



جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة ديالى
كلية التربية للعلوم الصرفة

دراسة بعض المؤشرات الجزيئية والفسلجية لمريضات سرطان الثدي في محافظة ديالى

رسالة مقدمة

إلى

مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة/ جامعة ديالى

وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير في علوم الحياة/ علم الحيوان

من قبل الطالبة

نور جاسم محمد الشمري

بكالوريوس علوم حياة 2014

بإشراف

د. فاضل أحمد دلف

أ.م.د. عمار احمد سلطان القره غولي

2017م

1438هـ

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

﴿اللَّهُ نُورُ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ مِثْلُ نُورِهِ
كَمِشْكُوهٍ فِيهَا مِصْبَاحٌ الْمِصْبَاحُ فِي زُجَاجَةٍ
الزُّجَاجَةُ كَأَنَّهَا كَوْكَبٌ دُرِّيٌّ يُوقَدُ مِنْ شَجَرَةٍ
مُبَارَكَةٍ زَيْتُونَةٍ لَا شَرْقِيَّةٍ وَلَا غَرْبِيَّةٍ يَكَادُ
زَيْتُهَا يُضِيءُ وَلَوْ لَمْ تَمْسَسْهُ نَارٌ نُورٌ عَلَى نُورٍ
يَهْدِي اللَّهُ لِنُورِهِ مَنْ يَشَاءُ وَيَضْرِبُ اللَّهُ الْأَمْثَلَ
لِلنَّاسِ وَاللَّهُ بِكُلِّ شَيْءٍ عَلِيمٌ﴾

سورة النور

الآية: ٣٥

بسم الله الرحمن الرحيم

اقرار المقوم اللغوي

اشهد ان اعداد هذه الرسالة الموسومة (دراسة بعض المؤشرات الجزيئية والفسنجية لمريضات سرطان الثدي في محافظة ديالى) التي قدمتها طالبة الماجستير (نور جاسم محمد نعمة الشمري) تمت مراجعتها من الناحية اللغوية بأشرافي بحيث اصبحت بأسلوب لغوي سليم خال من الاءخطاء غير الصحيحة والتعبيرات ولأجله وقعت

التوقيع : 

الاسم : د. عبد الرضا عبد الرزاق

المرتبة العلمية : مدرس دكتور

التاريخ :

بسم الله الرحمن الرحيم

اقرار المقوم العلمي

اشهد ان اعداد هذه الرسالة الموسومة (دراسة بعض المؤشرات الجزيئية والفسلجية لمريضات سرطان الثدي في محافظة ديالى) التي قدمتها طالبة الماجستير (نور جاسم محمد نعمة الشمري) تمت مراجعتها من الناحية العلمية، وبذلك أصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة

ابراهيم

التوقيع :

الاسم : د. ابراهيم الهادي

المرتبة العلمية : استاذ

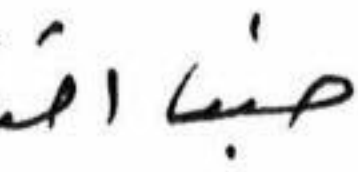
التاريخ : ٢٠١٨ / ١١ / ١٥

بسم الله الرحمن الرحيم

اقرار المشرفين

اشهد ان اعداد هذه الرسالة (دراسة بعض المؤشرات الجزيئية والفسلجية لمريضات سرطان الثدي في محافظة ديالى) التي قدمتها طالبة الماجستير (نور جاسم محمد نعمة الشمري) قد تم بأشرافي في قسم علوم الحياة/ كلية التربية للعلوم الصرفة/ جامعة ديالى، وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة/ علم الحيوان.

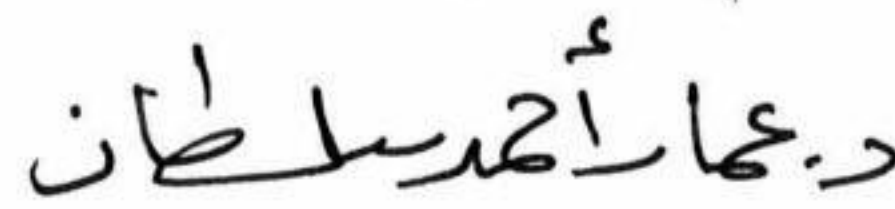
 : التوقيع :

المشرف :  صبا افضال

المرتبة العلمية :

التاريخ :

 : التوقيع :

المشرف :  د. عمار أحمد سلطان

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

التاريخ : ١٤ / ١ / ٢٠١٨

اقرار لجنة الدراسات العليا

بناءً على التوصيات التي تقدم بها المشرفين والمقوم اللغوي ارشح هذه الرسالة للمناقشة.

التوقيع : 

الاسم : د. عمار أحمد سلطان

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

التاريخ : ١٤ / ١ / ٢٠١٨

توصيات رئيس قسم علوم الحياة

بناءً على التوصيات المتوافرة ارشح هذه الرسالة الى المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها .

التوقيع : 

الاسم : د. عمار أحمد سلطان

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

التاريخ : ١٤ / ١ / ٢٠١٨

اقرار لجنة المناقشة

نشهد نحن رئيس واعضاء لجنة المناقشة نقر بأننا أطلعنا على رسالة الماجستير الموسومة بـ: (دراسة بعض المؤشرات الجزيئية والفسلجية لمريضات سرطان الثدي في محافظة ديالى) المقدمة من قبل الطالبة (نور جاسم محمد نعمة الشمري) وقد ناقشناها في محتوياتها وفيما له علاقة بها ونعتقد أنها جديرة بالقبول لنيل درجة الماجستير في علوم الحياة / علم الحيوان بتقدير (امتياز).

التوقيع: هادي رشيد

الاسم: أ. د. هادي رحمن رشيد

التاريخ: ٢٠١١/١/١٤

رئيس اللجنة

التوقيع: ابتسام بداي حسان

الاسم: م. د. ابتسام بداي حسان

التاريخ: ٢٠١١/١/١٤

عضواً

التوقيع: فاضل أحمد دلف

الاسم: د. فاضل أحمد دلف

التاريخ: ٢٠١٨ / ١ / ١٤

عضواً ومشرفاً

التوقيع: أسماء محمد صالح

الاسم: أ. م. د. أسماء محمد صالح

التاريخ: ٢٠١١/١/١١

عضواً

التوقيع: عمار أحمد سلطان

الاسم: أ. م. د. عمار أحمد سلطان

التاريخ: ٢٠١٨ / ١ / ١٤

عضواً ومشرفاً

صدقت الرسالة من قبل مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة ديالى

التوقيع:

أ.م.د. نصيف جاسم محمد الخفاجي

عميد كلية التربية للعلوم الصرفة/ وكالة

التاريخ

الاهداء

الحمد لله اقصى مبلغ الحمد .. والشكر لله من قبل ومن بعد..

الى من بلغ الرسالة وأدى الامانة ونصح الامة الى نبي الرحمة ونور العالمين سيدنا محمد
صل الله عليه وسلم

الى كل من اضاء بعلمه عقل غيره.. او هدى بالجواب الصحيح حيرة سائليه..

فأظهر بسماحته تواضع العلماء.. وبرحباته سماحة العارفين..

الى قدوتي الاولى ونبراسي الذي ينير دربي ..

الى من علمني ان اصمد امام امواج البحر الثائرة الى من اعطاني ولم يزل يعطيني بلا حدود
الى من رفعت راسي عاليا افتخارا به الى مصدر قوتي وثباتي.. {ابي العزيز}

الى من علمتني بأنه مع بزوغ كل فجر تتجدد سمات الامل.. وبأن غاية الحياة ليست المعرفة
بل العمل وبأنني خلقت للنجاح وليس للفشل الى من علمتني الصمود مهما تبدلت الظروف..
اليك يا شمس نهاري وفجر ليلي ونور عيني ومهجة قلبي {امي العزيزة}

الى من بها اكبر وعليها اعتمد .. الى شمعة متقدة تنير دربي ..الى من بوجودها اكتسب قوة
ومحبة لا حدود لها ..

الى من عرفت معها معنى الحياة ورافقتني في كل لحظات حياتي منذ الصغر {أخواتي قرة
عيني: شروق.. زينب}

الى من ارى التفاؤل بعينه والسعادة في ضحكته الى شعلة الذكاء والنور الى الوجه المفعم
بالطاقة والايجابية ولمحبتك لازهرت ايامي وتفتحت براعم اللغد {اخي الحبيب محمد}

الشكر والتقدير

اشكر الله العلي القدير الذي انعم علي بنعمة العقل والدين

القائل في محكم التنزيل "فوق كل ذي علم عليم" سورة يوسف ايه 76..صدق الله العظيم.
الصلاة والسلام على سيد المرسلين وخاتم النبيين محمد صل الله عليه وسلم.

انقدم بالشكر الى عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة وتدرسيين قسم علوم الحياة الذين اشرفوا على تدريسي وفي مقدمتهم رئيس قسم علوم الحياة الدكتور عمار احمد سلطان ..انقدم بالشكر والتقدير الى اولئك الاخيار الذين مدوا لي يد المساعدة خلال فترة اتمام الرسالة ، وفي مقدمتهم استاذي المشرف على الرسالة الاستاذ المساعد الدكتور (عمار احمد سلطان القرة غولي) الذي لم يدخر جهدا في مساعدتي وكان له الفضل الكبير من خلال اقتراحه لموضوع الرسالة وكان يحثني على البحث ويقوي عزيمتي فله من الله الاجر ومني كل تقدير.

وانقدم بالشكر الى الدكتور المشرف على الرسالة (فاضل احمد دلف) لما قدمه لي من المساعدة خلال فترة انجاز الرسالة وكان يساندني في اصعب الظروف ويمدني بالتفاؤل والاصرار والثبات ومقاومة الصعاب للوصول للهدف.

وانقدم بشكري وتقديري الى النور الذي يضيء حياتي والنبع الذي ارتوي منه حبا وحنانا الى الذي يشار اليه بالبنان ويفتخر به بين الانام الى "ابي الغالي" .

الى المخلوق المحب الذي يعطيني بلا حدود ولا ينتظر الشكر من احد الا من رب العالمين
الى نبع العطاء والحب والقلب الكبير الى مربية الاجيال وصانعة العظماء الى من لا يستطيع ان اوفيها حقها ولو ان حرصت "امي الغالية" .

الى من تذوقت معهم اجمل لحظاتي وساندوني في كل وقت {صديقاتي العزيزات} (شهد
شاكر. غفران فيصل . انفال محمد)

نور

الخلاصة

هدفت هذه الدراسة الى قياس بعض المعلمات الدموية و الكيميائية الحيوية والجزيئية لمرض سرطان الثدي في محافظة ديالى ، اشتملت هذه الدراسة على 100 عينة تم تقسيمها الى 50 امرأة مصابة بمرض سرطان الثدي تراوحت اعمارهن (40-70) سنة و 50 امرأة غير مصابة بأمراض الدم الوراثية تراوحت اعمارهن (40-70) سنة، والتي اعتبرت مجموعة سيطرة حيث جمعت العينات خلال الفترة الممتدة من شهر ايلول 2016 ولغاية شهر ايار 2017.

اظهرت نتائج الدراسة عندما تمت مقارنة اعمار النساء المصابات بمرض سرطان الثدي مع مجموعة السيطرة عدم وجود أي فرق معنوي ذي دلالة احصائية عند مستوى دلالة $P > 0.05$ ، ولكن يوجد فرق معنوي ذو دلالة احصائية عالي جدا عند $P \leq 0.001$ عندما تمت مقارنة اعمار النساء المصابات بالمرض فيما بينهم.

اما الحالة الوراثية فبينت النتائج عدم وجود اي فرق معنوي عند مستوى احتمالية $P > 0.05$. عندما تمت المقارنة ما بين مجموعة النساء المصابات بمرض سرطان الثدي مع مجموعة السيطرة .حيث اظهرت النتائج فروقا معنوية عالية جدا عند مستوى احتمالية $P \leq 0.001$. عندما تمت المقارنة على اساس الحالة الوراثية ما بين مجموعة النساء المصابات بمرض سرطان الثدي.

بينت النتائج ايضا عدم وجود اي فرق معنوي ذي دلالة احصائية عند $P > 0.05$ عندما تمت مقارنة مجموعة النساء المصابات بمرض سرطان الثدي مع مجموعة السيطرة حسب الموقع الجغرافي لمحافظة ديالى، ولكن بينت النتائج ان قضاء بعقوبة هو اكثر الاقضية من حيث نسبة الاصابة بالمرض وتبين وجود فرق معنوي ذو دلالة احصائية عالية جدا عند مستوى احتمالية $P \leq 0.001$ عند المقارنة ما بين الاقضية لمحافظة ديالى لمجموعة النساء المصابات بالمرض.

اما بالنسبة لهرمونات الغدة الدرقية فبينت النتائج وجود ارتفاع في هرموني T3 و T4 وكانت كالاتي $T3 = 2.57 \pm 0.75$ nmol/L و $T4 = 111.59 \pm 31.90$ nmol/L ومعدل هذين الهرمونين لمجموعة السيطرة $T3 = 1.97 \pm 0.70$ nmol/L و $T4 = 78.19 \pm 11.29$ nmol/L اما هرمون TSH بينت النتائج وجود انخفاض معنوي لهذا الهرمون فقد بلغت النسبة للنساء المصابات

بمرض سرطان الثدي 1.40 ± 1.17 uU/mL ولمجموعة السيطرة 3.47 ± 1.38 اذ بينت النتائج لهذه الدراسة وجود ارتفاع معنوي ذي دلالة احصائية عالي جدا عند مستوى احتمالية $P \leq 0.001$.

اما بالنسبة لمؤشرات وظائف الكلى فبينت نتائج هذه الدراسة وجود ارتفاع ملحوظ في معدل كل من الجلوكوز واليوريا و الكرياتينين، اذ بلغت النسب لمجموعة النساء المصابات بمرض سرطان الثدي على التوالي الجلوكوز = 4.63 ± 11.66 mmol/L واليوريا = 9.40 ± 10.91 mmol/L ونسبة الكرياتينين = 55.13 ± 28.57 umol/L اما بالنسبة لمجموعة السيطرة فقد بلغت النسب للجلوكوز = 6.16 ± 1.93 mmol/L واليوريا = 3.91 ± 0.60 mmol/L والكرياتينين = 44.91 ± 15.57 umol/L اذ وُجدَ أنَّ هناك فرق معنوي ذي دلالة احصائية عالي جدا عند $P \leq 0.001$ لمستوى الجلوكوز وفرق معنوي عند $P \leq 0.01$ لليوريا وفرق معنوي عند $P = 0.02$.

اما بالنسبة لمؤشرات Lipidprofile فشملت هذه الدراسة كل من الكوليسترول والدهون عالية الكثافة و الدهون واطئة الكثافة و الدهون الثلاثية فمعدل هذه المعلمات للنساء المصابات بمرض سرطان الثدي كانت كالآتي :الكوليسترول = 4.29 ± 1.11 mmol/L والدهون عالية الكثافة = 1.36 ± 0.51 mmol/L ، والدهون واطئة الكثافة = 2.63 ± 0.95 mmol/L ، والدهون الثلاثية = 1.50 ± 0.75 mmol/L ، اما معدل هذه المعلمات لمجموعة السيطرة كانت كالآتي : الكوليسترول = 5.35 ± 1.82 mmol/L ، الدهون عالية الكثافة = 61.3 ± 0.84 mmol/L ، الدهون واطئة الكثافة = 3.15 ± 1.02 mmol/L ، الدهون الثلاثية = 1.83 ± 1.01 mmol/L اذ بينت النتائج وجود انخفاض في مستوى كل من الكوليسترول عند مستوى احتمالية $P \leq 0.01$ والدهون واطئة الكثافة عند مستوى احتمالية $P = 0.009$ وعدم وجود اي فرق معنوي لكل من الدهون عالية الكثافة والدهون الثلاثية.

اما بالنسبة للمؤشرات الدموية لم يكن هناك اي فرق معنوي ذي دلالة احصائية عندما تمت مقارنة مجموعة النساء المصابات بمرض سرطان الثدي مع مجموعة السيطرة لكل من كريات الدم البيضاء والهيموكلوبين والصفائح الدموية ومعدل تكس كريات الدم الحمراء عند $P > 0.05$ ما عدا كريات الدم الحمراء فقد وجد هناك ارتفاع بسيط لهذا المؤشر لمجموعة النساء المصابات بمرض سرطان الثدي بالمقارنة مع مجموعة السيطرة عند مستوى احتمالية $P = 0.02$ ، وكانت كالآتي : كريات الدم البيضاء = 8.15 ± 4.39 $\times 10^9/L$ ، كريات الدم الحمراء = 5.34 ± 1.49 $\times 10^9/L$ ،

الهيموكلوبين $11.69 \pm 2.10 \text{ g/d L}$ ، الصفائح الدموية $313.1 \pm 76.93 \times 10^9/\text{L}$ ، معدل تكدس كريات الدم الحمراء $41.02 \pm 7.89 \%$ اما معدل قيم هذه المؤشرات لمجموعة السيطرة كانت كالاتي : كريات الدم البيضاء $9.01 \pm 2.72 \times 10^9/\text{L}$ ، كريات الدم الحمراء 4.79 ± 0.84 $320.12 \pm 45.25 \text{ g/d l}$ ، الصفائح الدموية $11.19 \pm 1.83 \times 10^9/\text{L}$ ، الهيموكلوبين $39.21 \pm 10.91 \%$ ، معدل تكدس كريات الدم الحمراء $39.21 \pm 10.91 \%$.

اما بالنسبة للدراسة الوراثية الجزيئية حيث تم استخدام عشرة اكسونات للكشف عن الطفرات النقطية وشملت هذه الاكسونات (2,20,11.3,5) لجين BRCA1 وكل من (2,4,1,3,5) لجين BRCA2 ، وبينت النتائج ان اكثر الطفرات شيوعا لمحافظة ديالى كانت لكل من اكسون 20,11 من جين BRCA1 واكسون 2,4 من جين BRCA2 واكثر الاكسونات حذفاً للقواعد النتروجينية هما اكسون 5 من جين BRCA1 واكسون 5 ايضا من جين BRCA2 وقد تم عمل تسلسل نيكلوتيدي لجينات BRCA لامرأة مصابة بالمرض مع اخرى سليمة حيث وجد ان هناك طفرات نقطية من نوع الحذف في جينات BRCA1 و BRCA2 للنساء المصابات بمرض سرطان الثدي.

قائمة المختصرات

List of abbreviation

A	Adnine
BCS	Breast Conserving Surgery
bP	Base Pair
C	Cytocin
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
DNA	Deoxy ribonucleic acid
EDTA	Ethylen diamine tetracetic acid
ER	Estrogen receptor
FANCA	Fanconi anaemia complementation group A
G	Guanine
GSB	Gel sample buffer
HBOC	Hereditary breast ovarian cancer
Hb	Hemoglobin
HCT	Hematocrit
HDL	High density lipoprotein
Her2nue	Human epidermal receptor
HGMD	Human gene mutation database
LDL	Low density lipoprotein
MCH	Mean cellular hemoglobin
MCV	Mean cellular volume
NIH	National institutes of health
PCR	Polymerase chain reaction
PgR	Progestron receptor
PLT	Platelets
RBC	Red blood cell
RNZF	Ring type zinc finger protein
SSCP	Single strand conformation polymorphism
T	Thymine

TRI	Triglyceride
TNM	(Tumer) (Node) (Metasis)
T3	Triiodothyronine
T4	Tetraiodothyronine
TSH	Thyroid stimulating hormone
UICC	Union international cancer control
WBC	White blood cell

قائمة المحتويات

التسلسل	الموضوع	رقم الصفحة
	الخلاصة	I
	قائمة المختصرات	IV
	قائمة المحتويات	VI
	قائمة الجداول	IX
	قائمة الأشكال	XI
	قائمة الملاحق	XV
الفصل الأول		
1	المقدمة	1
3	الهدف من الدراسة	
الفصل الثاني		
2	استعراض المراجع Literature Review	4
1-2	السرطان cancer	4
1-1-2	سرطان الثدي Breast cancer	5
2-1-2	جينات BRCA	7
3-1-2	تصنيف المرض Classification of disease	11
4-1-2	العوامل المؤهبة للإصابة بسرطان الثدي	15
5-1-2	التوزيع الجغرافي للمرض او الانتشار العالمي	17
6-1-2	الوراثة والتاريخ العائلي	18
2-2	تفاعل البلمرة المتسلسل	19
3-2	Single strand conformation polymorphism	20
4-2	مؤشرات جزيئية	21
5-2	تسلسلات الدنا	22
6-2	الدراسات السابقة للكشف عن الجينات المسببة لمرض سرطان الثدي وعلاقة سرطان الثدي ببعض	23

	المؤشرات الكيموحيوية	
25	هرمونات الغدة الدرقية	7-2
26	الكوليسترول والدهون عالية الكثافة والدهون واطئة الكثافة والدهون الثلاثية	1-7-2
27	سرطان الثدي وعلاقته مع مستوى الجلوكوز في الدم	2-7-2
الفصل الثالث		
28	المواد وطرائق العمل Material and methid	3
28	الاجهزة والادوات المستخدمة	1-1-3
29	المحاليل والمواد الكيميائية المستخدمة في الدراسة	2-1-3
30	جمع العينات	2-3
31	استخلاص الدنا	1-2-2-3
32	طريقة العمل	2-2-2-3
33	الترحيل الكهربائي للدنا المستخلص	3-2-2-3
34	المحاليل المستخدمة في الترحيل الكهربائي	4-2-2-3
35	قياس تركيز الدنا ونقاوته	5-2-2-3
35	تحاليل نظام single strand conformation polymorphism	6-2-2-3
36	البودئ الخاصة بجينات BRCA	3-3
37	مكونات خليط التفاعل	3-6-2-2-3
38	برامج نظام تضخيم single strand conformation polymorphism	4-6-2-2-3
41	ترحيل ناتج التضخيم	5-6-2-2-3
42	التسلسل المتتابعي للدنا	6-6-2-2-3
42	الفحوصات الكيميائية الحيوية	3-2-3
45	الفحوصات الدموية	1-3-2-3
47	فحص الهرمونات	2-3-2-3
48	التحليل الاحصائي	

الفصل الرابع		
49	Result and discussion النتائج والمناقشة	4
49	المؤشرات الكيميائية الحيوية والدموية	1-4
69	نتائج الاستخلاص والترحيل	2-4
69	نتائج عزل الدنا	1-2-4
70	ناتج التضخيم الاكسونات 2,20,11 من جين BRCA1	2-2-4
72	ناتج تضخيم الاكسونات 1,3,5 من جين BRCA2	3-2-4
76	Molecular geneticts الدراسة الوراثية الجزيئية	3-4
الفصل الخامس		
100	Conclusions and التوصيات والاستنتاجات Recommendation	5
100	الاستنتاجات	1-5
101	التوصيات	2-5
102	References المصادر	
127	الملاحق	
I	ملخص الرسالة باللغة الانكليزية	

قائمة الجداول
List of Tables

رقم الصفحة	عنوان الجدول	رقم الجدول
28	الاجهزة والادوات المستخدمة في الدراسة	1-3
29	المحاليل والمواد الكيميائية المستخدمة في الدراسة	2-3
36	البودائ المستخدمة لكل من جين BRCA1 و BRCA2	3-3
38	برنامج 1 للاكسونات 2,20,11 من جين BRCA1	3
38	برنامج 2 للاكسون 3 من جين BRCA1	4
39	برنامج 3 للاكسونات 5 من جين BRCA1 واكسون 5 من جين BRCA2	5
39	برنامج 4 للاكسونات 1,3 من جين BRCA2	6
40	برنامج 5 للاكسون 2 من جين BRCA2	7
40	برنامج 6 للاكسون 4 من جين BRCA2	8
49	توزيع مجموعتي الدراسة حسب العمر	1-4
50	توزيع مجموعتي الدراسة حسب النسب المئوية للعمر	2-4
51	توزيع مجموعة النساء المصابات بمرض سرطان الثدي حسب العمر	3-4
53	توزيع مجموعتي الدراسة حسب النسب المئوية للعمر مع الحالة الوراثية	4-4
55	توزيع مجموعتي الدراسة حسب النسب المئوية للاقضية لمحافظة ديالى	5-4
56	توزيع مجموعة النساء المصابات بمرض سرطان الثدي حسب للاقضية لمحافظة ديالى	6-4
58	توزيع مجموعتي الدراسة حسب النسب المئوية للعمر والاقضية لمحافظة ديالى	7-4
59	توزيع مجموعة النساء المصابات بمرض سرطان الثدي حسب النسب المئوية للعمر والاقضية لمحافظة ديالى	8-4

60	توزيع مجموعة النساء المصابات بمرض سرطان الثدي حسب الحالة الوراثية	9-4
62	قياس هرمونات الغدة الدرقية T3,T4,TSH لمجموعتي الدراسة	10-4
64	قياس نسبة Glucose,Urea,Creatnine لمجموعتي الدراسة	11-4
66	قياس نسبة الكوليسترول cholesterol والدهون واطنة الكثافة lowdensity lipoprotein والدهون عالية الكثافة high density lipoprotein والدهون الثلاثية triglyceride لمجموعتي الدراسة	12-4
69	قياس نسبة كريات الدم البيضاء white blood cell وكريات الدم الحمراء red blood cell والصفائح الدموية platelets والنسبة المئوية لكريات الدم الحمراء haematocrit لمجموعتي الدراسة	13-4
98	توزيع الطفرات الظاهرة والغير الظاهرة لجين BRCA1 المسبب لمرض سرطان الثدي تبعا للاقضية السكنية في محافظة ديالى	14-4
99	توزيع الطفرات الظاهرة والغير الظاهرة لجين BRCA2 المسبب لمرض سرطان الثدي تبعا للاقضية السكنية في محافظة ديالى	15-4

قائمة الاشكال
List of the Figure

الشكل	عنوان الشكل	رقم الصفحة
1-2	شكل الخلية السرطانية التي التقطت بواسطة المجهر المسحي	5
2-2	موقع جين BRCA1 على كروموسوم 17	10
3-2	موقع جين BRCA2 على كروموسوم 13	11
1-3	شكل جهاز التحليل الذاتي الكهربائي للفحوصات الكيميائية الحيوية	45
2-3	جهاز التحليل الذاتي الكهربائي للفحوصات الدموية (Blood count Complete)	47
3-3	جهاز التحليل الذاتي الكهربائي للهرمونات	48
1-4	مقارنة رصف القواعد النتروجينية Alignment لأكسون 1 من جين BRCA1 بين امرأة سليمة وامرأة مصابة بسرطان الثدي من مجتمع ديالى موضحا الطفرات النقطية بعد استخدام تقنية Single-strand conformation polymorphism	78
2-4	مقارنة رصف القواعد النتروجينية Alignment لأكسون 3 من جين BRCA1 بين امرأة سليمة وامرأة مصابة بسرطان الثدي من مجتمع ديالى موضحا الطفرات النقطية بعد استخدام تقنية Single-strand conformation polymorphism	80
3-4	مقارنة رصف القواعد النتروجينية Alignment لأكسون 5 من جين BRCA1 بين امرأة سليمة وامرأة مصابة بسرطان الثدي من مجتمع ديالى موضحا الطفرات النقطية بعد استخدام تقنية Single-strand conformation polymorphism	82
4-4	مقارنة رصف القواعد النتروجينية Alignment لأكسون 11 من جين BRCA1 بين امرأة سليمة وامرأة مصابة بسرطان الثدي من مجتمع ديالى موضحا الطفرات النقطية بعد استخدام تقنية Single-strand conformation polymorphism	84
5-4	مقارنة رصف القواعد النتروجينية Alignment لأكسون 20 من جين BRCA1 بين امرأة سليمة وامرأة مصابة بسرطان الثدي من مجتمع ديالى موضحا الطفرات النقطية بعد استخدام تقنية Single-strand conformation polymorphism	86
6-4	مقارنة رصف القواعد النتروجينية Alignment لأكسون 1 من جين BRCA2 بين امرأة سليمة وامرأة مصابة بسرطان الثدي من مجتمع ديالى موضحا الطفرات النقطية بعد استخدام تقنية Single-strand conformation polymorphism	88

	conformation polymorphism	
90	مقارنة رصف القواعد النتروجينية Alignment لأكسون 2 من جين BRCA2 بين امرأة سليمة وامرأة مصابة بسرطان الثدي من مجتمع ديالى موضحا الطفرات النقطية بعد استخدام تقنية Single-strand conformation polymorphism	7-4
92	مقارنة رصف القواعد النتروجينية Alignment لأكسون 3 من جين BRCA2 بين امرأة سليمة وامرأة مصابة بسرطان الثدي من مجتمع ديالى موضحا الطفرات النقطية بعد استخدام تقنية Single-strand conformation polymorphism	8-4
94	مقارنة رصف القواعد النتروجينية Alignment لأكسون 4 من جين BRCA2 بين امرأة سليمة وامرأة مصابة بسرطان الثدي من مجتمع ديالى موضحا الطفرات النقطية بعد استخدام تقنية Single-strand conformation polymorphism	9-4
96	مقارنة رصف القواعد النتروجينية Alignment لأكسون 5 من جين BRCA2 بين امرأة سليمة وامرأة مصابة بسرطان الثدي من مجتمع ديالى موضحا الطفرات النقطية بعد استخدام تقنية Single-strand conformation polymorphism	10-4

الفصل الأول

المقدمة

Introduction

المقدمة: Introduction

سرطان الثدي Breast cancer شكل من اشكال الامراض السرطانية التي تصيب انسجة الثدي وعادة ما يظهر في قنوات وغدد الحليب (Sariego, 2010). ويعد سرطان الثدي هو الاكثر شيوعا بين النساء (Dolinsky, 2002). احيانا يمكن ان تبدأ الخلايا المشكلة لنسيج الثدي في النمو دون رادع مزاحمة الخلايا الطبيعية المنتجة للحليب وقد تقتحم هذه الخلايا الطبيعية المتمردة غير المكبوحة الانسجة المحيطة بها دافعة ما حولها وتشكل تجمعاً نسيجياً يعرف بأسم كتلة او ورم واذا بقي الورم في مكانه ولم يغزو الصفيحات المحيطة او اجزاء اخرى من الجسم يصنف على انه ورم حميد ولكن اذا استمر بغزو انسجة الثدي المحيطة وانتشر الى العقد الليمفاوية عندها يصنف على انه ورم خبيث او سرطاني. ومن العوامل التي تزيد من احتمالية الاصابة بسرطان الثدي نوع الجنس اي النساء اكثر عرضة للاصابة بسرطان الثدي من الرجال ، السمنة ، عدم ممارسة الرياضة ، شرب الكحول ، العلاج بالهرمونات البديلة خلال فترة انقطاع الطمث (Harris, 2013).

ان الطفرات الخبيثة المسببة لمرض سرطان الثدي اصبحت موضوعاً ساخناً و البحث في الالوة الاخيرة وُجدَ بين 3% الى 5% من حالات سرطان الثدي قد تكون ذات صلة من ناحية التغيرات في الجين BRCA1 والجين BRCA2 (Dolinsky, 2002). ان حوالي 5_10% من الحالات الوراثية يظهر تغير في الجين سواء من الاب او الام بما في ذلك تتضمن غدد الحليب وقنوات الحليب. عند الاصابة في قنوات الحليب يسمى Ductal carcinomas وعند الاصابة في غدد الحليب يسمى Lubular carcinomas (WHO, 2014).

يعد سرطان الثدي السبب الخامس الاكثر شيوعاً لوفيات السرطان (Bray وآخرون ، 2012). ففي عام 2008 تم تشخيص ما يقارب 1.4 مليون امرأة مصابة بسرطان الثدي في جميع انحاء العالم بمقابل

460,000 حالة وفاة (Ferlay و اخرون، 2010). في العراق سرطان الثدي الاكثر شيوعا من انواع الاورام الخبيثة للاناث وهو ما يمثل تقريبا ثلث من سرطانات الاناث وفقا لاحداث سجل السرطان العراقي (Iraqi Cancer Registry، 2002). اي هو السبب الثاني لوفيات السرطان في العراق (Saaed و اخرون، 2011). يتسبب السرطان في جميع الحالات تقريبا من قبل طفرة او عن طريق الفعل الشاذ من قبل الجينات الخلوية التي تتحكم في نمو الخلايا والانقسام الخلوي (Guyton و Hall، 2000).

تعد جينات BRCA1 و BRCA2 من اشهر الجينات المسؤولة عن سرطان الثدي حيث انه يوجد ما يقارب 600 طفرة تحدث لجين سرطان الثدي BRCA1 و حوالي 450 طفرة تحدث لجين سرطان الثدي BRCA2 حيث ان وراثة الطفرة المسرطنة تزيد من احتمالية الاصابة بسرطان الثدي بنسبة 80% (Dardouk، 2014). اذ أنّ حصول الطفرات لجينات BRCA1 و BRCA2 تكون السبب في الاصابة بالسرطان وتشكل سرطانات الثدي الوراثية نسبة 5-10% من جميع السرطانات، اذ انه في اقل من 5% من الحالات تلعب الوراثة دور بالغ الاهمية من خلال التسبب في متلازمة سرطا الثدي-المبيض حيث يكون هناك طفرات في جينات معينة (Borispasche، 2010).

سرطان الثدي هو مشكلة صحية عامة رئيسة في جميع انحاء العالم وفي عام 2004 وهو العام الاحداث المتاح لبيانات عالمية كان هناك 1.15 مليون حالة سرطان ثدي جديدة واكثر من 500,000 حالة وفاة حول العالم (Hartobagyi و اخرون، 2005). حيث وقع اكثر من نصف جميع الحالات في الدول الصناعية (Parkin و Fernandez، 2006). وتعود هذه الزيادة في عدد حالات سرطان الثدي التي لوحظت في المناطق الاكثر نموا في العالم، لتوافر برامج الفحص المستخدمة للكشف عن سرطان الثدي والتي بخلاف ذلك لم يتم تشخيصها (Layon، 2002).

أهداف الدراسة:

1. والكشف الوراثي الجزيئي عن انواع الطفرات النقطية المسببة لمرض سرطان الثدي في مجتمع دىالى بأستخدام تقنية Single-Strand Conformation Polymorphsim لخسة اكسونات من جين BRCA1 وخسة اكسونات من جين BRCA2 واجراء تسلسل نيوكليوتيدي للاكسونات المنتخبة في كلا من الجينين BRCA1 و BRCA2 للنساء المصابات والسليمات لاجل المقارنة فيما بينها للكشف وتحديد عدد الطفرات النقطية و نوعها.
2. الكشف عن بعض التغيرات الكيموحيوية والدموية المرافقة لمرض سرطان الثدي في دم النساء المصابات بمرض سرطان الثدي ومقارنتها مع نساء غير مصابات كمجاميع سيطرة.

الفصل الثاني

استعراض المراجع

**Literature
Review**

2- استعراض المراجع: Literature Review

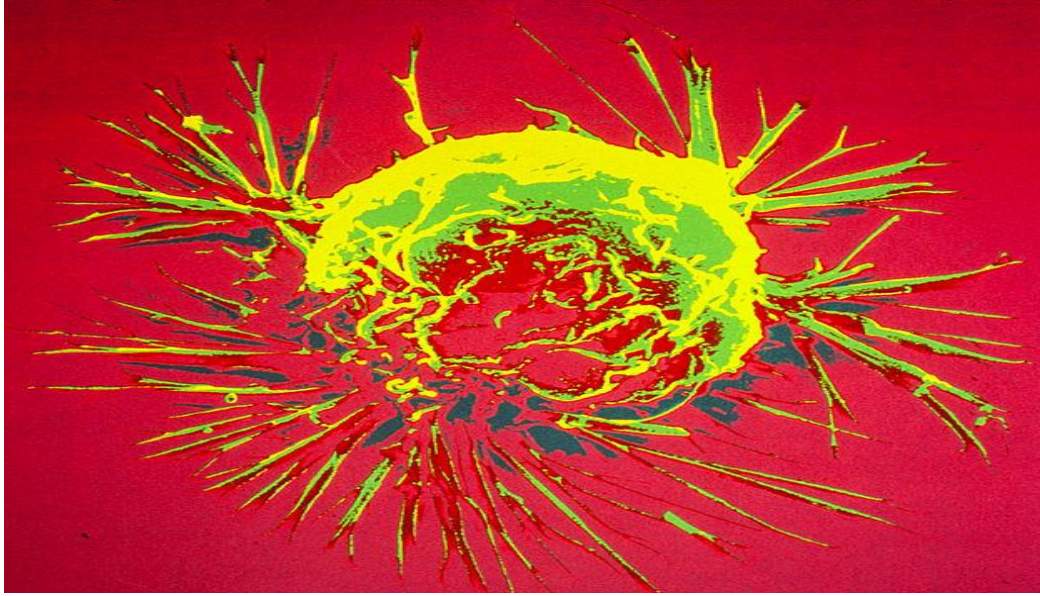
1-2 السرطان Cancer

مجموعة من الامراض التي تتميز خلاياها بالعدائية Aggressive (وهو النمو والانقسام الخلوي غير المحدود) و قدرة هذه الخلايا المنقسمة على غزو الانسجة المجاورة و تدميرها او الانتقال الى انسجة بعيدة بعملية يطلق يطلق اسم الانتباث Metastasis.(WHO،2014)

طوال حياة الناس، الخلايا في اجسامهم تنمو وتنقسم ويستعاض عنها بخلايا اخرى. اي العديد من الجينات تصنع بروتينات تشارك في السيطرة على عمليات نمو الخلايا و الانقسام . احداث اي تغير (طفرة) في جزيئات الحمض النووي يمكن ان يحدث خلل في الجينات و انتاج البروتينات والخلايا المعيبة (Chanin،2009)

ينشأ السرطان نتيجة لعدد من التغيرات الجينية في أنقسام الخلية (Bageman،2008) والسرطان نوع من الامراض او الاختلالات التي تتميز بالانقسام غير المسيطر من الخلايا، وقدرة هذه الخلايا غير الطبيعية على الانتشار، اما عن طريق نمو مباشر الى الانسجة المجاورة من خلال الغزو، او عن طريق التوطن في مواقع بعيدة بواسطة الانتباث Metastasis (حيث يتم نقل الخلايا السرطانية عن طريق مجرى الدم او الجهاز الليمفاوي) (Ghanim،2009)

يستطيع السرطان ان يصيب كل المراحل العمرية عند الانسان حتى الاجنة و لكن تزيد مخاطر الإصابة به كلما تقدم الانسان في العمر (Jan،2007).الجين الورمي Incogene هو الجين الذي لديه القدرة على حدوث السرطان في الخلايا السرطانية، و تتطلب معظم الجينات المسرطنة خطوة اضافية مثل الطفرات في جين اخر، او العوامل البيئية مثل العدوى الفايروسية للتسبب بالسرطان(Knowles واخرون، 2006).



شكل (1-2) خلية سرطانية التقطت بواسطة المجهر الالكتروني المسحي

(2014،National Cancer Institute)

1-1-2 سرطان الثدي Breast cancer

وهو النوع الأكثر شيوعا بين النساء في العالم (باستثناء سرطان الجلد وسرطان الانسجة)، والسبب الثاني الأكثر شيوعا للوفاة ، والمرض الذي تكون فيه الخلايا الطبيعية في الثدي متغيرة وتنمو من دون رادع، و يسمى السرطان الذي لم ينتشر في الموقع بمعنى في ذات المكان (سرطان) cancer، اما الذي انتشر فيسمى (السرطان المجتاح) (Bageman واخرون،2008)

سرطان الثدي هو مرض غير متجانس مع تركيبات وراثية كبيرة التنوع المظهري (Luis واخرون،2012). يُعتقد أنّ حوالي 40% الى 50% من سرطانات الثدي هو وراثي وتسببها طفرات في جينات سرطان الثدي BRCA1 و BRCA2 (Jumaah،2013). سرطان الثدي هو الورم الأكثر شيوعا عند النساء وهو يمثل 22% من حالات السرطان كل عام (WHO،2016). وهو لا يتبع طريقا واحدا بل هو عبارة عن سلسلة معقدة من الفعاليات الوراثية العشوائية التي تؤدي الى سرطان الثدي (Bertolo واخرون،2008). وجد الكثير من الادلة التي تؤيد فكرة ان مجموعة من الخلايا داخل الورم يطلق عليها الخلايا الجذعية السرطانية، إنّ الخلايا التي تبدأ بالورم هي قادرة على البدء بالورم والحفاظ على نمو

الورم (Pardal وآخرون، 2003). ويوجد سببان رئيسان حول فرضية أن الخلايا الجذعية للأنسجة الطبيعية تنشأ منها الخلايا الجذعية السرطانية هي أولاً: أن تطور الورم يأتي من تراكمات متتالية ومتطورة من التشوهات الجينية وعلى ما يبدو أن الخلايا الجذعية الكبيرة بالعمر بسبب طول عمرها تكون أهداف مميزة للتحويل إلى الورم الخبيث، ثانياً : إن الخلايا الجذعية السرطانية لها خصائص الخلايا الجذعية الطبيعية وهي القدرة على التمايز والتجدد الذاتي (Vermeulen وآخرون، 2008; Ponti وآخرون، 2005).

