein P53. **arXiv preprint arXiv., 1310.2182.**

Jacobsen, B. M. and Horwitz, K. B. (2012). Progesterone receptors, their isoforms and progesterone regulated transcription. **Molecular and Cellular Endocrinology., 357(1-2): 18-29.**

Jiang, L. and Zawacka-Pankau, J. (2020). The *p53*/*MDM2*/*MDMX*-targeted therapies—A clinical synopsis. **Cell Death and Disease., 11(4): 1-4.**

Johnson, S. B.; Park, H. S.; Gross, C. P. and James, B. Y. (2018). Complementary medicine, refusal of conventional cancer therapy, and survival among patients with curable cancers. **JAMA Oncology., 4(10): 1375-1381.**

Kabel, A. M. (2017). Tumor markers of breast cancer: New prospectives. **Journal of Oncological Sciences., 3(1): 5-11.**

Kabel, A. M. and Baali, F. H. (2015). Breast cancer: insights into risk factors, pathogenesis, diagnosis and management. **Journal of Cancer Research and Treatment., 3(2): 28-33.**

Kabel, A. M. and Elkhoely, A. A. (2016). Ameliorative potential of fluoxetine/raloxifene combination on experimentally induced breast cancer. **Tissue and Cell., 48(2): 89-95.**

Kerr, A. J.; Dodwell, D.; McGale, P.; Holt, F. and *et al*. (2022). Adjuvant and neoadjuvant breast cancer treatments: A systematic review of their effects on mortality. **Cancer Treatment Reviews., 102375.**

Kim, M. P. and Lozano, G. (2018). Mutant *p53* partners in crime. **Cell Death and Differentiation., 25(1): 161-168.**

Knudson, A. G. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences., 68(4): 820-823.**

Koff, J. L.; Ramachandiran, S. and Bernal-Mizrachi, L. (2015). A time to kill: targeting apoptosis in cancer. **International Journal of Molecular Sciences., 16(2): 2942-2955.**

Kontomanolis, E. N.; Kalagasidou, S.; Pouliliou, S.; Anthoulaki, X. and *et al*. (2018). The notch pathway in breast cancer progression. **The Scientific World Journal.**

Koo, N.; Sharma, A. K. and Narayan, S. (2022). Therapeutics Targeting *p53-MDM2* Interaction to Induce Cancer Cell Death. **International Journal of Molecular Sciences., 23(9): 5005.**

Koumakis, G.; Filis, J.; Vassilomanolakis, M.; Papanastasiou, K. and *et al*. (1995). Relation Between Hematological Recovery and Number of Transplanted Mononuclear Cells in Patients after High Dose Chemotherapy with Peripheral Blood Stem Cell (PBSC) Rescue. **Blood Cells, Molecules, and Diseases., 21(3): 235-238.**

Lee, E. Y. and Muller, W. J. (2010). Oncogenes and tumor suppressor genes. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology., 2(10): 003236.**

Lever, J.; Zhao, E. Y.; Grewal, J.; Jones, M. R. and Jones, S. J. (2019). CancerMine: a literature-mined resource for drivers, oncogenes and tumor suppressors in cancer. **Nature Methods., 16(6): 505-507.**

Levine, A. J. (2019). Targeting therapies for the p53 protein in cancer treatments. **Annual Review of Cancer Biology., 3: 21-34.**

Levine, A. J. and Puzio-Kuter, A. M. (2010). The control of the metabolic switch in cancers by oncogenes and tumor suppressor genes. **Science., 330(6009): 1340-1344.**

Liu, J.; Peng, Y. and Wei, W. (2021). Cell cycle on the crossroad of tumorigenesis and cancer therapy. Trends in cell biology.

Liu, J.; Zhang, C. and Feng, Z. (2014). Tumor suppressor *p53* and its gain-of-function mutants in cancer. **Acta Biochimestry Biophysics Science., 46(3): 170-179.**

Macedo, G. S.; Araujo Vieira, I.; Brandalize, A. P.; Giacomazzi, J. and *et al*. (2016). Rare germline variant (rs78378222) in the *TP53* 3' UTR: Evidence for a new mechanism of cancer predisposition in Li-Fraumeni syndrome. **Cancer Genetics., 209(3): 97–106.**

Mann, R. M.; Athanasiou, A.; Baltzer, P. A. and *et al*. (2022). Breast cancer screening in women with extremely dense breasts recommendations of the European Society of Breast Imaging (EUSOBI). **European Radiology., 1-10.**

Manuali, E.; De Giuseppe, A.; Feliziani, F.; Forti, K. and *et al*. (2012). CA 15–3 cell lines and tissue expression in canine mammary cancer and the correlation between serum levels and tumour histological grade. **BMC Veterinary Research., 8(1): 1-10.**

Marić, P.; Ozretić, P.; Levanat, S.; Orešković, S. and *et al*. (2011). Tumor markers in breast cancer–evaluation of their clinical usefulness. **Collegium Antropologicum., 35(1): 241-247.**

Matikas, A.; Kotsakis, A.; Apostolaki, S.; Politaki, H. and *et al*. (2022).Detection of circulating tumour cells before and following adjuvant chemotherapy and long-term prognosis of early breast cancer. **British Journal of Cancer., 1-7.**

Mattiuzzi, C. and Lippi, G. (2019). Current cancer epidemiology. **Journal of Epidemiology and Global Health, 9(4): 217.**

Mazelin, L.; Panthu, B.; Nicot, A. S.; Belotti, E. and *et al*. (2016). mTOR inactivation in myocardium from infant mice rapidly leads to dilated cardiomyopathy due to translation defects and *p53*/*JNK*-mediated apoptosis. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology., 97: 213-225.**

Memon, H. A. and Shah, A. M. (2019). To Evaluate the Changes Arise in the Parameters of Liver and Kidney during Adjuvant Chemotherapy in Breast Cancer Patients. **Liaquat Medical Research Journal., 1(2): 31-34.**

Mishra, P. A.; Chaudhari, H. R.; Desai, J. S. and Khan, U. N. (2013). *p53*: An overview. **Internafional Journal of Pharmacy and Pharmaceufical Sciences., 5: 59-65.**

Mohammad, R. M.; Muqbil, I.; Lowe, L.; Yedjou, C. and *et al*. (2015). Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer. **Seminars in Cancer Biology. Academic Press., 35: 78-103.**

Momenimovahed, Z. and Salehiniya, H. (2019). Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. **Breast Cancer: Targets and Therapy., 11: 151.**

Morris, L. G. and Chan, T. A. (2015). Therapeutic targeting of tumor suppressor genes. **Cancer., 121(9): 1357-1368.**

Mouabbi, J. A.; Hassan, A.; Lim, B.; Hortobagyi, G. N. and *et al*. (2022). Invasive lobular carcinoma: an understudied emergent subtype of breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment., 1-12.**

Moxley, A. H. and Reisman, D. (2021). Context is key: Understanding the regulation, functional control, and activities of the *p53* tumor suppressor. **Cell Biochemistry and Function., 39(2): 235-247.**

Mueller, C. R. and Roskelley, C. D. (2002). Regulation of BRCA1 expression and its relationship to sporadic breast cancer. **Breast Cancer Research., 5(1): 1-8.**

Muller, P. A. and Vousden, K. H. (2013). *p53* mutations in cancer. **Nature cell Biology., 15(1): 2-8.**

Muller, P. A. and Vousden, K. H. (2014). Mutant *p53* in cancer: new functions and therapeutic opportunities. **Cancer Cell., 25(3): 304–317.**

Muralikrishnan, G. and Shyamaladevi, C. S. (1996). The modulating effect of glutathione on lipid peroxidation in rats treated with anticancer drugs and X-ray irradiation. **Indian Journal Pharmacol., 28: 188-90.**

Nagpal, M.; Singh, S.; Singh, P.; Chauhan, P. and Zaidi, M. A. (2016). Tumor markers: A diagnostic tool. **National Journal of Maxillofacial Surgery., 7(1): 17.**

Nandhini, T.; Priya, J. and Devi, R. G. (2019). Biochemical evaluation of patients with breast cancer. **Drug Invention Today., 11(8).**

Nepomuceno, L.; Ferreira, J. L.; Cruz, V.; Gabriel, G. and Araújo, E. (2018). P53 Protein and its fundamental role in the cell cycle, apoptosis and cancer. **Enciclopedia Biosfera., 15(28).**

Olivier, M.; Hollstein, M. and Hainaut, P. (2010). *TP53* mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology., 2(1): 001008.**

Osterburg, C. and Dötsch, V. (2022). Structural diversity of p63 and p73 isoforms. **Cell Death and Differentiation., 29(5): 921-937.**

Pant, V. and Lozano, G. (2014). Dissecting the *p53-Mdm2* feedback loop *in vivo*: uncoupling the role in *p53* stability and activity. **Oncotarget., 5(5): 1149–1156.**