في اتفاق مع هذا المفهوم تم عزل الخلايا الجذعية السرطانية من سرطان الثدي وثبت أن هذه الخلايا تكون مقاومة للعقاقير والعلاج الكيميائي (Dave و Chang، 2009). والدراسات الوراثية الجزيئية أشارت إلى أن هذه التشوهات هي نتيجة لتنشيط الجينات الكابتة للورم Tumor suppressor gene وتفعيل الجينات المسرطنة بالتبدلات الهيكلية لهذه الجينات (Ueno وآخرون، 2012). وكما هو معروف أن معظم الأورام الخبيثة من 5-10% تكون وراثية (Lynch، 2012). الطفرات في الجينات الكابتة للورم Tumor suppressor gene BRCA1 و BRCA2 حساب ما يقارب 20% من الحالات الوراثية لسرطان الثدي (Couch وآخرون، 2014). أن التحور في السلالة للحاملين لجينات BRCA1 لديهم خطر تراكمي للإصابة بسرطان الثدي تتراوح النسبة ما بين 44% إلى 68% من فئة عمر 70 سنة (Marroni وآخرون، 2004).

تشارك جينات BRCA1 و BRCA2 في الحفاظ على سلامة الجينوم من خلال مختلف العمليات الخلوية مثل النسخ ودورة الخلية وإصلاح الحمض النووي من التلف. (Fryedenso، 2005). ونظراً لهذه التغيرات المرضية لهذه الجينات قد تسبب تغيرات في وظيفة البروتينات لها حيث أثبت حتى الآن أكثر من 2500 من الطفرات المسببة للأمراض تم وضعها في جميع أنحاء تسلسلات جينات BRCA1 و BRCA2 والتي يمكن العثور عليها في Clin var (قاعدة بيانات) وكذلك البوابة Bio base-HGMD (قاعدة بيانات الجينوم البشري) (Landrum وآخرون، 2004).

2-1-2 جينات BRCA1 و BRCA2

هناك نوعين من مورثة BRCA هما BRCA1 و BRCA2 وكل منها تنتمي الى عائلة مختلفة حيث تنتمي مورثة BRCA1 الى عائلة مورثات تسمى RNF وهي تشفر البروتينات تسمى بروتينات اصبع الزنك Ring_type_zinc finger protein وسميت بهذا الاسم لان جزيء البروتين يحتوي على مناطق تتطوي حول شاردة الزنك، بينما مورثات BRCA2 تنتمي الى عائلة (FANCA) Fanconi anaemia complementation group A تنتج هذه المورثات في هذه المجموعة معقدات بروتينية وتقع كلا من المورثات على الكروموسوم 17q21 و الكروموسوم 13q13 على التوالي. (Harris، 2013) كما مبينة في الشكل (2-2) والشكل (3-2).

جينات ال BRCA1 و BRCA2 تنتج بروتينات كابطة للورم Tumor suppressor protein هذه البروتينات تساعد على اصلاح الحمض النووي ومن ثم تلعب دوراً في استقرار المادة الوراثية للخلية و لكن عندما يحدث تحور لهذه الجينات او تغير يؤدي الى عدم اصلاح الحمض النووي من التلف بشكل صحيح و نتيجة لذلك تكون هذه الجينات اكثر عرضة لتطوير تغيرات جينية اضافية التي تؤدي الى الاصابة بسرطان الثدي (Campeau وآخرون، 2008). ولقد تم العثور على كل من BRCA1 و BRCA2 مع تجمعات بروتينية والتي تعتبر مهمة في الاستجابة الخلوية (Garcia و Benite، 2008). جين BRCA1 هو البروتين القامع للورم وُجد في جميع البشر وهو المسؤول عن اصلاح الحمض النووي ويتحد مع المكثفات السرطانية الاخرى، كما انه يتفاعل مع البروتينات الهستونية ومن ثم يلعب دوراً مهم في النسخ واصلاح فواصل الحمض النووي DNA المتقطعة اي التنظيم النسخي فضلا عن وظائف اخرى (Antoniou وآخرون، 2003)

وجين BRCA2 قامع للورم ايضاً. ووجد في جميع البشر ومسؤول عن اصلاح الحمض النووي DNA. (Frank وآخرون، 2007). عندما تتعرض مورثات BRCA الى المساس او الضرر او تحدث طفرة في احد المورثات. فالمورثات إذ لم تعد لديها القدرة على بناء الاصدارات الصحيحة من البروتين الموافق لها، فسيكون البروتين قصير بشكل غير طبيعي، او قد لا تمتلك

التسلسل الصحي. للاحماض الامينية، فأن هذه البروتينات المشوهة لا تستطيع المشاركة في عملية اصلاح الحمض النووي الامر الذي يؤدي في نهاية المطاف الى انتشار خلايا تحمل الحمض النووي التالف اذا كانت هذه الخلايا تبطن الاقنية اللبنية في نسيج الثدي فأن كتلة او ورم سينشأ من الخلايا الغير طبيعية (Harris, 2013)

إنَّ سرطان الثدي وسرطان المبيض المرتبطة بطفرات BRCA1 و BRCA2 تميل الى التطوير في سن مبكر (Pal وآخرون، 2005). إنَّ حوالي 12% من النساء في عموم السكان تصاب بسرطان الثدي في وقت ما من خلال حياتهم (Howlader وآخرون، 2013). ووفقا لاحدث التقديرات حوالي 55%-65% من النساء الذين يرثون طفرة BRCA1 الضارة، ونحو 45% من النساء الذين يرثون طفرة BRCA2 سوف تصاب بسرطان الثدي في سن 70 عام (Chen وآخرون، 2007).

فقد حدد العلماء حتى الان اكثر من 1000 طفرة في مورثة BRCA1 واكثر من 800 طفرة في مورثة BRCA2 (Harris, 2013).

الاشخاص الذين لديهم متلازمة (HBOC) Hereditary Breast_Ovarian Cancer Syndrom متلازمة سرطان الثدي-المبيض الوراثي لديهم تاريخ عائلي قوي للسرطان بشكل رئيسي في الاجهزة التالية ،سرطان الثدي، والمبيض والبنكرياس والبروستات. وتتميز عائلات HBOC في الاستعداد للإصابة بالسرطان في سن مبكر من خلال تشخيص بعض الاورام الاولى المتعددة والاورام الثنائية والاورام النادرة اي اكثر العائلات المتأثرة بالسرطان. (Gronwald وآخرون، 2008)

وتشارك جينات BRCA1 وBRCA2 في الحفاظ على سلامة الجين من خلال العمليات الخلوية المختلفة من خلال التعرف على تلف الحمض النووي وانظمة النسخ و دورة حياة الخلية و اصلاح تلف الحمض النووي (Friedenson, 2005)

ونظرا لهذه التغيرات المرضية في هذه الجينات قد تسبب تغيرات في وظيفة البروتينات لها، حتى الان اكثر من 2500 من الطفرات المسببة للأمراض في جميع انحاء تسلسلات جينات BRCA1 BRCA2 التي يمكن العثور عليها في Clin var (قاعدة

بيانات). (Landrum, 2016). وكذلك في البوابة Bio base_HGMD (قاعدة بيانات تحور الجينات البشرية) (Stenson وآخرون، 2014). وبالرغم من الترابط بين المثيلة و جينات BRCA1 في التنشيط التشخيصي التي اعلن عنها في العديد من الدراسات (Matros وآخرون، 2005). هناك القليل من الادلة على العلاقة ما بين مثيلة BRCA1 وسرطان الثدي الوراثي (Hsu وآخرون، 2013).

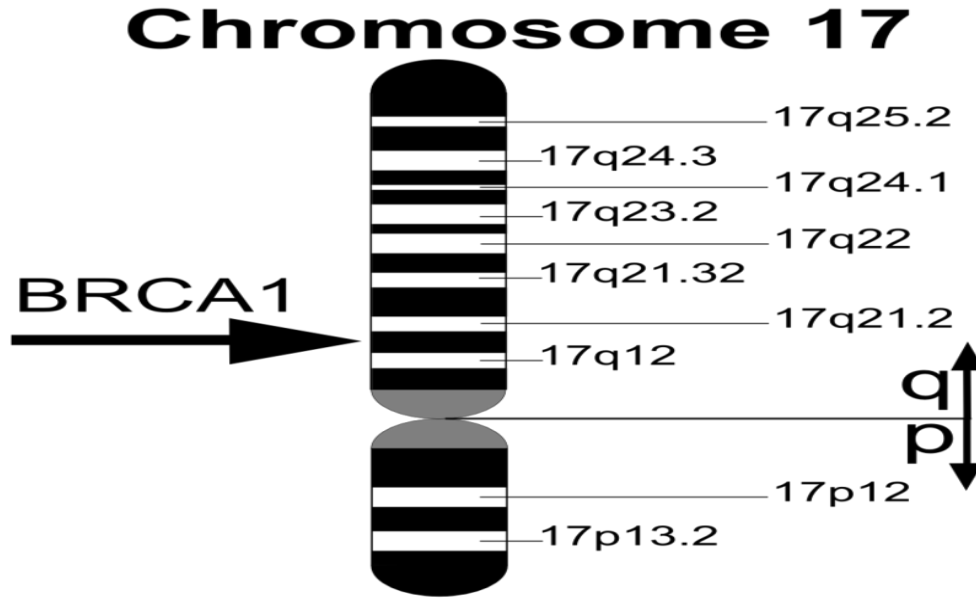
حيث ان المرضى الذين يعانون من الطفرات الضارة في جينات BRCA1 و BRCA2 عادة يتسبب بفقدان النمط البري للليل ومن ثم فإن BRCA1 و BRCA2 تعاني من نقص. في حين يتم الاحتفاظ بتغاير جينات BRCA1 و BRCA2 من قبل الخلايا الطبيعية (Gudmundsson, 1995).

إن جينات BRCA1 و BRCA2 هي كبرى الجينات المرتبطة مع قابلية الإصابة بسرطان الثدي الوراثي (Wooster وآخرون، 1995 ; Miki وآخرون، 1994)

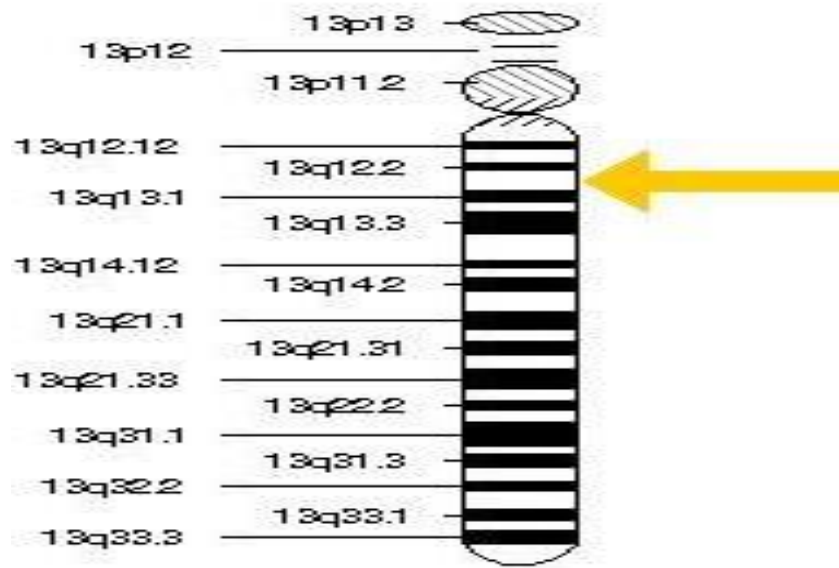
ومتوسط المخاطر التراكمية للإصابة بسرطان الثدي للطفرات في جينات BRCA1 و BRCA2 قبل سن 70 سنة هي 45%-65% على التوالي وهذه الإصابة بسرطان المبيض 11%-39% على التوالي. يمكن تشخيص نمط الحياة والعوامل البيئية يمكن ان تعدل حالات السرطان المرتبطة للاستعداد الوراثي قبل بلوغهم سن 30 سنة (Claus وآخرون، 1991).

سرطان الثدي الذي يسببه طفرة في جين BRCA1 لديه معدل للانقسام والنفوذ اللمفي وهو ايضا مرجح ان يفتقد للتعبير عن مستقبلات هرمون الاستروجين (ER) Estrogen Receptor ومستقبلات عامل نمو البشرة (HER-2nue) Human Epidemal receptor ويكون لها طفرة جديدة في الجين P53 (Mosolino وآخرون، 2005 ; Phillips وآخرون، 2000). وقد وصف (Odonovan وIvingston، 2010) مئات الطفرات الضارة لكل من جينات BRCA1 و BRCA2 وهذه الطفرات تؤدي في الكثير من الاحيان الى استبدال القواعد او استبدال قاعدة واحدة او تؤدي الى ادراج قاعدة بدل اخرى او الحذف مما يؤدي الى وقف للكودونات اي ايقاف للشفرة الوراثية ويحصل تقطعات في البروتينات غير الوظيفية .

وقد بين (Staaaf وآخرون، 2008) انتشار الطفرات في جميع أنحاء تسلسلات الجين BRCA1، هذه الطفرات هي طفرات الحذف والتضاعفات الكبيرة والتكرارات وكذلك وجود جوانب عديدة من الحذف والأدراج، أدى ارتفاع معدل إعادة ترتيب جينات BRCA1 مقارنة BRCA2 أي الهيكل الجزيئي والذي يتميز بوجود الكثافة العالية من عنصر الـ Alue المكرر وبوجود منطقة المنظم promoter المكررة للجينات.



شكل (2-2) موقع جين BRCA1 على كروموسوم (Armin Kubelbeck، 2007)



شكل (2-3) جين BRCA2 على كروموسوم 13 (Harris, 2013)

2-1-3 تصنيف المرض Classification of diseases

تصنف أورام الثدي تشريحيًا وفقًا لموقع المنشأ. فالأورام القنوية تتطور في قنوات الثدي وتمثل 80% من الأورام، الأورام الفصيصية تتطور داخل فص الثدي وتمثل 10-15% من الحالات وتمثل الأنواع الفرعية الأخرى أقل من 10% من الحالات التي تم تشخيصها سنويًا (Vargo_Gogola و Rosen, 2007).

ونظام التدرج يستخدم على نطاق واسع هو ورم عقدة ورم خبيث تصنيف الأورام الخبيثة على النحو الموصى به من قبل الاتحاد لمكافحة السرطان الدولية UICC UnioInternational cancer control وهو النظام القائم تشريحيًا أن يسجل المدى العقدي الابتدائي أو الإقليمي من الورم وحالة عدم أو وجود الانتقالات. تقييم هذه المعايير يسمح بتحديد الانطلاق تتفاوت من مرحلة 0 إلى مرحلة 4 (Sobin و wittekind, 2007). تطوير سرطان الثدي ينطوي على التدرج من خلال سلسلة من العمليات الوسطية بدءًا من القنوي المفرط يليها التطور اللاحق للسرطان في الموقع و سرطان الغازي وأخيرًا إلى المرض المنتشر (Polyak, 2007). وبالنظر إلى التباين في التقدم السريري للمرض وتحديد العلامات يمكن

التنبؤ لسلوك الورم له اهمية خاصة في سرطان الثدي ايضا فأن تحديد علامات الورم هو اداة مفيدة للإدارة السريرية لمرض السرطان و المساعدة في الاجراءات التشخيصية وتنظيمه وتقييم الاستجابة العلاجية والكشف عن التكرار والانتبثات البعيد والتشخيص (Matose وآخرون، 2005).

يتطور سرطان الثدي على 3 فئات هي:

1. حجم الورم.
 2. ما اذا كان الورم قد انتشر الى الغدد الليمفاوية في الابط.
 3. إذا كان الورم قد انتشر (اي انتشار الى اجزاء اخرى من الجسم غير مكانه الاصلي وهو الثدي). اذا كان الورم كبير الحجم وانتشار الورم قد وصل الغدد الليمفاوية بالإضافة لانتشار السرطان في اجزاء اخرى من الجسم يكون لدى الشخص المصاب مراحل متقدمة كثيرة للمرض بحيث تكون التوقعات الطبية لسير المرض اسوأ المراحل الرئيسية.
- المرحلة 0:** هي المرحلة قبل السرطانية تتمثل بوجود اما سرطان الافنية او سرطان في غدد الثدي.

المرحلة من 1_3: تكون سرطان ضمن الثدي او الغدد اللمفية الخاصة بمنطقة الثدي.

المرحلة 4: هي مرحلة سرطان الثدي النقيلي هو اسوأ التوقعات الطبية للمرض.

حيثما كان ذلك متاحا . يجوز استخدام دراسات وفحوصات التصوير كجزء من عملية التدرج في حالات معينة للبحث عن علامات انتشار السرطان في اماكن اخرى من الجسم، ومع ذلك في الحالات التي يكون فيها الشخص مصاب بسرطان الثدي لكن احتمالية انتشاره لاجزاء اخرى من الجسم قليلة، ممكن ان تزيد اذ تم تصوير المريض بجهاز التصوير المقطعي ماسحا الاشعة المقطعية او ماسحا للعظام حيث هذه الفحوصات تعرض المريض لكمية كبيرة من الاشعاع المؤين الخطير (Carlson وآخرون، 2000). سرطان الثدي كما يدل من اسمه هو السرطان الذي ينشأ من انسجة الثدي العادية، ولكن من المفهوم انه تطور من الانسجة الطبيعية للثدي

ويسمى سرطان الثدي الغازي أو المجتاح السيء، ويسمى سرطان الثدي غير المجتاح أي يبقى بالموقع CIS أي مقرون أو مرتبط بالنسيج . ويمكن أن ينشأ من الأبقانية أو فرط التنسج الفصيصي من الخلايا الطلائية، ويسمى السرطان الذي تقدم إلى الأنسجة المحيطة سرطان الثدي وعادة ما لديه القدرة على الانبثاث (Li وآخرون، 2005).

وتصنف أورام الثدي وفقاً لنوع وحجم التغيرات النسيجية المرضية المجتاحة، ومرحلة الورم، والتعبير عن المستقبلات ومع تقدم التقنيات الجزيئية قد تحسن فهم أعمق أنواع سرطان الثدي المتنوع، وكيف أنها تختلف في اكتسابها واستنادا إلى تصنيف منظمة الصحة العالمية يتم التعرف على ستة أنواع رئيسية من السرطان، الأبقانية، الفصيصي، موسيني، النخاع، الحليمي، والسرطان الأنبوبي (Tavassoli و Devilee، 2003).

TNM هو نظام طبي يصنف الورم أو السرطان على حسب حجمه وانتشاره للعقد للمفاوية

يتضمن التصنيف مرحلة حجم الورم (T) Tumor ووضع العقدة الليمفاوية (N) Node والانبثاث (M) Metasis (sBenson وآخرون، 2003). يستخدم للتعبير عن مستقبلات هرمون الاستروجين ER ومستقبلات هرمون البروجسترون Pgr ومستقبلات عامل نمو البشرة HER2 (Parise وآخرون، 2009).

وعلى الصعيد الجزيئي وجد (Perou وآخرون، 2000) أن مرض سرطان الثدي يظهر اختلافا كبيرا وواسعا، ووجد عما لا يقل عن خمسة أنواع فرعية لهذا المرض والتي يتم تقسيمها على أساس التعبير الجيني. إنّ الأنواع الفرعية الجزيئية لسرطان الثدي تكون قيمة جدا في تحديد خطط العلاج والعلاجات المفيدة وقد أجريت العديد من الدراسات في ذلك المجال، وأن الكثير من هذه الدراسات تقسم سرطان الثدي إلى ستة مجاميع فرعية رئيسية :

Luminal A, Luminal B , Triple negative, HER,2 type, Claudin low, Cancer_like

Luminal A: الخلايا السرطانية اللمعية تكون هنا خلايا سرطان الثدي في بداية الخلايا الداخلية لبطانة قنوات الثدي. تميل الخلايا السرطانية هنا إلى أن تكون إيجابية لمستقبلات هرمون الاستروجين ومستقبلات هرمون البروجسترون ولكنها سلبية لمستقبلات عامل نمو البشرة

HER2. يكون هنا التنبؤ أفضل وترتفع معدلات البقاء على قيد الحياة ومعدل التكرار ينخفض في هذه الحالة.

Luminal B: على خلاف للنوع الاول تميل الاورام هنا ان تكون ايجابية لكل من عامل نمو البشرة ومستقبلات هرمون الاستروجين والبروجسترون حيث هذه الاورام يتم الكشف عنها في سن مبكر او سن اصغر للمرأة، ولكن ضعف التشخيص نظرا لانخفاض صف الورم وحجم الورم اكبر ومشاركة العقدة اللمفاوية.

Triple_ negative: شبيهة بالقاعدية الثلاثية السلبية لسرطان الثدي تكون سلبية لمستقبلات هرموني البروجسترون والاسستروجين ومستقبلات عامل النمو البشري لهذا السبب سميت بالثلاثية السلبية.

وهناك انواع من اورام سرطان الثدي تعود لهذه الفئة تسمى القاعدية وسميت بالقاعدية لان لها صفات متطابقة للخلايا الخارجية القاعدية المبطنة لفتوات الثدي، وان ما يقارب 15% - 20% من سرطان الثدي هي ثلاثية سلبية او شبيهة بالقاعدية. إن مثل هذه الاورام تحدث في النساء الاصغر سناً والمرأة الافريقية الامريكية.

معظم سرطان الثدي المرتبط بجينات BRCA1 وهي من الجينات المؤهلة لتطوير سرطان الثدي تكون ثلاثية سلبية وشبيهة بالقاعدية. ان الاورام القاعدية عادة ما تكون انتهائية ويضعف بها التشخيص.

HER2: تكون هذه الاورام سلبية لمستقبلات هرموني الاستروجين والبروجسترون وتكون مرافقة للعقدة اللمفاوية وتكون هنا درجة الورم منخفضة. ان ما يقارب 10% - 15% من سرطان الثدي ينتمي الى هذه المجموعة الفرعية HER2 يكون لديها ضعف في التشخيص والتكرار في وقت مبكر للورم وان اورام HER2 موجودة في النساء الاصغر سنا مقارنة بالنوع الاول Luminal A و الثاني Luminal B .

Claudin_low: هذه الانواع من الاورام تكون عادة ثلاثية سلبية وتحتوي هذه الاورام على خصائص الخلايا الجذعية وان ما يقارب 6% - 10% من جميع حالات سرطان الثدي هي اورام طبيعية .

ان هذه الاورام تكون صغيرة والتشخيص فيها جيد (Amir و Mansoureh، 2016).

2-1-4 العوامل المؤهبة للإصابة بسرطان الثدي Factors qualifying for

:breast cancer

عامل الخطر هو العامل الذي يؤثر على فرصتك للإصابة بمرض سرطان الثدي، ترتبط بعض عوامل الخطر مثل التدخين والنظام الغذائي والشرب بالأشياء التي يفعلها الشخص، ولا يمكن ان تتغير بعض العوامل مثل التاريخ العائلي والعرق والعمر.

معظم النساء اللواتي يعانون من سرطان الثدي لا يكون لها اي من عوامل الخطر (باستثناء كونها امرأة وعمرها بتزايد) مع ذلك الكثير من عوامل الخطر تزيد من فرصة الإصابة بسرطان الثدي، وحتى الان غير معروف كيف إنّ لبعض عوامل الخطر تتسبب للخلايا ليصبح سرطان (Breast_Cancer_Org، 2014).

الاختلافات العرقية والجغرافية في الإصابة بسرطان الثدي تدل على تأثير الظروف البيئية ونمط الحياة والدراسات الخاصة بالبيئة قد عرفت من عوامل المخاطر لسرطان الثدي وتشمل هذه العوامل غير الوراثية، بداية سن اليأس والكحول والتبغ والتعرض للاشعاع، والسمنة، وانخفاض النشاط البدني والتحضر، ونمط الحياة المستقرة، وارتفاع حمية الدهون، الاجهاض التلقائي المتكرر، وعدم الرضاعة الطبيعية، العلاج بالهرمونات البديلة والتقدم بالعمر، الموقع الجغرافي والظروف الاجتماعية، والاقتصادية، والاحداث الانجاب، هرمونات خارجية، كثافة الثدي، العائلة وتاريخها من سرطان الثدي او غيرها من انواع السرطان. (Ayub وآخرون، 2014 ; Calderon-Garciduenal وآخرون، 2005).

ومن بين عوامل الخطر لسرطان الثدي، التاريخ العائلي هو الاكثر اهمية من بين العوامل (Neamat zadeh وآخرون، 2015; Antoniou وآخرون، 2000). ومن المعروف ان

العوامل الوراثية هي من الاسباب الرئيسية لسرطان الثدي (Ayub وآخرون، 2014 ; Calderon-Garciduenas وآخرون، 2005).

وعامل الخطر الوراثي مسؤول عن 3% الى 10% من جميع حالات سرطان الثدي وتصل الى 30% من جميع بداية سرطان الثدي (Tereschen وآخرون، 2002).

ووفقا للدراسات السابقة فاعن سرطان الثدي يحدث نتيجة لسبب وراثي اي 5%-10% من بين جميع حالات سرطان الثدي (Armaous وآخرون، 2009).

إنّ الطفرات في جينات BRCA1 و BRCA2 هي العامل الرئيس من العوامل الوراثية لسرطان الثدي وسرطان المبيض. (Kwong وآخرون، 2011). الطفرات في جينات BRCA1 و BRCA2 هي كفوءة جدا في الخطر المتزايد للتطوير المبكر لسرطان الثدي وسرطان المبيض العائلي، ان الطفرات في هذين الجينين ليست مسؤولة فقط عن 90% من حالات سرطان الثدي الوراثي ولكن ايضا الغالبية العظمى لسرطان المبيض الوراثي (Martin وآخرون، 2009; Chen وآخرون، 2009). الطفرات الجينية لل BRCA1 و BRCA2 تكون عرضة لخطر الاصابة بسرطان الثدي وانواع اخرى من السرطان وخاصة سرطان المبيض (Marchina وآخرون، 2010).

بالإضافة الى زيادة خطر الاصابة بسرطان الثدي، الجينات الحاملة للطفرة في BRCA1 و BRCA2 يكون لها خطر متزايد لانواع اخرى من السرطان مثل القولون والبروستات والبنكرياس وسرطان الجلد وسرطان المعدة (Dult وآخرون، 2012; Jancarkova وآخرون، 2003). لذلك وفقا للدراسات التي اجريت تسعى الى اقتراح الكشف عن جينات BRCA1 و BRCA2 لجميع سرطان الثدي والمبيض للمرضى الذين لديهم تاريخ عائلي (Tazzite وآخرون، 2012).

يرتبط العمر ارتباطا وثيقاً بسرطان الثدي بشكل ايجابي وفي هذا الصدد فقد وُجِدَ ان خطر 10% من سرطان الثدي في سن 40 عاما وبعد ذلك ازدادت الى 1.45% في سن 40 عاما و 2.38% في سن 50 عاما و 3.45% في سن 60 عاما ونسبة 3.72% في سن 70 عاما (Anderson وآخرون، 2006). وان ما يقرب 75% من حالات سرطان الثدي تم تشخيصها في النساء الاكثر سنا من 50 عام (Zaemey وآخرون، 2012).

وبين (Colditz وآخرون، 2012) أن ازدياد الخطر لاصابة المرأة بسرطان الثدي إذا كان للمرأة تاريخ عائلي لهذا المرض.

هناك دراسة تبين أن النسوة اللواتي لديهن تاريخ من الام لهذا المرض وتم تشخيصها قبل سن 50 سنة أي يكون لها الخطر النسبي بنسبة 1.69 وإن النسوة اللواتي لديهن تاريخ من الام والتي تم تشخيصها في سن 50 سنة أو أكثر، كان الخطر النسبي لها 1.37 مقارنة بالنسوة اللواتي لهن لها تاريخ عائلي لسرطان الثدي.

أيضا تاريخ الاخت من سرطان الثدي تظهر له نسبة كبيرة من 1.66 إذا تم التشخيص قبل سن 50 سنة والخطر بنسبة 1.52 إذا تم التشخيص بعد سنة 50 بالمقارنة مع المرضى الذين لا يمتلكون خطر التاريخ العائلي.

2-1-5 التوزيع الجغرافي للمرض او الانتشار العالمي Geographical distribution of disease or global spread:

سرطان الثدي هو الورم الخبيث الأكثر انتشارا بين النساء في جميع انحاء العالم ويشكل هذا المرض 22.9% من جميع حالات السرطان بين النساء وهو واحد من الاسباب الرئيسية للوفاة (Xing وآخرون، 2014). تتأثر 1.000.000 من النساء بهذا المرض سنويا و 300.000 امرأة اخرى تموت سنويا نتيجة لذلك. (Ayub وآخرون، 2014; Armaou وآخرون، 2009). معدل الاصابة بسرطان الثدي بين النساء في البلدان المتقدمة والبلدان النامية هي 1\12 و 1\22 على التوالي (Ayub وآخرون، 2014)

العمر الأكثر خطرا الذي تواجهه المرأة لهذا المرض في الاربعينيات بالنسبة للمرأة الاسيوية وفي الستينيات للمرأة الاوربية (Neamat وآخرون، 2015; Mousavi وآخرون، 2009).

وبالتالي يتم تصنيف سرطان الثدي في اسيا على اساس بدء الوضع المبكر. (Toh وآخرون، 2008). وقد بين (Ferlay وآخرون، 2000) أن مرض سرطان الثدي هو مرض ذو عبئ كبير في جميع انحاء العالم ويعتبر أيضاً السبب الأكثر شيوعا للسرطان ما بين النساء ذات المورد العالي والمورد المنخفض. أيضا هو المرض المسؤول عن أكثر من 10

مليون من الاورام المشخصة لكلا الجنسين في جميع انحاء العالم. وهو المرض الرئيس المسبب لوفاة النساء على الصعيد العالمي اي مسؤول عن ما يقارب 375000 حالات وفاة للعام 2000. وقد وفرت المقارنة ما بين الدول لمعدل هذه الامراض وجاءت حسب وقت التشخيص والمنطقة والتي تعتبر من الادلة المهمة والمبينة للاسباب التي تكمن وراء هذه الامراض وايضا تبين ما اذا كان هذا المرض هو امر طبيعي اي تداخلات طبيعية او مخطط له اي تكون دلائل للخطة العلاجية. وايضا وجد Parkin وآخرون 1997 عن ما لا يقل عن 10 اضعاف اختلافات لمعدلات الاصابة بسرطان الثدي في كافة انحاء العالم، ان هذا الاختلاف الكبير يعود الى الاختلافات الاقتصادية والاجتماعية المرتبطة بانتشار السكان نتيجة لعوامل عديدة منها العوامل الانجابية والعوامل الهرمونية وعوامل التغذية .

وقد وجد الاثار الكبيرة لفحص الثدي بالاشعة السينية في البلدان النامية لها اثر كبير لتشخيص سرطان الثدي وايضا لتسجيل الوفيات. إن الاختلاف في معدل الوفيات يعود الى الاختلافات في حالات الاصابة، و يتأثر بالتشخيص المبكر بواسطة الفحص او نتيجة لزيادة الوعي الفردي بالنسبة للمرض واعراضه (Tyczynski وآخرون، 1994).

2-1-6 الوراثة والتاريخ العائلي Family History and Genetics:

العوامل البيئية ونمط الحياة فضلا عن العوامل الوراثية الموروثة بمعظم حالات سرطان الثدي، اي ان العوامل الوراثية تسهم في حوالي ربع العوامل البيئية، ونمط الحياة الى حوالي ثلاثة ارباع من القابلية الكلية لمدى الاصابة بسرطان الثدي (Lichtenstein وآخرون، 2000).

ان هذه الالتفاتة تؤدي الى مدى اهمية نمط الحياة والعوامل البيئية المهمة لتطور المرض بالنسبة للنساء المؤهلات وراثيا، لذا اصبح الاختبار الجيني للاستعداد السرطاني الوراثي امرا مهما في علم الاورام الطبي ويؤدي فعالية افضل من حيث الوقاية والمراقبة (Graber و Offit، 2005). وبالنسبة الى الطفرات ذات الخطورة العالية، ادى وجودها الى التأهب لسرطان الثدي وهي اربع طفرات جينية وتشمل الطفرات كل من جينات BRCA1 و BRCA2 و P53 و PTEN والتي تعد جينات كابطة للورم تساعد في عملية تصنيع البروتين واصلاح الحمض النووي وتمنع السرطان، حيث وجد ان كل خلية في ناقلات الطفرة ينعدم بها اليل وظيفي

واحد(الوظيفة الكابتة للورم انفققت من هذا الجين) في مثل هذه الحالة يؤدي التشجيع على الاصابة بالسرطان(Blanco واخرون،2010).اغلبية النساء اللاتي يصبين بمرض سرطان الثدي ليس لديهن تاريخ عائلي لهذا المرض، وهذا لا يعني انك لن تصاب بسرطان الثدي لانعدام وجود قريب مصاب بالمرض، ولكن خطر الاصابة بسرطان الثدي يكون الاعلى بين النساء اللواتي لديهن اقارب مصابين بالمرض(Breast cancer.org، 2014)

2-2 تفاعل البلمرة المتسلسل PCR Polymerase chain reaction

تفاعل البلمرة هي التقنية الحيوية في مجال البايولوجية الجزيئية لتضخيم واحدة او مجموعة نسخ من قطعة من الحمض النووي عبر مجموعة من الاوامر وانتاج الالاف الى ملايين النسخ من تسلسل الحمض النووي وهذه الطريقة تم تطويرها من قبل كاري Karry mullis عام 1983(Bartlett و Stirling،2003).

والغرض من تفاعل البلمرة المتسلسل PCR هو الكشف وتوصيف الجينات(Morgan،2002). ويعتمد هذا الاسلوب على درجات الحرارة التي تتألف من دورات التسخين والتبريد المتكرر التفاعل لتفكيك الحمض النووي، والتكرار الانزيمي من الحمض النووي، اي ان البادئات(قطع من الحمض النووي القصيرة) التي تحتوي على المتتاليات التكميلية للمنطقة المستهدفة جنبا الى جنب مع البوليميريز DNA وهي المكونات الرئيسية للتمكن من التضخيم الانتقائي المتكرر والحمض النووي الذي يتم انشاؤه هو نفسه الذي يستخدم كنموذج للنسخ المتماثل لتفعيل تفاعلا مسلسلا حيث يتم تصنيعه الى القالب DNA بشكل مضاعف او بشكل كبير (Partlett و Stirling،2003). إنَّ الكثير من النسخ من تسلسلات الحمض النووي الصغيرة والتي بالامكان ان يتم تضخيمها ابتداءً من هذه النسخ، وايضا دراسة الحمض النووي تكون اكثر سهولة، على سبيل المثال يتم تحديد تسلسلات النيكلوتيدات لجين معين .ان هذه التقنية هي الاكثر استخداما في مجال البايولوجيا الجزيئية وتستخدم في البحوث الطبية الحيوية وايضا الطب الشرعي والجنايات حيث يتم تضخيم جين واحد او تسلسل الحمض النووي عن طريق عينة صغيرة من نسيج حتى وان كانت خلية (Ksaiki واخرون،1988).

2-3 Single-strand conformation polymorphism (SSCP):

حتى الان تم تحديد من 1000 من الجينات التي تكون مشاركة في الامراض الموروثة واكثر من 20000 طفرة لهذه الجينات من خلال قاعدة بيانات طفرات الجينات البشرية (Krawczak وآخرون، 2000). ومن بين التقنيات التي تستخدم للكشف عن هذه الطفرات هي تقنية SSCP (Orita وآخرون، 1989). حيث تكشف هذه التقنية عن التغيرات التي تحصل للحمض النووي المتقطع حيث ان تقنية SSCP تعتمد على ما ينتجه PCR اي منتجات PCR المحرفة او المشوهة، اي الحامض النووي الغير طبيعي حيث ان فصل الخيوط يعتمد على الهياكل المطوية التي يحددها تسلسل النيكلوتيدات. حيث تمكن تقنية SSCP الكشف عن تغير قاعدة واحدة عندما يكون الالتفاف او الطي الناتج من التغيرات المتقطعة المفردة كافي لتغير تنقلات الترحيل الكهربائي. ففي الكثير من الاحيان يتم الكشف في هذه التقنية عن الطفرات المختلفة حيث تصل حساسية SSCP الى 80% عندما يتم استخدام ظروف واحدة للترحيل الكهربائي (Michaud وآخرون، 1992).

وتعرف تقنية SSCP بأنها الفرق بتكوين تسلسل نيكلوتيدات الشريط المفردة المتطابقة بالطول والناجمة عن الاختلافات في التسلسل تحت بعض الظروف التجريبية، تسمح هذه الخاصية تمييز المتتاليات والمتابعات عن طريق هلام الترحيل الكهربائي والذي يفصل بين الاجزاء وفقا للتشكلات المختلفة (Orita وآخرون، 1989). تعتمد SSCP على مبدأ الترحيل الكهربائي لجزيء الحمض النووي المفرد الشريط على المادة الهلامية او الجل ويعتمد بشكل اساسي على الحجم والتركيب (Hayashi، 1996). في المحلول فأن جزيئات الحمض النووي المفرد الشريط تأخذ التشكلات الثانوية والثلاثية بسبب قاعدة الاقتران بين النيكلوتيدات ضمن مسارات فردية وتعتمد هذه التشكلات على طول الخيط، وتسلسله، والموقع، وعدد مناطق قاعدة الاقتران (Orita و آخرون، 1989). SSCP جانب من PCR يوفر اداة قوية لتحديد المسببات المرضية والفحص الفعال للتباين الوراثي بين عينات السكان، والاهم من ذلك الكشف عن الطفرات غير المعروفة (Doik وآخرون، 2004؛ Gasser وآخرون، 2004).

تحليل ال SSCP مفيد للكشف عن اصغر وادق ضرر مثل استبدال قاعدة واحدة او حذف قاعدة او العناصر المتداخلة الصغيرة او الاستقلابات الصغيرة او الدقيقة وتشكل كل هذه التغيرات عادة غالبية الطفرات المسببة للمرض (Hayashik, 1996).

وحساسية ال PCR-SSCP تعتمد على العوامل التالية:

1. نمط الطفرة او اسلوب الطفرة في التسلسل الهدف.
2. حجم قطع او شظايا ال DNA ومحتوياتها من G C.
3. درجة حرارة الهلام
4. تركيبة هلام المصفوفة.
5. تكوين المحاليل العازلة (القوة الايونية، درجة الحموضة)
6. تركيز ال DNA .

وبين (Suzukiy وآخرون، 1991) ان في تحليل PCR-SSCP يتم فصل قطع مختلفة من التسلسل والتي يتم عزلها على الهلام حيث يتم عزل الجين المتحور واعادة تشكيله من خلال هذا التحليل وذلك بواسطة تحديد التسلسل لمعرفة الطفرة ومن ثم يمكن الكشف عن الطفرات للخلايا التي لم تشكل سوى جزء صغير من خليط المواد التي يتم فحصها والتي تتميز بشكل جيد على مستوى التسلسل ككل. وجينات المرض تحتوي على العناصر المدرجة الصغيرة و الحذف والاستبدال قاعدة واحدة فأن الاداء يكون بشكل افضل عادة في تحليل SSCP من تلك التي لديها اسلوب او نمط طفرة التي تسيطر عليها عمليات الحذف بشكل كبير (Vorechovsk, 2002)

4-2 مؤشرات جزيئية Molecular markers:

وفقا للمعهد الوطني الامريكي للصحة، و (National institutes of health NIH) والفريق العامل، واتحاد المؤشرات الحيوية ان المؤشرات الجزيئية هي السمة التي تقاس بموضوعية كمؤشر على العمليات البايولوجية المسببة للأمراض (Mishra و Mverma, 2010).

على الرغم من أنّ معظم هذه العلامات هو بروتين ففي الآونة الأخيرة اتخذت انماط التعبير الجيني والحمض النووي أيضا أهمية كعلامات للورم. (Ventura و Merajver، 2008)

ان هذه الاورام لديها مجموعات فرعية واضحة المعالم والتي تظم الامراض المميزة والمعقدة وهي الميزات النسيجية والنتائج السريرية تعمل على التعبير الجيني وترتبط ارتباطا وثيقا بسلوك هذه الانواع الفرعية الجزيئية.

واشار Sotiriou و Puztai، 2009 الى أنّ نتائج دراسات التعبير الجيني قد غيرت وجهة نظر سرطان الثدي من خلال توفير اداة جديدة للتشخيص الجزيئي، في الواقع قد استخدم وضع مستقبلات هرمون الاستروجين ومستقبلات هرمون البروجسترون ونوع من مستقبلات عامل نمو البشرة HER2 كعلامات تنبؤية لتحديد النمط الظاهري من مرض سرطان الثدي واختيار العلاجات الأكثر فعالية (Weigl و Reis fitho، 2010).

بعد تسلسل الجينوم البشري والتقدم التقني في تحديد البروتين فمن المعقول النظر في برنامج متكامل لعلم الجينوم والبروتينومات لتحقيق فهم افضل لمميزات سرطان الثدي وتطوير علاجات محسنة (Honder mark وآخرون، 2001).

2-5 تسلسلات الدنا DNA Sequencing :

تسلسلات الدنا هي عبارة عن تحديد التسلسل الصحيح للنكليوتيدات في جزيئة الحمض النووي. والذي بدوره يشمل اي تقنية او طريقة مستخدمة كانت لتحديد تسلسل القواعد الادنين A - الغوانين G - الثايمين T - السيتوسين C DNA (Olsvik وآخرون، 1993). واصبح لمعرفة تسلسلات الحمض النووي أهمية لا غنى عنها في البحوث البايولوجية الرئيسية مثل التشخيص، والتقنية الحيوية، وعلم الاحياء الشرعي، والمنهجية البايولوجية (Petterson وآخرون، 2009). إنّ الهدف الأساسي من الأبحاث التي تخص السرطان هو من اجل ان يتم تحديد الجينات التي يحدث بها التحول اي الجينات المسببة للسرطان والتي يتم تحديدها من خلال المقارنة مع مجموعة الجينات الكاملة والتي يتم الكشف عنها في تسلسل الجيوم البشري. حيث اجري تعداد للجينات المسببة للسرطان ووجد انها تشير الى اكثر من 1% من طفرات الجينات المشاركة في

الاصابة بسرطان الانسان، ان هذا التعداد يبين السمات العديدة لانواع التغيرات التي تطرأ على التسلسل (Andrew وآخرون، 2004).

وكان المنحدر السريع للتسلسل الذي تحقق مع تقنية تسلسل الحمض النووي الحديث ذات أهمية في تسلسل الحمض النووي الكامل او جينوم انواع اخرى او عديدة من الحياة بما في ذلك جينوم البشر وغير ذلك من تسلسلات الحمض النووي الكامل للكثير من الكائنات مثل الحيوانات والنباتات وغيرها من الميكروبات (Ahmadian وآخرون، 2009).

2-6 الدراسات السابقة للكشف عن الجينات المسببة لمرض سرطان الثدي و علاقة سرطان الثدي ببعض المؤشرات الكيموحيوية

اشار (Omer وآخرون، 2014) في دراسته الى تقييم تعدد الاشكال في جينات BRCA1 والطفرات التي تميز سرطان الثدي حيث شملت هذه الدراسة على 206 اناث مصابات بمرض سرطان الثدي واستخدم تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل من اجل تحليل تعدد الاشكال للحمض النووي DNA وقد تم التحقق من تعدد الاشكال باستخدام الاكسونات لجين BRCA1، وهي 2، 3، 5، 20، 11 على التوالي وتم فحص العينات للتأكد من وجود الطفرات حيث بينت نتائج هذه الدراسة تعدد اشكال اكسون 2 بنسبة بلغت 86% واكسون 20 3.48 % واكسون 11 بمقدار 4% حيث بينت هذه الدراسة ان اكثر التغيرات انتشارا في جين BRCA1 تقع على اكسون 11 وان الهدف من هذه الدراسة المستقبلية لتقييم انتشار الطفرات في جينات BRCA2 وتحليل جينات BRCA1 في الاقارب.

وفي دراسة سابقة من قبل (Rozan وآخرون، 2015) للكشف عن الطفرات الخاصة بجين BRCA1 وجين BRCA2 المسببة لمرض سرطان الثدي استخدم في هذه الدراسة تقنية Single-Strand Conformation Polymorphism للاكسونات الخاصة بجين BRCA1 وهي 2، 3، 5، 20، 11 وايضا اكسونات BRCA2 وهي اكسون 10 واكسون 11 حيث تم تحديد التغيرات في كل من جين BRCA1 وجين BRCA2 ، واحدة من هذه

التغيرات وقعت على جين BRCA1 والثلاثة الأخرى وقعت على جين BRCA2 اي ان هذه الدراسة تبين ان جين BRCA2 تفوق على جين BRCA1 في اظهار مرض سرطان الثدي.

ان الهدف من هذه الدراسة هو توضيح دور الجينات الوراثية الاساسية لمرض سرطان الثدي وهي جينات BRCA1 وBRCA2 وانتشار طفراتها بين النساء من اجل انشاء ملامح وراثية من هذه الدراسة.

إنّ تقنية SSCP هي من اكثر التقنيات الحساسة للجينات التي تكون مهينة لمرضى السرطان وواحدة من اكثر التقنيات استخداما حيث تم استخدام هذه التقنية من قبل E.Gros و S. Gross، 1999 للكشف عن طفرات جين BRCA1 وما يسببه هذا الجين من تغيرات مؤدية الى تكوين المرض وايضا شملت هذه الدراسة مقارنة مابين تقنية SSCP وتقنية High performance liquid chromatography (HPLC) حيث بينت الدراسة مقدار الطفرات التي تنتج عن طريق جين BRCA1. و دراسة جاء بها B.Campos وآخرون، 2001 استخدمت تقنية sscp للكشف عن طفرات جينات BRCA1 و BRCA2 حيث كشفت الدراسة ان مابين 45%-50% من الطفرات كانت تقع على جين BRCA1 و مابين 25%-35% واقعة على جين BRCA2 بمعنى ان جين BRCA1 في هذه الدراسة تفوق على جين BRCA2 في اظهار مرض سرطان الثدي، ان هذه الاختلافات في النسب يعود سببها الى الامور المتعلقة بسن التشخيص اي في اي عمر للمرأة تم تشخيصها بالمرض، وكذلك نوع سرطان الثدي . ان هذه الدراسة تعزز نسبة الطفرات في جينات BRCA1 و BRCA2 المسببة لمرض سرطان الثدي.

اما فيما يتعلق بالمؤشرات الكيموحيوية وعلاقتها بمرض سرطان الثدي فكانت هناك دراسة جاء بها Tareq و Wassan، 2007 حيث بينت هذه الدراسة تقدير نسبة الكوليسترول الكلي Total Cholestrol والدهون عالية الكثافة High Density Lipoprotien والدهون واطئة الكثافة Low Density Lipoproyien لنساء مصابات بمرض سرطان الثدي حيث بينت النتائج لهذه الدراسة وجود ارتفاع معنوي لكل من الدهون الكلية والدهون عالية الكثافة وانخفاض معنوي في مستوى الدهون واطئة الكثافة ولا وجود لأي فرق معنوي للكوليسترول الكلي.

7-2 هرمونات الغدة الدرقية T3 , T4, TSH

يؤدي هرمون الغدة الدرقية دورا مهما في تنظيم عملية التمثيل الغذائي الخلوي، والانتشار والتمايز (Meng وآخرون، 2011).

ويوجد نوعان أساسيان من هرمون الغدة الدرقية هما:

T4 (3,5,3,5-Tetraio dothyronine)

T3 (3,3,5_ Triio dothyronine)

ويتم انتاج هذه الاشكال الهرمونية من قبل الخلايا الجريبية للغدة الدرقية Schurartz و Stevenson، 2007. توسط هرمونات الغدة الدرقية عملها على انواع متنوعة من الخلايا (الغشاء البلازمي، النواة، الساييتوبلازم، المايتكوندريا) وبمختلف الطرق يتم تنظيم الانشطة البيولوجية من قبل T3 من قبل مستقبلات هرمون الغدة الدرقية النووية TRS عن طريق التنظيم النسيجي (Cheng sye وآخرون، 2010). وقد ارتبطت امراض الغدة الدرقية مع العديد من الامراض بما في ذلك سرطان الثدي (Cheng وآخرون، 2010). هناك الكثير من النتائج التي تكون متناقضة وقد اعطي اهمية للتمييز الجغرافي في الاصابة بسرطان الثدي بسبب الاختلافات في تناول اليود في النظام الغذائي، واقترح ايضا تأثير اليود على الثدي، والنتائج تشير الى زيادة حدوث امراض الغدة الدرقية في مرضى سرطان الثدي (Turken وآخرون، 2003). ان مبدا ان يكون هرمون الغدة الدرقية قد يكون عامل نمو لسرطان الثدي قد تم الاشارة اليه من قبل الكثير من العلماء (Cristo وآخرون، 2005). ان مستقبلات هرمون الغدة الدرقية والستريودية ينتمي الى نفس العائلة ذات التركيب الجزيئي المتشابه، ولكن لها وضائف نسخية مختلفة تحدها احداثها الجينية (Meng وآخرون، 2011). هرمونات الغدة الدرقية T3 و T4 تؤدي دورا مهما في تكاثر الخلايا السرطانية وتكاثر الاوعية اي ان دور هرمونات الغدة الدرقية في تطوير وتمايز الانسجة الطبيعية هو امر معروف (Lin وآخرون، 2011). ومع ذلك فإن الارتباط السريري بين سرطان الثدي وامراض الغدة الدرقية هو مثير للجدل على الرغم من ان هناك بعض الدراسات التي لا تؤيد هذا الارتباط ولكن بالمقابل هناك العديد من الدراسات التي تشير الى وجود ارتباط

محتمل بين سرطان المبيض وامراض الغدة الدرقية.(Rae وآخرون، 2007 ; Nasser وآخرون، 2000).

2-7-1 الكوليسترول والدهون عالية الكثافة والدهون واطئة الكثافة

Cholestrol, HDL, LDL ,Tri

المحتوى الدهني في البلازما يعتمد على ما يتناوله الفرد من المواد الدهنية في غذائه، هناك العديد من البحوث التي تشير الى ارتفاع مستوى الدهون في البلازما مثل الدهون الكلية (TL) Total Lipoprotein والدهون الفسفورية Phosphate Lipoprotein (PL) ثلاثي الشحوم TriGlyceride (TG)، الكوليسترول الكلي Total Cholestrol (TC)، البروتين الدهني منخفض الكثافة Low Density Lipoprotein (LDL)، والاحماض الدهنية الحرة Free fatycid (FFA) قبل وبعد سن اليأس لمرضى سرطان الثدي (Sachdana و Kumar، 1991؛ Bani وآخرون، 1986). وقد اقترح ان التغيرات في التراكيز الدهنية في مصل دم مرضى سرطان الثدي يمكن ان يؤدي الى الزيادة في انتاج عامل النخر الورمي وتنشيط فعالية ونشاط الدهون البروتينية الدهنية المسماة (lipasa) بواسطة عمل او فعالية الانسولين (Knappm وآخرون، 1991؛ Zielinski وآخرون، 1988). الكوليسترول هو مقدمة من هرموني الاستروجين والبروجسترون (Gruber وآخرون، 2002). اي العامل او المفتاح الرئيسي لسرطان الثدي (Key وآخرون، 2002)، بالإضافة الى ذلك ترتبط المستويات العالية من الكوليسترول و HDL عكسيا مع تطور سرطان الثدي (Agnoli وآخرون، 2010؛ Furberg وآخرون، 2004). في حين الزيادة في مستويات البروتين الدهني واطئ الكثافة قد ارتبط بالشكل الايجابي مع حجم ورم الثدي ومرحلة الورم ومدى انتشار الورم. (Rodrigues Dos santos وآخرون، 2014) وقد تبين ان جزيئات الدهون لها تأثير مباشر على الالتهاب (Kaji، 2013؛ Vedin وآخرون، 2009). والتي تعتبر اهم الخصائص الرئيسية او الممييزة للسرطان، وتطوير سرطان الثدي (Hanahan و Weinberg، 2011). إن مدى التوزيع لجزيئات البروتين الدهني لديه الامكانية العالية لتطوير تشخيص الاضطرابات الايضية (Mihaleva وآخرون، 2014). التي تكون ذات اهمية لمدى تطوير سرطان الثدي والعلاج ولا سيما الذين يعانون من حالات مرضية اخرى مثل مرض

السكري. (Gustbee وآخرون، 2015). (Pan وآخرون، 2012) ويرتبط البروتين الدهني المنخفض الكثافة جدا VLDL مؤخرا بالقدرة على نقل الدهون الى الخلايا السرطانية (Daniels وآخرون، 2014).

2-7-2 علاقة سرطان الثدي مع مستوى الجلوكوز في الدم

إنَّ الارتباط ما بين مرض السكري و مرض سرطان الثدي يعود الى عوامل الخطر المرتبطة بكلا المرضين مثل التقدم بالعمر، قلة النشاط البدني، الامراض التي تكون مصاحبة لكلا المرضين، السمنة، الاستعداد الوراثي ومتلازمة التمثيل الغذائي (Ahn وآخرون، 2007). حيث وجد ان حوالي 16% من مريضات سرطان الثدي في كافة انحاء العالم مصابات بمرض السكري وتميل المصابات في مثل هذه الحالة الى معدلات قليلة للبقاء على قيد الحياة بعد الخضوع للعلاج الكيميائي (Yerrabothala وآخرون، 2013). وعادة مريضات سرطان الثدي الاتي يأخذن المنشطات التي تعتبر جزء من العلاج الكيميائي حيث ان هذه المنشطات بجانب العلاج الكيميائي يكون لها اثار واسعة على استقلاب الجلوكوز وبالاخص ارتفاع السكر في الدم بعد الاكل (Hickish وآخرون، 2009). هناك العديد من الدراسات التي تسلط الضوء على ان مرض السكري من النوع 2 يرتبط مع زيادة خطر الاصابة بسرطان الثدي (Chen وآخرون، 2013). ان الزيادة في مستوى الجلوكوز تكون عادة مصحوبة بزيادة مستوى الانسولين حيث ان الانسولين يعزز من نمو وتكثر الخلايا ويعود السبب الى تأثيره الذي يؤدي الى انتشار الخلايا (Chappell وآخرون، 2001). ان الزيادة في نسب الجلوكوز لمريضات سرطان الثدي قد تعود الى كل من العلاج دكساميثازون و جلايكورتيد وكلاهما يستخدم بشكل واسع وشائع من اجل التقليل من الاثار الجانبية الذي يتركه العلاج الكيميائي وكلا العلاجين يسببان ارتفاع مستوى السكر في الدم (Hickish وآخرون، 2009). حيث ان زيادة السكر في الدم تعطي مقاومة للعلاج الكيميائي (Zeng وآخرون، 2010). وفي عام 1977 لاحظت كارول ان هناك علاقة بيئية ما بين ما بين معدل الوفيات لسرطان الثدي و معدل استهلاك الفرد للسكر (Caroll، 1977).

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل

**Materials
and
Methods**

3. المواد وطرائق العمل. Materials and Method.

3-1-1 الاجهزة والادوات المستخدمة في الدراسة

جدول 3-1 الاجهزة و الادوات المستخدمة والشركات المصنعة والمنشأ

المنشأ	اسم الشركة المصنعة	اسم الجهاز	ت
Turkey	Arcelik	Deep freeze	1.
—	—	Gel tube	2.
Taiwan	Genada	Eppendrof tube	3.
TheusA	Labnet	Gel-Electrophoresis	4.
Korea	Vision	Hotplate magnic stirrer	5.
U.S.A	Safe Pack	Medical Gloves	6.
Germany	TUV	Micro centrifuge	7.
Germany	Dragonmed	Micro pipettes	8.
Bio basic INC	Genada	Micro tip short 10-0.1	9.
Bio Basic INC	Genada	PCR Rack tube	10.
U.S.A	Labned Edison	PCR Thermal Black	11.
Germany	ECM	Power Supply	12.
Bio Basic INC	Genada	Rack eppendrof 100 sample	13.
Germany	Denver Instrument	Sensitive Electronic Balance	14.
Germany	ECM	Spectrophotometer	15.

Germany	–	Tube deferent size (50ml,100ml,500ml)	16.
The U.K	Diocom	UV Cabinet	17.
Baeco–Eufor	Boeco	Vortex Vlplus	18.
Germany	Memmer	Water bath	19.
Geneaid	Taiwan	GD column tube	20.
–	–	EDTA tube	21.
–	–	Glass flasks of different sizes	22.

جدول (2-3) المحاليل المواد الكيميائية المستخدمة في الدراسة .

ت	المحاليل والمواد الكيميائية المستخدمة	اسم الشركة المصنعة	المنشأ
1.	100bp DNA Ladder D-1030	Bioneer	Korea
2.	Agarose 50mg	Genada	Bio Basic INC
3.	Elusion Buffer 30ml	Geneaid	Taiwan
4.	Deionized water	Bioneer	Korea
5.	Ethidium bromide solution	Genada	Bio Basic
6.	Ethyl Alcohol Absolut 96%	–	Iraq
7.	Genomic DNA mini kit blood protocol	Geneaid	Taiwan
8.	GSB Buffer 40ml	Geneaid	Taiwan
9.	GST Buffer 30ml	Geneaid	Taiwan

Bio Basic INC	Genada	Loading Dye	10.
Koria	Bioneer	PCR premix k-2012 0.2ml\20μl\9 tube	11.
Koria	Bioneer	Specific primers	12.
Bio Basic INC	Genada	TBE Aoo26 10x1L	13.
Taiwan	Geneaid	W1 Buffer 45ml	14.
Taiwan	Geneaid	Wash Buffer 25ml	15.
Taiwan	Geneaid	Elushion Buffer	16.
Kuwait	—	Filtered water	17.

2-3 طرائق العمل

1-2-3 جمع العينات Collection of Samples

تم الحصول على عينات دم لإناث مصابة بمرض سرطان الثدي من جميع اقضية محافظة ديالى (بعقوبة، المقدادية، بلدروز، الخالص، جلولاء، خانقين)، وكان العدد (100) عينة، اذ كان عدد العينات النساء المصابة بالمرض (50) عينة وعدد عينات مجموعة السيطرة (50) عينة.

و كانت تتراوح الاعمار بالنسبة للنساء المصابة بالمرض ومجموعة السيطرة ما بين (40_70) سنة وقد تم اخذ المعلومات من النساء المصابة بمرض سرطان الثدي من حيث التاريخ العائلي، ثدي أيمن - أيسر، فترة الخضوع للعلاج الكيميائي وهل تمت ازالة الثدي بالكامل ام جزء من الثدي اي فقط الجزء المتضرر من الثدي.

وكذلك بالنسبة لمجاميع السيطرة ان تكون النساء لا تعاني اي امراض متعلقة بالثدي او اي امراض وراثية.

ان طريقة جمع النماذج كان يتم عن طريق سحب 6 مل من الدم قسم الى جزئين 3مل
تم وضعه في انابيب حاوية على مادة EDTA (مادة مانعة للتخثر) مع رج الانبوبة رجاً خفيفاً
لمزج العينة مع المادة لحين استخدامها لأجراء الفحوصات الوراثية الجزيئية والفحوصات الدموية
.

والجزء الاخر 3 مل وضعت في انابيب الطرد المركزي للحصول على المصل (السيرم)
لاستخدامه لأجراء الفحوصات الكيميائية الحيوية.

2-2-3 الدراسة الوراثية الجزيئية Molecular Study

1-2-2-3 استخلاص الدنا DNA Extraction

تمت عملية استخلاص الدنا باستخدام عدة الاستخلاص

Genomic DNA mini kit blood protocol

محاليل الاستخلاص Buffer used in DNA Extraction

Proteinase K	20µl
GSB Buffer	200µl
Absolut Ethanol	200µl
W1 Buffer	400µl
Wash Buffer	600µl
Elution Buffer	50µl

3-2-2-2 طريقة العمل

1. تم وضع 200µl من الدم في انبوبة ايندروف 1.5مل.
2. تم اضافة 20µl من مادة Proteinase K الى كل انبوبة ومزج هذه المادة مع الدم باستخدام ال Vortex وضعت العينة بعدها في حمام مائي لمدة 5 دقائق بدرجة حرارة 60 مئوية.
3. بعدها اضيف 200 µl من GSB Buffer الى كل انبوبة ايندروف وترج ب Vortex ايضا لمدة (15) ثانية ووضعت العينات الحاوية على المادة في حمام مائي ايضا لمدة 5 دقائق مع الرج المستمر كل 2 دقيقة.
4. بعد انتهاء ال 5 دقائق نضيف 200 µl من Absolute Ethanol الى كل انبوبة ثم ترج المحتويات في جهاز ال Vortex لمدة 15 ثانية.
5. بعدها ينقل هذا السائل الى انبوبة GD Column الحاوية على فلتر ترشيح وتوضع ال GD Column الحاوية على هذا السائل في جهاز الطرد المركزي Micro Centrifuge بسرعة 14000 دورة في الدقيقة لمدة دقيقة واحدة.
6. بعد انتهاء الطرد المركزي واخراج الانابيب يتم اخذ فلتر الترشيح الى انبوبة GD Column جديدة وتبدأ عمليات الغسل Wash:
7. نضيف 400µl من W1 Buffer الى كل انبوبة حاوية على فلتر ترشيح ثم توضع المحتويات في جهاز الطرد المركزي Micro Centrifuge بسرعة 14000 دورة في الدقيقة لمدة دقيقة واحدة.
8. بعد ذلك يتم اخراج المحتويات من الجهاز وتستبدل انبوبة فلتر الترشيح بأخر جديد بعد ازالة السائل المترسب اسفل الفلتر.
9. اضافة 600µl من Wash Buffer الى كل انبوبة ويتم وضعها ايضا في جهاز الطرد المركزي Micro Centrifuge بسرعة 14000 دورة في الدقيقة لمدة دقيقة واحدة.

10. بعد ذلك يتم تجفيف الدنا الملتصق بفلتر الترشيح عن طريق وضع الفلتر في انبوبة GD جديدة ومن ثم وضعها في جهاز الطرد المركزي بسرعة 14000 دورة في الدقيقة لمدة ثلاث دقائق.

11. يتم بعدها اخراج الانابيب من جهاز الطرد المركزي ويتم اخذ فلتر الترشيح من كل انبوبة وتوضع في انبوبة ابندروف 1.5 مل بدل من انابيب GD Column.

12. يتم اضافة 50µl من Elution Buffer الى الانابيب وتوضع في جهاز الطرد المركزي بسرعة 14000 دورة في الدقيقة ولمدة دقيقة واحدة.

13. بعد انتهاء الطرد المركزي يتم اخراج العينات من الجهاز ويتم ازالة فلتر الترشيح وتبقى فقط انابيب الابندروف الحاوية على الدنا المترسب اسفل الانبوبة بلون ابيض شفاف وتحفظ في درجة حرارة 4م لحين استخدامها.

3-2-2-3 الترحيل الكهربائي للدنا المستخلص: Gel Electrophoresis

1. يحضر الهلام بوزن 1غم من الاكاروز في الميزان الحساس وتوضع الكمية الموزونة في دورق زجاجي مدرج حجمه 500ml يحتوي على كبسولة صلبة (magntic) الغرض منها ملابسة المكونات اثناء عملية التسخين.

2. يضاف 450ml من الماء المقطر الى انبوبة زجاجية مدرجة 500ml ثم يكمل الحجم بإضافة 50ml من محلول TBE Buffer بقوة 10x بواسطة انبوبة زجاجية مدرجة حجمها 50ml. بعدها يؤخذ من الخليط 100ml بواسطة انبوبة زجاجية مدرجة حجمها 100ml ويضاف الى الدورق الزجاجي الذي يحتوي على الاكاروز ثم يوضع الدورق لمدة (15) ثانية في جهاز الازابة HotPlate بدرجة حرارة 100مئوية حيث تغطي فتحة الدورق بالورق المقوى (السليفون) لمنع التبخر اثناء التسخين، وتستمر عملية الازابة لحين وصول السائل الى الحالة التي يكون فيها صافي تماما بدون اي فقاعات او شوائب.

3. ترك الهلام المذاب لمدة 10 دقائق الى درجة حرارة 40_50،

4. بعد ذلك يتم اضافة $5 \mu\text{l}$ من صبغة Ethidium bromide وبعدها يحضر الحوض المعد لصب الهلام ثم يسكب الهلام بعناية شديدة لمنع حدوث اي فقاعات ويترك ليتصلب تماما بعد وضع مشط بلاستيكي في الحوض لعمل الحفر في الهلام لغرض وضع عينات الدنا المستخلص.

5. بعد ان يتصلب الهلام يتم رفع المشط بحذر وبدقة فائقة لمراعاة الحفر الموجودة ويوضع في جهاز الترحيل الكهربائي بعد غمره بمحلول ال TBE بقوة X1 . تم بعدها وضع $2 \mu\text{l}$ من صبغة التحميل Loading Dae على ورق السليكون لكل عينة ووضع عليها $5 \mu\text{l}$ من الدنا المستخلص وتمزج مع بعض لتصبح بمقدار $7 \mu\text{l}$ ، بعدها توضع في الحفر الموجودة في الهلام. توصل اقطاب الجهاز ويجهز بقدره كهربائية 100 فولت وتستمر عملية الترحيل لمدة نصف ساعة.

6. وبعد الانتهاء من عملية الترحيل يتم تصوير الهلام بواسطة جهاز تصوير الهلام ليتم التأكد من وجود حزم الدنا المستخلص.

3-2-2-4 المحاليل المستعملة في الترحيل الكهربائي Electrophoresis solutio:

حضرت المحاليل التي تخص الترحيل الكهربائي حسب ما ورد في (Sambrook و Russel، 2001)

1- محلول (TBE) بقوة X1 Tris-Boric acid-EDTA:

تم التحضير من 0.089 مولار من Tris-OH و 0.089 مولار من حامض اليوريك و 0.002 مولار من Na₂-EDTA في 800 مليلتر من الماء المقطر، وتم ضبط PH الى 8 وتم اكمال الحجم الى 1000 مليلتر، وتم التعقيم بالمؤصدة، وحفظ في 4 م لحين استعماله.

2- محلول التحميل Loading Buffer بقوة 6x :

تم التحضير 100 مليلتر منه بأذابة 0.25 غم من صبغة البروموفينول الزرقاء (Bromophenol blu) في 50 مليلتر من الماء المقطر وتم اضافة 30 مليلتر من الكليسرول وتم عملية تعديل الاس الهيروجيني الى 8 باستخدام هيدروكسيد الصوديوم والذي تركيزه 10

عياري (يحضر بإضافة 40 غم من هيدروكسيد الصوديوم الى 80 مليلتر من الماء المقطر) ومن ثم يتم اكمال الحجم الى 100 مليلتر من الماء المقطر.

3-صبغة بروميد الاثيديوم Ethidium Bromide:

حضر بإذابة 0.05 غم من صبغة بروميد الاثيديوم في 9 مل من الماء المقطر بعدها اكمل الحجم الى 10 مل من الماء المقطر وذلك من اجل الحصول على تركيز نهائي قدره 5 ملغم/مل.

3-2-2-5 قياس تركيز الدنا ونقاوته:

تم قياس تركيز الدنا من خلال اضافة 495µl من الماء المقطر الى 5µl من الدنا وتتم قراءة امتصاص العينة للأشعة فوق البنفسجية باستخدام جهاز Spectrophotometer الذي يستخدم لقياس الكثافة الضوئية (O.D) عند الطولين الموجيين 260-280 نانوميتر واستخدام القانون الاتي:

تركيز الدنا (mg/ml) = مقدار الامتصاصية للطول الموجي 260nm من العينة × مقلوب التخفيف × 50، اما النقاوة فهي = الامتصاصية عند الطول الموجي 260 \ الامتصاصية عند الطول الموجي 280، هذه النسبة تدل على مدى كفاءة استخلاص الدنا ومدى تلوثه (Mainatis وآخرون، 1982)

3-2-2-6 تحاليل نظام Single-Strand Conformation Polymorphism:

هو النظام الذي يستخدم للكشف عن الطفرات غير المعروفة وهي واحدة من ابسط واكثر التقنيات حساسية وقوية للكشف عن الطفرة والكشف عن الاضطرابات والاعتلالات والسرطان. والتي تتم بواسطة استخدام البودائ المتخصصة للجينات المسببة لمرض السرطان اي باستخدام بودائ متخصصة لجينات BRCA1 وبودائ متخصصة لجينات BRCA2 .

3-2-2-6-1 Mutation Selection اختصار الطفرات المستخدمة للدراسة

وفقا لتوزيع الطفرات على جميع انحاء تسلسلات جينات BRCA1 و BRCA2 في الدول والبلدان المجاورة (Ford وآخرون، 1998، F.Z. Francies وآخرون، 2015، Omar وآخرون، 2014).

تم اختيار عشرة من طفرات التشخيص الجزيئي لمرض سرطان الثدي في محافظة ديالى - العراق اي الطفرات الخاصة بجينات BRCA1 و BRCA2 .

3-2-2-6-2 Primers Selection: اختصار البوداي**جدول (3-3) البوداي الخاصة بجينات BRCA1 و BRCA 2**

Exon	Sequence	Size
Exon2F	GAA GTT GTC ATT TTA TAA ACC	280
Exon2R	TGT CTT TTC TTC CCT CCT AGT ATG T	280
Exon20F	ATA TGA CGT GTC TGC TCC AC	350
Exon20R	GGG AAT CCA AAT TCA ACA GC	350
Exon11 F	CCA AGG TGT ATG AAG TAT GT	350
Exon11 R	CAG CAT TCA GAT CTA CC	350
Exon3 F	TCC TGA CAG AGC AGA CAT TTA	300
Exon3 R	TTG GAT TTT CGT TCT CAC TTA	300
Exon5 F	CTC TTA AGG GCA GTT GTC AC	280
Exon5 R	TTC CTA CTG TGG TTA CTT CC	280
Exon2 F	CTC ATT TGT ATC TGA AGT GG	600
Exon2 R	GAG AGA TGA AGA GCA GCA TC	600
Exon4 F	CTG TTT GCT CAC AGA AGG AG	600
Exon4 R	GAT TCA GGT ACC TCT GTC	600
Exon1 F	AGT GAA TGT GAT TGA TGG TAC	400

Exon1 R	CAT GCT GCA GCC AAG ACC TCT	400
Exon3 F	AAG ATG TAT GTG CTT TAA ATG	400
Exon3 R	CTC CTC TGC AAG AAC ATA AAC	400
Exon5 F	GCT CTC TGA ACA TAA CAT TAA G	490
Exon5 R	CAT TAT GAC ATG AAG ATC AG	490

(Rozany M وآخرون، 2015)

3-6-2-2-3 Single-Strand Conformation polymorphsim مكونات خليط تفاعل

تمت اضافة Deionized water للبادئ Primer المصمم حسب نوع الطفرة التي اختيرت للدراسة وتتم الاضافة حسب المقدار والكمية المكتوبة على كل بادئ (Primer) كالآتي:

Exon2 F

GAA GTT GTC ATT TTA TAA ACC TTT

تمت اضافة 128.8µl من Deionized water

Exon2 R

وكذلك بالنسبة

TGT CTT TTC TTC CCT AGT ATG

تمت الاضافة بمقدار 154.7µl من Deionized water

أي ان الاضافة تتم حسب الرقم المثبت على قائمة الاكسونات. بعد ذلك يتم اخذ 10ul من forward و اضافتها الى انبوبة ابندروف ويضاف عليه 90µl من Deionized water ليصبح الحجم مقداره 100µl وتمزج جيدا باستخدام جهاز الرج Vortex.

وكذلك الامر بالنسبة لل Reverse ايضا يتم اخذ 10µl من انبوبة الندروف حاوية على 90µl من Deionized water بعد ان تم تحضيره مسبقا Primer Stock.

اخذ 5µl من DNA و 2µl Primer forward و 2µl من Primer Reverse و 6µl من Deionized water، وتمت اضافتهم جميعا الى انبوبة خليط التفاعل الرئيسية Master mix المصممة خصيصا لهذا التفاعل وتم مزج الخليط جيدا ووضعت الانابيب الحاوية على خليط التفاعل في جهاز البلمرة الحراري Thermocycler ونفذت البرامج حسب درجة حرارة الالتحام Temperature Annealing.

:Single-Strand Conformation Polymorphisim نظام تضخيم 4-6-2-2-3 برامج

جدول(3) برنامج (1) للاكسونات 11-20-2 من جين BRCA1:

Step	Temperature	Time (minute)	N. of Cycles
Initial Denaturation	96	5	1
Denaturation	96	30	35
Anneling	57	30	
Extention	72	1	
Final extention	72	10	1

جدول(4) برنامج (2) للاكسون 3 من جين BRCA1:

Step	Temperature	Tim(minute)	N. of Cycles
Initial denaturation	96	5	1
Denaturation	96	30	35
Anneling	53	30	
Extention	72	1	
Final extention	72	10	1

جدول (5) برنامج (3) للاكسونات 5 من جين BRCA1 والاكسون 5 من جين
:BRCA2

Step	Temperature	Time (minute)	N. of Cycles
Initial denaturation	96	5	1
Denaturation	96	30	35
Anneling	58	30	
Extention	72	10	
Final extention	72	1	1

جدول (6) برنامج (4) للاكسونات 1-3 من جين BRCA2:

Step	Temperature	Time (minute)	N. of Cycles
Initial denaturation	96	5	1
Denaturation	96	30	35
Anneling	54	30	
Extention	72	10	
Final extention	72	1	1

جدول (7) برنامج (5) للاكسون 2 من جين BRCA2:

Step	Temperature	Time (minute)	N. of Cycles
Initial denaturation	96	5	1
Denaturation	96	30	35
Anneling	56	30	
Extention	72	1	
Final extention	72	10	1

جدول (8) برنامج (6) للاكسون 4 من جين BRCA:

Step	Temperature	Time (minute)	N. of Cycles
Initial denaturation	96	5	1
Denaturation	96	30	35
Anneling	52	30	
Extention	72	1	
Final extention	72	10	1

(Rozany M واخرون، 2015)

5-2-2-5-6 ترحيل ناتج التضخيم

Single-Strand Conformation Polymorphism PCR-Products

1. حضر الهلام بإضافة 1 غم من الاكاروز بعد قياسه بميزان حساس.
2. تم وضع 450ml من الماء المقطر الى دورق زجاجي مدرج الى 500ml واكمل الحجم الى 500ml بإضافة 50ml من TBE Buffer واخذ من الخليط 100ml واضيف للدورق الحاوي على الاكاروز وسخن الخليط بدرجة حرارة الغرفة ووضع على جهاز Hotplate Stirrer لغرض الازابة ووضع ورق سيليفون على فوهة الدورق لمنع التبخر وبدرجة حرارة 100م لحين اكتمال الازابة التامة بدون اي شوائب او مواد غير ذائبة، ثم يترك الخليط ليبرد الى درجة حرارة 40 - 50م.
3. تم اضافة 5ul من صبغة Ethidium bromide للهلام الموجود في الدورق الزجاجي مع الرج المباشر للمكونات لمدة 10 ثواني .
4. بعد ذلك سكب الهلام في الحوض بعناية شديدة لمنع حدوث الفقاعات وتركه يتصلب لمدة غير محددة من الوقت.
5. بعد غمر حوض جهاز التوصيل الكهربائي بكمية من محلول TBE Buffer بقوة 1x المحضر من اضافة 50 مل من محلول TBE Buffer بقوة 1x الى 450 مل من الماء المقطر، يرفع المشط من الهلام بعد التصلب التام في قالب الصب بعناية ورفق ينقل الهلام الى حوض جهاز الترحيل الكهربائي.
6. يوضع DNA Ladder في الحفرة الاولى من الهلام والحفرة الاخيرة وبحجم 7µl لغرض المقارنة ثم حملت العينات في بقية الحفر اي كل عينة في حفرة وبحسب الترقيم المعطى لكل واحدة.

7. تم اىصال اقطاب التيار الكهربائي بجهاز الترحيل والذي يجهز بقدره 100 فولت ولمدة 90 دقيقة .

8. وبعد الاكتمال من عملية الترحيل يتم رفع الهلام من جهاز الترحيل ووضعه على سطح جهاز التصوير الخاص بتصوير الهلام للتأكد من وجود حزم الطفرات في كافة العينات المرحلة.

3-2-2-6 التسلسل التتابعي للـ DNA Sequencing :

بعد الانتهاء من عملية التضخيم في جهاز PCR وتحليل ناتج التضخيم من خلال اجراء عملية الترحيل للـ PCR Product والتأكد من وجود حزم الاكسونات لكل من الجينين BRCA1 و BRCA2 تم عمل الخليط اللازم للفحص بواسطة جهاز Sequencer Genetic Analyzer و ارسال العينات الى شركة PCR الى شركة Bioner- koria لغرض عمل التسلسل التتابعي للجينات.

3-2-3 الفحوصات الكيميائية الحيوية Biochemical Tests

اجريت الفحوصات الكيموحيوية باستخدام جهاز التحليل الذاتي الكهربائي Cobas interga 400plus system.

يمتاز هذا الجهاز بالسرعة، والدقة، في استخراج النتائج إذ يتم استخراج 400 نتيجة خلال ساعة واحدة وصورة الجهاز المبينة (1-3)

مبدأ العمل:

تم تحضير هذه الفحوصات من خلال سحب الدم من المرضى بحدود 3 مليلتر وتوضع في انابيب وتوضع هذه الانابيب في جهاز الطرد المركزي بسرعة 14000 دورة في الدقيقة حتى ينفصل السيرم، بعدها تؤخذ هذه الانابيب وتوضع في جهاز Cobas interga 400plus system ويوجد كمبيوتر خاص مربوط مع هذا الجهاز ويوجد ايضا باركود خاص لكل عينة دم خاصة بكل شخص، يكتب هذا الباركود في الحاسبة اثناء عملية وضع العينات في الجهاز حيث

يكتب رقم الباركود في الكمبيوتر اذ يوجد المعدل الطبيعي لكل مؤشر وهكذا يتم الحصول على النتائج لكل مريض على شاشة الكمبيوتر

طريقة تشغيل الجهاز:

1. يتم فتح جهاز الكمبيوتر ويتم ادخال اسم المستخدم والباركود الخاص به.
2. يفتح زر الجهاز من الكمبيوتر ويتم الانتظار حتى تصبح جميع اللمبات خضراء اللون وهذا يشير الى ان الجهاز على اتم استعداد للعمل.
3. بعد ذلك تخرج العينات من الفريز وتترك في درجة حرارة الغرفة قبل العمل بنصف ساعة حتى يتم تحويلها الى سائل.
4. تخرج الكواشف من الثلاجة قبل العمل ايضا بنصف ساعة وتوضع على الحوامل الخاصة لحمل الكواشف وتدخل بالممرات المخصصة لها في الجهاز حتى لا تتأثر بالرطوبة فور خروجها من الثلاجة.
5. ميلان الحوامل التي تخص الكليسات والانابيب الخاصة بالعينة وايضا الكليسات الخاصة بالكونترول مع المراعاة الدقيقة لوضع الانابيب باتجاه السهم في اقصى اليمين ويتم نزع الشريط الازرق من كل من الجانبين مع مراعاة عدم الضغط على اي من الانابيب من جهة واحدة بل يتم الضغط بصورة خفيفة ومتوازنة على جوانب الجهاز.
6. مراعاة التأكد من ان الجهاز باستعداد للعمل باختيار System من رأس الشاشة ثم ok.
7. تتم برمجة الجهاز باختيار Sample rack وبالضغط على طلب order ومن ثم الضغط على New ويدخل بعد ذلك رقم الحامل ويتم تحديد الاماكن الخاصة بالعينات والكونترول.
8. الانتباه الى ضرورة استخدام الكونترول الخاص بنفس الكاشف او الذي يحمل نفس رمز الكاشف Lot number .