Pitolli, C.; Wang, Y.; Mancini, M.; Shi, Y. and *et al*. (2019). Do mutations turn *p53* into an oncogene?. **International Journal of Molecular Sciences., 20(24): 6241.**

Rack, B.; Schindlbeck, C.; Jueckstock, J.; Genss, E. M. and *et al*. (2010). Prevalence of CA 27.29 in primary breast cancer patients before the start of systemic treatment. **Anticancer Research., 30(5): 1837-1841.**

Raffone, A.; Travaglino, A.; Cerbone, M.; De Luca, C. and *et al*. (2020). Diagnostic accuracy of *p53* immunohistochemistry as surrogate of *TP53* sequencing in endometrial cancer. **Pathology-Research and Practice., 216(8): 153025.**

Rivlin, N.; Brosh, R.; Oren, M. and Rotter, V. (2011). Mutations in the *p53* tumor suppressor gene: important milestones at the various steps of tumorigenesis. **Genes and Cancer., 2(4): 466-474.**

Saadati, A.; Hassanpour, S.; Hasanzadeh, M.; Shadjou, N. and Hassanzadeh, A. (2019). Immunosensing of breast cancer tumor protein CA 15-3 (carbohydrate antigen 15.3) using a novel nano-bioink: A new platform for screening of proteins in human biofluids by pen-on-paper

technology. **International Journal of Biological Macromolecules., 132: 748-758.**

Saito, M.; Goto, A.; Abe, N.; Saito, K. and *et al*. (2018). Decreased expression of CADM1 and CADM4 are associated with advanced stage breast cancer. **Oncology letters, 15(2): 2401-2406.**

Sarkar, A.; Bishayee, A. and Chatterjee, M. (1995). Beta-carotene prevents lipid peroxidation and red blood cell membrane protein damage in experimental hepatocarcinogenesis. **Cancer Biochemistry Biophysics., 15(2): 111-125.**

Saxena, K. and Konopleva, M. (2020). An expert overview of emerging therapies for acute myeloid leukemia: Novel small molecules targeting apoptosis, *p53*, transcriptional regulation and metabolism. **Expert Opinion on Investigational Drugs., 29(9): 973-988.**

Shah, R.; Rosso, K. and Nathanson, S. D. (2014). Pathogenesis, prevention, diagnosis and treatment of breast cancer. **World Journal of Clinical Oncology., 5(3): 283.**

Shao, Y.; Sun, X.; He, Y.; Liu, C. and Liu, H. (2015). Elevated levels of serum tumor markers CEA and CA15-3 are prognostic parameters for different molecular subtypes of breast cancer. **PloS one., 10(7): 0133830.**

Shen, L.; Shi, Q. and Wang, W. (2018). Double agents: genes with both oncogenic and tumor-suppressor functions. **Oncogenesis., 7(3): 1-14.**

Shortt, J. and Johnstone, R. W. (2012). Oncogenes in cell survival and cell death. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology., 4(12): 009829.**

Sokoll, L. J. and Chan, D. W. (2020). Tumor markers. **Contemporary Practice in Clinical Chemistry. Academic Press., 779-793**

Takahashi, C. and Kato, J. Y. (2022). Targeting Abnormal Cell Cycle in Cancer: A Preface to the Special Issue. **Oncogenesis., 2(1): 34-35.**

Takaoka, M. and Miki, Y. (2018). BRCA1 gene: function and deficiency. **International Journal of Clinical Oncology., 23(1): 36-44.**

Talib, W. H.; Al-Hadid, S. A.; Ali, M. B. W.; Al-Yasari, I. H. and Abd Ali, M. (2018). Role of curcumin in regulating p53 in breast cancer: An overview of the mechanism of action. Breast Cancer: **Targets and Therapy., 10, 207.**

Tang, Q.; Su, Z.; Gu, W. and Rustgi, A. K. (2020). Mutant *p53* on the path to metastasis. **Trends in Cancer., 6(1): 62-73.**

Timofeev O. (2021). Editorial: Mutant *p53* in Cancer Progression and Personalized Therapeutic Treatments. **Frontiers in Oncology., 11: 740578.**

van Hellemond, I. E.; Geurts, S. M. and Tjan-Heijnen, V. C. (2018). Current status of extended adjuvant endocrine therapy in early stage breast cancer. **Current treatment options in oncology., 19(5): 1-18.**