9. برمجة العينات حسب ما هو مكتوب في ورقة العمل وبعد ما يتم ادخال جميع العينات والكونترول يتم الضغط على ايعاز الحفظ الذي يكون موجود عادة اسفل الشاشة.
10. ايضا يمكن ان تتم اضافة عينات جديدة وكونترول جديد معها لنفس الاختبار على حامل العينات.
11. بعد ذلك تخرج العينات جيدا في Vortex واحدة تلو الاخرى وتوضع في Centrifuge لأقل وقت من اجل ازالة اي قطرات من الغطاء منعا للتلوث الذي ممكن ان يحصل قبل بدء وضع العينات في الجهاز في الانابيب المخصصة لها مع التأكد من ان جميع العينات بصورة جيدة.
12. توضع العينات داخل الكبينة الخاصة بالجهاز حيث يتم وضع 1050 ميكرون من العينة بعناية شديدة مع الانتظار ثواني بعد الشفط داخل البلازما من اجل منع شفط الهواء لان في حالة حصول اي نقص في العينة سوف يرفضها جهاز التحليل.
13. بعد انتهاء عملية التحليل يجب مراعاة اخراج العينات بحذر بدون اي فقاعات حتى لا يتوقف الجهاز ويتم اغلاق الانبوبة .
14. الانتباه الى ضرورة عدم وجود اي رسالة تحذيرية على الصفحة الرئيسية لجهاز التحليل بعد وضع العينات.
15. يتم الضغط بعدها على ايعاز Start من الكمبيوتر حتى يبدأ جهاز التحليل بالعمل.



صورة (1-3) جهاز التحليل الذاتي الكهربائي للفحوصات الكيميائية الحيوية Cobas integra 400 plus system

1-3-2-3 الفحوصات الدموية Complete Blood Count

يتم باستخدام جهاز العد الكامل للدم (C.B.C) Complete blood coun المبين في الصورة (2-3). اذ يتم اعطاء صورة كاملة لمكونات الدم ويتم استخدام انابيب الدم الحاوية على مادة EDTA المانعة للتخثر. اي تمنع تجلط الدم بمعنى منع كرات الدم والمكونات الاخرى من التراص مع بعضها مما يساعد على اعطاء نتيجة صحيحة وضمان سلامة الجهاز من الانسداد في حالة مرور كتل متجلطة من مكونات الدم.

مبدأ العمل:

احتواء الجهاز على حجرتين:

الاولى يقاس فيها خلايا الدم البيضاء ويتم قياس الهيموكلوبين بوساطة تحليل كريات الدم الحمراء بوساطة مادة تؤدي الى تكسير كريات الدم الحمراء وخروج الهيموكلوبين الذي يتم قياسه بوساطة جهاز القياس الضوئي Spectrophotometers .

اما الحجرة الثانية تقاس فيها كريات الدم الحمراء والصفائح الدموية وتعتمد طريقة القياس على وجود حقل كهربائي مشع بمحلول الايزيتون لمعادلة الشحنات ووجود عامود يمر به تيار كهربائي ذا جهد ثابت، عند مرور احد مكونات الدم فأنها تولد مقاومة جزئية للتيار الكهربائي المار في القضيب الكهربائي ويتم قياس شدة المقاومة المتولدة من مرور هذه المكونات. وبحسب حجم مكونات الدم المارة وشدة المقاومة الكهربائية يتم التفريق بين هذه المكونات كالآتي:

الصفائح الدموية من 20-40 ميكرون

كريات الدم الحمراء من 40-60 ميكرون

كريات الدم البيضاء من 60 ميكرون

اما الاختبارات التالية فيتم قياسها وحساب نسبها رياضيا بواسطة معادلات مخزنة بالجهاز.

قياس الهيماتوكريت Hematocrit (تكس الكريات الحمراء) (HCT) .

قياس متوسط حجم الكرية الوسطي Mean Cellular Volume (MCV) .

قياس متوسط الهيموكلوبين في كريات الدم الحمراء Mean Cellular Hemoglobin

(MCH).



شكل (2-3) جهاز التحليل الذاتي الكهربائي للفحوصات الدموية (Blood Count)
Horiba diagnostics ABx (Complete)

2-3-2-3 فحص الهرمونات Hormone Tests

جهاز Cobas لتحليل الهرمونات المبين في الصورة (3-3)

1. نفتح جهاز الكمبيوتر ويتم ادخال اسم المستخدم والباركود الخاص به.
2. بعدها يتم فتح زر الجهاز من الكمبيوتر وننتظر الى ان يستعد الجهاز للعمل.
3. تخرج العينات من الفريزر وتوضع بدرجة حرارة الغرفة الى ان تصبح سائلة .
4. تخرج الكواشف ايضا من الثلاجة وتوضع الكواشف بالأنابيب المخصصة لها بالجهاز.
5. يتم التأكد من ان الجهاز مستعد للعمل بأخيار System من راس الشاشة ثم ok .
6. ييرمج الجهاز بأخيار Sample rack ومن ثم الضغط على ايعاز طلب order ومن ثم الضغط على New بعد ذلك يتم تحديد اماكن العينات والكونترول.
7. يجب مراعاة استخدام الكونترول الذي يحمل نفس الكاشف او نفس رمز الكاشف.

8. يتم بعدها وضع العينات داخل كبينة الجهاز مع التأكد من عدم وجود اي رسالة تحذيرية على شاشة الجهاز الرئيسية .

9. وبعد الضغط على ايعاز Start من الكمبيوتر المتصل بالجهاز يبدأ الجهاز بالعمل وتستخرج النتيجة بصورة تلقائية من على شاشة الكمبيوتر المتصلة بالجهاز.



شكل (3-3) جهاز التحليل الذاتي الكهربائي للهرمونات Cobas integra E 411

التحليل الاحصائي Statiastical Analysis

تم اجراء التحليل الاحصائي وذلك باستخدام البرنامج الاتي :

Statistical package for social sciences والمقصود به برنامج الحزمة الاحصائية للعلوم الاجتماعية ذي الاصدار 22 والخاص بالمتغيرات ذات الصيغة الوصفية والتي يتم وصفها بصيغة العدد والنسبة المئوية وبالنسبة للمتغيرات ذات الصيغة العددية تم وصفها باستخدام المعدل والانحراف المعياري للمعدل حيث تمت المقارنة ما بين المجاميع وذلك باستخدام اختبار t-test بين مجموعتين (Levesque،2007).

الفصل الرابع

النتائج والمناقشة

**Results and
Discussion**

4 -النتائج والمناقشة Results and Discussion

4-1-1 توزيع مجموعتي الدراسة بالنسبة للعمر

اظهرت نتائج هذه الدراسة ان متوسط عمر النساء المصابات بمرض سرطان الثدي (53.68 $\pm$ 8.30) للمدى من (40.00-77.00) في حين ان متوسط عمر مجموعة السيطرة (52.12 $\pm$ 8.13) للمدى من (40.00-68.00) اذ بلغت قيمة t test الكلية 0.21 وكما موضح في الجدول (4-1) اذ بينت النتائج عدم وجود اي فرق معنوي ذي دلالة احصائية عند $p>0.05$.

سرطان الثدي هو مرض وراثي غير متجانس ظاهريا حيث ان و من خلال النتائج المستحصلة للمريض والضمانات المهمة هو كيفية فهم وتحديد العمليات الخلوية والجزيئية من وراء هذه الاجراءات. اذ ان سرطان الثدي هو المرض الخبيث الاكثر شيوعا ما بين النساء في جميع انحاء العالم اذ تتواجد القليل من المعرفة حول الاليات الخلوية الوراثية من اجل التقدم في المجموعة الغير متجانسة من الورم (Rohen وآخرون، 1995)

سرطان الثدي هو الاكثر شيوعا في جميع انحاء العالم وسوف يزداد العبء العالمي لسرطان الثدي الى اكثر من مليون حالة جديدة بحلول عام 2030 (J Ferlay وآخرون ، 2008)

جدول (4-1) توزيع مجموعتي الدراسة حسب النسب المئوية للعمر

Age	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
Patients	50	40.00	77.00	53.6800	8.30893
Controls	50	40.00	68.00	52.1200	8.13318
Total	50				
T	0.21				
Sig.	0.34 ^{NS}				

4-1-2 الفئات العمرية والنسب المئوية لمجموعتي الدراسة

تراوحت اعمار النساء المصابات بمرض سرطان الثدي (40-70) سنة وكانت موزعة حسب الفئات العمرية الموضحة في الجدول (2-4) اذ اظهرت النتائج ان الفئة العمرية (40-49) سنة بلغت نسبتها 30.0% اما الفئة العمرية (50-59) سنة بلغت نسبتها 48.0% والفئة العمرية (60-69) سنة بلغت نسبتها 18.0% اما الفئة الاخيرة (70-79) سنة بلغت 4.0% والتي تعتبر اوطأ نسبة من بين مجموعة النساء المصابات بمرض سرطان الثدي في حين ان الفئة العمرية (50-59) سنة هي الفئة الاعلى بين الفئات بنسبة الاصابة. اما بالنسبة لمجموعة السيطرة فقد تراوحت اعمارهن (40-70) سنة و كانت موزعة حسب الفئات العمرية الموضحة في الجدول (2-4) اذ بينت النتائج عدم وجود فرق معنوي ذي دلالة احصائية لتلك المجموعتين عند $p > 0.05$ وهذه النتائج تتوافق مع نتائج الدراسة التي جاء بها (Elzaemy وآخرون، 2012) (اذ بينت نتائج ونتائجنا ان اعلى قيمة للفئة العمرية للإصابة بسرطان الثدي تسجل عند سن الخمسين سنة.

جدول (2-4) توزيع مجموعتي الدراسة حسب النسب المئوية للعمر

			Groups		Total
			Patients	Control	
Age	40-49	Count	15	20	35
		%	30.0%	40.0%	35.0%
	50-59	Count	24	21	45
		%	48.0%	42.0%	45.0%
	60-69	Count	9	9	18
		%	18.0%	18.0%	18.0%
	70-79	Count	2	0	2
		%	4.0%	0.0%	2.0%
Total		Count	50	50	100
		%	100.0%	100.0%	100.0%
Chi-square		2.91			
Sig.		0.41 ^{NS}			

N.S عدم وجود فرق معنوي عند مستوى احتمالية $P > 0.05$

4-1-3 توزيع مجموعة النساء المصابات بمرض سرطان الثدي بالنسبة للعمر

تراوحت اعمار النساء المصابات بالمرض (40-70) سنة وكانت موزعة حسب الفئات الموضحة في الجدول (3-4) وقد اظهرت النتائج ان نسبة الفئة العمرية (40-49) سنة كانت 35.0% والفئة العمرية (50-59) سنة كانت نسبتها 45.0% اما الفئة العمرية (60-69) سنة فبلغت 18.0% اما الفئة العمرية (70-79) سنة كانت نسبتها 2.0% حيث اعتبرت النسبة الاوطأ ما بين الفئات العمرية .

اما الفئة العمرية الاعلى بنسبة الاصابة كانت الفئة (50-59) سنة حيث بينت النتائج وجود فرق معنوي عالي جدا ما بين مجموعة النساء المصابات بمرض سرطان الثدي من حيث العمر عند $p \leq 0.001$ وكما موضحة في الجدول (3-4)

جاءت نتائج هذه الدراسة متوافقة مع نتائج الدراسة التي افادت ان 70.0 من حالات الاصابة بمرض سرطان الثدي كانت عند سن 50 سنة حيث وجد العديد من الابحاث التقريبية في بعض البلدان مثل السودان (74%) وليبيا (71%) وايران (60%) اما في بعض الدول الغربية كانت النسب بحدود 19% في انجلترا و 24% في استراليا (Jemal وآخرون، 2011). (Agrawad و Ragderkar، 2012)

جدول (3-4) توزيع مجموعة النساء المصابات بمرض سرطان الثدي حسب العمر

age period (PATIENTS)	N	%
40-49	35	35.0%
50-59	45	45.0%
60-69	18	18.0%
70-79	2	2.0%
Chi-square	43.3	
Sig.	<0.001***	

*** فرق معنوي عالي جدا عند $p \leq 0.001$ ، عدد المرضى N=

4-1-4 توزيع مجموعة النساء المصابات بمرض سرطان الثدي حسب النسب المئوية للعمر والحالة الوراثية

بينت هذه الدراسة العلاقة ما بين العمر والحالة الوراثية للنساء المصابات بمرض سرطان الثدي و كما هو موضح في الجدول (4-4) ان الفئة العمرية (40-49) سنة تمثلت في الجدول بنسبة 28.2% بسرطان الثدي الغير وراثي و نسبة 36.4% سرطان الثدي الوراثي اما الفئة العمرية (50-59) سنة وهي الفئة العمرية الاعلى ما بين الفئات بنسبة الاصابة بسرطان الثدي كما وضح في الجدول السابق (4-3) تمثلت بنسبة 46.2% سرطان الثدي الغير وراثي و نسبة 54.5% سرطان الثدي الوراثي بينت النتائج لهذه الدراسة ان الفئة العمرية (50-59) هي الفئة الاعلى ما بين الفئات من الناحية العمرية للاصابة والناحية الوراثية للاصابة بسرطان الثدي اما الفئة (60-69) سنة جاءت في الجدول بنسبة 20.5% سرطان الثدي الغير وراثي و 9.1% سرطان الثدي وراثي اما الفئة العمرية (70-79) سنة جاءت بنسبة 5.1% سرطان الثدي الغير وراثي ونسبة 0.0% سرطان الثدي وراثي وهي الفئة العمرية الاوطأ من الناحية العمرية والوراثية للاصابة بسرطان الثدي وكما جاءت في الجدول (4-4)

يتبين من ذلك ان الفئة العمرية (50-59) سنة تأتي بعدها الفئة (40-49) سنة ومن ثم الفئة (60-69) سنة واخيرا الفئة (70-79) سنة التي اعتبرت الفئة الاوطأ.

بينت نتائج هذه الدراسة عدم وجود فرق معنوي ذي دلالة احصائية ما بين مجموعتي الدراسة عند مستوى احتمالية $p > 0.05$. ويبين الشكل (3) الوصف العام للعينات المدروسة حسب الحالة الوراثية مع العمر.

هذه النتائج لا تتفق مع نتائج الدراسة التي جاء بها (Siegel وآخرون، 2014) اذ بينت نتائج ان سرطان الثدي قبل عمر 49 سنة بلغ خطر الاصابة بهذا العمر 1/53 في حين يرتفع الى 1/43 لعمر 50-59 سنة ويرتفع الى 1/23 للعمر 60-69 سنة وعمر 70 سنة هو الفئة العمرية التي تزيد من مخاطر الاصابة .

بينت نتائج (Toi وآخرون، 2010) ان معدلات الاصابة بمرض سرطان الثدي حسب العمر يختلف ما بين المناطق حيث بلغ الحد الاقصى للاصابة في اسيا ما بين (40-50) فئة

عمرية على خلاف ذلك في البلدان الغربية اذ ان معدل الاصابة بسرطان الثدي يزداد مع التقدم بالعمر.

اما بالنسبة للحالة الوراثية فأن 80-90% من الحالات الوراثية لسرطان الثدي هو نتيجة حدوث الطفرات في جينات BRCA1 و BRCA2 (Victor و Vogel، 2003) وذكر (Ford وآخرون، 1998) ان حالات سرطان الثدي التي تشخص قبل سن 60 سنة هو نتيجة حدوث الخلل في جين BRCA1.

جدول (4-4) توزيع مجموعتي الدراسة حسب النسب المئوية للعمر والحالة الوراثية

(PATIENTS)			Genetics		Total
			No	Yes	
Age	40-49	Count	11	4	15
		%	28.2%	36.4%	30.0%
	50-59	Count	18	6	24
		%	46.2%	54.5%	48.0%
	60-69	Count	8	1	9
		%	20.5%	9.1%	18.0%
	70-79	Count	2	0	2
		%	5.1%	0.0%	4.0%
Total		Count	39	11	50
		%	100.0%	100.0%	100.0%
Chi-square		1.51			
Sig.		0.68 ^{NS}			

لا يوجد فرق معنوي N.S= عند $P>0.05$

4-1-5 توزيع مجموعتي الدراسة حسب النسب المئوية لأقضية محافظة ديالى

شملت هذه الدراسة (100) عينة تم تقسيمها الى مجموعتين، مجموعة النساء المصابات بمرض سرطان الثدي والتي تضم (50) عينة، ومجموعة النساء الغير مصابة بالمرض والتي

اعتبرت مجموعة سيطرة والتي تضم ايضا (50) عينة ، تم توزيع هذه العينات بحسب الاقضية لمحافظة ديالى كما هو مبين في الجدول (4-5) ابتداء من قضاء بعقوبة وصولا الى قضاء خانقين وظهرت النتائج ان نسبة النساء المصابات بمرض سرطان الثدي في قضاء بعقوبة هي 64.0% اما في قضاء الخالص فبلغت النسبة 10.0% وقضاء بلدروز 10.0% وقضاء المقدادية 14.0% اما قضاء خانقين فبلغت النسبة 2.0% اما بالنسبة لمجموعة السيطرة بلغت النسبة لاعلى قيمة في قضاء بعقوبة 82.0% واطأ قيمة في قضاء خانقين 2.0% .

وبينت نتائج هذه الدراسة ان النسبة الاعلى والاكثر اصابة كانت في قضاء بعقوبة ومن ثم قضاء المقدادية وبعدها قضاء الخالص ومن ثم بلدروز واخيرا قضاء خانقين الذي يعتبر القضاء الاقل نسبة اصابة و تبين انه لا وجود لاي فرق معنوي ذي دلالة احصائية عند مستوى احتمالية $P>0.05$ ما بين مجموعتي الدراسة .

في صدد هذه الدراسة التي تقدمنا بها، جاءت دراسة من قبل (Ayoubه) وآخرون، 2014) تبين ان الاختلافات في المواقع الجغرافية للإصابة بسرطان الثدي تدل على مدى تأثير الظروف البيئية ونمط الحياة اي العوامل الغير وراثية ومنها السمنة، سن اليأس، التعرض للإشعاع، التحضر، النشاط البدني، الموقع الجغرافي وغيرها من العوامل التي تؤثر على الاصابة بسرطان الثدي و تؤدي الى اختلافات في تمركز هذا المرض بالنسبة لتوزيع النساء المصابات بحسب المواقع الجغرافية .

جدول (4-5) توزيع مجموعتي الدراسة حسب النسب المئوية للأفضية في محافظة ديالى

			Groups		Total
			Patients	Control	
Residence	Baqubeh	Count	32	41	73
		%	64.0%	82.0%	73 73.0 %
	Alkhals	Count	5	5	10
		%	10.0%	10.0%	10.0%
	Baladrose	Count	5	1	6
		%	10.0%	2.0%	6.0%
	Almiqdaydiah	Count	7	2	9
		%	14.0%	4.0%	9.0%
	Khanaqin	Count	1	1	2
		%	2.0%	2.0%	2.0%
Total		Count	50	50	100
		%	100.0%	100.0%	100.0%
Chi-square		6.55			
Sig.		0.16 ^{NS}			

N.S لا يوجد فرق معنوي عند $P>0.05$

4-1-6 توزيع النساء المصابات بمرض سرطان الثدي حسب النسب المئوية لأفضية

محافظة ديالى

يبين الجدول (4-6) توزيع مجموعة النساء المصابات بمرض سرطان الثدي فقط حسب

الأفضية لمحافظة ديالى و كما مبين في الجدول السابق (4-5) ان قضاء بعقوبة هو القضاء

الاعلى لنسبة الاصابة بمرض سرطان الثدي بنسبة 32.0% بعدها يأتي قضاء المقدادية بنسبة

7.0% ومن ثم قضاء الخالص و بلدروز بنفس النسبة 5.0% واخيرا قضاء خانقين بنسبة 1.0% وهي النسبة الاوطأ للإصابة بمرض سرطان الثدي على مستوى الاقضية لمحافظة ديالى، حيث بينت النتائج وجود فرق معنوي ذي دلالة احصائية عالي جدا عند $p \leq 0.001$.

ان هذه الاختلافات في التوزيعات الجغرافية تعود الى عدة عوامل ومنها عوامل بيئية اي العوامل الغير وراثية مثل السمنة والتعرض للإشعاع ونمط الحياة الخارجية والنشاط البدني وغيرها من العوامل التي بينها (Ayoub وآخرون، 2014) في نتائجها وجميعها تؤثر على الاختلافات في توزيع النساء المصابة بالمرض بحسب المواقع الجغرافية.

ايضا من بين العوامل التي تؤدي الى اختلافات في التوزيعات الجغرافية لمرض سرطان الثدي هو ان هناك عوامل ترتبط مع انتشار السكان في منطقة معينة دون اخرى والتي تتأثر بالعوامل الهرمونية وعوامل التغذية وايضا العوامل الانجابية جميعها تؤثر على مدى انتشار المرض في منطقة دون اخرى (Parkin وآخرون، 1997).

جدول (4-6) توزيع مجموعة النساء المصابات بمرض سرطان الثدي حسب الاقضية لمحافظة ديالى

residence(PATIENTS)	N	%
Baqubeh	32	32.0%
Alkhals	5	5.0%
Baladrose	5	5.0%
Almiqdaydiah	7	7.0%
Khanaqin	1	1.0%
Chi-square	43.21	
Sig.	<0.001***	

*** فرق معنوي عالي جدا $P \leq 0.001$

4-1-7 توزيع مجموعتي الدراسة حسب النسب المئوية للعمر والاقضية لمحافظة ديالى

يبين الجدول (4-7) مقارنة ما بين مجموعتي الدراسة اي ما بين النساء المصابات بمرض سرطان الثدي مع مجموعة السيطرة حسب النسب المئوية للعمر والاقضية لمحافظة ديالى حيث بينت النتائج ان قيمة الفئة العمرية (40-49) قد بلغت الاعلى نسبة في قضاء بعقوبة بنسبة 38.4% يأتي بعد ذلك قضاء المقدادية بنسبة 33.3% ومن ثم قضاء الخالص بنسبة 20.0% وقضاء بلدروز بنسبة 16.7% ومن ثم قضاء خانقين بنسبة 50.0% وهي الفئة الاوطأ ما بين الفئات من ناحية نسبة الاصابة والتوزيع الجغرافي.

اما بالنسبة للفئة العمرية (50-59) سنة فبلغت النسبة لقضاء بعقوبة 41.1% وقضاء الخالص بنسبة 50.0% وقضاء بلدروز بنسبة 83.3% اما قضاء المقدادية فكانت النسبة 55.6% وقضاء خانقين بنسبة 0.0%.

اما الفئة العمرية (60-69) سنة فكانت النسبة لقضاء بعقوبة 17.8% اما قضاء الخالص فبلغت النسبة 30.0% وقضاء بلدروز 0.0% اما قضاء المقدادية فبلغت النسبة 11.1% وقضاء خانقين 50.0% اما بالنسبة للفئة الاخيرة وهي فئة عمر (70-79) سنة فقد بلغت لقضاء بعقوبة 2.7% اما قضاء بلدروز والخالص والمقدادية وخانقين بلغت النسبة 0.0%. ان هذه النسب تبين المقارنة ما بين النساء المصابات بمرض سرطان الثدي مع مجموعة السيطرة لكل قضاء من محافظة ديالى مع العمر اذ بينت النتائج الموضحة في الجدول (4-7) عدم وجود اي فرق معنوي ذي دلالة احصائية ما بين مجموعتي الدراسة عند $p > 0.05$.

جدول (4-6) توزيع مجموعة النساء المصابات بمرض سرطان الثدي حسب النسب المئوية للعمر والاقضية لمحافظة ديالى

(PATIENTS) and control			Residence					Total
			Baqubeh	Alkhals	Baladrose	Almiqdaydiah	Khanaqin	
age	40-	N	28	2	1	3	1	35
	49	%	38.4%	20.0%	16.7%	33.3%	50.0%	35.0%
	50-	N	30	5	5	5	0	45
	59	%	41.1%	50.0%	83.3%	55.6%	0.0%	45.0%
	60-	N	13	3	0	1	1	18
	69	%	17.8%	30.0%	0.0%	11.1%	50.0%	18.0%
	70-	N	2	0	0	0	0	2
	79	%	2.7%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	2.0%
Total		N	N	10	6	9	2	100
		%	%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
Chi-square			8.97					
Sig.			0.71 ^{NS}					

NS = عدم وجود فرق معنوي عند مستوى احتمالية $P > 0.005$

4-1-8 توزيع مجموعة النساء المصابات بمرض سرطان الثدي حسب النسب المئوية للعمر و الاقضية لمحافظة ديالى

يبين الجدول (4-8) توزيع النساء المصابات بمرض سرطان الثدي حسب النسب المئوية للعمر والاقضية لمحافظة ديالى ابتداء من قضاء بعقوبة وصولاً الى قضاء خانقين اذ بلغت النسبة الكلية للفئة العمرية (40-49) سنة لجميع اقضية محافظة ديالى 30.0% اما الفئة العمرية (50-59) سنة فبلغت 48.0% اما الفئة (60-69) سنة فبلغت النسبة الكلية 18.0% اما الفئة الاخيرة (70-79) سنة بلغت 4.0% بينت النتائج الموضحة في الجدول (4-8) وجود فرق معنوي ذي دلالة احصائية عند $p = 0.41$ تبين هذه النتائج ان الفئة العمرية (50-59) سنة هي الفئة العمرية الاعلى بنسبة الاصابة بمرض سرطان الثدي ما بين الفئات وان قضاء بعقوبة هو اكثر الاقضية تواجدا للنساء المصابات بمرض سرطان الثدي من بين جميع الاقضية

لمحافظة ديالى وكما تم التوضيح في الجداول السابقة (4-5) (4-6) من ناحية الفئات العمرية والاقضية لمحافظة ديالى.

جدول (4-8) توزيع مجموعة النساء المصابات بمرض سرطان الثدي حسب النسب المئوية للعمر مع الاقضية لمحافظة ديالى

Patients			Residence					Total
			Baqubeh	Alkhals	Baladrose	Almiqdaydia h	Khanaqin	
Age	40-	N	10	2	0	3	0	15
	49	%	31.3%	40.0%	0.0%	42.9%	0.0%	30.0%
	50-	N	14	2	5	3	0	24
	59	%	43.8%	40.0%	100.0%	42.9%	0.0%	48.0%
	60-	N	6	1	0	1	1	9
	69	%	18.8%	20.0%	0.0%	14.3%	100.0%	18.0%
	70-	N	2	0	0	0	0	2
	79	%	6.3%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	4.0%
Total		N	32	5	5	7	1	50
		%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
Chi-square		11.72						
Sig.		0.41						

فرق معنوي عند $p=0.41$

4-1-9 توزيع مجموعة النساء المصابات بمرض سرطان الثدي حسب الحالة الوراثية

يبين الجدول (4-9) توزيع مجموعة النساء المصابات بمرض سرطان الثدي حسب النسب المئوية للحالة الوراثية ويقصد بالحالة الوراثية اي هل هناك تاريخ وراثي وعائلي للمرأة المصابة بالمرض ام لا يوجد. اذ بينت النتائج لهذه الدراسة ان النساء اللاتي لديهن تاريخ وراثي وعائلي لمرض سرطان الثدي قد بلغت النسبة 11.0% اما النساء التي اكتسبت مرض سرطان الثدي بدون تاريخ وراثي ولا عائلي بلغت نسبتها 39.0%. حيث كان هناك فرق معنوي ذي دلالة احصائية عالي جدا عند $p \leq 0.001$. ان الدراسات المتعلقة بالتاريخ العائلي لمرض السرطان تعطي اهمية للاستعداد الوراثي لتقدم المرض اذ ان حالات سرطان الثدي الوراثي ترجع الى عدة

عوامل منها الجينات المشاركة بالمرض وايضا اختلاف البيئات وانماط الحياة، لكن يزداد خطر الإصابة بسرطان الثدي الى اضعاف مضاعفة عندما تكون النساء متأثرة بالتاريخ العائلي من الدرجة الاولى عن النساء التي لا تمتلك تاريخ وراثي للمرض لعامة السكان (Shwartz واخرون، 2008) وبينت نتائج دراستنا ان النساء اللاتي لديهن تاريخ عائلي للمرض جاءت بنسبة 11.0% اما النساء المصابات بمرض سرطان الثدي الغير وراثي اي النساء اللاتي لا يمتلكن تاريخ عائلي للمرض جاءت النسبة 39.0% اي ليس كل سرطان ثدي هو وراثي حيث بينت نتائج (Reis-Fitho و Lakhani، 2008) ان نسبة 10-30% من حالات الإصابة بسرطان الثدي تكون وراثية اي عندما يكون للمرأة اقرباء من نفس المرض. وأيضاً في نتائج دراسة كل من (Scheuner واخرون 1997) و نتائج (Colditz واخرون، 1993) ان نسبة النساء المصابات بمرض سرطان الثدي الناتج عن اثر عائلي وتاريخ وراثي للمرض بلغت 5-19% في حين تبين نتائج دراسة (Tereschenko واخرون، 2002) ان نسبة حالات سرطان الثدي الوراثي قد بلغت 3-10% ونلاحظ ان هذه النسبة قريبة من نسبة دراستنا التي بلغت 11.0%.

جدول (4-9) توزيع مجموعة النساء المصابات بمرض سرطان الثدي حسب الحالة الوراثية

Genetics(PATIENTS)	N	%
No	39	39.0%
Yes	11	11.0%
Chi-square	15.23	
Sig.	<0.001***	

فرق معنوي عالي جدا عند $p \leq 0.001$

10-1-4 قياس هرمونات الغدة الدرقية T3, T4, TSH لمجموعتي الدراسة

يبين الجدول (4-10) توزيع مجموعة النساء المصابات بمرض سرطان الثدي مقارنة مع مجموعة السيطرة حسب هرمونات الغدة الدرقية بدأ بهرمون T3 للغدة الدرقية كانت نسبة هذا الهرمون للنساء المصابات بمرض سرطان الثدي (2.57 ± 0.75) . اما بالنسبة لمجموعة

السيطرة فبلغت النسبة (1.79 ± 0.70) اذ بينت النتائج وجود فرق معنوي ذي دلالة احصائية عالي جدا عند $P \leq 0.001$. اما بالنسبة لهرمون T4 فكانت النسبة لمجموعة النساء المصابات بمرض سرطان الثدي (111.59 ± 31.90) اما مجموعة السيطرة فبلغت النسبة (78.19 ± 11.29) اذ كان هناك فرقاً معنوياً ذي دلالة احصائية عالية جدا عند $P \leq 0.001$ اما بالنسبة لهرمون TSH فبلغت النسبة لمجموعة النساء المصابات بمرض سرطان الثدي (1.47 ± 1.17) اما بالنسبة لمجموعة السيطرة فبلغت النسبة (3.40 ± 1.38) وظهرت النتائج وجود فرق معنوي عالي ذي دلالة احصائية عند مستوى احتمالية $p \leq 0.001$. تبين النتائج عندما تمت مقارنة هرمونات الغدة الدرقية للنساء المصابات بمرض سرطان الثدي مع مجموعة السيطرة وجود ارتفاع لكل من هرموني T3 و T4 وانخفاض في هرمون TSH هذه النتائج جاءت متطابقة مع نتائج دراسة (Saraiva وآخرون، 2005) حيث بينت نتائج دراسته وجود ارتفاع لكل من هرموني T3 و T4 للنساء المصابات بمرض سرطان الثدي وانخفاض في مستوى هرمون TSH عندما تمت المقارنة مع مجموعة السيطرة حيث بين ان انخفاض هرمون TSH يعزز نمو الورم السرطاني. ان الاختلافات في هذه النسب تعود الى الاختلافات الجغرافية لمعدلات سرطان الثدي وايضا سرطان بطانة الرحم وسرطان المبيض والتي تتناسب عكسيا مع تناول اليود في النظام الغذائي (Burns وآخرون، 2005) (Gulaboglum وآخرون، 2007)

وبين (Stade وآخرون، 1976) ان نقص اليود في النظام الغذائي يؤدي الى زيادة فرص الاصابة بسرطان الثدي وسرطان الرحم وسرطان المبيض في حين الزيادة في اليود المستخدم في النظام الغذائي تقلل من فرص الاصابة. تأتي الان الى العلاقة ما بين هرمونات الغدة الدرقية وسرطان الثدي حيث بين (Giani وآخرون، 1986) ان العلاقة المشتركة ما بين الغدة الدرقية وانسجة الثدي تعود الى الخاصية المشتركة للخلايا الظهارية للغدة الدرقية مع الخلايا الظهارية الثديية عن طريق تركيز اليود لخاصية غشاء النقل الفعال وان الانسجة الدهنية التي تحتوي على مستقبلات هرمون TSH والتي تكون موجودة بكثرة عادة في الغدد الثديية. (Davies وآخرون، 1994). ايضا تم افتراض ان منتجات الغدة الدرقية وجد بها بعض المحفزات للغدد الصماء والتي تمارس نشاطاتها عادة في اوقات معينة على الثدي مع مختلف الاجسام المضادة للغدة الدرقية وايضا من الممكن ان يتم التفاعل مع بعض المستقبلات الموجودة

على اورام الثدي لكي تكون هي المسؤولة عن اية اضطرابات للغدة الدرقية والغدة الثديية (Dumont و Maen haute، 1991).

جدول (4-10) توزيع مجموعتي الدراسة حسب هرمونات الغدة الدرقية

hormones	Groups	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	T	Sig.
T3	Patients	50.00	2.57	0.75	0.11	4.14	<0.001***
	Control	50.00	1.97	0.70	0.10		
T4	Patients	50.00	111.59	31.90	4.51	-6.97	<0.001***
	Control	50.00	78.19	11.29	1.60		
TSH	Patients	50.00	1.47	1.17	0.17	7.52	<0.001***
	Control	50.00	3.40	1.38	0.20		

فرق معنوي عالي جدا عند $p \leq 0.001$

11-1-4 قياس نسبة الجلوكوز Glucose واليوريا، Urea والكرياتين Creatnine لمجموعتي الدراسة

يبين الجدول (4-11) مقارنة ما بين مجموعة النساء المصابات بمرض سرطان الثدي و مجموعة السيطرة اذ بلغت نسبة الجلوكوز لمجموعة النساء المصابات بمرض سرطان الثدي (11.66 ± 4.63) ما بالنسبة لمجموعة السيطرة، فبلغت النسبة (6.16 ± 1.93) اذ بينت النتائج وجود ارتفاع في مستوى الجلوكوز لمجموعة النساء المصابات بمرض سرطان الثدي ووجود فرق معنوي ذي دلالة احصائية عالية جدا عند $p \leq 0.001$ ما بين النساء المصابات بمرض سرطان الثدي ومجموعة السيطرة. اما بالنسبة لليوريا فبلغت النسبة لمجموعة النساء المصابات بمرض سرطان الثدي (9.40 ± 10.91) اما مجموعة السيطرة فقد بلغت (3.91 ± 0.60) حيث كان هناك فرق معنوي ذو دلالة احصائية عالية عند $p \leq 0.01$. اما بالنسبة للكرياتين فقد بلغت نسبته لمجموعة النساء المصابات بمرض سرطان الثدي (55.13 ± 28.57) ومجموعة السيطرة بلغت نسبته (44.91 ± 15.57) حيث وجد هناك فرق معنوي ذي دلالة احصائية عند

$p=0.02$. ان الزيادة في نسبة الجلوكوز لمجموعة النساء المصابات بمرض سرطان الثدي لهذه الدراسة تتوافق مع نتائج الدراسة التي اجريت من قبل (Goodwin وآخرون ، 2008) وايضا نتائج دراسة (Law وآخرون، 2008) اذ بينت نتائج الدراسات وجود ارتباطات قوية مع الزيادة في الانسولين و عوامل نمو اورام الثدي. هذه النتائج تؤدي الى التوصية بأنه يجب فحص النساء المصابات بمرض سرطان الثدي من اجل اجراء التعديلات لعملية التمثيل الغذائي للكاربوهيدرات مستوى الانسولين العالي.(Josefson، 2000). بينت نتائج كل من (Anisimov وآخرون، 2010) و (Zakihani وآخرون، 2006) و (Jiralerspong وآخرون ، 2009) ان عقار الميتورفين المضاد للسكري هو علاج اضافي وله نشاط قوي مضاد للسرطان وايضا يقلل من الخطر ويحسن فرص البقاء على قيد الحياة والميتومورفين يحسن من استجابة النساء المصابات بمرض سرطان الثدي للعلاج الكيميائي. ان نسب الكلوكوز المرتفعة تؤدي الى اختيار استئصال الخلايا السرطانية المقاومة لنقص الاكسجة والتي تنتج الطاقة من التحلل، وهذه الحالة تمثل احد الانظمة البايولوجية التي تبين لنا العلاقة ما بين ارتفاع الجلوكوز وتطور السرطان (Garber، 2004).

وايضا بين (Dandona وآخرون، 1996) ان استقلاب الجلوكوز يؤدي الى التحفيز على التغير السرطاني من خلال انتاج الجذور الحرة والتي تسبب التلف الذي يحصل للحمض النووي وايضا تلف الانزيمات التي تكون مشاركة في عملية اصلاح الحمض النووي .ان قياس المؤشرات الكيميائية الحيوية للدم تشير الى مدى انطلاق المواد الكيميائية من انسجة الجسم والتي تزداد اثناء عملية ايض بعض المواد، اي ان اجراء فحوصات كيمياء الدم يعطينا معلومات مهمة عن وظائف الكلى والكبد اذا ان دراستنا اشتملت على تقييم وظائف الكلى ووجد ارتفاع في مستوى اليوريا ولكن ضمن المعدل الطبيعي للجسم وهذه النتيجة جاءت متوافقة مع نتائج دراسة (Devi وآخرون، 2015). اما بالنسبة لمعدل الكرياتنين حيث يعتبر اكثر حساسية في اختبار وظائف الكلى من اليوريا، بينت النتائج ارتفاع هذا المؤشر في دراستنا اي ارتفع عن المعدل الطبيعي ويعود السبب الى الاختلافات في العلاج الكيميائي التي تسبب اختلافات في نسب الكرياتنين كما بينها (Devi وآخرون، 2015) في نتائجه .

جدول (4-11) توزيع مجموعتي الدراسة حسب مؤشرات وضائف الكلى

parameters	Groups	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	t	Sig.
GLUCOSE	Patients	50.00	11.66	4.63	0.66	7.73	<0.001***
	Control	50.00	6.16	1.93	0.27		
UREA	Patients	50.00	9.40	10.91	1.54	3.51	0.01**
	Control	50.00	3.91	0.60	0.09		
CREATNINE	Patients	50.00	55.13	28.57	4.04	2.22	0.02*
	Control	50.00	44.91	15.57	2.20		

*** فرق معنوي عالي جدا عند $p \leq 0.001$ ** فرق معنوي عالي عند $p \leq 0.01$ ، * فرق معنوي عند $p \leq 0.05$

12-1-4 قياس نسبة الكوليسترول Cholestrol ،الدهون عالية الكثافة HighDensityLipo protein ،الدهون واطئة الكثافة LowDensityLipo protein ،الدهون الثلاثيةTriglyceride لمجموعتي الدراسة

يبين الجدول (4-12) ان نسبة الكوليسترول لمجموعة النساء المصابات بمرض سرطان الثدي بلغت (4.29 ± 1.11) اما بالنسبة لمجموعة السيطرة فقد بلغت (5.35 ± 1.82) بينت النتائج وجود فرق معنوي ذي دلالة احصائية عند $p \leq 0.01$ اما بالنسبة للدهون عالية الكثافة (HDL) فقد بلغت النسبة لمجموعة النساء المصابات بمرض سرطان الثدي (1.36 ± 0.51) اما مجموعة السيطرة فبلغت (1.36 ± 0.84) بينت النتائج وجود فرق معنوي ذي دلالة احصائية عند $p=0.95$ اما بالنسبة للدهون واطئة الكثافة (LDL) فبلغت النسبة لمجموعة النساء المصابات بمرض سرطان الثدي (2.63 ± 0.95) اما بالنسبة لمجموعة السيطرة فقد بلغت نسبة هذا المؤشر (3.1 ± 1.025) اي وجود فرق معنوي ذي دلالة احصائية عند $p=0.009$ اما

بالنسبة للدهون الثلاثية (TRI) فبلغت نسبتها في مجموعة النساء المصابات بمرض سرطان الثدي (1.50 ± 0.75) اما بالنسبة لمجموعة السيطرة فقد بلغت (1.83 ± 1.01) وبينت النتائج لا وجود لاي فرق ذي دلالة احصائية للدهون الثلاثية ما بين مجموعة النساء المصابات بمرض سرطان الثدي و مجموعة السيطرة عند $p > 0.05$. إن أنسجة الثدي تستقلب الدهون من البلازما حيث تعاني البلازما من تأثيرات وتغيرات تابعة لهرمونات الغدد التناسلية الانثوية اذ ان هناك ارتباط ما بين انتشار الاورام السرطانية لانسجة الثدي مع التغيرات التي تحدث في مستويات البروتينات الدهنية والدهون في البلازما لدى النساء. (Lane وآخرون، 1995). حيث بينت نتائج الجدول (4-12) انه لا يوجد اي ارتفاع لمستوى الكوليسترول لمجموعة النساء المصابات بمرض سرطان الثدي مع مجموعة السيطرة وبقاء نسبة الكوليسترول ضمن المدى الطبيعي للجسم وهذه النتائج تتوافق مع النتائج التي جاء بها (Riley وآخرون، 1999) وايضا نتائج دراستنا تتوافق مع نتائج دراسة (Devi وآخرون، 2015). اذ بين في نتائجها ان نسبة الكوليسترول ليس لها اي تأثير في مرض سرطان الثدي وبقاءها ضمن المعدل الطبيعي. اما بالنسبة للدهون عالية الكثافة فيبين الجدول (4-12) لا وجود لاي فرق معنوي ما بين مجموعة النساء المصابات بمرض سرطان الثدي مع مجموعة السيطرة، تأتي هذه النتيجة مخالفة لنتائج (Shlipak، 2010) التي بين بها وجود ارتفاع لنسبة الدهون عالية الكثافة لمجموعة النساء المصابات بمرض سرطان الثدي مع مجموعة السيطرة. هذه الزيادة تعود الى وجود ارتفاع في هرموني الاستروجين والبروجيستيرون وايضا يمكن ان تتأثر نسب الدهون عالية الكثافة بالعلاج الذي تخضع له النساء المصابات بمرض سرطان الثدي (Shyamala وآخرون، 1992).

يبين الجدول (4-12) وجود انخفاض في مستوى الدهون واطئة الكثافة لمجموعة النساء المصابات بمرض سرطان الثدي مع مجموعة السيطرة وهذه النتائج تتوافق مع نتائج دراسة (Shlipak، 2010). حيث بينت نتائجها وجود انخفاض في معدل الدهون واطئة الكثافة لمجموعة النساء المصابات بمرض سرطان الثدي ويعود السبب ايضا للتأثر بنسبة هرموني الاستروجين والبروجيستيرون وايضا التأثير بالعلاج للنساء المصابات بمرض سرطان الثدي. اما بالنسبة للدهون الثلاثية بينت النتائج لا وجود لاي فرق معنوي ما بين مجموعة النساء المصابات

بمرض سرطان الثدي مع مجموعة السيطرة وهذه النتائج لا تتفق مع نتائج الدراسة التي جاء بها (King وآخرون، 2002) إذ بينت نتائجها وجود ارتفاع في نسبة الدهون الثلاثية للنساء المصابات بمرض سرطان الثدي، إذ إن هذه الاختلافات تعود لعلاج التاموكسيفين حيث وجد أن هذا العلاج يغير من مستويات كل من الكوليسترول و الدهون الثلاثية للنساء المصابات بمرض سرطان الثدي .

جدول (4-12) توزيع مجموعتي الدراسة حسب مؤشرات lipidprofile

Parameters	Groups	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	T	Sig.
CHOLESTROL	Patients	50.00	4.29	1.11	0.16	-3.35	0.01**
	Control	50.00	5.35	1.82	0.26		
HDL	Patients	50.00	1.36	0.51	0.07	0.05	0.95 ^{NS}
	Control	50.00	1.36	0.84	0.12		
LDL	Patients	50.00	2.63	0.95	0.13	-2.65	0.009**
	Control	50.00	3.15	1.02	0.14		
TRI	Patients	50.00	1.50	0.75	0.11	-1.83	0.06 ^{NS}
	Control	50.00	1.83	1.01	0.14		

**فرق معنوي عالي عند $p \leq 0.01$

N.S لا يوجد فرق معنوي عند $P > 0.05$

4-1-13 قياس نسبة كريات الدم البيضاء White blood cell ، كريات الدم الحمراء Reed blood cell ، الهيموكلوبين Haemoglobin ، الصفائح الدموية Platelets ، النسبة المئوية لكريات الدم الحمراء Haematocrit لمجموعتي الدراسة

يبين الجدول (4-13) قياس كل من كريات الدم البيضاء WBC وكريات الدم الحمراء RBC والهيموكلوبين Hb والصفائح الدموية PLT ومعدل تكس كريات الدم الحمراء HCT لمجموعة النساء المصابات بمرض سرطان الثدي بالمقارنة مع مجموعة السيطرة لمعرفة ما هي التغيرات التي يمكن ان تطرأ على الجسم بعد الاصابة بهذا المرض الخبيث ان نسبة كريات الدم البيضاء WBC لمجموعة النساء المصابات بمرض سرطان الثدي (8.15 ± 4.39) اما بالنسبة لمجموعة السيطرة فقد بلغت (9.0 ± 2.721) اذ بينت النتائج عدم وجود فرق معنوي ذو دلالة احصائية بين مجموعتي الدراسة عند $P > 0.05$. اما كريات الدم الحمراء RBC فقد بلغت نسبتها للنساء المصابات بمرض سرطان الثدي (5.3 ± 1.494) اما مجموعة السيطرة فقد بلغت (4.79 ± 0.84) اذ بينت النتائج وجود فرق معنوي ذي دلالة احصائية عند $P \leq 0.05$ ويبين الشكل (13) الوصف العام للعينات المدروسة حسب مؤشر RBC. اما بالنسبة للهيموكلوبين Hb فقد بلغت نسبته لمجموعة النساء المصابات بمرض سرطان الثدي (11.69 ± 2.10) اما مجموعة السيطرة فقد بلغت النسبة (11.19 ± 1.83) وبينت النتائج لا وجود لاي فرق معنوي ذي دلالة احصائية بين مجموعتي الدراسة عند $P > 0.05$. اما بالنسبة للصفائح الدموية PLT فقد بلغت نسبتها لمجموعة النساء المصابات بمرض سرطان الثدي (313.14 ± 76.93) اما مجموعة السيطرة فقد بلغت نسبتها (320.12 ± 45.25) وبينت النتائج لا وجود لاي فرق معنوي ذي دلالة احصائية عند $P > 0.05$. اما معدل تكس كريات الدم الحمراء HCT فقد بلغت نسبتها في مجموعة النساء المصابات بمرض سرطان الثدي (41.02 ± 7.89) اما بالنسبة لمجموعة السيطرة فقد بلغت (39.21 ± 10.91) واطهرت النتائج لا وجود لأي فرق معنوي ذي دلالة احصائية عند $P > 0.05$. بين (Zang وآخرون، 2014) ان القيم المنخفضة من Hb تؤثر على النساء المصابات بمرض سرطان الثدي وهذا لا ينطبق على

نتائج دراستنا ،اذ بينت نتائجنا ان معدل الهيموكلوبين لمجموعة النساء المصابات بمرض سرطان الثدي بقي ضمن المعدل الطبيعي للجسم.

بينت نتائج دراسة كل من (Bambace و Holmes،2011) ونتائج دراسة (Nurden،2011) ان الصفائح الدموية تؤدي دور هام في الالتهابات والتئام الجروح وايضا تعتبر اداة مهمة في الادلة السريرية و الادلة التجريبية اي انها تلعب دورا مهما في تطور سرطان الثدي.نتائجنا تبين بقاء اعداد الصفائح الدموية طبيعية مقارنة مع مجموعة السيطرة وهذا مؤشر جيد مع قيم Hb اي ان النساء المصابات بمرض سرطان الثدي لا تعاني من فقر الدم بعكس النتائج التي توصل اليها (Hoffbrand وآخرون،2001) اذ بينت نتائجنا ان اعداد الصفائح الدموية للنساء المصابات بمرض سرطان الثدي اعلى من مجموعة السيطرة وهذا مؤشر سئ حيث ان كثرة الصفائح الدموية في مرضى السرطان نتيجة فقر الدم الذي يسببه المرض والذي يعطي ردود الفعل السلبية على انتاج الايثروبوتين في مثل هذه الحالات نتيجة لفقر الدم والتي يمكن ان تكون مسؤولة عن انتاج الصفائح الدموية بكثرة ويبين بين (Fine وآخرون،1997) ان العلاقة ما بين المعلمات الدموية وعلامات الاستجابة الالتهابية الجهازية للنتنؤ للكثير من الاورام السرطانية حيث ان اعداد خلايا الدم الحمراء وايضا حجم الخلية يشير الى مدى شدة المرض وايضا معدل الوفيات. في دراستنا تبين بقاء كريات الدم البيضاء للنساء المصابات بمرض سرطان الثدي ضمن المدى الطبيعي وهذا مؤشر جيد لمجموعة النساء المصابات يمكن ان يخفف من اعباء هذا المرض الخطير.

جدول (4-13) مقارنة بعض المؤشرات الدموية لمجموعتي الدراسة

	Groups	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	T	Sig.
WBC	Patients	50.00	8.15	4.39	0.62	-1.18	0.23 ^{NS}
	Control	50.00	9.01	2.72	0.39		
RBC	Patients	50.00	5.34	1.49	0.21	2.02	0.02*
	Control	50.00	4.79	0.84	0.12		
HB	Patients	50.00	11.69	2.10	0.30	1.26	0.21 ^{NS}
	Control	50.00	11.19	1.83	0.26		
PLT	Patients	50.00	313.14	76.93	10.88	-0.55	0.55 ^{NS}
	Control	50.00	320.12	45.25	6.40		
HCT	Patients	50.00	41.02	7.89	1.12	0.88	0.37 ^{NS}
	control	50.00	39.21	10.91	2.31		

N.S لا يوجد فرق معنوي عند $P > 0.05$

* فرق معنوي عند $p \leq 0.05$

2-4 نتائج الاستخلاص والترحيل Results of extraction and migration

1-2-4 نتائج عزل الدنا DNA Isolation Results



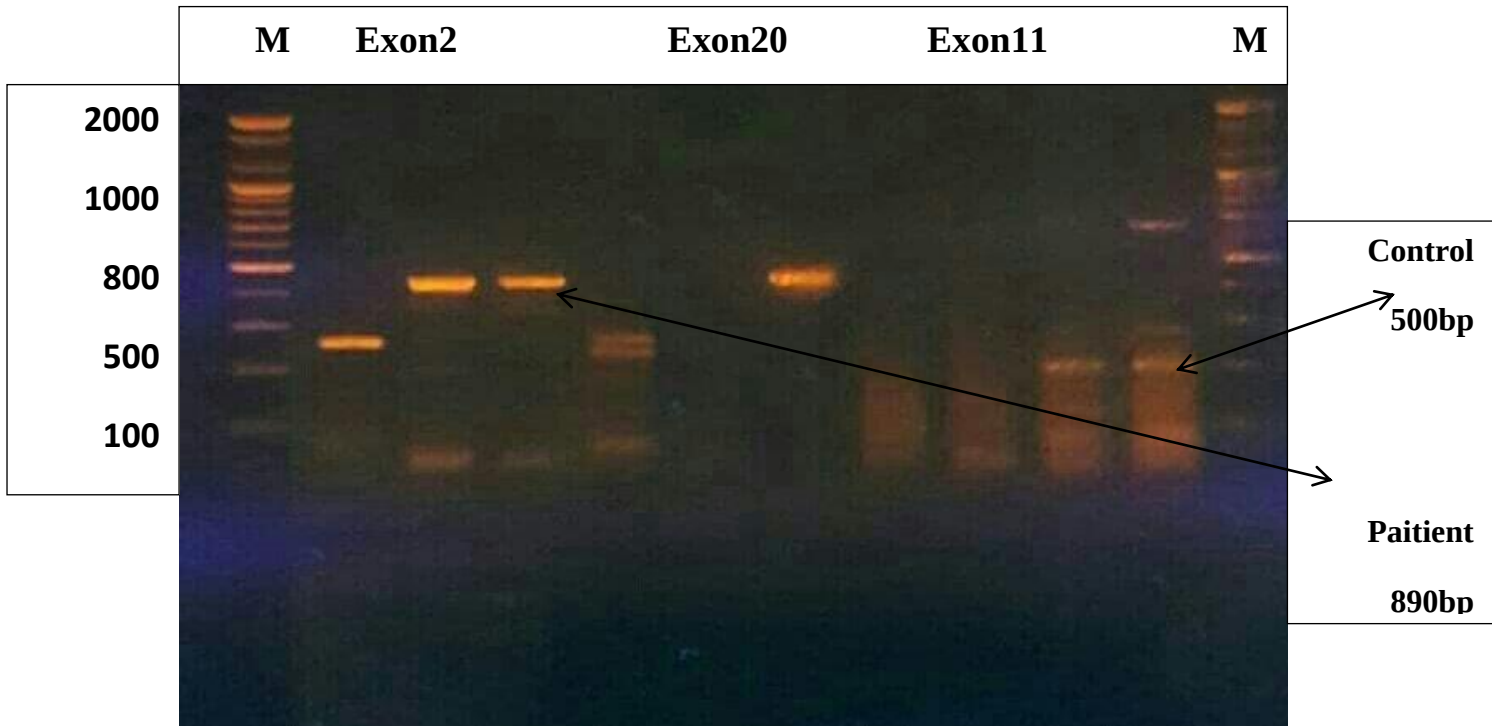
صورة (1) حزم الدنا الكروموسومي المستخلص من عينات دم الانسان والمرجل على هلام

الكاروز بتركيز 1% وفرق جهد كهربائي 100 فولت ولمدة نصف ساعة

تبين صورة (1) حزم الدنا الكروموسومي والذي استخلص من عينات دم نساء مصابات بمرض سرطان الثدي والذي تم ترحيله على هلام الاكاروز بتركيز 1% و فرق جهد كهربائي 100 فولت ولمدة ساعة و التصوير تحت الاشعة فوق البنفسجية UV ومشاهدة النتائج، توجد العديد من الطرق المستخدمة لعزل الدنا من الكائنات الحية بما فيها الانسان وفي هذه الدراسة تم استخدام عدة الاستخلاص Genomic DNA Mini Kit Blood والتي انتجتها شركة Bioneer وتعد من الطرق المثالية لعزل الدنا من الانسان وذلك لما تتميز به من الامكانية العالية لعزل المادة الوراثية وبنسبة نقاوة عالية، اذ تراوحت نقاوة الدنا المعزول 1.2.8 نانومتر وتعد هذه النقاوة المثالية والمطلوبة لتفاعل البلمرة المتسلسل PCR.

2-2-4 ناتج تضخيم الطفرة Single-Strand Conformation Polymorphsim

للاكسونات 2,20,11 من جين BRCA1 المسبب لمرض سرطان الثدي



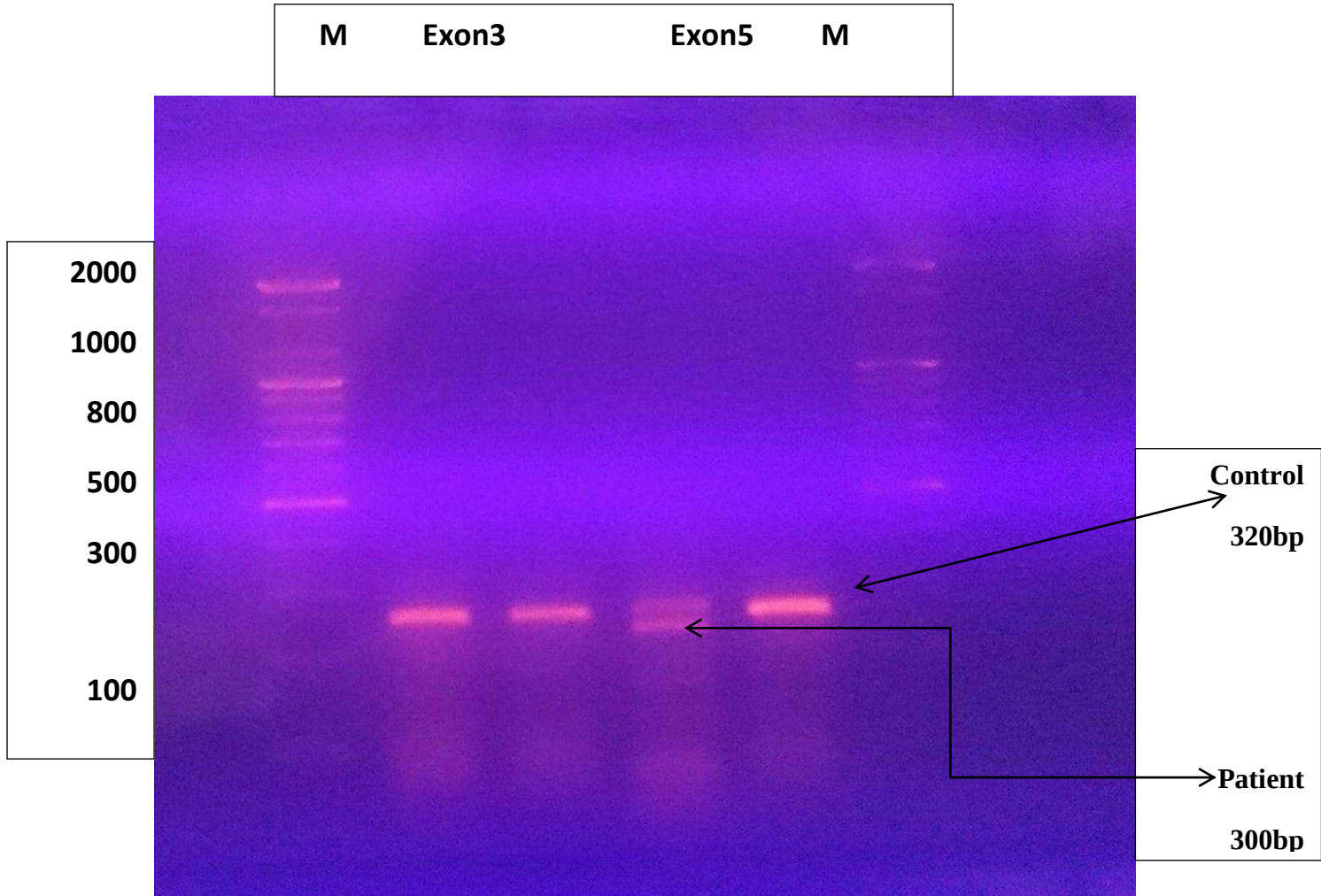
صورة(2) ناتج تضخيم الاكسونات 11، 20، 2 على التوالي من جين BRCA1 المسببة لمرض سرطان الثدي والمرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 1% و فرق جهد كهربائي

M:Marker (100bp-2000bp)

100فولت ولمدة ساعة ونصف

تبين الصورة (2) ناتج تضخيم الطفرات بالنسبة لجين BRCA1 والتي تشمل اكسون 2,20,11 حيث اظهرت نتائج الترحيل ان الوزن الجزيئي MW للحزم الناتجة لأكسون 2 (590) زوجا قاعديا للسيطرة الداخلية اما الوزن الجزيئي للطفرة فقد بلغ 150 زوجا قاعديا كانت هذه الطفرة من اكسون 2 الاكثر شيوعا في محافظة ديالى من بقية الطفرات لجين BRCA1 اذا كانت نسبة تواجد هذا الاكسون المسبب للطفرة في قضاء بعقوبة بمقدار 6 عينة من اصل 32 عينة ظهرت بمقدار 18% في حين قضاء بلدروز ظهر هذا الاكسون بنسبة 2 عينة من اصل 5 عينات اي بمقدار 40%. اما قضاء المقدادية ظهر هذا الاكسون بمقدار 1 عينة من اصل 7 عينات اي 14% ولم يظهر هذا الاكسون في قضاء الخالص من اصل 5 عينات وقضاء خانقين لعينة واحدة. اما اكسون 20 فقد بلغ الوزن الجزيئي لناتج الترحيل 890 زوجا قاعديا بينت النتائج ان قضاء بعقوبة هو اكثر الاقضية تواجدا لهذا الاكسون حيث بلغت النسبة 6 عينات من اصل 32 عينة اي بنسبة 18% في حين قضاء بلدروز ظهر بمقدار 2 عينة من اصل 5 عينات اي بنسبة 40% وقضاء المقدادية بمقدار 1 عينة من اصل 7 عينات اي بنسبة 14% وقضاء الخالص بمقدار 1 عينة من اصل 5 عينات لي بنسبة 20% ولم يظهر في قضاء خانقين.

اما بالنسبة لأكسون 11 حيث بلغ الوزن الجزيئي لناتج التضخيم 350 زوجا قاعديا وبلغت نسبة قضاء بعقوبة من هذا الاكسون 8 عينة من اصل 32 عينات اي بنسبة 25% وبلغت نسبة هذا الاكسون في قضاء بلدروز 2 عينة من اصل 5 عينات اي بنسبة 40% ولم يظهر هذا الاكسون في كل من قضاء المقدادية من اصل 7 عينات وقضاء الخالص من اصل 5 عينات وقضاء خانقين من اصل عينة واحدة.

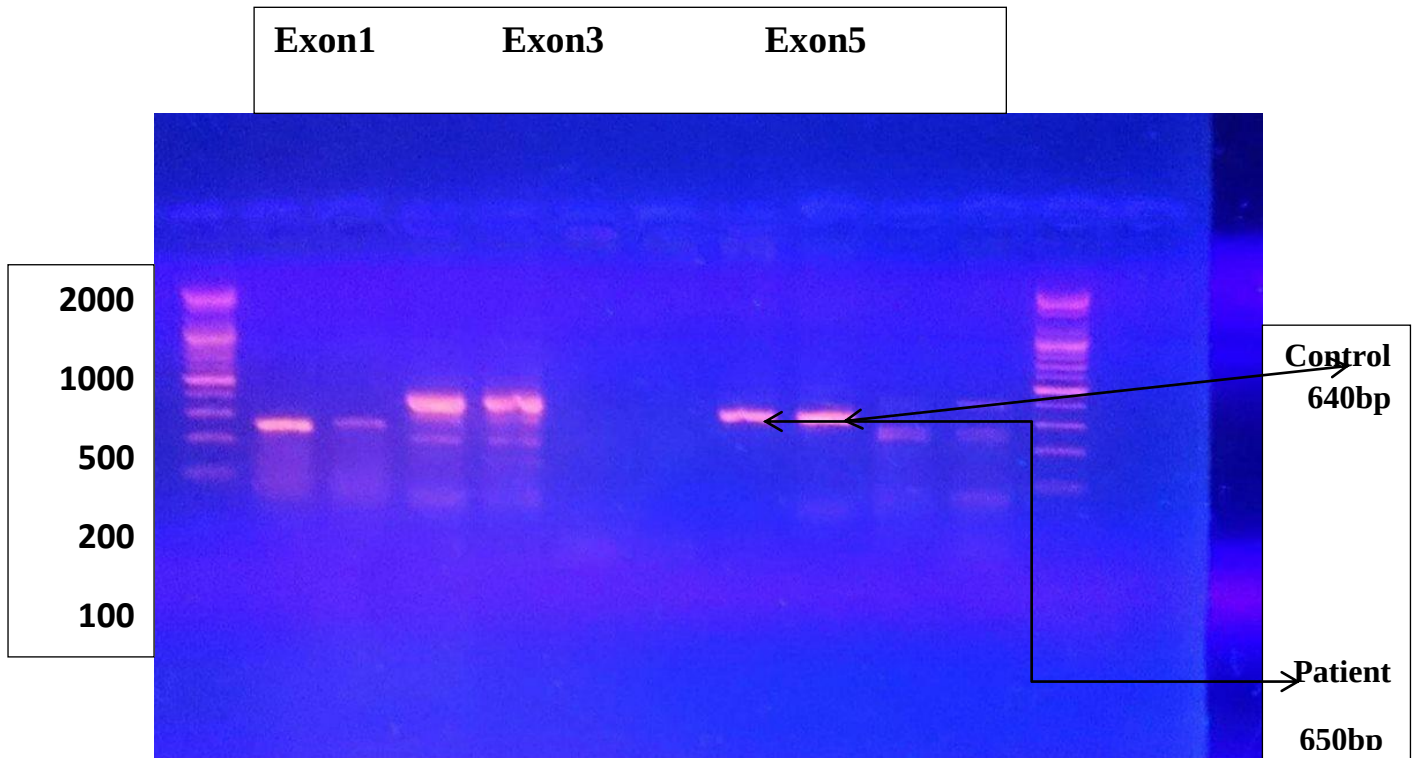


صورة (3) ناتج تضخيم اكسونات 3,5 لجين BRCA1 والمسببة لمرض سرطان الثدي والمرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 1% وفرق جهد كهربائي 100 فولت ولمدة ساعة و نصف

تبين الصورة (3) ناتج التضخيم للطفرات بالنسبة لأكسون 3,5 من جين BRCA1 المسبب لمرض سرطان الثدي حيث بينت نتائج الترحيل ان الوزن الجزيئي MW للحزم الناتجة لأكسون 3 هو 300 زوج قاعدي، لم يظهر هذا الاكسون في كل من قضاء بعقوبة من اصل 32 عينة، وقضاء الخالص من اصل 5 عينات، وقضاء خانقين من اصل 1 عينة، ولكن ظهر في قضاء بلدروز بمقدار 1 عينة من اصل 5 عينات اي بنسبة 20% وايضا ظهر في قضاء المقدادية بمقدار 2 عينة من اصل 7 عينات اي بنسبة 28%. اما اكسون 5 فقد بلغ الوزن الجزيئي MW له 280 زوج قاعدي حيث بينت النتائج ان نسبة هذا الاكسون لقضاء كل من المقدادية بمقدار 2 عينة من اصل 7 عينات اي بنسبة 28% وبلدروز 1 عينة من اصل 5 عينات اي بنسبة 20% ولم يظهر هذا الاكسون لكل من قضاء بعقوبة من اصل 32 عينة و

قضاء الخالص من اصل 5 عينات، وقضاء خانقين من اصل عينة واحدة. . حيث تبين النتائج ان قضاء بعقوبة هو اكثر الاقضية تواجدا للطفرات نظرا لان قضاء بعقوبة هو القضاء الاكثر من ناحية العينات من بقية الاقضية لمحافظة ديالى حيث تتركز سرطان الثدي في قضاء بعقوبة اكثر من بقية الاكثر وهذه النتيجة يعود سببها الى اختلاف عدة عوامل متداخلة وتختلف باختلاف التوزيعات الجغرافية وانتشار السكان واختلاف نمط المعيشة حسب نتائج الدراسة التي بينها (Ayoub وآخرون، 2014).

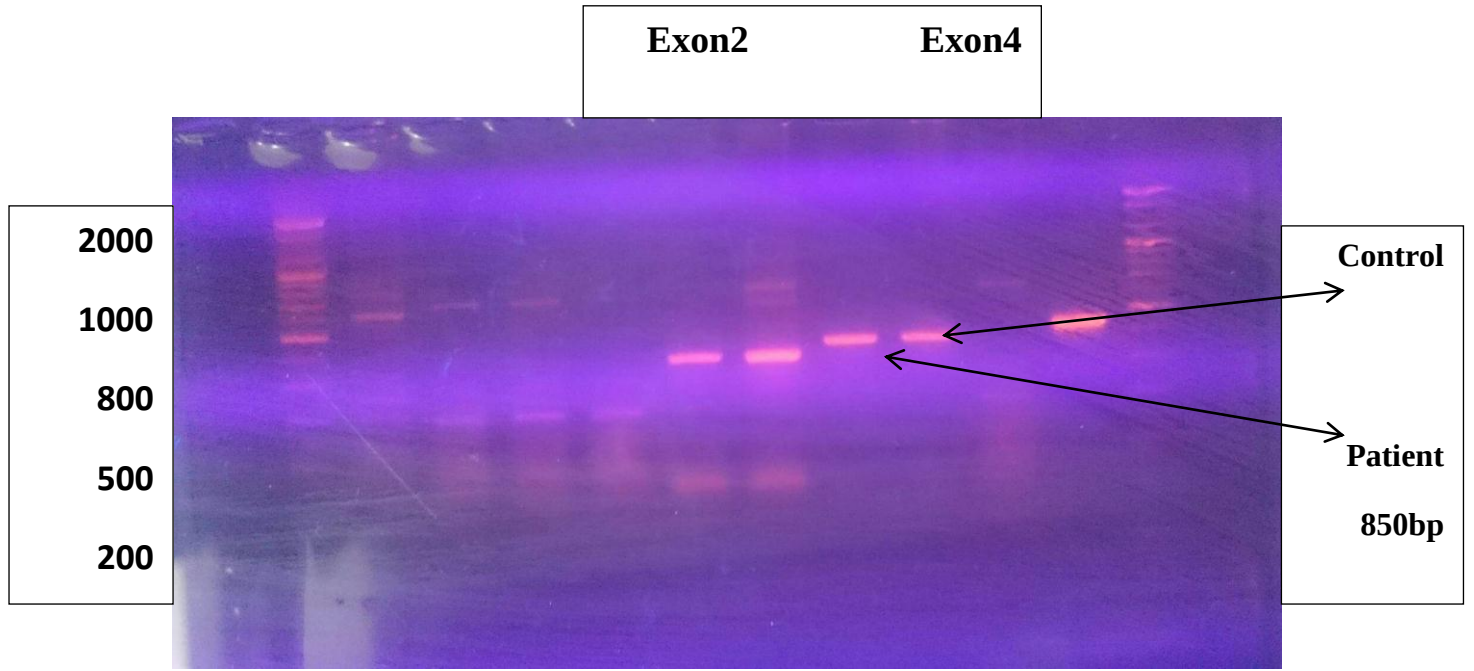
4-2-3 ناتج تضخيم الطفرة للاكسونات 1,3,5 من جين BRCA2 المسبب لمرض سرطان الثدي



صورة (4) ناتج تضخيم الاكسونات 1,3,5 من جين BRCA2 والمسببة لمرض سرطان الثدي والمرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 1% وفرق جهد كهربائي 100 فولت ولمدة ساعة ونصف

تبين الصورة (4) ناتج التضخيم لأكسونات جين BRCA2 والتي تشمل كل من أكسون 1,3,5 على التوالي والمرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 1% وفرق جهد كهربائي 100

فولت ولمدة ساعة ونصف والمصورة تحت الاشعة فوق البنفسجية UV بعد التصبيغ بصبغة الاثيديوم برومايد Ehtidium Bromide وبعد الاكتمال من عملية الترحيل وبأنتهاء الوقت المحدد ظهرت النتائج وكما موضحة في الصورة (4) اكسون 1 من جين BRCA2 حيث بينت نتائج الترحيل ان الوزن الجزيئي له 650 زوج قاعدي حيث اظهرت النتائج ان نسبة هذا الاكسون في قضاء بعقوبة 3 عينة من اصل 32 عينة اي بنسبة 9% وفي قضاء بلدروز 1 عينة من اصل 5 عينات اي بمقدار 20% ولم يظهر هذا الاكسون في كل من قضاء المقدادية من اصل 7 عينات وقضاء الخالص من اصل 5 عينات ولكن ظهر في قضاء خانقين بمقدار 1 من اصل عينة واحدة اي بنسبة 10%. اما اكسون 3 من جين BRCA2 بينت النتائج ان الوزن الجزيئي MW لهذا الاكسون بلغت 700 زوج قاعدي حيث ظهر هذا الاكسون في قضاء بعقوبة بمقدار 4 عينة من اصل 32 عينة اي بنسبة 12% وفي قضاء بلدروز 1 عينة من اصل 5 عينات اي بنسبة 20% ولم يظهر هذا الاكسون في كل من قضاء المقدادية من اصل 7 عينات وقضاء الخالص من اصل 5 عينات وقضاء خانقين من اصل عينة واحدة. اما بالنسبة لأكسون 5 بينت نتائج الترحيل ان الوزن الجزيئي MW له 650 زوج قاعدي حيث ظهر هذا الاكسون في قضاء بعقوبة بمقدار 2 عينة من اصل 32 عينات اي بنسبة 6% ولم يظهر هذا الاكسون في كل من قضاء بلدروز من اصل 5 عينات وقضاء المقدادية من اصل 7 عينات وقضاء الخالص من اصل 5 عينات وقضاء خانقين من اصل عينة واحدة.



صورة (5) ناتج تضخيم الاكسونات 2,4 جين BRCA2 والمسببة لمرض سرطان الثدي والمرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 1% وفرق جهد كهربائي 100 فولت ولمدة ساعة و نصف

حيث بلغ الوزن الجزيئي MW لحزم اكسون 2 من جين BRCA2 800 زوج قاعدي حيث بلغت نسبة هذا الاكسون في قضاء بعقوبة 2 عينة من اصل 32 عينات اي بنسبة 6% وقضاء المقدادية 2 عينة من اصل 7 عينات اي بنسبة 28% اما قضاء الخالص فبلغ هذا الاكسون مقدار 2 عينة من اصل 5 عينات اي بنسبة 40% ولم يظهر هذا الاكسون في كل من قضاء بلدروز من اصل 5 عينات وايضا قضاء خانقين من اصل 1 عينة .اما بالنسبة لأكسون 4 من جين BRCA2 حيث بينت نتائج الترحيل ان الوزن الجزيئي MW لهذا الاكسون 850 زوج قاعدي حيث بلغت نسبة هذا الاكسون في قضاء بعقوبة 6 عينات من اصل 32 عينة اي بنسبة 18% وفي قضاء المقدادية عينة واحدة ظهرت لهذا الاكسون من اصل 7 عينات اي بنسبة 14% وفي قضاء الخالص ايضا عينة واحدة من اصل 5 عينات اي بنسبة 20% ولم يظهر هذا الاكسون في كل من قضاء بلدروز من اصل 5 عينات وقضاء خانقين من اصل 7 عينات وقضاء الخالص من اصل 5 عينات ولكن ظهر في قضاء خانقين من اصل عينة واحدة .

إنّ كل من جين BRCA1 وجين BRCA2 هي جينات متشابهة هيكلية اي هي جينات كابتة للورم في الحالة الطبيعية. (Ewald وآخرون، 2011). وظيفيا كل من جينات BRCA1 و BRCA2 تشارك في الكثير من العمليات الخلوية مثل تنظيم عملية النسخ بمثابة ردة فعل على تلف الحامض النووي وايضا تشارك في المحافظة على استقرار الكروموسومات وتنظيم الجينات التي تشترك في دورة الخلية والموت الخلوي المبرمج. (Miki وYoshida، 2004). بإمكاننا الان ان نتخيل حصول اي طفرة لهذه الجينات التي تقوم بكل هذه المهم والعمليات المهمة ،يؤدي ذلك الى اختلال في نظام الجسم واعطاء ردود الفعل التي تظهر على شكل خلايا ورمية خبيثة مؤدية الى حدوث السرطان.