Varna, M.; Bousquet, G.; Plassa, L. F.; Bertheau, P. and Janin, A. (2011). *TP53* status and response to treatment in breast cancers. **Journal of Biomedicine and Biotechnology., 2011, 284584.**

Vieler, M. and Sanyal, S. (2018). *p53* isoforms and their implications in cancer. **Cancers., 10(9): 288.**

Vijayaraman, K. P.; Veluchamy, M.; Murugesan, P.; Shanmugiah, K. P. and Kasi, P. D. (2012). *p53* exon 4 (codon 72) polymorphism and exon 7 (codon 249) mutation in breast cancer patients in southern region (Madurai) of Tamil Nadu. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention., 13(2): 511-516.**

Waks, A. G.; Kim, D.; Jain, E.; Snow, C. and *et al*. (2022). Somatic and germline genomic alterations in very young women with breast cancer. Clinical Cancer Research.

Wang, L. H.; Wu, C. F.; Rajasekaran, N. and Shin, Y. K. (2018). Loss of tumor suppressor gene function in human cancer: An overview. **Cellular Physiology and Biochemistry., 51(6): 2647-2693.**

Wang, S.; Zhao, Y.; Aguilar, A.; Bernard, D. and Yang, C. Y. (2017). Targeting the *MDM2-p53* Protein-Protein Interaction for New Cancer Therapy: Progress and Challenges. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine., 7(5): 026245.**

Wang, Z.; Strasser, A. and Kelly, G. L. (2022). Should mutant *TP53* be targeted for cancer therapy?. **Cell Death and Differentiation., 29(5): 911-920.**

Weinberg, R. A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. **Cell., 81(3): 323-330.**

Wenzel, E. S. and Singh, A. T. (2018). Cell-cycle checkpoints and aneuploidy on the path to cancer. ***In Vivo*., 32(1): 1-5.**

Witkiewicz, A. K.; Kumarasamy, V.; Sanidas, I. and Knudsen, E. S. (2022). Cancer cell cycle dystopia: heterogeneity, plasticity, and therapy. **Trends in Cancer.**

Woods, S. J.; Hannan, K. M.; Pearson, R. B. and Hannan, R. D. (2015). The nucleolus as a fundamental regulator of the *p53* response and a new target for cancer therapy. **Biochimica et Biophysica acta., 1849(7): 821–829.**

Xiong, Y.; Hannon, G. J.; Zhang, H.; Casso, D. and *et al*. (1993). *p21* is a universal inhibitor of cyclin kinases. **Nature., 366(6456): 701-704.**

Yedjou, C. G.; Sims, J. N.; Miele, L.; Noubissi, F. and *et al*. (2019). Health and racial disparity in breast cancer. **Breast Cancer Metastasis and Drug Resistance., 31-49.**

Yokota, J. (2000). Tumor progression and metastasis. **Carcinogenesis., 21(3): 497-503.**

Zhang, C.; Liu, J.; Xu, D.; Zhang, T.; Hu, W. and Feng, Z. (2020). Gain-of-function mutant *p53* in cancer progression and therapy. **Journal of Molecular Cell Biology., 12(9): 674-687.**

Zhao, K.; Yang, Y.; Zhang, G.; Wang, C. and *et al*. (2018). Regulation of the *Mdm2-p53* pathway by the ubiquitin E3 ligase MARCH7. **EMBO Reports., 19(2): 305–319.**

Zhao, M.; Sun, J. and Zhao, Z. (2013). TSGene: a web resource for tumor suppressor genes. **Nucleic Acids Research., 41(1): 970-976.**

Zhu, G.; Pan, C.; Bei, J. X.; Li, B.; Liang, C.; Xu, Y. and Fu, X. (2020). Mutant *p53* in cancer progression and targeted therapies. **Frontiers in Oncology., 10: 595187.**

Zwart, W.; Theodorou, V. and Carroll, J. S. (2011). Estrogen receptor-positive breast cancer: a multidisciplinary challenge. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine., 3(2): 216-230.**

الملاحق

Appendices

الملحق(١)

تسجيل البروتين P53 في موقع NCBI العالمي

Protein

COVID-19 Information

Public health information (CDC)

Research information (NIH)

SARS-CoV-2 data (NCBI)

Prevention and treatment information (HHS)

Español

GenPept

tumor suppressor protein p53, partial [Homo sapiens]