3-4 الدراسة الوراثية الجزيئية

BRCA1 جين 1-3-4

تبين الصورة (1-4) شكل اكسون 2 من جين BRCA1 المسبب لمرض سرطان الثدي حيث بينت نتائج هذه الصورة وجود النقص في عدد القواعد النتروجينية المكونة لهذا الجين، و قد تم التعبير عن هذا النقص بشكل طفرات حذف عندما تمت مقارنة هذا الجين الذي يعود لامرأة مصابة بالمرض مع اخرى سليمة ،حيث تبين الصورة (1-4) وجود نقص 200 قاعدة نتروجينية لهذا الاكسون وهذا العدد الكبير من الحذف ادى ظهوره على شكل اورام سرطانية ادى تعبير هذا الجين على شكل مرض سرطان الثدي حيث بينت النتائج حدوث عملية الحذف في المواقع التالية من الموقع 10 الى الموقع 30 وايضا من الموقع 116-124 وحذف في الموقع 138,142,162,172,235 ومن الموقع 280 للمرأة المصابة بالمرض وايضا حذف في الموقع 181 والموقع 182 و 252 للمرأة السليمة. يتم تقييم مرض سرطان الثدي من خلال سلسلة من العمليات النسيجية والتي تكون عادة مدعومة بسلسلة من من تراكمات التغيرات الجينية والتي تؤدي الى تغير نمط التعبير الجيني (Garnis وآخرون، 2004). اذا وجد ان غياب الاستقرار الجيني هو من الصفات المميزة لنشوء الورم وانبثاث الاضرار الجينية لذا فأن تحديد التغيرات الوراثية مثل الادراج والحذف واعادة الترتيب وحصول الطفرات النقطية في الجين والتي يؤدي تطورها الى مرض سرطان الثدي امر في غاية الاهمية من اجل تفسير العمليات الجزيئية الدقيقة

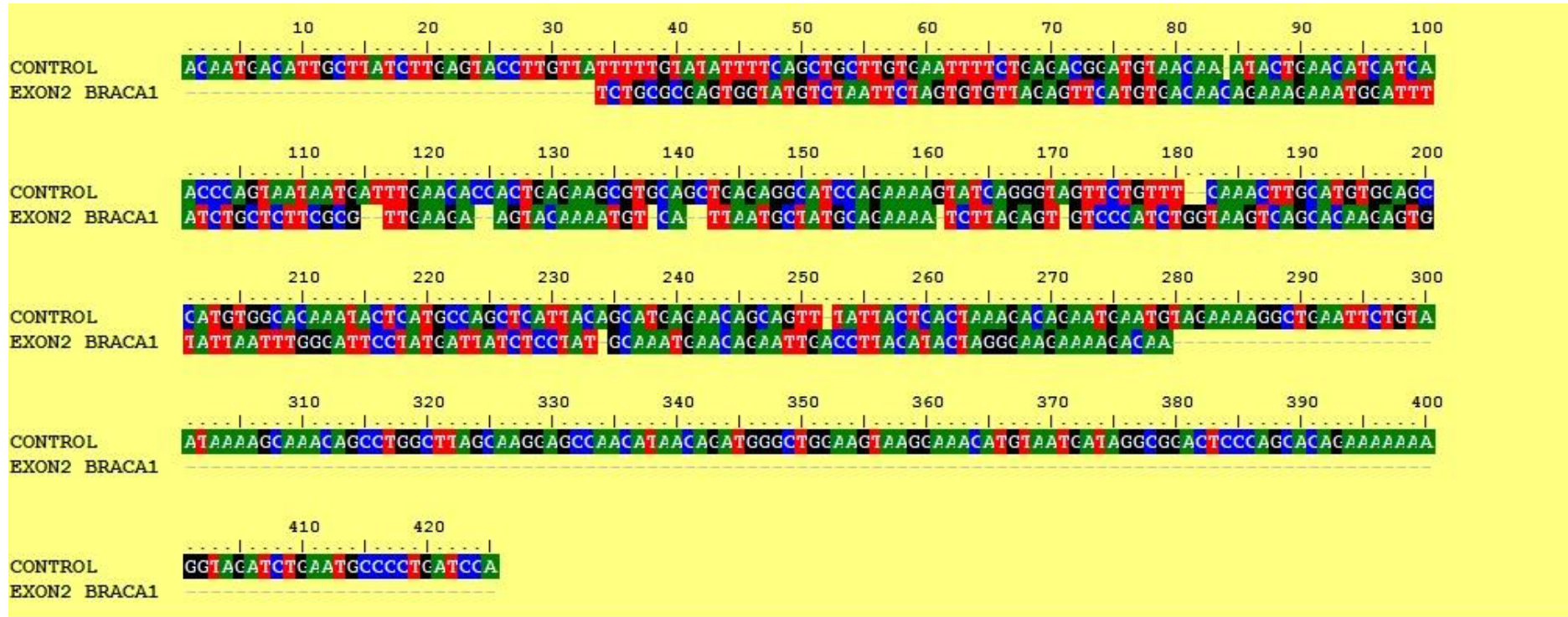
والتي تكون عادة مساهمة في تطور الاورام (Singh و Roy، 2001). ان سرطان الثدي الذي ينتج عن طفرة ضارة في جين BRCA1 تكون نسبة السرطان في مثل هذه الحالة اعلى وايضا معدل انقسامه اسرع ولديه القابلية العالية على الاختراق للمفاوي (Mosolino واخرون، 2005). وتم توضيح النسبة المئوية لعدد طفرات الحذف للمرأة المصابة بالمرض والمرأة السليمة المبينة في الصورة (4-1) وكما يلي:

$$\text{النسبة المئوية لعدد طفرات الحذف للمرأة المصابة} = 100 \times \frac{\text{عدد طفرات الحذف}}{\text{المجموع الكلي للتسلسل}}$$

$$47.61 = 100 \times \frac{200}{420}$$

$$\text{النسبة المئوية لعدد طفرات الحذف للمرأة السليمة} = 100 \times \frac{\text{عدد طفرات الحذف}}{\text{المجموع الكلي للتسلسل}}$$

$$0.95 = 100 \times \frac{4}{420}$$



شكل (1-4) مقارنة رصف القواعد النتروجينية Alignment لأكسون 2 من جين BRCA1 بين امرأة سليمة وامرأة مصابة بسرطان الثدي من مجتمع

ديالى موضعا مواقع الطفرات النقطية بعد استخدام تقنية Single-Strand Conformation Polymorphism

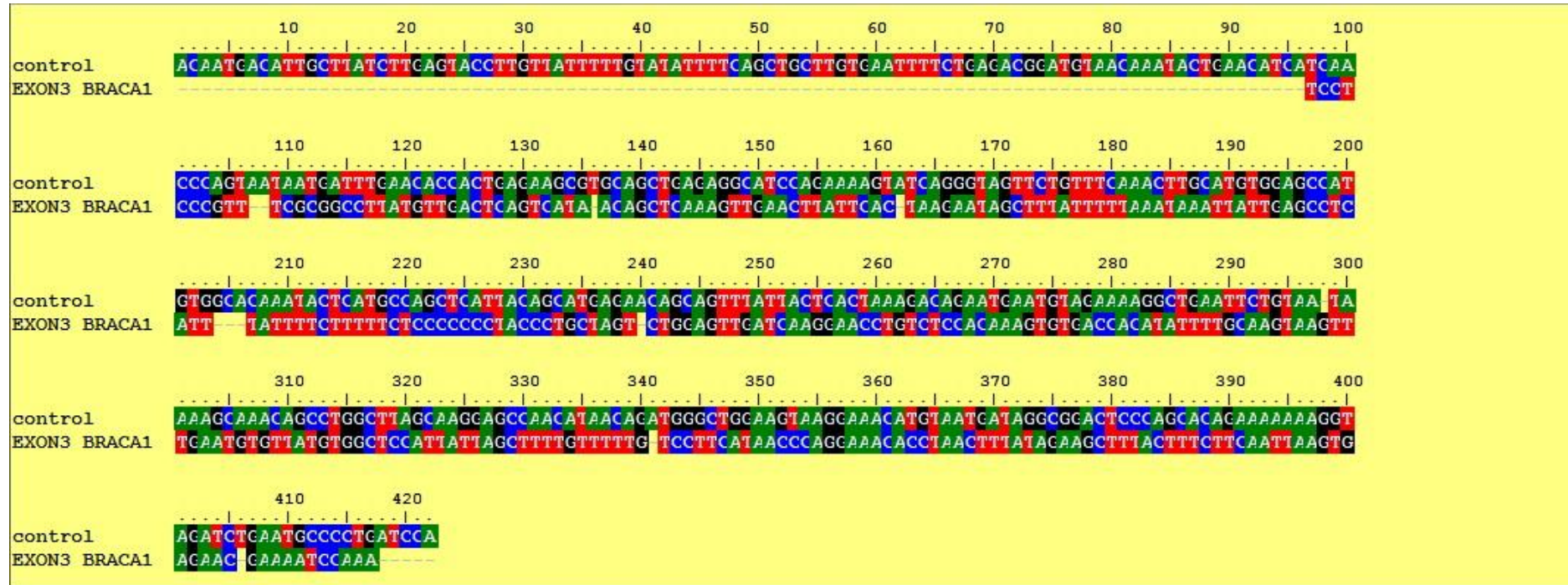
الصورة (4-2) تبين اكسون 3 من جين BRCA1 المسبب لمرض سرطان الثدي حيث بينت نتائج السكونس وجود نقص 110 قاعدة نيتروجينية عندما تمت المقارنة ما بين امرأة مصابة بالمرض مع أخرى سليمة حيث كانت المرأة المصابة بالمرض تبلغ من العمر 53 سنة ولا يوجد اي تاريخ وراثي لها للمرض و هذا يدل على التغير المفاجئ لجين BRCA1 وظهور هذا التغير على شكل طفرات من نوع الحذف وظهور الجين بهذا الشكل الناقص حيث ظهرت اعراض هذا الحذف على شكل ورم في الثدي حيث بدأ الحذف من الموقع 10-100 وايضا حذف في الموقع 110,116,162,208,240,340 ومن الموقع 406-420 للمرأة المصابة بالمرض وايضا الحذف في الموقع 299 للمرأة السليمة. وقد بين (Antoniou وآخرون، 2003) ان جين BRCA1 هو الجين المسؤول عن اصلاح فواصل الحمض النووي DNA اي هو جين قاعم للورم اي ان حدوث اي خلل في عمل هذا الجين يؤدي الى انتاج البروتينات المتقطعة يؤدي تعبيرها عن هذا الخلل الى ظهور الورم السرطاني في الثدي. لان جينات BRCA1 و BRCA2 هي الجينات المرتبطة مع قابلية الإصابة بسرطان الثدي الوراثي (Miki وآخرون، 1994). النسبة المئوية لطفرات الحذف المبينة في الصورة (4-2)

$$\text{النسبة المئوية لعدد طفرات الحذف للمرأة المصابة} = 100 \times \frac{\text{عدد طفرات الحذف}}{\text{المجموع الكلي للتسلسل}}$$

$$26.190 = 100 \times \frac{110}{420}$$

$$\text{النسبة المئوية لعدد طفرات الحذف للمرأة السليمة} = 100 \times \frac{\text{عدد طفرات الحذف}}{\text{المجموع الكلي للتسلسل}}$$

$$0.238 = 100 \times \frac{1}{420}$$



شكل (2-4) مقارنة رصف القواعد النتروجينية Alignment لأكسون 3 من جين BRCA1 بين امرأة سليمة وامرأة مصابة بسرطان الثدي من مجتمع

ديالى موضعا مواقع الطفرات النقطية بعد استخدام تقنية Single-Strand Conformation Polymorphsim

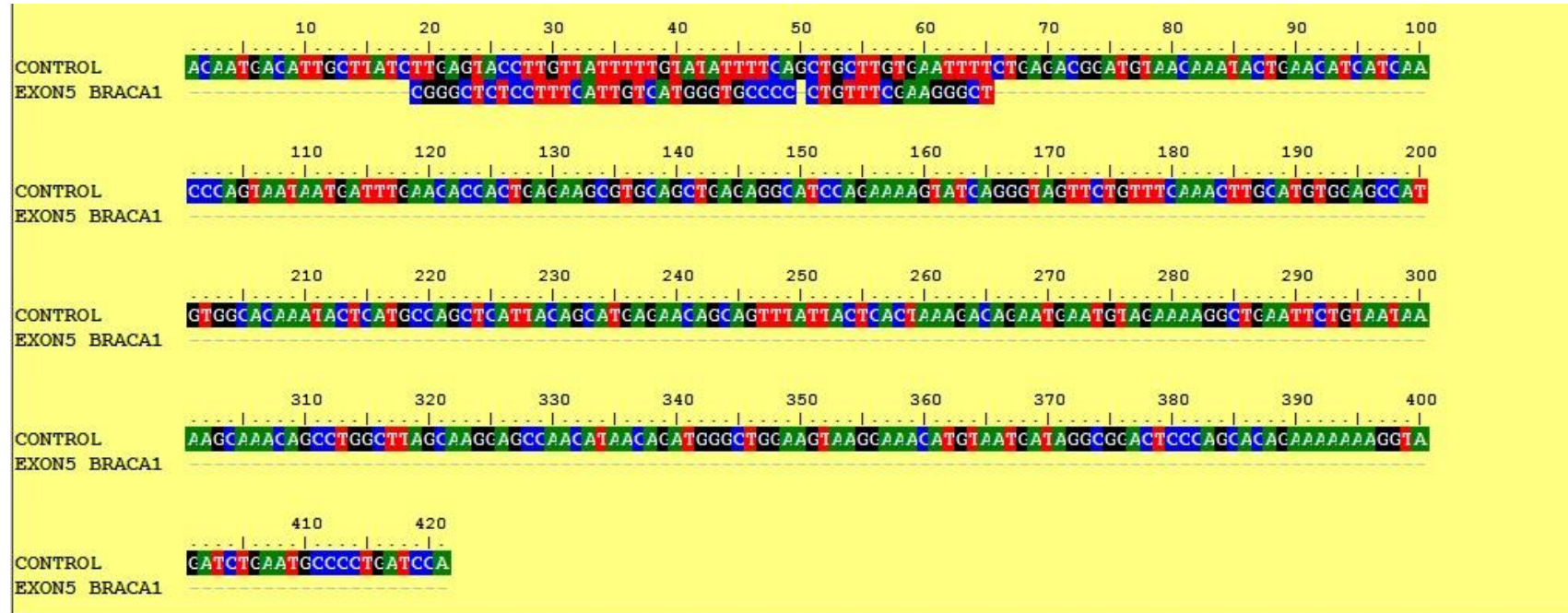
اما بالنسبة للصورة (3-4) تبين شكل اكسون 5 من جين BRCA1 المسبب لمرض سرطان الثدي حيث بينت النتائج وجود النقص الكبير في اعداد القواعد النتروجينية عندما تمت المقارنة ما بين امرأة مصابة بالمرض مع اخرى سليمة حيث كان عمر المرأة المصابة يبلغ 43 سنة وايضا لم يكن لديها تاريخ وراثي للمرض وان هذا النقص الكبير في اعداد القواعد النتروجينية ادى الى حدوث المرض بدرجة كبيرة ومتقدمة وظهر هذا النقص على شكل طفرات الحذف الذي بلغ لهذا الاكسون 365 قاعدة نتروجينية وهو الاكسون الاكثر حذفاً للقواعد النتروجينية من جين BRCA1 حيث بدأ الحذف من الموقع 10-50 ومن الموقع 70 وصولاً الى الموقع 420. ان جين BRCA1 والذي يشمل الاكسونات التالية (2,20,11,3,5) وهي الاكسونات التي تم اختيارها في دراستنا، حيث بينت نتائج دراسة (Hedau وآخرون، 2004) ونتائج دراسة (Vorkas وآخرون، 2009) ان هذه الاكسونات هي اكثر مناطق الجين زيادة للطفرات اي اكثر مناطق الجين التي تحدث بها الطفرات من جين BRCA1 وهذه النتائج تتفق مع نتائج دراستنا من حيث التغيرات التي حصلت في شكل هذا الجين والطفرات التي تسببت في الحذف الكبير في اعداد القواعد النتروجينية وادت الى حدوث الخلل في وظائف جين BRCA1 وظهر هذا الخلل بشكل ورم سرطاني في الثدي. والنسبة التالية توضح عدد طفرات الحذف للمرأة المصابة مقارنة مع المرأة السليمة

$$\text{النسبة المئوية لعدد طفرات الحذف للمرأة المصابة} = 100 \times \frac{\text{عدد طفرات الحذف}}{\text{المجموع الكلي للتسلسل}}$$

$$86.90 = 100 \times \frac{365}{420}$$

$$\text{النسبة المئوية لعدد طفرات الحذف للمرأة السليمة} = 100 \times \frac{\text{عدد طفرات الحذف}}{\text{المجموع الكلي للتسلسل}}$$

$$0 = 100 \times \frac{0}{420}$$



شكل (3-4) مقارنة رصف القواعد النروجينية Alignment لأكسون 5 من جين BRCA1 بين امرأة سليمة وامرأة مصابة بسرطان الثدي من مجتمع

ديالى موضحا مواقع الطفرات النقطية بعد استخدام تقنية Single-Strand Conformation Polymorphsim

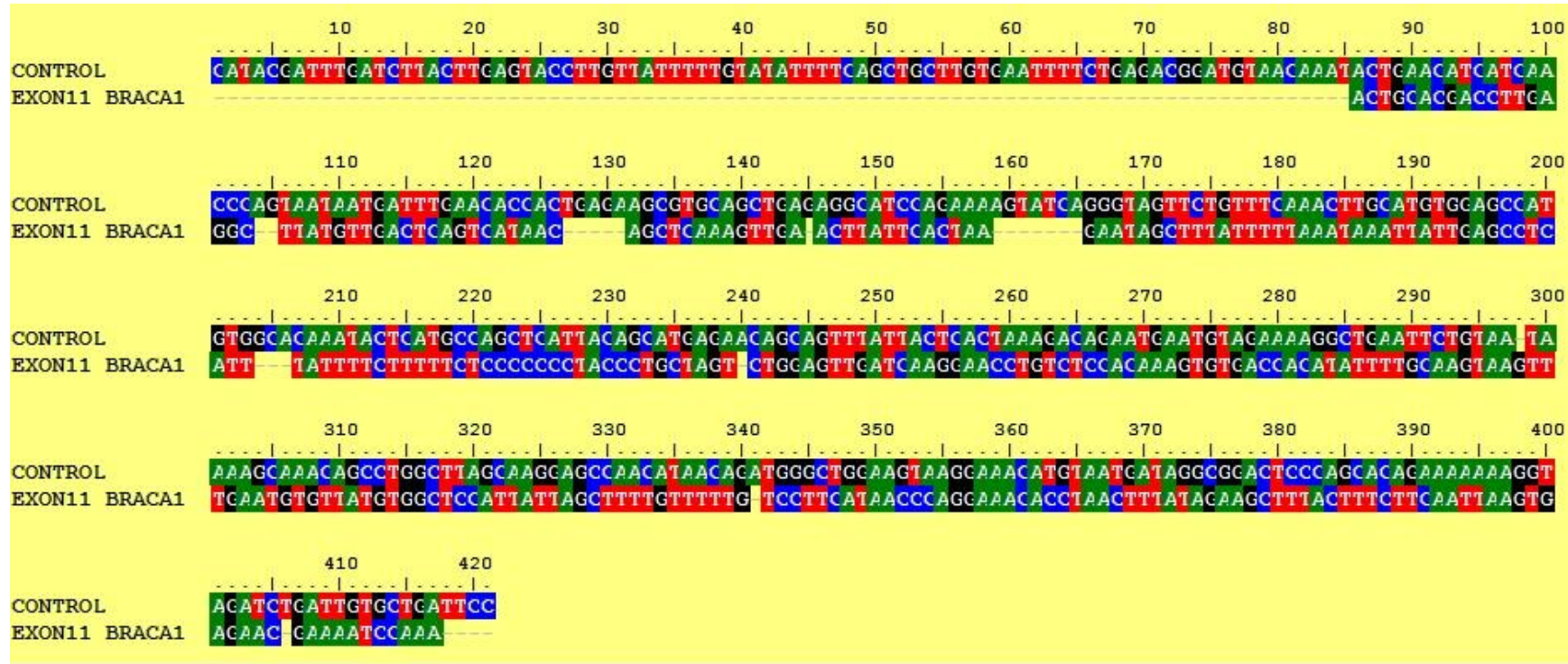
اما الصورة (4-4) تبين شكل اكسون 11 من جين BRCA1 ويعتبر اكثر الاكسونات تواجدا ما بين مجموعة النساء المصابات بمرض سرطان الثدي في محافظة ديالى حيث بينت النتائج وجود نقص 106 قاعدة نروجينية ، حيث ادى هذا النقص الكبير الى حدوث ورم سرطاني في الثدي وكانت الطفرات من نوع الحذف التي تسببت بهذا النقص للجين، حيث كانت نتيجة هذا الاكسون تعود لامرأة تبلغ من العمر 53 سنة وكان لها تاريخ وراثي للمرض عن طريق الام.بدأ الحذف لهذا الاكسون من الموقع 10 وصولا للموقع 90 وايضا في الموقع 108,130,147,160,208,240,340,408,420 للمرأة السليمة. بينت نتائج دراسة (Pal واخرون، 2008) ان اكثر الاكسونات لجين BRCA1 شيوعا ما بين العينات هو اكسون 11 وهذه النتيجة تتفق مع نتائج دراستنا حيث بينت النتائج ان اكسون 11 من جين BRCA1 كان شائع وموجود في معظم الاقضية لمحافظة ديالى للنساء المصابات بمرض سرطان الثدي.واشارت نتائج دراسة (Omar واخرون، 2015) ان اكثر التغيرات المسببة لمرض سرطان الثدي كانت واقعة على اكسون 11 من جين BRCA1 وهذا يخالف ما توصلت له نتائج دراستنا حيث بينت نتائج الدراسة الحالية ان اكثر التغيرات ويقصد بالتغيرات (الاكسونات الاكثر حذفاً للقواعد النروجينية) كانت واقعة على اكسون 5 واكسون 20 من جين BRCA1 واكسون 5 ايضا من جين BRCA2 حيث اظهرت النتائج لهذه الاكسونات حذفاً كبيراً في اعداد القواعد النروجينية وحذفاً ملفتاً للنظر، الامر الذي ادى الى ظهور سرطان الثدي وتطوره في مراحله الاخيرة و المتقدمة.

$$\text{النسبة المئوية لعدد طفرات الحذف للمرأة المصابة} = 100 \times \frac{\text{عدد طفرات الحذف}}{\text{المجموع الكلي للتسلسل}}$$

$$25.23 = 100 \times \frac{106}{420}$$

$$\text{النسبة المئوية لعدد طفرات الحذف للمرأة السليمة} = 100 \times \frac{\text{عدد طفرات الحذف}}{\text{المجموع الكلي للتسلسل}}$$

$$0.23 = 100 \times \frac{1}{420}$$



شكل (4-4) مقارنة رصف القواعد النروجينية Alignment لأكسون 11 من جين BRCA1 بين امرأة سليمة وامرأة مصابة بسرطان الثدي من مجتمع

ديالى موضعا مواقع الطفرات النقطية بعد استخدام تقنية Single-Strand Conformation Polymorphsim

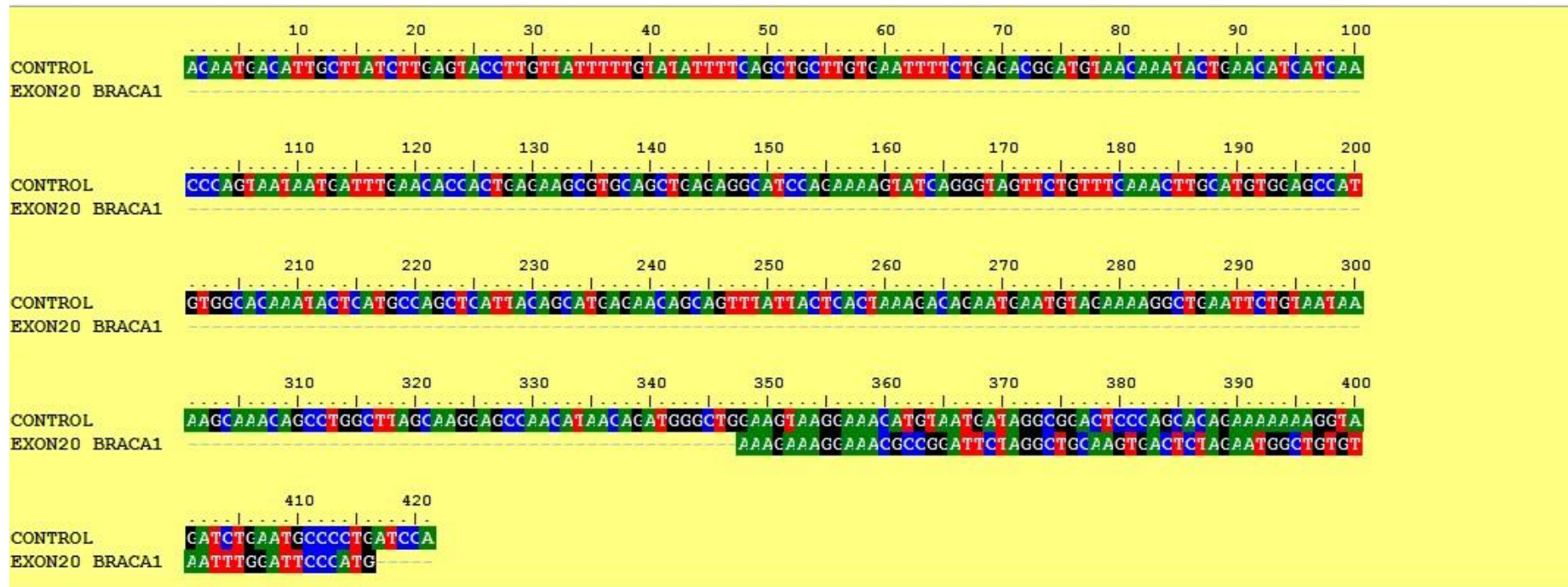
اما الصورة (4-5) تبين شكل اكسون 20 من جين BRCA1، ويتعبر هذا الاكسون ايضا الاكثر تواجدا ما بين النساء المصابات بمرض سرطان الثدي عندما تم تقسيم العينات للنساء المصابات حسب الاقضية لمحافظة ديالى حيث بينت الصورة (4-5) شكل الجين لامرأة مصابة بالمرض مقارنة مع اخرى سليمة و كما هو مبين النقص الكبير في اعداد القواعد النتروجينية و الناتجة عن طفرات الحذف الذي تسببه مرض سرطان الثدي و الذي ادى الى خلل كبير في فعالية وتعبير جين BRCA1 حيث وصل عدد القواعد النتروجينية المحذوفة الى 347 قاعدة نتروجينية حيث بدأ الحذف من الموقع 10 وصولا للموقع 350، وايضا حذف في الموقع 420. اما بالنسبة للتغيرات التي حدثت في اكسون 20 من جين BRCA1، حيث عثر على الطفرة في الموقع 130 ويشار الى اسم هذه الطفرة C5382 حسب قاعدة بيانات Breast cancer information، وهي طفرات تعرف باسم طفرات تحول الهيكل او الاطار او الوظيفة والشكل والتي تنشأ عادة من كودون توقف يسبق اوانه اي لم يحين وقته ويتوقف وهو كودون يعرف بأسم (Stop 1822) هذا يؤدي الى تكوين بروتينات منقطعة (Rozany وآخرون، 2005). بينت نتائج السكونس اشكال اكسونات جين BRCA1 المسبب لمرض سرطان الثدي وشملت الاكسونات كل من اكسون (5,3,11,20,2) وتبين من خلال نتائج السكونس الطفرات المسببة لمرض سرطان الثدي وهي طفرات الحذف حيث كان اعداد القواعد النتروجينية المفقودة او المحذوفة كبير جدا الى درجة تؤدي الى اظهار هذا التعبير على شكل ورم سرطاني في الثدي. وهذه النسبة توضح طفرات الحذف المبينة في الصورة (4-5) :

$$\text{النسبة المئوية لعدد طفرات الحذف للمرأة المصابة} = 100 \times \frac{\text{عدد طفرات الحذف}}{\text{المجموع الكلي للتسلسل}}$$

$$82.61 = 100 \times \frac{347}{420}$$

$$\text{النسبة المئوية لعدد طفرات الحذف للمرأة السليمة} = 100 \times \frac{\text{عدد طفرات الحذف}}{\text{المجموع الكلي للتسلسل}}$$

$$0 = 100 \times \frac{0}{420}$$



شكل (4-5) مقارنة رصف القواعد النتروجينية Alignment لأكسون 20 من جين BRCA1 بين امرأة سليمة وامرأة مصابة بسرطان الثدي من مجتمع

ديالى موضحا مواقع الطفرات النقطية بعد استخدام تقنية Single-Strand Conformation Polymorphsim

الان نأتي الى توضيح مدى ارتباط جين BRCA1 مع مرض سرطان الثدي حيث وضع (Ye وآخرون، 2001) ان جين BRCA1 لديه القدرة على الارتباطات المباشرة مع الحمض النووي وخاصة هياكله المتفرعة اي ان هذا الجين يلعب دورا هاما في كل من عميلتي النسخ واصلاح الحمض النووي، آلا ان اتضح الدور الهام لجين BRCA1 حيث انه من الواضح وجود بروتين وظيفي لجين BRCA1 يكون مهم جدا لمنع حدوث التحولات في الثدي لذا ان اي تعطيل انتقائي لوظيفة جين BRCA1 للثدي يؤدي ذلك الى تنمية وتنشيط الاقنية المتقطعة للثدي و يؤدي الى تضخم الثدي فيتشكل الورم. (Xu وآخرون، 1999)

BRCA2 جين 2-3-4

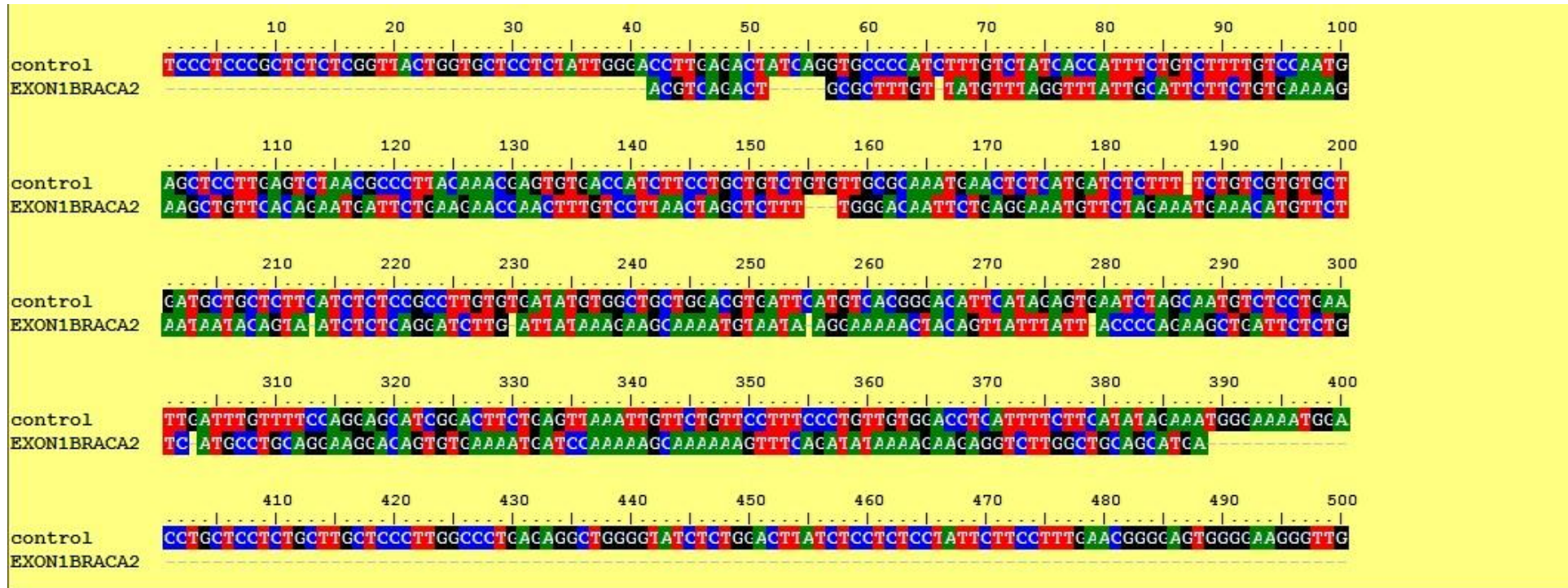
تبين الصورة (4-6) شكل اكسون 1 من جين BRCA2 المسبب لمرض سرطان الثدي، حيث بينت الصورة شكل هذا الاكسون واعداد القواعد النتروجينية المفقودة عندما تمت المقارنة ما بين امراة مصابة بالمرض واخرى غير مصابة، حيث ظهرت طفرات الحذف وادى ذلك الحذف الى ظهور الاورام السرطانية في الثدي وظهور الجين بهذا الشكل وبهذا النقص الامر الذي ادى الى حدوث خلل في وظائف جين BRCA2 وظهور الكتل السرطانية، حيث وصل اعداد القواعد النتروجينية المحذوفة لهذا الاكسون الى 165 قاعدة نتروجينية لامراة تبلغ من العمر 65 سنة ولها تاريخ وراثي للمرض حيث بدأ الحذف من الموقع 10 وصولا للموقع 40 وايضا حذف في الموقع 50 وصولا للموقع 60 وايضا حذف في كل من المواقع 156,212,303 وحذف اخير بدأ من الموقع 390 وصولا للموقع 500 للمرأة المصابة بالمرض والحذف في الموقع 187 للمرأة السليمة. بصورة عامة الجينات الكابتة او القامعة للورم هي تلك الجينات التي تحافظ على الخلية وتحميها من خطر السرطان ويقصد به الانقسامات العشوائية للخلايا الطبيعية بصورة غير مسيطر عليها لذا فأن حدوث اي تحور في تلك الجينات يؤدي ذلك الى فقدان الجينات الكابتة للورم لوظيفتها وتفعيل الجينات الورمية لتبدأ بتشكيل خلايا سرطانية (National cancer institute، 2014). وايضا تم توضيح النسبة المئوية لعدد طفرات الحذف للمرأة المصابة بالمقارنة مع المرأة السليمة :

$$\text{النسبة المئوية لعدد طفرات الحذف للمرأة المصابة} = \frac{\text{عدد طفرات الحذف}}{\text{المجموع الكلي للتسلسل}} \times 100$$

$$33 = 100 \times \frac{165}{500}$$

$$\text{النسبة المئوية لعدد طفرات الحذف للمرأة السليمة} = \frac{\text{عدد طفرات الحذف}}{\text{المجموع الكلي للتسلسل}} \times 100$$

$$0.2 = 100 \times \frac{1}{500}$$



شكل (4-6) مقارنة رصف القواعد النتروجينية Alignment لأكسون 1 من جين BRCA2 بين امرأة سليمة وامرأة مصابة بسرطان الثدي من مجتمع ديايلى

موضحا مواقع الطفرات النقطية بعد استخدام تقنية Single-Strand Conformation Polymorphsim

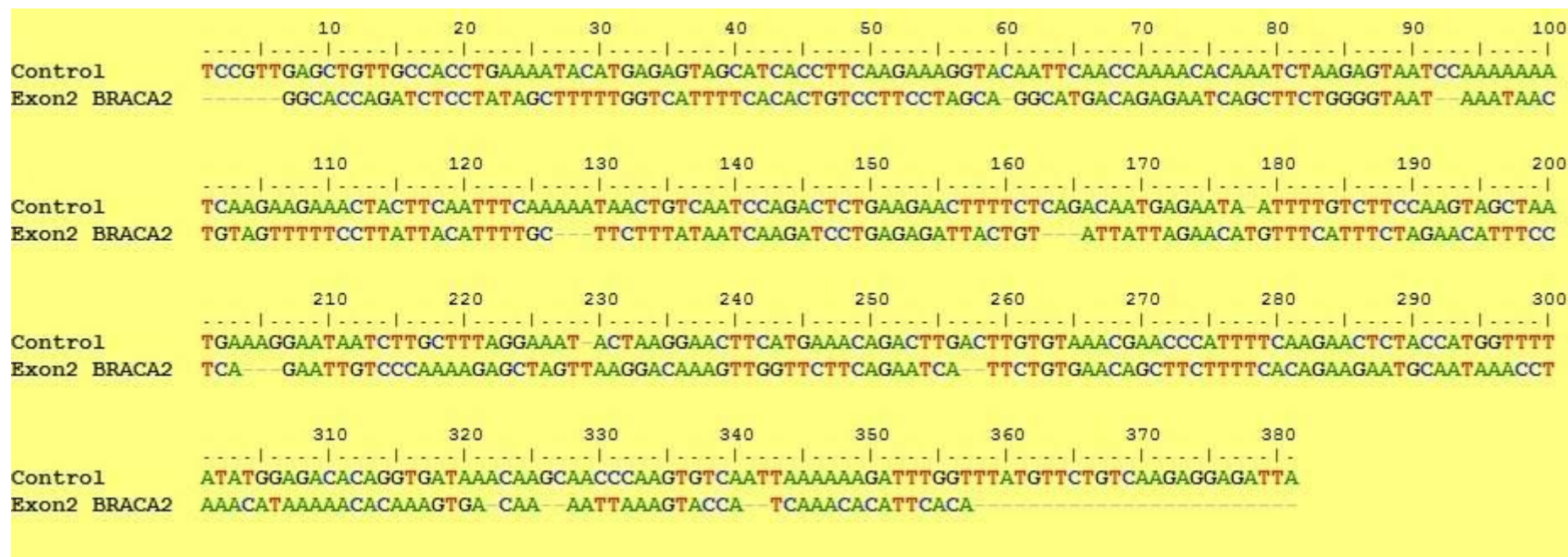
اما بالنسبة للصورة (4-7) تبين شكل اكسون 2 من جين BRCA2 المسبب لمرض سرطان الثدي حيث تبين النتائج في هذه الصورة شكل الجين لامرأة مصابة بالمرض و مقارنتها مع اخرى سليمة و ذلك من اجل معرفة عدد القواعد النتروجينية المفقودة والتي ادت الى حدوث الطفرات وظهور الاعراض على شكل ورم سرطاني في الثدي، ويعتبر اكسون 2 من جين BRCA2 الاكثر تواجدا ما بين النساء المصابات بالمرض في محافظة ديالى حيث وصل عدد القواعد المحذوفة نتيجة الطفرات الى 49 قاعدة نتروجينية حيث كان شكل هذا السكونس لامرأة يبلغ عمرها 62 سنة ولا يوجد لها تاريخ وراثي للمرض، حيث يلاحظ الحذف من بداية السكونس وصولا للموقع 10 وحذف ايضا في الموقع 91,92,93 والموقع 127,128,129 والموقع 163,164,165 والموقع 204,205,206 والموقع 257,258 والموقع 323 والموقع 328,329 والموقع 341 وحذف من الموقع 360 وصولا للموقع 380 للمرأة المصابة بالمرض وحذف ايضا في كل من الموقعين 178,229 للمرأة السليمة. ان الدراسات الجزيئية تبين مدى التقلبات التي تحدث نتيجة لتنشيط الجينات الكابتة للورم وتفعيل الجينات المسرطنة والتي عادة تؤدي الى حصول تبدلات في الهيكل العام للجينات التي تحافظ على شكل الحامض النووي DNA وبالتالي تتطور الى طفرات (Ueno وآخرون، 2012). والنسبة التالية تبين عدد طفرات الحذف:

$$\text{النسبة المئوية لعدد طفرات الحذف للمرأة المصابة} = 100 \times \frac{\text{عدد طفرات الحذف}}{\text{المجموع الكلي للتسلسل}}$$

$$12.89 = 100 \times \frac{49}{380}$$

$$\text{النسبة المئوية لعدد طفرات الحذف للمرأة السليمة} = 100 \times \frac{\text{عدد طفرات الحذف}}{\text{المجموع الكلي للتسلسل}}$$

$$0.52 = 100 \times \frac{2}{380}$$



شكل (4-7) مقارنة رصف القواعد النروجينية Alignment لأكسون 2 من جين BRCA2 بين امرأة سليمة وامرأة مصابة بسرطان الثدي من مجتمع

ديالى موضعا مواقع الطفرات النقطية بعد استخدام تقنية Single-Strand Conformation Polymorphsim

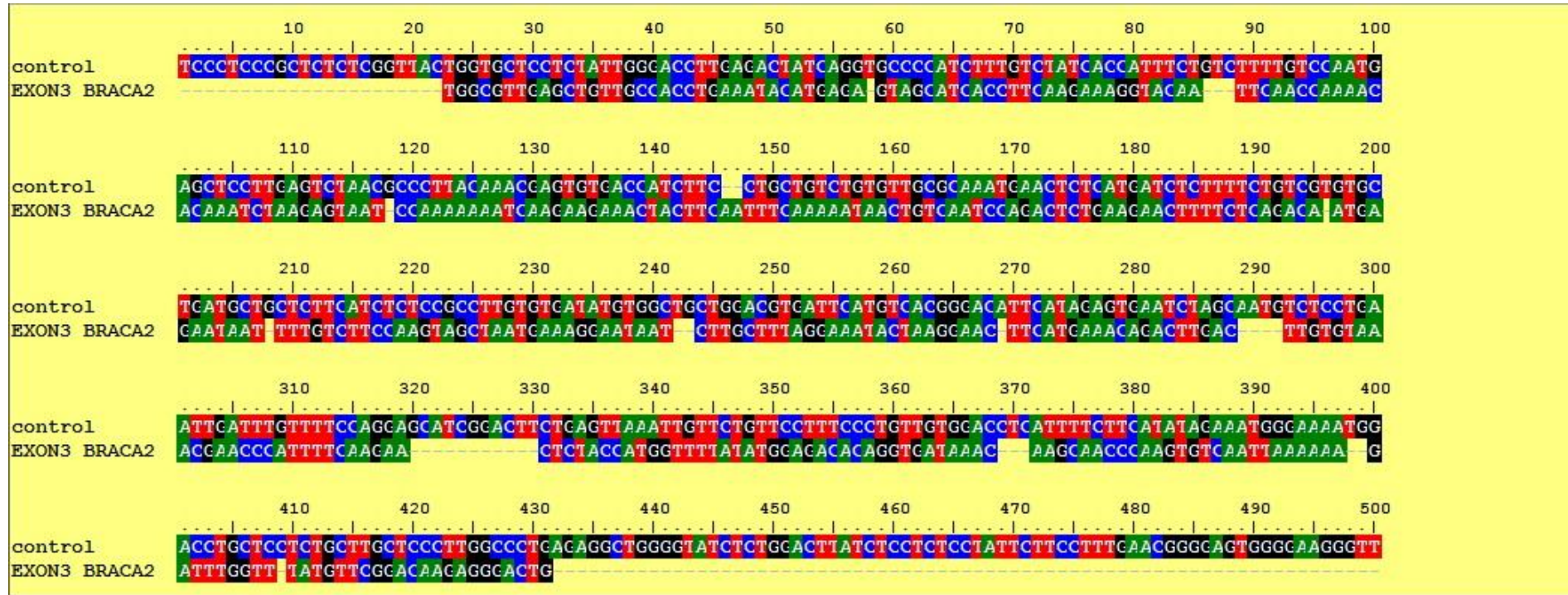
اما الصورة (4-8) توضح شكل اكسون 3 من جين BRCA2 والمسبب لمرض سرطان الثدي حيث نلاحظ في شكل هذا الاكسون اعداد القواعد النتروجينية المحذوفة لامرأة مصابة بالمرض عند مقارنتها مع اخرى سليمة حيث وصل عدد القواعد النتروجينية المحذوفة لهذا الاكسون 113 قاعدة نتروجينية ادت الى ظهور هذا النقص وتغيير شكل الاكسون وظهور الورم السرطاني في الثدي حيث بدأ الحذف من الموقع 20-10 وفي الموقع 58 وايضا الموقع 86 الى الموقع 90 وفي الموقع 118,196,206,242,269,290 ومن الموقع 320 وصولا للموقع 330 والموقع 370,399,409 ومن الموقع 440 وصولا للموقع 500 للمرأة المصابة وحذف ايضا في الموقع 146 والموقع 147 للمرأة السليمة. ان الكشف عن طفرات جين BRCA2 في النساء يجب ان يكون لديها على الاقل اثنين من اقارب الدرجة الاولى من سرطان الثدي حيث وصفت طفرات اكسون 11 والذي بدوره يتفرع الى كل من اكسون 1,3,5 حيث تبين انها تنشأ من كودون توقف في النيكليوتيدات 6885 والتي تسمى S2219X (Rozany وآخرون، 2005). والنسبة التالية توضح عدد طفرات الحذف للمرأة المصابة مقارنة مع المرأة السليمة:

$$\text{النسبة المئوية لعدد طفرات الحذف للمرأة المصابة} = 100 \times \frac{\text{عدد طفرات الحذف}}{\text{المجموع الكلي للتسلسل}}$$

$$22.6 = 100 \times \frac{113}{500}$$

$$\text{النسبة المئوية لعدد طفرات الحذف للمرأة السليمة} = 100 \times \frac{\text{عدد طفرات الحذف}}{\text{المجموع الكلي للتسلسل}}$$

$$0.4 = 100 \times \frac{2}{500}$$



شكل (4-8) مقارنة رصف القواعد النروجينية Alignment لأكسون 3 من جين BRCA2 بين امرأة سليمة وامرأة مصابة بسرطان الثدي من مجتمع

ديالى موضحا مواقع الطفرات النقطية بعد استخدام تقنية Single-Strand Conformation Polymorphsim