GenBank: BDF83325.1

Identical Proteins FASTA Graphics

Go to:

```
LOCUS       BDF83325                 93 aa            linear   PRI 08-FEB-2022
DEFINITION  tumor suppressor protein p53, partial [Homo sapiens].
ACCESSION   BDF83325
VERSION     BDF83325.1
DBSOURCE    accession LC682536.1
KEYWORDS    .
SOURCE      Homo sapiens (human)
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
            Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini;
            Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1
  AUTHORS   Hamead,M.
  TITLE     Detection of new Mutation in P53 gene in Iraqi population
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (residues 1 to 93)
  AUTHORS   Hamead,M. and Hamed,O.M.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (04-FEB-2022) Contact:Mohammad Hamead University of
            Mosul, Department of Biology; Almajmoaa, Mosul, North of IRAQ
            09334, Iraq
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..93
                     /organism="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:9606"
                     /cell_type="leukocyte"
                     /tissue_type="blood"
                     /country="Iraq: Mosul"
                     /collection_date="2021-10-07"
     Protein         <1..>93
                     /product="tumor suppressor protein p53"
     CDS             1..93
                     /gene="P53"
                     /coded_by="LC682536.1:<52..>329"
ORIGIN
        1 splpsqamdd lmlspddieq wftedpgpde aprmpeaapr vapapaaptp aapapapswp
       61 lsssvrsqkt yqgrygfrgg vghsgtakcv rar
//
```

HHS Vulnerability Disclosure

الملحق (٢)

تسجيل الجين *TP53* في موقع NCBI العالمي

Nucleotide

COVID-19 Information

Public health information (CDC)

Research information (NIH)

SARS-CoV-2 data (NCBI)

Prevention and treatment information (HHS)

Español

GenBank

Homo sapiens P53 gene for tumor suppressor protein p53, partial cds

GenBank: LC682536.1

FASTA Graphics

Go to:

```
LOCUS       LC682536                335 bp    DNA     linear   PRI 08-FEB-2022
DEFINITION  Homo sapiens P53 gene for tumor suppressor protein p53, partial
            cds.
ACCESSION   LC682536
VERSION     LC682536.1
KEYWORDS    .
SOURCE      Homo sapiens (human)
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
            Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini;
            Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1
  AUTHORS   Hamead,M.
  TITLE     Detection of new Mutation in P53 gene in Iraqi population
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 335)
  AUTHORS   Hamead,M. and Hamed,O.M.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (04-FEB-2022) Contact:Mohammad Hamead University of
            Mosul, Department of Biology; Almajmoaa, Mosul, North of IRAQ
            09334, Iraq
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..335
                     /organism="Homo sapiens"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /db_xref="taxon:9606"
                     /cell_type="leukocyte"
                     /tissue_type="blood"
                     /country="Iraq: Mosul"
                     /collection_date="2021-10-07"
     gene            <52..>329
                     /gene="P53"
     CDS             <52..>329
                     /gene="P53"
                     /codon_start=1
                     /product="tumor suppressor protein p53"
                     /protein_id="BDF83325.1"
                     /translation="SPLPSQAMDDLMLSPDDIEQWFTEDPGPDEAPRMPEAAPRVAPA
                     PAAPTPAAPAPAPSWPLSSSVRSQKTYQGRYGFRGGVGHSGTAKCVRAR"
     exon            52..329
                     /gene="P53"
                     /number=4
ORIGIN
        1 gtgggggggct gaggacctgg tcctctgact gctcttttca cccatctaca gtccccctttg
       61 ccgtcccaag caatggatga tttgatgctg tccccggacg atattgaaca atggttcact
      121 gaagacccag gtccagatga agctcccaga atgccagagg ctgctccccg cgtggccct
      181 gcaccagcag ctcctacacc ggcggccccct gcaccagccc cctcctggcc cctgtcatct
      241 tcggttcgtt cccagaaaac ctaccagggc aggtacggtt tccgtggggg ggtggggcat
      301 tcggggacag ccaagtgtgt gagggcacgg tcagt
//
```

HHS Vulnerability Disclosure

Abstract

Dysfunction of P53 protein has been associated with approximately 75% of different types of cancer and this malfunction often results mutation in *TP53* gene. *TP53* activated as a response to DNA damage, hypoxia and repairs damaged DNA, acting on cell aging and apoptosis. These activities are important for suppressing tumor formation as well as for mediating cellular responses related to cell cycle control being a key component of tumor suppression.

The current study included (96) women with ages ranging between (45-35) years who were referred to the Alternative Nuclear Medicine and Oncology Hospital in the city of Mosul in a period of time ranging from September to November of 2021. The samples were divided into two groups, the first included 25 women as a control group and the second included 71 women with breast cancer.

This study determined the polymorphisms of *TP53* in codon 249 for exon 7 and (rs1042522) in exon 4, also the nucleotide sequences of the amplified pieces were done by DNA sequencing technology, as well as a number of biochemical parameters and blood component were measured. Such as the measurement of CA 15-3, urea, creatinine, red blood cells, white blood cells, platelets and hemoglobin concentration.

The results of the genetic variation in the locus (rs1042522) in exon 4 in women with breast cancer showed that the recurrence rate of the GG mutant genotype is the highest in women with breast cancer by 19% compared to the genotype mutant in the control group by 10%, while the percentage of the normal genotype CC was the lowest among women diagnosed with breast cancer by 35% compared to the control group in which the percentage of the normal genotype was high 70% , as for the heterogeneous CG genotype, the percentage of seeing it was high in the group of patients 56% compared to the

control group 20%. As for the allelic recurrence, the results showed that the percentage of observing the mutant G allele was high in the patients group 42% compared to the control group 20%, as for the normal allele, it was 58% in patients compared to the control group 80%. The results of the study also showed that the value of the probability level for the mutant GG genotype was O.R = 4.038 at the probability level of P = 0.089, and for the mutant allele, the probability level was O.R = 3.06 at the probability level of P = 0.008. The results also showed that the allelic frequency ratio for the natural allele C was The highest was 0.58 compared to the frequency of the mutant G allele of 0.42 in the study groups.

The results of the study for the genetic variation at the site (codon 249) of the *TP53* gene in exon No. 7 of the group of patients showed that the percentage of observation for the mutant genotype CC was the highest 69%, and the percentage of observation for the normal genotype GG was the lowest 11%, while for the heterogeneous CG genotype was The viewing rate was 20% compared to the healthy group, as the percentage of viewing for the mutant genotype CC was the lowest 5%, and the percentage of viewing for the normal genotype GG was the highest 61%. As for the heterogeneous genotype CG, the percentage of viewership was 34%, and the percentage of allelic viewing was 61% of the mutant allele C and 39% of the normal allele G in women with breast cancer compared to the control group, as the percentage of observation for the mutant allele was 22% compared to the normal allele of 78%. The results of the study also showed that the O.R = 84.5 for the mutant genotype was very high at the P = 0.0001 probability level, and the O.R = 14.2 for the mutated allele was O.R = 14.2 at the P < 0.0001 probability level. The study also showed that the allelic frequency of the mutant allele was 0.79 compared to the normal allele frequency of 0.21.

After making a sequencing test for the amplified exons of the gene, the results showed that there was a variation of a number of nucleotides in exon No.

3, 4 and 6, while the results of the sequence did not show any variation of the nucleotides in exon No. 5. Also, through this study, a new genotype of the *TP53* gene was recorded in the city of Mosul at the NCBI global gene site. was given the identification number GenBank: LC682536.1. In addition, a new phenotype of the P53 tumor suppressor protein was recorded in the city of Mosul at the NCBI global site and was given the identification number GenBank: BDF83325.1

The results of the study showed a significant increase in the levels of CA15-3 in the blood plasma of patients with breast cancer compared to the healthy ones, and also showed a significant decrease in the levels of urea and creatinine compared to the healthy ones, as the study showed that the levels of CA15-3 in patients are 125.82 (U/ml) compared to the healthy ones, as the ratio was 23 (U/ml), and the levels of urea in the patients were 38.2 (mg/dl) and creatinine 0.6 (mg/dl) compared with the healthy ones, as it was 41 (mg/dl) and 1.4 (mg/dl) respectively. The results of the current study showed a significant decrease in the total number of white blood cells, red blood cells, platelets and hemoglobin levels in the blood of patients with breast cancer.

University of Mosul
College of Science

Determination of *P53* suppressor Gene Mutation in Women with Breast cancer in Mosul city

Mohammad Abd Alrazaq Hameed Al-Dulaimi

M.Sc. Thesis

In

Biology / Zoology

Supervised By

Assistant Professor

Dr. Owayes M. Hamed Al-Hassani

1444 A.H. **2022 A.D.**

Determination of *P53* suppressor Gene Mutation in Women with Breast cancer in Mosul city

A Thesis submitted by

Mohammad Abd Alrazaq Hameed Al-Dulaimi

To

The Council of College of Science University of Mosul in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of

Master Science

In

Biology / Zoology

Supervised By

Assistant Professor

Dr. Owayes M. Hamed Al-Hassani

1444 A.H. **2022 A.D.**