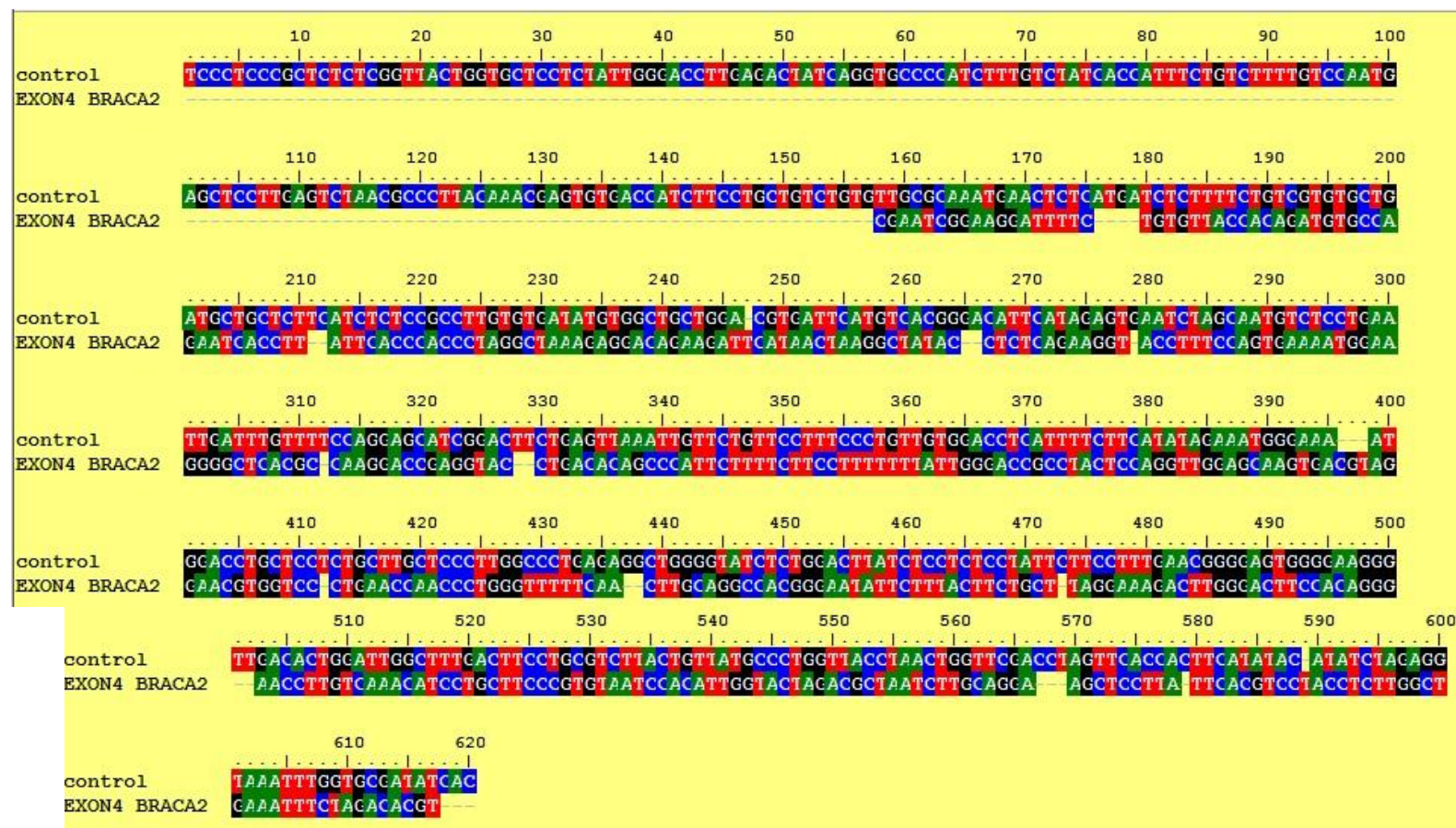
اما بالنسبة لأكسون 4 من جين BRCA2 حيث بينت الصورة (4-9) شكل هذا الأكسون حيث يعتبر الأكسون الأكثر تواجدا بين النساء المصابات بمرض سرطان الثدي في محافظة ديالى حيث بينت النتائج اشكال الحذف، اي القواعد النتروجينية المحذوفة بسبب الطفرات التي ادت الى حدوث هذا النقص في اعداد القواعد، حيث وصل اعداد القواعد النتروجينية المحذوفة الى 184 قاعدة نتروجينية ادى ذلك الحذف الى ظهور الجين بهذا الشكل عندما تمت المقارنة ما بين امراة مصابة بالمرض مع اخرى سليمة وعبر جين BRCA2 عن هذا الحذف على شكل طفرات ادى ظهورها على شكل ورم سرطاني في الثدي لامراة لا يوجد لها تاريخ وراثي للمرض حيث بدأ الحذف من الموقع 10 وصولا للموقع 160 وفي الموقع 176 وصولا للموقع 180 وايضا حذف في كل من المواقع 620,567,502,473,437,414,328,312,279,265,211 للمراة المصابة بالمرض وفي الموقع 297,298,589 للمراة السليمة. حيث بين (Ewald وآخرون، 2011) في نتائج دراسته ان الطفرات التي تحدث في تسلسلات جين BRCA1 وايضا جين BRCA2 هي عادة تكون طفرات نقطية اي طفرات الحذف والادراج التي تؤثر على عمليات الارتباط فتسبب حدوث النقطعات في تسلسل الجين. والنسبة التالية ايضا توضح طفرات الحذف التي تبينت في الصورة (4-8):

$$\text{النسبة المئوية لعدد طفرات الحذف للمراة المصابة} = 100 \times \frac{\text{عدد طفرات الحذف}}{\text{المجموع الكلي للتسلسل}}$$

$$29.67 = 100 \times \frac{184}{620}$$

$$\text{النسبة المئوية لعدد طفرات الحذف للمراة السليمة} = 100 \times \frac{\text{عدد طفرات الحذف}}{\text{المجموع الكلي للتسلسل}}$$

$$0.48 = 100 \times \frac{3}{620}$$



شكل (4-9) مقارنة رصف القواعد النروجينية Alignment لأكسون 4 من جين BRCA2 بين امرأة سليمة وامرأة مصابة بسرطان الثدي من مجتمع ديالى

موضحا مواقع الطفرات النقطية بعد استخدام تقنية Single-Strand Conformation Polymorphsim

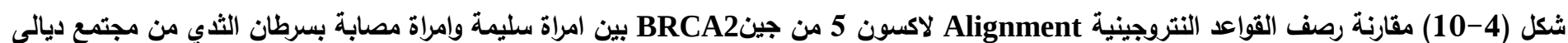
اما بالنسبة لأكسون 5 من جين BRCA2 توضح شكله في الصورة (4-10) حيث بينت نتائج السكونس لهذا الاكسون النقص الكبير وهو اكثر اكسونات جين BRCA2 حذفاً للقواعد النتروجينية حيث وصل عدد القواعد النتروجينية المحذوفة الى 203 قاعدة نتروجينية عندما تمت المقارنة ما بين امرأة مصابة بالمرض مع اخرى سليمة كمجموعة سيطرة حيث أن هذا العدد الكبير من طفرات الحذف لهذا الاكسون ادى الى حدوث خلل في وظائف جين BRCA2 وادى تعبير هذا الجين على شكل طفرات غير مسيطر عليها وظهورها على شكل ورم سرطاني في الثدي حيث بدأ الحذف من الموقع 46 والموقع 124,150,167,209,290,340 وحذف من الموقع 400 وصولاً للموقع 620 للمرأة المصابة وحذف في الموقع 26,88,113,114,277,397,398,399 للمرأة السليمة. حيث بين (Vander وآخرون، 2011) في نتائج دراسته، أن معظم التغيرات أي طفرات الحذف كانت واقعة على أكسون 11 من جين BRCA1 وأكسون 5 من جين BRCA2 ولكن من خلال نتائج دراستنا الحالية بينت النتائج أن معظم الطفرات أي الاكسونات الأكثر حذفاً للقواعد النتروجينية هو أكسون 5 وأكسون 20 من جين BRCA1 وأكسون 5 من جين BRCA2 حيث اظهرت النتائج لهذه الاكسونات الحذف الكبير في اعداد القواعد النتروجينية بصورة كبيرة وملفتة الامر الذي ادى في نهاية المطاف الى ظهور المرض في مراحله المتقدمة والنسبة التالية توضح عدد طفرات الحذف لكل من المرأة المصابة والمرأة السليمة:

$$\text{النسبة المئوية لعدد طفرات الحذف للمرأة المصابة} = 100 \times \frac{\text{عدد طفرات الحذف}}{\text{المجموع الكلي للتسلسل}}$$

$$32.74 = 100 \times \frac{203}{620}.$$

$$\text{النسبة المئوية لعدد طفرات الحذف للمرأة السليمة} = 100 \times \frac{\text{عدد طفرات الحذف}}{\text{المجموع الكلي للتسلسل}}$$

$$1.29 = 100 \times \frac{8}{620}$$



موضحا مواقع الطفرات النقطية بعد استخدام تقنية Single-Strand Conformation Polymorphsim

ان حدوث الطفرات لكل من جين BRCA1 و BRCA2 يؤدي الى انتاج البروتينات الغير وظيفية (Neamatzadeh وآخرون، 2015). لذلك فأن معظم الطفرات في جينات BRCA1 و BRCA2 تؤدي الى انتاج البروتينات المتقطعة الالاقيمة لها ذات الهيكل المتحول والوظيفة المتحولة ويؤدي ذلك كله الى انتاج الطفرات (Pchreich وآخرون، 2005). لذلك فأن وظيفة كل من جين BRCA1 وجين BRCA2 هي المشاركة في العمليات الحيوية للخلية مثل تنظيم عملية النسخ وايضا المحافظة على استقرار الكروموسومات وايضا الموت الخلوي المبرمج (Yoshida وآخرون، 2004). اي ان حدوث اي خلل في وظيفة تلك الجينات بسبب طفرة او اي عامل اخر يؤدي ذلك الى فقدان تلك الجينات لوظيفتها وانتاج البروتينات المتقطعة وايضا عدم السيطرة على انتشار وتكاثر الخلايا العشوائي وبالتالي ظهور الورم السرطاني.

يبين الجدول (4-24) توزيع الطفرات الخاصة بأكسونات جين BRCA1 والمسبب لمرض سرطان الثدي والذي يشمل اكسون كل من (2,20,11,3,5) حسب الاقضية لمحافظة ديالى ابتداء من قضاء بعقوبة وصولا الى قضاء خانقين حيث بينت نتائج هذه الدراسة الطفرات الظاهرة والغير ظاهرة حيث ان اكسون 2 ظهر في كل من قضاء بعقوبة و قضاء بلدروز وقضاء المقدادية ولم يظهر في قضاء كل من الخالص وخانقين، اما اكسون 20 ظهر في قضاء بعقوبة وبلدروز والخالص والمقدادية ولم يظهر في قضاء خانقين، اما بالنسبة لأكسون 11 حيث ظهر في قضاء كل من بعقوبة و بلدروز ولم يظهر في كل من قضاء الخالص والمقدادية وخانقين، اما اكسون 3 ظهر في قضاء بلدروز وقضاء المقدادية ولم يظهر في قضاء بعقوبة و الخالص وخانقين، اما الاكسون الاخير وهو اكسون 5 ظهر في قضاء بلدروز وقضاء المقدادية ولم يظهر في قضاء كل من بعقوبة و الخالص وخانقين.

جدول (4-14) توزيع الطفرات الظاهرة والغير الظاهرة لجين BRCA1 المسببة لمرض

سرطان الثدي تبعا للأفضية السكنية في محافظة ديالى

نوع الطفرة	خانقين	الخالص	المقدادية	بلدروز	بعقوبة
	% NP NT	% NP NT	% NP NT	% NP NT	% NP NT
Exon2	0 0 1	0 0 5	14 1 7	40 2 5	18 6 32
Exon20	0 0 1	20 1 5	14 1 7	40 2 5	18 6 32
Exon11	0 0 1	0 0 5	0 0 7	40 2 5	25 8 32
Exon3	0 0 1	0 0 5	28 2 7	20 1 5	0 0 32
Exon5	0 0 1	0 0 5	28 2 7	20 1 5	0 0 32

NT: العدد الكامل للعينات

NP: العينات التي ظهرت بها الطفرات

اما بالنسبة للجدول (4-15) يوضح توزيع الطفرات الخاصة بأكسونات جين BRCA2 والمسبب لمرض سرطان الثدي والذي يشمل اكسون كل من (2,4,1,3,5) ايضا بدءا من قضاء بعقوبة وصولا الى قضاء خانقين حيث بينت نتائج هذا الجدول ان اكسون 2 من هذا الجين ظهر في قضاء بعقوبة وقضاء المقدادية وقضاء الخالص ولم يظهر في قضاء كل من بلدروز وخانقين، اما اكسون 4 ظهر في قضاء كل من بعقوبة والمقدادية والخالص ولم يظهر في قضاء خانقين وقضاء بلدروز، اما اكسون 1 ظهر في قضاء بعقوبة وقضاء بلدروز وخانقين ولم يظهر في كل من قضاء المقدادية وقضاء الخالص، اما بالنسبة لأكسون 3 حيث ظهر في قضاء بعقوبة وقضاء الخالص ولم يظهر في كل من قضاء المقدادية والخالص وخانقين، اما اكسون 5 حيث بينت النتائج ظهوره في قضاء بعقوبة فقط ولم يظهر هذا الاكسون في كل من قضاء المقدادية والخالص وبلدروز وخانقين.

جدول (4-15) توزيع انواع الطفرات الظاهرة والغير الظاهرة لجين BRCA2 المسببة لمرض سرطان الثدي تبعا للاقضية السكنية في محافظة ديالى

نوع الطفرة	خانقين	الخالص	المقدادية	بلدروز	بعقوبة
	% NP NT	% NP NT	% NP NT	% NP NT	% NP NT
Exon2	0 0 1	40 2 5	28 2 7	0 0 5	6 2 32
Exon4	0 0 1	20 1 5	14 1 7	0 0 5	8 6 32
Exon1	10 1 1	0 0 5	0 0 7	20 1 5	9 3 32
Exon3	0 0 1	0 0 5	0 0 7	20 1 5	12 4 32
Exon1	0 0 1	0 0 5	0 0 7	0 0 5	6 2 32

تبين نتائج الجداول (4-14) (4-15) ان قضاء خانقين هو اكثر الاقضية قلة للعينات وذلك نظرا لبعد المسافة عن قضاء بعقوبة وصعوبة اجراء الفحوصات واخذ التدابير اللازمة. تبين النتائج الاختلافات الجغرافية لسرطان الثدي اي هو المرض الذي يحدث تحت تأثيرات كل من اختلاف الظروف البيئية ونمط الحياة وقد بينت العديد من الدراسات الوبائية عوامل الخطر الغير وراثية المسببة لمرض سرطان الثدي والتي تختلف فيما بينها وتشمل: التعرض للإشعاع، السمنة، انقطاع الطمث بصورة مبكرة، النشاط البدني، طبيعة الحياة المستقرة، مدى احتواء النظام الغذائي على الدهون، التحضر، استخدام العلاج بالهرمونات البديلة، اختلاف الظروف الاقتصادية والاجتماعية، غياب الرضاعة الطبيعية، ايضا مدى كثافة الثدي والتاريخ العائلي من سرطان الثدي. (Tereschenko وآخرون، 2002)

الفصل الخامس

الاستنتاجات والتوصيات

Conclusion and Recommendation

5-1 الاستنتاجات Conclusion

1. استخدام تقنية Single-strand conformation polymorphism وهي تقنية بسيطة و سريعة للكشف عن الطفرات النقطية لجين BRCA1 وجين BRCA2 المسببة لمرض سرطان الثدي.
2. كان التوزيع الجغرافي لطفرات BRCA في محافظة ديالى بحسب المناطق الجغرافية حيث كان قضاء بعقوبة هو اكثر الاقضية تواجدا للطفرات المسببة لمرض سرطان الثدي والتي تشمل كل من جين BRCA1 وجين BRCA2 يأتي بعدها قضاء المقدادية تم قضاء الخالص وبلدروز واخيرا قضاء خانقين حيث كان اكسون 20,11 من جين BRCA1 واكسون 2,4 من جين BRCA2 الاكثر تواجدا من بين الاكسونات واكسون 5من جين BRCA1 واكسون 5 من جين BRCA2 هما اكثر الاكسونات حذفاً للقواعد النتروجينية.
3. لوحظ ان طفرات الحذف هي اكثر انواع الطفرات شيوعا في كل من اكسونات جيني BRCA1 و BRCA2 في النساء المصابات بمرض سرطان الثدي في مجتمع ديالى بعد عمل التسلسل التتابعي للجينين.
4. ارتفاع كل من هرموني T3 و T4 وانخفاض هرمون TSH،ارتفاع في قيم مؤشرات وضائف الكلى لكل من الجلوكوز واليوريا والكرياتتين، عدم وجود فرق لكل من الدهون عالية الكثافة والدهون الثلاثية وانخفاض في كل من الكوليسترول والدهون واطئة الكثافة،عدم وجود فرق معنوي لكل من كريات الدم البيضاء والصفائح الدموية والهيموكولبين ومعدل تكس كريات الدم الحمراء عدا كريات الدم الحمراء اظهرت فرقا بسيطاً.

2-5 التوصيات Recommendation

1. ضرورة اجراء دراسات اخرى لأنواع جديدة من الطفرات باستخدام تقنية SSCP وذلك من اجل الكشف عن انواع الطفرات الجديدة في جينات اخرى مسببة لمرض سرطان الثدي.
2. تسليط الضوء على جينات BRCA1 و BRCA2 في المجالات البحثية لما تسببه هذه الجينات من سرطانات اخرى غير سرطان الثدي.
3. ضرورة اهتمام المرأة بالكشف المبكر عن سرطان الثدي واجراء فحص الثدي الدوري لكل امرأة بلغت من العمر 25 سنة فما فوق
4. اجراء دراسة شاملة على مستوى العراق ككل واستخدام نفس التقنية ونفس اكسونات الجينين BRCA1 و BRCA2

المصادر

Reference

(A)

- **Ahmadian, A; Pettersson, E. and Lunderberg, j . (2009).**generation of Sequencing technologies genomics, 93 (2): 105-11.
- **Ahn, J; Schatzkin, A; Lacey, JV; Albanes, D; Ballard-Barbash ,R; Adams,KF;Kipnis,V;Mouw,T;Hollenbeck,AR;Leitzmann,MF. (2007) .**Adiposity, adult weight change, and postmenopausal breast cancer risk. Arch Intern Med 167: 2091–2102.
- **Anderson, W. f; Pfeiffer, R.M ; Dores, G.M. and Sherman ,M .E. (2006) .**Comparison of age distribution patterns for different histopathology types of breast carcinoma. Cancer epidemiol. Bio Markers prev; 15: 1899-1905.
- **Anisimov, VN.(2010).** Metformin for aging and cancerprevention. Aging (Albany NY); 2:760-74PMID:21084729;
- **Antonion, AC; Gayther , SA; Stratton . j ; Pander, BA; Easton, Df . (2000) .**Risk Models for Familial a varian and breast cancer. Genetic epidemiology; 18 (2): 173-90.
- **Antonion, A ; Pharoah , P.D; and Narod,S. (2003).** Average risks of breast and ovarian Cancer associated with BRCA1 and BRCA2 Mutation detected in case series un selected for family history. A Combind analysis of 22 studies AMJ Hum Genet. 72(5): 1117-30
- **Anderson , W.f; Pfeiffer, R.M; Dores , G.M and Sherman M.E. (2006).** Comparison of age distribution patterns for different histo pathologic. Types of breast carcinoma Cancer epidemiol. Biomarkers prev; 15: 1899-1905.
- **Agrawal, K.H. and Rajderkar, S.S. (2012).** Clinico-epidemiological profile offemale breast cancers and its important and correlates: A hospital based study. National J. Community Medicine, 3: 3316-3320.
- **Agnoli, C ; Berrino, f ; Abagnato, CA. (2010).** .Metabolic Syndrome and Post menopausal breast cancer in the ORDET cohort: oneseted Case-Control study- Nutr Metab Cardio Vasc Dis. 20 (1) : 41-8 dor 10-1016

- **Armin Kubelbeck.(2007)** self-made with Inkscape. Derived from SVG-Masterfile..
- **Amir,M and Mansoureh,A.(2016).** The Importance of BRCA1 andBRCA2 gene mutations in breast cancer development. Review article.<http://mjiri.jums.ac.ir>.medical journal of the islamic Repuplic of iran.
- **Ayub, SG; Rassol, S; Ayub, T; Khan, SN; wani , KA; Andrabi, KI. (2014).** 'Mutational analysis of the BRCA2 gene in breast carcinoma patients of kashmir descent Molecular Medicine reports, (2): 749-53 .

(B)

- **B.Campos;O.Diez;M.Domenech;M.Baena;C.Pericay;J.Balmana;E.de l. Rio;J.Sanz;C.Alonso&M.Baiget.(2001).**BRCA2 Mutation analysis of 87 spanish breast _ovarian cancer family.
- **Bageman, A. (2008).** .Genetic Polymorphisms in breast Cancer in relation to risk and prognosis. Thesis Ph.D Lund University, Lund , Sweden. PP. 85.
- **Bambace, NM; Holmes ,CE(2011).** The platelet contribution to cancer progression. J Thromb Haemost.;15:237–249. doi: 10.1111/j.1538-7836.2010.04131.x. [PubMed] [Cross Ref
- **Bani , TA; Williams, C.M; Bouter, P.S; Dickers on, J.W.T. (1986).** ".plasma lipids and prolactin in Patients with breast Cancer. Br.J cancer, 54L439-446.
- **Bartlett, S. M. S. and Stirling, D. (2003)** .A short History of the polymerase Chain Reaction". PCR protocols- 226. PP.3-6.
- **Beebe – Dimmer JL; yee, Cote, ML; petrucelli, N; palmer, N; Bock,C; Lane,D;Aqalliu,I;Stefanick,ML;Siman,MS. (2015).** familial clustering of breast and prostate Cancer and risk of postmeno pausal breast cancer in the women health ini ta ative study; /2/ 98): 1262-72.
- **Benson, j .R; Weaver .D.L; Mittra, I and Hayashu, M. (2003).** The TNM staging system and breast cancer. L-ancet oncol, 4. 56-60.

- **Bertolo, C; Guerrero, D, Vicente,f ; Cordoba, A; Esteller, M; Roperro, S; Guillen- Grima, f ; Martinez- Penuela, J-M. and Lera, L.M. (2008).** Differences and Molecular Immuno his to chemical parameters in the subtypes of infiltrating ductal breast cancer. AM.J.Clin. Pathol; 130:414-424.
- **Boris Pasche. (2010).** Cancer Genetics.Publisher: (2010):ASIN:BO15
- **Bray, f; Ren, J.; Masuyer and E; ferlay, J. (2012).** Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008 . int. . Cancer, 132:1133-1145.
- **Breast cancer Screening. Lyon france , I AR C press , 2002.**
- **B.Weigelt and J.S. Reis- filho. (2010) .** Molecular profiling currently offers no more that tumor Morphology and basic Immuno histo chemistry. breast cancer Resereach, Vol 12, no, 11.
- **Blanco ,A; Brana ,B; fachal, L; Santa marina, M; Came selle –Teijeir . j; Ruiz-Ponte, C; Carracedo, A and Vega , A. (2010).** Beyond BRCA1 and BRCA2 wild- type. Breast and /or ovarian Cancer families: germ line Mutations in TP53and TEN. Clin- Gene; 77:193-196.
- **Burns, R; Azizi ,F; Hedayati ,M; Miamian ,PO; Herlihy, C; Smyth P\PPA.(2011).** Does placental iodine storage compensate for low maternal iodine intake? Clin Endocrinol.;75(2):261-264. doi: 10.1111/j.1365-2265.2011.04039.x.

(C)

- **Camidge, R; Price ,A. (2002).** Radiation recall dermatitis may represent the Koebner phenomenon. J Clin Oncol 20(19):4130 author reply 4130
- **Caldern- Garciuenas Al; Ruiz-flores P; Cerda- flores, RM; Barrera-Saldana, HA (2005) .**Clinical follow of Mexican women with early onset of breast Cancer and Mutations in the BRCA 1 and BRCA2 gene. Sakud publica de Mexico, 47(2): 110-5 .
- **Carroll ,KK(1977).** Dietary factors in hormone-dependent cancers. Curr Concepts Nutr. ;6:25–40.[[PubMed](#)]

- **Carlson , RW; Allred DC; Anderson, 130; Burstein, Hj; Crter, WB; Edge, SB; Erban, JK; Farrar, WB; Goldstein, Lj; Gradi Shar, Wj; Hayes, Df; Hudis, CA; Jahanzeb, M; Kiel, K; L Jung, BM; Marcom, PK ; Reed, EC; Smith, ML; Somlo, G; theriant, RL; Topham, NS; ward, JH, (2009).**Breast Cancer clinical practice guidetine inoucbl.org.
- **Campean, PM; foalkes, WD; Tischkowits, MD. (2008).** Hereditary breast Cancer; New genetic developments, new the rapeutic avenues. Human Genetic: 124(1): 31-42.
- **Chappell ,J; Leitner ,JW; Solomon, S; Golovchenko, I; Goalstone,ML; Draznin, B.(2001).** Effect of insulin on cell cycle progression in MCF-7 breast cancer cells. Direct and potentiating influence. J Biol Chem. ;276(41):38023–8.
- **Chang, R; Wong, GY.(1991).** Prognostic significance of marked leukocytosis in hospitalized patients. J Gen Intern Med. ;6:199–203.
- **Chanim ,A. (2009).** Amolecular study of Loss of Heterozygosity in tissue Samples Isolated from breast cancer patients in Relation with Their sex Hormones status .M. Sc. Thesis Baghdad university. P.102.
- **Chen ,HF; Liu, MD; Chen ,P; Chen, LH; Chang ,YH; Wen, PC;YiLi,CH. (2013).** Risks of breast and endometrial cancer in women with diabetes: a population-based cohort study. PLoS One. ;8(6) doi: 10.1371/journal.pone.0067420. [PMC free article] [PubMed] [Cross Ref]
- **Cheng ,Sy; Leonard, JL; Davis, PS. (2010) .** Molecular aspects of thyroid hormone actions. Endocrinol Rev; 21 (2): 139-170 doi: 10/2/0/er .
- **Chen, parmigiani G.(2007) .**Meta- analyss of BRCA1 and BRCA2 penetrance. 25 (11)1329-1333.
- **Chen, W; pan, K; ougang , T; Li, j; Wang, T; fan, Z; Li,E. (2009).** BRCA1 germ line Mutations and tunor Characteristics in chinese women with familical or early-onset breast cancer. Breast cancer research and threat Ment; 117(1): 55-60.
- **Cristo fanilli ,M; yamamura, J; Beverssw storms, T; patangun, M; Rishna, Murthys. (2005) .**Thyroid hormone and breast carcinoma,

primary hypothyroidism is associated with are duced Incidence of breast carcinoma. cancer 103 (6). 112-1128- doi:10 : 1002/cnrcr. 2088/

- **Colditz, GA; Kaphingst, KA;Hankinson, SE; Rosner, B.(2012).** Family history and risk of breast cancer: nurses' health study. Breast Cancer Res Treat; 133: 1097-1104 [PMID: 22350789]
- **Couch, FJ; Nathan son, KL; Offit, K. (2014) .** Two decades after BRCA: Setting paradigms inpersonalized cancer care and prevention: 343: 1466-1470.
- **Cramer, JA; Roy, A; Burrell, A; Fairchild,CJ;Fuldeore,MJ;Ollendrof,DA;Wong,PK. (2008)** .Medication Compliance and persistence: Terminology and Definitions value Health ; 11 (1) 44-7.
- **C.satirious and L, pusztai. (2009) .**Gene expression signatures in breast cancer. the new England journal of Medicine, vol 360, no8 pp.752-800.

(D)

- **Dandona ,P; Thusu ,K; Cook, S; Snyder, B; Makowski ,J; Armstrong ,D; Nicotera ,T.(1996).** Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. Lancet. ;347:444–5.
- **Daniels, VW; smans, K; Royaux, I; Chyper,M;Swinnen,JV;Zaidi,N. (2014).** Cancer cells differentially activate and thrive on denovo liped synthesis path ways in low-lipid environment –Plos one , (9): e106913. doi:/0.1371/ journal. Pone 0106913.
- **Dardonk, K. (2014).** .Molecular detection of breast cancer susceptibility genes. (BRCA1 / BRCA2) in Palestine. M.S.C. thesis Nablus Palestine 78P.
- **Dave, B. and chang, J.C. (2009).** Treatment in stem cells and breast cancer. J. Mammary Gland. Biol. Neoplasia, 14:79-82.
- **Davies ,TF(1994).** The thyrotrophin receptors spread themselves around. J Clin Endocrinol Metabol. ;79:1232–1238
- **D. ford; D.F Easton; M .Stratton; S. Narod; D. Goldgar; P. Devilee; D.Tbishop B.Weber;G.Lenoir;J.Chang-**

- Claude;H.Sobol;MD.Teare;J.Struewing;A.Arason;S.Scherneck; J.Peto;S.Neuhausen;R.Barkardottir;J.Eyfjord;H.Lynch;BA.Ponder; SA.Gyther;M.Zelada-Hedman. (1998).** Genetic. Heterogeneity and penetrance of the BRCA1 and BRCA2 Genes in breast cancer families.
- **Devi, LI; Ralte ,L; Ali ,MA.(2015).** Serum Biochemical Profile of Breast cancer patients. European Journal ofPharmaceutical and Medical Research.;2(6):210-214.
 - **Doi, K. (2004)** .High – through put single nucleotide polymorphism typing by fluorescent single- strand , conformation polymorphism analysis with Capillary electrophoresis . Electrophoresis 25, 833-838.
 - **Dolinsky, C. (2002).** Breast caner: The basics [Internet] .
 - **Dufloth, RM; Carvalho, S; Heinrich ,JK; Shinzato ,JY; Dos Santos, CC; Zeferino, LC; Schmitt ,F.(2005).** Analysis of BRCA1 and BRCA2 mutations in Brazilian breast cancer patients with positive family history. Sao Paulo Med J. ;123:192–197. doi: 10.1590/S1516-318020050000.
 - **Dumont ,JE; Maenhaut ,C.(1991).** Growth factors controlling the thyroid gland. Baillieres Clin Endocrinol Metabol. ;5:727–753.
 - **Dutil, J; Colon – Colon. JL; Matta, JL; Sutphen, R; Echenique, M. (2012).** Identification of the prevalent BRCA1 and NRCA2Mutation in the female population of puer to Rico. Cancer genetics; 205(5) : 242-8.
- (E)**
- **E, Gross;N, Arnold;J, Goette;U ,Shwariz ;Boeger;M ,Kiechle. (1999).** Acomparison of BRCA1 and BRCA2 mutation analysis by sequencing SSCP,DHPLC.
 - **EL- Zaemey, S; Nagib, N; fritschic, L; and Heywor th, J . (2012)** .Breast cancer among yemen : women using the national oncology centre Registry 2004- 2010 cancer epidemiol; 36:249-253.
 - **E. Bclaus; N. Risch and D. Thompson. (1991).** Genetic analysis of breast cancer in the cancer and steroid hormones study" The American journal of Human genetics, vol 48, no. 2, pp-232-242.

- **Ewald, IP; Izetti ,P; Vargas, FR; Moreira ,MA; Moreira, AS; Moreira-Filho, CA; Cunha, DR; Hamaguchi ,S; Camey, AS; Schmidt,A;Caleffi,M;Koehler-Santos,P;Giugliani,R;Ashton-Prolla,P.(2011).** Prevalence of the *BRCA1* founder mutation c.5266dup in Brazilian individuals at-risk for the hereditary breast and ovarian cancer syndrome. *Hered Cancer Clin Pract.* ;9:12.

(F)

- **Ferlay, j; shin, H; bary, f; Forman , D; mather, C; Parkin, D. (2010).**Cancer Incidence and Mortality worldwide In. IARC cancer Base No.1 (version 2.0) .
- **Ferlay, J; Bray ,F; Pisani, P; Parkin, DM.(2001).** GLOBOCAN: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide IARC Cancer Base No 5 [10] Lyon, France: IARC;.
- **Ferlay ,J; Shin ,HR; Bray, F; Forman, D; Mathers, C;Parkin, DM(2008).** Estimates of worldwide burden of cancer in: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer.* **2010;127:2893–917**
- **Ford, D; Easton, DF;Stratton, M.(1998).** Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the *BRCA1* and *BRCA2* genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet* ;62:676–689.
- **Fine,MJ;Auble,TE;Yealy,DM;Hanusa,BH;Weissfeld,LA;Singer,DE; Coley,CM;Marrie,TJ;Kapoor,WN.(1997).**Aprediction rule to identify low-risk patients with community-acquired pneumonia
- **Frank, B; hemminki, K; meindl, A; and wappen suchidt, B. (2007).** BrIP1 Risk : a case- control studt *BMC. Cancer.* 7:83.
- **Friedenson, B. (2005).** "BRCA1 and BRCA@ pathways and risk of cancers other than breast or ovarian. *Med Gen Med.* , 7:60.
- **Furberg, AS; Veierod, MB; Wlisgaard, T;Bernstein,L;Thune,I. (2004).** serum high-density lipoprotein cholesterol, metabolic profile and breast cancer risk. *J Natt cancer Inst.* 96 (15) 1152-60 doi: 10./093/Jnci/jj 216.

- **Francies,FZ;Wainstein, T;De Leeneer, K; Cairns, A; Murdoch, M;Nietz ,S; Cubasch, H; Poppe ,B; Van Maerken, T; Crombez ,B; Coene, I; Kerr, R; Slabbert, JP;Vral ,A; Krause, A; Baeyens, A; Claes, KB. (2015).** BRCAL and BRCA2. and PALB Mutation and ChEK2 e. 1100del clin different south African ethnic groups diagnosed with premeno pausal and or triple negative breast cancer .

(G)

- **Gaber, J.E. and offit , K . K . (2005).** Hereditary cancer predisposition syndromes.j. clin- oncol; 23: 276-292 .
- **Garcia, MJ; benitez ,J. (2008).** The fanconi anaemia / BRCA pathway and cancer Susceptibility. 10:78-84.
- **Garber ,K(2004).** Energy boost: the Warburg effect returns in a new theory of cancer. J Natl Cancer Inst. ;96(24):1805–6. [[PubMed](#)]
- **Garnis, C., Buys, T., and Lam, W.L. (2004).** Genetic alteration and gene expression modulation during cancer progression. Molecular Cancer, 3: 9-56.
- **Gartner, R; Hensen ,MB; Nielsen, J; Ewertz ,M; Kroman, N; Kehlet, H. (2009).** Prevalence of and factors associated with persistent pain following breast cancer surgery. JAMA. , 302:1985-1992.
- **Gasser, R.B; Hu, M; Ans EL- osta, Y.G; Zarlenga, D.S.Pozio, E. (2004)** .Non-isotopic single-strand conformation Polymorphism analysis of sequence variability in ribosomal DNA expansion segments within the genus Trichinella (Nematod: Adenophora) Electrophoresis 25 , 3357-3364.
- **Giani ,C; Fierabracci ,P; Bonacci ,R; Gigliotti , A; Campani ,D;DeNegri, F; Cecchetti ,D; Martino, E; Pinchera ,A.(1986).** Relationship between breast cancer and thyroid disease: relevance of autoimmune thyroid disorders in breast malignancy. J Endocr Metab. ;81:990–994.

- **Goodwin, PJ.(2008).** Host-related factors in breast cancer: an underappreciated piece of the puzzle? J Clin Oncol; 26:3299-300; PMID:18612145; <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2008.16.3299>.
- **Goodwin ,PJ; Ligibel ,JA; Stambolic V.(2009).** Metformin. Goodwin PJ, Ligibel JA, Stambolic V. Metformin 2009; 27:3271-3; PMID:19487373; <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2009.16.3271>
- **Gronwald,J; Byrsk, T; Huzarsk, T; Oszurek, O; Janicka, A; Szymanska- Pasternak, J; Gorsk, B; Menkiszak ,J; Rzepka- Gorska, I ; Lubinski, L. (2008).** Hereditary cancer in Clinical practice , 6:88-98.
- **Gruber ,CJ; Tschugguel, W; Schneeberger, C;Huber,JC . (2002).** Production and actions of estrogens. N. Engl J med: 346 (5): 390-52 doi: 10.1056/NEJmra000471.
- **Gudmundsson, j; Jahnsson, G; Bergthorsson, JT , Arason , A; Ingvarsson , E; Gilsson, V. (1995).** Different tumor types from BRCA2 Carriers show wild type. Chromosome deletions on 13p12-13. Cancer research 55:4830-2.
- **Gulaboglu ,M; Borekci ,B; Halici, Z.(2007).** Placental tissue iodine level and blood magnesium concentration in pre-eclamptic and normal pregnancy. Int J Gynaecol Obstet. 2007;98:100-105. doi:10.1016/j.ijgo.2007.03.047.
- **Gustbee, E; Tryggvadottir , H; Markkula, A; Simonsson,M; Nodin,B; Jirstom,K; Rose,C; Ingvar,C; Borquist,S; Jernstrom,H.(2015).** Tumor specific expression of HMG-CoA reductase in cancer patients: BMC Clin Pathol, 15:8 . doi:10.1186/s12907-015-0015-1.
- **Guyton ,A. C; and Hall. G.E (2000).** Textbook of Medical physiology, 10th ed, W.B. Saunders company, P, S.6.
- **Gaber, J.E. and Offit , K , K . (2005).** Hereditary cancer predisposition syndromes. J. Clin. Oncol; 23: 276-292.

(H)

- **Hana Han, D; Weinberg, RA. (2011).** Hallmarks of cancer: the next generation call, 144 (5): 646-74. doi: 10.1016/j.jcell.2011.05.002.

- **Harris, w. (2013).** How BrCA Genes work.
 - **Hayashi, K. (1996)** .in Laboratory protocols for mutation Detection (Londergren, U. ed) Oxford university press, New York, P.P. 14-22.
 - **Hayashi, K. (1991)** .PCR- SScp: asimple and sensitive method for detection of Mutations in the genomic. DNA. PCR meth. APPL.1.34-38.
 - **H, Honder Marck; A svercouter Edouart; f, Revillion. (2001)** .Proteomics of breast cancer for Marker discovery and dingle. Pathway profiling" proteomics, vol.1. no11p.p.
 - **Hedau, S; Jain, N; Husain ,SA;Mandal,AK;Ray,G;Shahid,M;Kant,R; Gupta,V;Shukla,NK;Deo,SS;Das,BC.(2004).** Novel germline mutations in breast cancer susceptibility genes BRCA1, BRCA2 and p53 gene in breast cancer patients from India. Breast Cancer Res Treat. ;88:177–186. doi: 10.1007/s10549-004-0593-8.
 - **Hickish ,T; Astras ,G; Thomas ,P; Penfold ,S; Purandare, L. (2009).** Glucose intolerance during adjuvant chemotherapy for breast cancer. J Natl Cancer Inst 101: 537.
 - **Hickish, T; Astras, G; Thomas ,P; Penfold ,S; Purandare, L; Hickish TF.(2009).** Glucose intolerance during adjuvant chemotherapy for breast cancer. J Natl Cancer Inst. ;101(7):537. doi: 10.1093/jnci/djp025.
 - **Hoffbrand, AV; Lewis ,MS; Tuddenham ,ED(2001).** Postgraduate Haematology. 4th edition. Oxford Press2001. p. 19.
- Hortobagyi GN1, de la Garza Salazar J, Pritchard K, Amadori D, Haidinger R, Hudis CA, Khaled H, Liu MC, Martin M, Namer M, O'Shaughnessy JA, Shen ZZ, Albain KS; ABREAST Investigators. (2005).**the global breast cancer burden: Variqtions Epidemiology and survival clin Breast cancer .
- **Howard- Anderson, j; Ganz, PA; Bower, JE; stanton, AL. (2012)** .Quality of life, fertility concerns and behavioral health out comes in younger breast cancer Survivors : a systematic review. J. Natl cancer inst., 104: 386-405.
 - **Howlader, N; Noone , AM; Krapchom. (2013).** Seer cancer statistics Review 1975- 2011.

- **Howlader, N; Noone , AM; Krapchom. Om. (2013).**Seer cancer statistics Review 1975- 2010. Be the Sda, MO. National cancer Institute .
- **Hsu, NC; Huang, yf; Yokoyami, K. K; Chu, Py; Chen, fM; Houm, f. (2013).** methylamine of BRCA1 Promoter region is associated with unfavorable prognosis in women with early- stage breast cancer Plos one. 89 e56256.

(I)

Iraqi Cancer Registry, Iraqi Ministry of Health, 2002. Novel binding functions of mutant *p53* in breast cancer cell. Genes and development, 14: 397-402.

(J)

- **Jamal, A.A., (2001).** Pattern of breast disease in a teaching hospital in Jeddah Saudi Arabia. Saudi Med. J., 22: 110-113.
- **Jan. (2007) .** UK cancer incidence statistics by age"
- **Jan Carkov, N; Zikan, M; pohreich, P; freitage, P; Matous, B; Zivny, J. (2003).** Detection and occurrence of BRCA1 gene mutation in patients with carcinomo of the breast and ovary. Ceska gyne Kologie/ Ceska lekarska spolecnost J Ev Pur Kyne; 68(1). 11-6.
- **Jato; , I; Proshan, MA. (2009) .**Randomized trials of breast-Conserving the rapy versus Mastectomy analysis of updated resulhs. AM.J. Clin. Oncol, 28:289-294.
- **Jiralerspong, S; Palla, SL; Giordano, SH; Meric-Bernstam ,F; Liedtke ,C; Barnett, CM; Hsu, L; Hung,MC; Hortobagyi , GN; Gonzalez-Angulo ,AM.(2009).** Metformin and pathologic complete responses toneoadjuvant chemotherapy in diabetic patientswith breast cancer. J Clin Oncol; 27:3297-302; PMID:19487376; <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2009.19.6410>
- **Josefson, D.(2000).** High insulin levels linked to deaths frombreast cancer. BMJ; 320:1496; PMID:10834888

- **Jumaah, D. (2013).** Molecular Detection of Mutations in BRCA1 , BRCA2, K-Ras and P1K3CA Genes in Iraqi breast cancer patients and their families. PH. D thesis. Baghdad university. P.P.79.

(K)

- **Kaji, H. (2013).** High-density lipoproteins and the Immune system j Lipids,: 684903.
- **Key, T; Appleby, P; Barnes, I ;Reeves,G. (2002).** Endogene nous sex hormones and breast cancer in postmeno pausal women. Reanalysis of nine prospective studies. J Natal cancer trust. 94 (8): 606-16.doi: 10-10931.
- **King, M.C.; Wieand, S; Hale, K;and Lee, M. 2002.** Tamoxifen and breast cancer incidenceamong women with inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. Jama MiddleEast, 12(3): pp.58-62.
- **Knapp,M- L; ALsheibani, S; Richer, P.G. (1991).** Alteration of serm lipids in breast cancer. Effect of disease. Activity treatment and hormonal factor. Clin chem: 37:2093-2101.
- **Knowles, PP1; Murray-Rust, J; Kjaer, S; Scott, RP; Hanrahan, S; Santoro, M; Ibáñez, CF; McDonald, NQ. (2006).** structure and chemical inhibition of the RET tyrosine Kinase domain. J. Biol. Chem. 2813.
- **K, Polyak. (2007) "** Breast Cancer: origins and evolution;; Journal of clinical Investigation Vol, 117,no.11, PP,3155-3163.
- **Krawczak ,M; Ball,E.V., Fenton,I., Stenson,P.D., Abeysinghe,S., Thomas,N. and Cooper,D.N. (2000) .**Human gene mutation database-a biomedical information and research resource. Hum. Mutat., 15, 45–51.
- **Kumar, K; Sachdanandam, P. (1991).** Studies on the changes in plasma lipids, lipoproteins in patient with ben: gn and Malignant breast cancer. Biochem. Inter. 23:581-589.
- **Kwong, A; NgE, K; Tang, EY; Wong, CL; Law, FB; Lenng, CP. (2010).** Anovel de novo BRCAMutation Inchinese women with early onset breast cancer. Familial cancer: 10 (2): 233-7.

(L)

- **Landrum, Mj; Lee, JM; Benson, M; Brown, G ; Chao, C; chitipralla, S; Gu, B; Hart, j; Hoffman, D; Hoover, j; Jang, W; Katz, K; ovetsky, M; Riley, G; Seth, A; Tully, R; Villa marin-Salomon, R; Rubinstein, W; Maglott, DR. (2016).** Vlinvar: Public archive of inter pretationsof clinically relevant variants. Nucleic Acids Res44: D862-8.
- **Lane, DM; Boatman, KK; McConathy, W.J(1995).** Serum lipids and apolipoproteinsin women with breast masses. Breast Cancer Res Treat;34:161-9.
- **Lawenda, BD; Mondery, TE; Johnstone, PA. (2009)** Lymphedema: a primer on the Identification and management of achronic condition in oncologic treatment CA Cncer Jclin, 59:8-24.
- **Law, JH; Habibi, G; Hu, K; Masoudi, H; Wang, MY; Stratford, AL; Park, E; Gee, JM; Finlay, P; Jones, HE; Nicholson, RI; Carboni, J;Gottardis, M; Pollak, M;Dunn, SE.(2008).** Phosphorylated insulin-like growth factor-i/insulin receptor is present in all breast cancer subtypesand is related to poor survival. Cancer; 68:10238-46; PMID:19074892; <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2755>
- **Levesqu, R. (2007).** SPSS programming and Dta Management, Uth ed, Chicago, PP:522.
- **Li, CI; uribe. , D.j and Daling, J.R. (2005) .** Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. Br. J. Cancer, 93:1046-1052.
- **Lin, Hy; Cady, V; Davis, FB; Hercbergs , AA; Luidens, MK; Mousa, SA; Davis,PJ. (2011).** Identification and function of plasma Membrane receptor for thyroid hormone analogues. Discov Med . , 11 (59): 337-347.
- **L.L.M, Matos; N.S, Leandro; MB, Maauricio and M.P. Roberta. (2005) .** Maria aparecida dasilva tecnologia aplicada nadetecca de Marcadores tumorais" Arquivos medicos.
- **L.Sobin and C. Witte Kind . (2007) .**TNM classification for esophagus cancer Hepato-Gastro, Vol 4. no 6. PP.491-492.
- **Luis, A.A. ; Ottesen, M, and Hughes, E. (2010).** .Impact of hormone receptor statuson patterns of recurrence and clinical out comes among

patients with human epidermal growth factor- 2 positive breast cancer in the National comprehensive cancer Network: a prospective . Cohort study Breast cancer Research/29-1-14.

- **Lynch, HT; snyder, C and Lynch, J. (2012).** Gereditary breast cancer: Practical pursuit for clinical translation. Ann surg. Oncol. 19-1723-1731.
- **Lichtenstein, P; Holm, N.V and verkasalo, P.K. (2000).** Enviromental and heritable fact or sin the Causation of cancer Engl. J. Med; 343:78-85.

(M)

- **Manistis, t; fritsch, E.F and Samboork, J. (1982).** Molecular cloning: Alaboratory Manual. Cold spring Harbor Laboraltory. New York, 458 P.P.
- **Marron; , F; Aretini, P; D' Andrea, F; Caligom, A; Cortes; , L, viet, A; Ricevuto, E; Montagna, M; Cipollini, G; Federico, M; Santarosa, M; Marchetti, P; Bailey- Wilson, JE. (2004).** Penetrances of breast cancer and Ovarian Cancer in a large series of families tested for BRCA1/2 Mutations. Eur J Hum Genet. 12:899-906.
- **Martin, SE; Sausen, M; Joseph, A; Biggs, O D; Kingham, Bf; Martin, ES. (2005).** BRCA! E1644X: deleterious Mutation in African American Identification with early onset breast cancer- Breast cancer research and treatment 113(2) : 323-5.
- **Marchina ,E; Fontana ,MG; Speziani, M; Salvi, A; Ricca, G; DiLorenzo, D; Gervasi, M;Caimi ,L; Barlati, S. (2010).** BRCA1 and BRCA2 genetic test in high risk patients and families. Counseling and Management. Oncology report; 24(6): 1661-7 .
- **Massarut, S; D Andrea, S; Ezio, C, Perin, T; Roncadin, M, vaidya , HS. (2006).** Intra operative radio therapy Impairs breast cancer cell motility induced by surgical wound fluid. J clin oncol. 24 (18s): 10611.
- **Matros , E; Wang, ZC; Lodero, G; Miron, A; Iglehart ,JD; Richard, AL. (2005) .**BRCA1 promoter Methylation in Sporadic breast tumors; relationship to gene, expression profiles. Breast cancer Restred-91:179-186.

- **Meng-Ti Hsieh; Le-Ming Wang; Chun, A. Changou; Yu-Tang Chin; Yu-Chen S.H Yang; Hsuan-Yu Lai; Sheng-Yang Lee; Yung-Ning Yang; Jacqueline Whang-Peng; Leroy F. Liu; Hung-Yun Lin; Shaker A. Mousa; and Paul J. Davis. (2011).** Cross taul; between Integrin avB3 and Estrogen receptor- ais involved in thyroid hormone- Induced proliferation In human lnnng Carcinoma cells. PLos one. 6 (11): 27547. doi 10.137 Journal- pone. 0027547.
- **Mihaleva, VV; van Schalkwijk, DB; de Graaf, AA; van Duynhoven, J; van Dorsten, FA; Vervoort ,J; Smilde, A; Westerhuis, JA; Jacobs, DM. (2014).** Asystematic. Approach to obtain validated partial least Square Models for predicting lipoprotein subclasses from serum NMR. Anal Chem., 86(1): 543-50. doi: /0./021/ ac 40 25712.
- **Michaud, J., Brody, L.C., Steel, G., Fontaine, G., Martin, L.S., Valle, D. and Mitchell, G. (1992)..** Strand-separating conformational polymorphism analysis: efficacy of detection of point mutations in the human ornithine delta-aminotransferase gene. Genomics, 13, 389–394.
- **Mittra ,I; Perrin, J; Kumaoka, S.(1976).** Thyroid and other autoantibodies in British and Japanese women: an epidemiological study of breast cancer. BMJ. ;1:257–259.
- **Moorman, PG; Hulka, BS; Hiatt, RA; Krieger ,N; Newman, B; Vogelman, JH; Orentreich, N .(1998).** Association between high-density lipoprotein cholesterol and breast cancer varies by menopausal status. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. ;7:483–488.
- **Morgan, KT; NiH , Brown , HR; Yoon, L. (2002) .** Application of DNA Microarray toxicology and technology to in vitro for a real time RT-PcR-based screen for oxidative stress in He P-G2 cells. Toxical pathol 30:45-451.
- **Mousavi, SM; Gouya, MM Ramazaini, R; Davan lon, M; HaJ Sadegji, N; seddingnu, Z.(2009).** Cancer Incidence and mortality In Tran Annals of oncology: official for Medical oncology/ EsMo .20(3): 556-63.
- **Musolino, A; Naldi ,N; Bortesi, B; Pezzuolo, D; Capelletti, M; Missale G; Laccabue, D; Zerbini, A; Camisa, R; Bisagni, G; Neri, TM; Ardizzoni ,A. (2005).** A breast cancer patient feom Italy with germ line

mutations in both the BrCA1 and BRCA2 genes. Breast cancer research and treatment. 91 (2): 205.

(N)

- **National Cancer Institute.(2014).** “What You Need to Know About Breast Cancer.” June 5from http://www.cancer.gov/cancertopics/wyntk/breast/WYNTK_breast.pdf
- **Neamatzadeh, H; Shiryazdi ,SM;Kalantar, SM.(2015).** BRCA1 and BRCA2 mutations in Iranian breast cancer patients: A systematic review. Journal of research in medical sciences : the official journal of Isfahan University of Medical Sciences. ;20(3):284–93.
- **Ness, RB;Grisso, JA; Cottreau, C; Klapper, J; Vergona, R; Wheeler, JE; Morgan, M; Schlesselman, JJ. (2000).** factors related to Inflammation of the ovarian cancer. Epidemiology, (T11(2): 111-117.
- **Nurden, AT.(2011).** Platelets, inflammation and tissue regeneration. Thromb Haemost.;15(Suppl 1):S13–33.

(O)

- **Olsvik, O; Wahlberg, J; Petterson, B; Uhlén, M; Popovic, T; Wachsmuth, IK; Fields ,PI. (1993).** Use of Outo mated . Sequencing of polymerase Chain reaction- generated amplicons. To identify three, types of cholera toxin sub unit B in vibrio cholerae O1 , Strains" . J. Vlin. Micro, biol. 1(1): 22-25.
- **Omar, Jaure; Ellana, N. Alonso; Diego Agullera Braico; Alvaro Nieto; Manuela, Orozco; Cecilla ,Morelli; Alejandro ,M. Ferro; Elena, Barutta; Esteban, Vincent; Domingo, Martinez; Ignacio, Martlnez; Marla Ines ,Maegli; Alejandro, Frizza; Ruben ,Kowalyzyn; Marisa, Salvadori; Paul, Ginestet; Marla, L. Gonzalez, Donna; and Gabriela, A. Balogh. (2014).** BRCA Polymorphism in breast cancer patients from Argentina.
- **Orita, M; H lawahana; K. Hyyashi and Tsekiya.(1989).** Detection of polymorphisms of human DNA by gel electro phoresis as single- strand conformation polymorphism. Proc Nat a cad.Sci . USA, 86: 2766-2670.

- **Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T. and Hayashi, K. (1989)** .Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*, 5, 874–879. [
- **O'Donovan, PJ ;and Livingston, DM. (2010).** BRCA1 and BRCA2: Breast/ovarian cancer susceptibility gene products and participants in DNA double-strand break repair. *Carcinogenesis* 31:961-967.

(P)

- **P.Andrew, Futreal;Lachlan ,Coin;Mhairi,Marshall;Thomas, Down;Timothy, Hubbard;Richard, Wooster;Nazneen ,Rahma and Michael, R.Stratton.(2004).**Acensus Of Human Cancer Genes.
- **Pan, B; Ren, H; He, Y. (2012)** .HDL of patients with type2 diabetes Millitus elevates the Capability of promoting breast cancer Metastasis . *Clin cancer Res*, 18: 1246-56 doi; 10:115811078-0932-CCR. 11-0817.
- **Pal, T;Vadaparampil ,S; Betts, J; Miree, C; Li ,S; Narod, SA.(2008).** BRCA1/2 in high-risk African Americanwomen with breast cancer: providing genetic testingthrough various recruitment strategies. *Geneticstesting*;12(3):401-7.
- **Pal, T' Permuth-Wey, J; Behs, JA. (2005)** .BRCA1 and BRCA2 Mutations accaunt for alarge Proportion of Ovarian Carcinoma Cases: 104 (12:2807-16.
- **Parkin, DM; fernandez, LM. (2006)** . Use of statistics to assess the global burden of breast cancer.
- **Parkin ,DM; Whelan, SL; Ferlay, J; Raymond, L;Young, J.(1997).** Cancer Incidence in Five Continents. VIII. Lyon: IARC.
- **Parise, C.A; Bauer, K.R; Brown, M.Mand Caggiano, V. (2009).** Breast Cancer Subtypes as defined by the estrogen receptor (ER), Progesterone receptor (PR) and the human epidermal growth factor receptor (HER2) among women with Invasive breast cancer in California, 1999-2004. *Breast. J*, 15:593-602.
- **Pardal, R; Clarke, MF; Morrison, SJ. (2003).** Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer* 3: 895–902.R. PardalMF

ClarkeSJ Morrison2003Applying the principles of stem-cell biology to cancer.Nat Rev Cancer3895902

- **Perou, CM; Sørlie ,T,Eisen, MB; van de Rijn ,M;Jeffrey, SS; Rees CA, Pollack ,JR; Ross ,DT; Johnsen ,H; Akslen ,LA; Fluge, ø; Pergamenschikov, A; Williams ,C; Zhu, SX; Lønning ,PE; Børresen-Dale ,AL;Brown, PO; Botstein ,D.(2000).** Molecular portraits of human breast tumours. Nature. ;406:747–752.
- **Pettersson, E; Landenberg, J and Ahmadian, A. (2009) .** Generation of Sequencing technologies Genomics 93(2): 105-11.
- **Pan, B; Ren, H; He, Y. (2012) .**HDL of patients with type2 diabetes Millitus elevates the Capability of promoting breast cancer Metastasis . Clin cancer Res, 18: 1246-56 doi; 10:115811078-0932-CCR. 11-0817.
- **. Petr, Pohlreich;corresponding, author; Michal ,Zikan; Jana, Stribrna; Zdenek, Kleibl; Marketa, Janatova; Jaroslav ,Kotlas; Jana, Zidovska; Jan, Novotny; Lubos ,Petruzelka; Csilla, Szabo; and Bohuslav, Matous. (2005)** High proportion of recurrent germline mutations in the BRCA1 gene in breast and ovarian cancer patients from the Prague area. BCR. ;7(5):BCR 2005;7(5).
- **Ponti, D; Costa ,A; Zaffaroni ,N; Pratesi ,G;Petrangolini ,G; Coradini, D; Pilotti ,S; Pierotti, MA; Daidone, MG. (2005)** Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. Cancer Res 65: 5506–5511.D. PontiA. CostaN. ZaffaroniG. PratesiG. Petrangolini2005Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties.Cancer Res6555065511
- **Phillips, SA. (2000).** Immunopheno typic and pathologic differences between BRCA1 and BRCA2 hereditary breast cancer- Journal of clinical oncology. Official Journal of the American Society of clinical oncology 9 (18): 107S-12S.
- **Pakkiri ,P; Lakhani, SR; Smart, CE.(2009).** Current and future approach to the pathologist's assessment for targeted therapy in breast cancer. Pathology.;41:89–99. Review.

(R)

- **RK.Saiki; DH .Gelfand; S. Stoffel; SJ. Scharf; R. Higuchi; GT. Horn; KB. Mullis; and HA. Erlich.(1988).**primer_directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.
- **Rae,MT; Gubbay, O; Kostogiannou, A; Price,D; Critchley, Ho, Hillier, SG. (2007)** .Thyroid hormone Signaling in human Ovarian Surface epithelium cells. J Clin Endocrinal Metab, 92(!): 322-327.
- **Reis-Filho, JS; Lakhani, SR.(2008).** Breast cancer special types: why bother? J Pathol. ;216:394–398.
- **Rodrignes Dos Santos ,C; Fnseca , I; Diass. (2014).** Plasma level of LDL- Cholesterol at diagnosis is a predictor factor of breast tumor pregression. BMC. Cancer:14:132.doi: /0.1186/1471-2407-14-132.
- **Rohen, C., Meyer-Bolte, K., Bonk, U., Ebel, T., Staats, B., Leuschner, E., Gohla, G., Caselitz, J., Bartnitzke, S., and Bullerdiek, J. (1995).** Trisomy 8 and 18 as Frequent clonal and single-cell aberrations in 185 primary breast carcinomas. Cancer Genet. Cytogenet., 80: 33-39.
- **Rozany, Mucha; Dufloth,Silvia; Carvalho,Juliana ;Karina Heiurich,Julia ,Yoriko;Shinzato,Cesar; Cabello dos, Santos;Luiz ,Carlos; Zeferiuo,Fernando; Schmi, H.(2015).**Analysis of BRCA1 and BRCA2 mutation in Brazilian breast cancer patients with positive family history.
- **Russo, j; Russo, I h. (2004).** Development of the human Breast". 49(1):2-15.
- **Wooster, R; Bignell, G; Lancaster, J; Swift, S;Seal, S; Mangion, J;Collins, N;Gregory, S; Gumbs, C; Micklem, G. (1995).** Identification of the breast cancer susceptibility gene, BRCA2" . Nautere, Vol 378. no655; . P.p. 789-792.

(S)

- **Saaed, A.M; Sheikha, A.K; Mohammed S; Ameen , H.A.M; Sheet, mand Khasraw, S.Y. (2011).**A survey of Suspected familial breast cancer in Iraqi Kurdish women." Clin. Oncol; 29; (Supple; abstr 1602) .

- **Sarlis ,NJ; Gourgiotis ,L; Pucino ,F; Tolis ,GJ.(2002).** Lack of association between Hashimoto thyroiditis and breast cancer: a quantitative research synthesis. *Hormones (Athens)* ;1:35–41.
- **Sariego, J. (2010).** Breast cancer in the young patient. *Pup med*, 76 912); 1397-400" .
- **Saraiva, PP; Figueiredo, NB; Padovani ,CR; Brentani ,MM; Nogueira, CR.(2005).** Profile of thyroid hormones in breast cancer patients. *Braz J Med Biol Res.*;38(5):761-765. doi: 10.1590/S0100-879X2005000500014
- **Siegel ,R., Ma, J., Zou, Z., Jemal ,A.(2014)** Cancer statisticsCA Cancer J. Clin. ;64:9–29. doi: 10.3322/caac.21208. [PubMed] [Cross Ref
- **Schmitz, KH; Ahmed, RL; Troxel, A; Cheville, A; Smith, R;Lewis-Grant ,L; Bryan, CJ; Williams-Smith, CT; Greene, QP. (2010).** Weight lifting for women at risk for breast cancer-related lymphedema a ran domized trial. *JAMA*. 304:2699-2700.
- **Schwartz, CE; Stevenson, RE. (2007)** .The MCT8 thyroid hormone transporter and all an-Herndon – Dudley syndrome – Best pract Res clin Endocrinal Metab, 21 (2): 307-321. Dol: /0,1016/J.beem. 3.009.
- **Stadel, BV(1976).** Dietary iodine and risk of breast, endometrial, and ovarian cancer. *Lancet.*;24(7965):890-891.
- **Shlipak, M., Simon, J.A., Vittinghoff ,E., Lin F., Knopp R.H. and Hulley, S.B(. 2000).** Estrogenand progestin, lipoprotein (a), and the risk of breast cancer events afterMenopause, *Jamma Middle East.*, 10(9): pp.78-84.
- **Shyamala, G., Schneider, W. and Guiot ,M.C.(1992).** Estrogen dependent regulation ofestrogen-receptor gene expression in normal mammary gland and its relationship toestrogenic sensitivity. *Br. Med. J.*, 2: pp.121-128.
- **Staaf, J; Törngren, T; Rambech , E; Johansson, U; Persson, C; Sellberg, G; Tellhed, L; Nilbert, M; and Borg, A. (2008).** Detection and precise mapping of germline rearrangements inBRCA1, BRCA2,

- MSH2, and MLH1 using zoom-in array comparative genomic hybridization (aCGH). Hum Mutat 29:555-564.
- **Singh, K.P., and Roy, D. (2001).** Identification of novel breast tumor-specific mutation(s) in the q11.2 region of chromosome 17 by RAPD/PCR fingerprinting. Gene, 269:33-43
 - **Society, AC. (2016).** American Government [http://www. Cancer .org/cancer/breast cancer/detail gude/breast-cancer-treating - chemotherapy .](http://www.Cancer.org/cancer/breast-cancer/detail-guide/breast-cancer-treating-chemotherapy)
 - **Stenson, P; Mort, M; Ball Ev; shaw, K; Phillips, A; cooper, DN. (2014).** The Human Gene mutation Database: Building a comprehensive Mutation repository for Clinical and Molecular genetics, diagnostic testing and Molecular genetics, diagnostic testing and pe10.
 - **Surbone ,A(2011).** Social and ethical implications of BRCA testing. Ann Oncol. ;22(Suppl 1):i60–i66. doi: 10.1093/annonc/mdq668.
 - **Suzuki ,Y; Sekiya, T; Hayashi ,K.(1991).** Anal Biochem 192:82-84,
 - **rsonalized genomic Medicine Human genet, 133:1-9.**

(T)

- **Tareq.Y Ahmed&Wassan.K Ali.(2007).**Some Biochemical Parameter in Breast Cancer.Department of Chemistry
College of Science Mousul University.
- **Tavassoli, F.A. and Devilee, B. (2003).** world heath organization classification of tumours. Pathology and Genetics of tumours of the breast and Female organs. IARC oress: Lyon.
- **Tazzite, A; Jouhadi, H; Nadifi, S; Aretini, P; Falaschi, E; Collavoli, A; Benider, A; Caligo, MA. (2012).** BRCA1 and NRCA2 germ line mutations in Moroccan breast ovarian cancer families novel Mutations and unclassified variants. Gynecologic oncology; 12593): 687-92.
- **Tereschenko, TV; Basham, VA, ponder,BA; pin aroah, PD. (2002).**BrCA1 and BRCA2 mutation in Russian familial breast cancer human mutation; 19(2): 184.

- **Tereschenko, IV; Basham ,VM; Ponder, BA; Pharoah, PD.(2002).** BRCA1 and BRCA2 mutations in Russian familial breast cancer. Human mutation. ;19(2):184.
- **Gaik Theng Toh ; Peter, Kang ; Sharlene, S. W. Lee ; Daphne ,Shin-Chi Lee ; Sheau, Yee Lee ;Suhaida, Selamat; Nur Aishah ,Mohd, Taib; Sook-Yee, Yoon; Cheng, Har Yip; Soo-Hwang, Teo. (2008).** .BRCA1 and BRCA2 germ line Mutations in Malaysian Women with early – onset breast cancer without a family history. Plos one; 3(4): e2024.
- **Toi ,M; Ohashi ,Y; Seow, A; Moriya, T; Tse, G;Sasano, H; Park, BW; Chow, LW;Laudico, AV; Yip, CH; Ueno, E;Ishiguro, H; Bando, H.(2010).** The breast cancer working group presentation divided into three sections: the epidemiology, pathology and treatment of breast cancer. Jpn J Clin Oncol. ;40(Suppl 1):i13–18.
- **Tosovic, A; Bondeson ,A-G; Bondeson ,L; Ericsson ,U-B; Malm, J;Manjer ,J.(2010).** Prospectively measured triiodothyronine levels are positively associated with breast cancer risk in postmenopausal women. *Breast Cancer Research*. ;12(3, article R33)
- **Turken, O; Narln , y; Dernalbas , S; onde ,ME; Sayano, O, Kandermlr, Eg. (2003).** Breast cancer in association with thyroid disorders Breast cancer Res, 5. 110-113 doi:10, 11861 bcr 609.
- **Tvargeo- Gogola and J.M Rosen. (2007).** Modelling breast cancer: One size does not fill all". Nature Reviews cancer, Vol 7 no9, P.P. 659-672.
- **Tyczynski, J; Tarkowski, W; Parkin, DM; Zatonski ,W.(1994).** Cancer mortality among polish migrants to Australia. Eur J Cancer. ;30A:478–484. doi: 10.1016/0959-8049(94)90423-5.

(U)

- **Ueno, T; Emi, M; Sato, H; Ito, N; Muha, M; Kuroi,K and ToiM. (2012).** Genome- wide copy number analysis in primary breast cancer expert. Opin. Their. Targets 16: S31-S35.

(V)

- **Van der Groep, P; van der ,Wall ,E; van Diest, PJ.(2011).** Pathology of hereditary breast cancer. *Cell Oncol (Dordr)* ;34:71–88. doi: 10.1007/s13402-011-0010-3.
- **Vedin, LL; Lewandowski, SA; Parini, P; Gustafsson, JA; Steffensen, KR. (2009) .** The oxy stered receptor LXR inhibits proliferation of human breast cancer cell. *Carcinogenesis* : 30 (4): 575-9. do10.1093) Carcin/ bg Po29.
- **Vermeulen ,L; Sprick, MR; Kemper, K; Stassi, G; Medema, JP. (2008).** Cancer stem cells-old concepts, new insights. *Cell Death Differ*. L. VermeulenMR SprickK. KemperG. StassiJP Medema2008Cancer stem cells-old concepts, new insights.Cell Death Differ
- **Vorechovsky, I. (2002).** Mutation analysis of large genomic regions in tumer DNA using single- strand conformation polymorphism Lessons from the ATM gene. *Methods MOL, Med-68*, 115-124.
- **Vorkas, PA; Christopoulos, K; Kroupis, C; Lianidou, ES .(2009).** Mutation scanning of exon 20 of the BRCA1 gene by high-resolution melting curve analysis. *Clin Biochem.* 2010;43:178–185. doi: 10.1016/j.clinbiochem..08.024.
- **Victor ,G; Vogel, M.D.(2003).** Recognition and Management of Hereditary Breast Cancer Syndromes. Magee/UPCI Breast Cancer **Prevention Program, Magee-Women’s Hospital, 300 Halket Street, Room 3524, Pittsburgh, Pennsylvania 15213, USA. Telephone: 412-641-6500; Fax: 412-641-6461**

(W)

- **Waston, M. (2008) .** Assessment of suspected cancer" 1(2): 94-107.
- **World Health organization. (2014).** " Adherence to long tem therapies. Power point presentation , Available from: [http://www.who.int/chp/knowledge/](http://www.who.int/chp/knowledge/publication/adherence_full_report) publication/ adherence full report. Pdf .
- **WHO. The world Health report. (2016)**

(X)

- **Xing, W; Li, Q; Cao, R; Xu, Z. (2014).** Neogenin expression is inverselely associated with breast cancer grade in exvivo. Woald Journal of surgical oncology : 12:352 .
- **Xu ,X; Wagner ,KU; Larson ,D; Weaver, Z; Li ,C; Ried,T,;Hennighausen, L; Wynshaw-Boris, A; Deng ,CX.(1999).** Conditional mutation of Brca1 in mammary epithelial cells results in blunted ductal morphogenesis and tumour formation. Nat Genet. ;22:37–43. doi: 10.1038/8743

(Y)

- **Ye, ;Hu ,YF; Zhong ,H; Nye ,AC; Belmont ,AS; Li ,R.(2001).** BRCA1-induced large-scale chromatin unfolding and allele-specific effects of cancer-predisposing mutations. J Cell Biol. ;155:911–921. doi: 10.1083/jcb.200108049.
- **Miki ,Y; Swensen, J; Shattuck-Eidens ,D; Futreal ,PA; Harshman, K; Tavtigian, S; Liu, Q;Cochran, C; Bennett, LM; Ding ,W. (1994).** A strong Candidate for the breast and Ovarian cancer susceptibility gene BRCA1". Science, Vol. 266.no. 5182, PP. 66-71.
- **Yoshida,K&Miki,Y.(2004).**Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repar,Transcription and cell cycle in response to DNA damage .95(11):866-71.
- **Yerrabothala, S; Shaaban, H; Capo ,G; Maroules, M; Debari ,VA. (2013).**The Impact of Diabetes Mellitus on Breast Cancer Outcomes: A Single Center Retrospective Study. Pathol Oncol Res.

(Z)

- **Zakikhani, M; Dowling, R; Fantus ,IG; Sonenberg, N; Pollak, M.(2006).** Metformin is an AMP kinase-dependentgrowth inhibitor for breast cancer cells. Cancer; 66:10269-73; PMID:17062558; http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-1500.
- **Zeng, L; Biernacka ,KM; Holly, JM; Jarrett, C; Morrison, AA; Morgan, A; Winters, ZE; Foulstone ,EJ; Shield, JP; Perks,**

CM.(2010). Hyperglycaemia confers resistance to chemotherapy on breast cancer cells: the role of fatty acid synthase. *Endocr Relat Cancer.* ;17(2):539–51.

- **YingJun, Zhang; YuYang, Chen; DongTai ,Chen; Yu, Jiang; Wan, Huang; HanDong, Ouyang; Wei, Xing;MuSheng, Zeng; XiaoMing, Xie; and Weian, Zeng**corresponding author . (2014). Impact of preoperative anemia on relapse and survival in breast cancer patients. *BMC Cancer* 14: 844 doi: 10.1186/1471-2407-14-844 [PMC free article] [PubMed]
- **Zielinski, C.C; Stuller, I; Ransch, P; Muller, C.(1988).** Increased Serum concentration of cholesterol and Triglyceriden in the progression of breast cancer. *J. Cancer. Res. Clin. Oncol.* 114,514-518.

الملاحق

ملحق رقم (1) أنواع البوادي المستخدمة في الدراسة

BIONEER
Innovation • Value • Discovery

Bioneer Corporation
8-11 Munpyeongseo-ro, Daedeok-gu
Daejeon, 34302, Republic of Korea
Tel: +82-42-930-8777 (Korea: 1588-9788)
Fax: +82-42-930-8688
E-mail: sales@bioneer.com

Bioneer Inc.
1301 Marina Village PKWY, Suite 110
Alameda, CA 94501, USA
Toll Free: +1-877-264-4300
Fax: +1-510-865-0350
E-mail: orderusa@bioneer.us.com

Bioneer R&D Center
Korea Bio Park BLDG #B-702
700 Daewangpangyo-ro, Bundang-gu, Seongnam-si
Gyeonggi-do, 13488, Republic of Korea
Tel: +82-31-628-0500
Fax: +82-31-628-0555

Bioneer Oligo Synthesis Report

Dr. Almusai b _160926

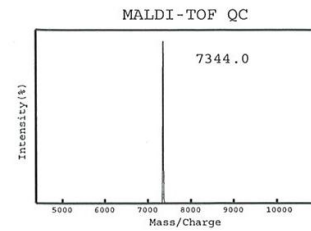
Order No.: 10013877

The mass of each oligonucleotide, indicated by the MALDI-TOF mass spectrum, may differ from the theoretical value by 0.2~0.6%

noor Exon 2 F

GAA GTT GTC ATT TTA TAA ACC TTT

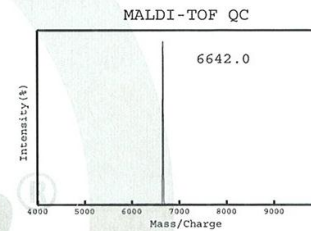
Optical Density	3.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	12.9 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	25.0 %
Length	24mer	Molecular Weight	7331.7 g/mole
Tm	51.3 C	Volume for	128.8 ul
		100 pmoles/ul	



noor Exon 2 R

TGT CTT TTC TTC CCT AGT ATG T

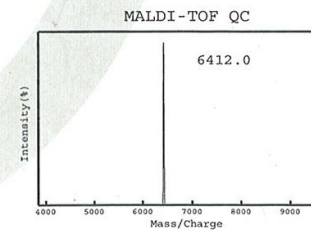
Optical Density	3.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	15.5 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	36.4 %
Length	22mer	Molecular Weight	6648.2 g/mole
Tm	53.2 C	Volume for	154.7 ul
		100 pmoles/ul	



noor Exon 3 F

TCC TGA CAG AGC AGA CAT TTA

Optical Density	3.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	14.4 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	42.9 %
Length	21mer	Molecular Weight	6414.1 g/mole
Tm	55.4 C	Volume for	143.7 ul
		100 pmoles/ul	



5-multiplex 기능과 빠른 cycling이 가능한 최고 성능의 Real-Time PCR 장비!

Exicycler™ 96 (ver.4)

- 높은 민감도와 정확도 (Ct variation < 0.3 cycle)
- 빠른 ramp rate로 실험시간 단축 (Max. 5°C/sec)
- Reference dye가 필요없어 5-multiplex PCR 가능
- 9 log 이상의 넓은 dynamic range



ملحق رقم (2) أنواع البوادي المستخدمة في الدراسة

BIONEER
Innovation • Value • Discovery

Bioneer Corporation
8-11 Munpyeongseo-ro, Daedeok-gu
Daejeon, 34302, Republic of Korea
Tel: +82-42-930-8777 (Korea: 1588-9788)
Fax: +82-42-930-8688
E-mail: sales@bioneer.com

Bioneer Inc.
1301 Marina Village PKWY, Suite 110
Alameda, CA 94501, USA
Toll Free: +1-877-264-4300
Fax: +1-510-865-0350
E-mail: order.usa@bioneer.com

Bioneer R&D Center
Korea Bio Park BLDG #B-702
700 Daewangpangyo-ro, Bundang-gu, Seongnam-si
Gyeonggi-do, 13488, Republic of Korea
Tel: +82-31-628-0500
Fax: +82-31-628-0555

Bioneer Oligo Synthesis Report

Dr. Almusaib_160926

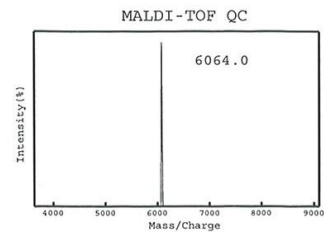
Order No.: 10013877

The mass of each oligonucleotide, indicated by the MALDI-TOF mass spectrum, may differ from the theoretical value by 0.2~0.6%

noor Exon 20 F

ATA TGA CGT GTC TGC TCC AC

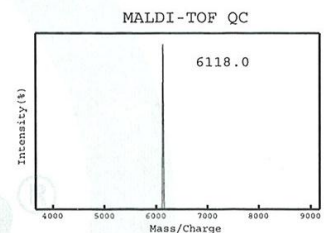
Optical Density	2.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	10.7 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	50.0 %
Length	20mer	Molecular Weight	6067.9 g/mole
Tm	56.5 C	Volume for 100 pmoles/ul	107.3 ul



noor Exon 20 R

GGG AAT CCA AAT TAC ACA GC

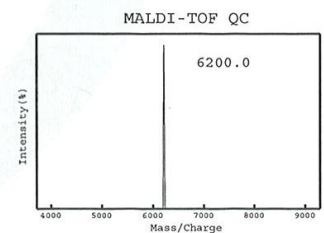
Optical Density	2.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	9.9 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	45.0 %
Length	20mer	Molecular Weight	6118.9 g/mole
Tm	53.7 C	Volume for 100 pmoles/ul	98.8 ul



noor Exon 11 F

CCA AGG TGT ATG AAG TAT GT

Optical Density	2.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	9.8 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	40.0 %
Length	20mer	Molecular Weight	6195.9 g/mole
Tm	51.3 C	Volume for 100 pmoles/ul	97.8 ul



5-multiplex 가능과 빠른 cycling이 가능한 최고 성능의 Real-Time PCR 장비!

Exicycler™ 96 (ver.4)

- 높은 민감도와 정확도 (Ct variation < 0.3 cycle)
- 빠른 ramp rate로 실험시간 단축 (Max. 5°C/sec)
- Reference dye가 필요없어 5-multiplex PCR 가능
- 9 log 이상의 넓은 dynamic range



AccuOligo® is manufactured in clean-room under strict ISO 9001 to confirm DNase/RNase and DNA free environment

ملحق رقم (3) أنواع البوادي المستخدمة في الدراسة

BIONEER
Innovation • Value • Discovery

Bioneer Corporation
8-11 Munpyeongseo-ro, Daedeok-gu
Daejeon, 34302, Republic of Korea
Tel: +82-42-930-8777 (Korea: 1588-9788)
Fax: +82-42-930-8688
E-mail: sales@bioneer.com

Bioneer Inc.
1301 Marina Village PKWY, Suite 110
Alameda, CA 94501, USA
Toll Free: +1-877-264-4300
Fax: +1-510-865-0350
E-mail: orderusa@bioneerus.com

Bioneer R&D Center
Korea Bio Park BLDG #8-702
700 Daewangpangyo-ro, Bundang-gu, Seongnam-si
Gyeonggi-do, 13488, Republic of Korea
Tel: +82-31-628-0500
Fax: +82-31-628-0555

Bioneer Oligo Synthesis Report

Dr. Almusai b _ 160926

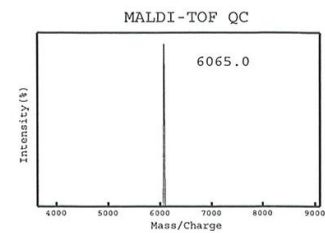
Order No. : 10013877

The mass of each oligonucleotide, indicated by the MALDI-TOF mass spectrum, may differ from the theoretical value by 0.2~0.6%

noor Exon 11 R

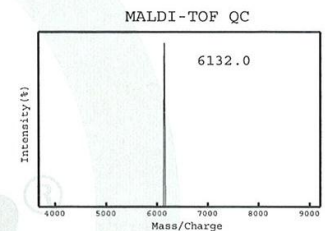
GAT CAG CAT TCA GAT CTA CC

Optical Density	2.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	10.3 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	45.0 %
Length	20mer	Molecular Weight	6060.9 g/mole
Tm	52.0 C	Volume for 100 pmoles/ul	103.1 ul

noor Exon₂10 F

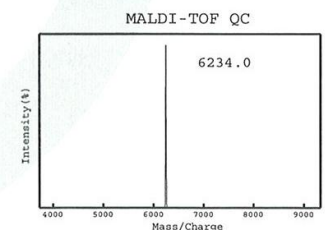
CTC ATT TGT ATC TGA AGT GG

Optical Density	2.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	10.5 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	40.0 %
Length	20mer	Molecular Weight	6137.9 g/mole
Tm	50.3 C	Volume for 100 pmoles/ul	104.8 ul

noor Exon₂10 R

GAG AGA TGA AGA GCA GCA TC

Optical Density	2.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	9.4 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	50.0 %
Length	20mer	Molecular Weight	6224.0 g/mole
Tm	54.8 C	Volume for 100 pmoles/ul	94.2 ul



5-multiplex 기능과 빠른 cycling이 가능한 최고 성능의 Real-Time PCR 장비!

Exicycler™ 96 (ver.4)

- 높은 민감도와 정확도 (Ct variation < 0.3 cycle)
- 빠른 ramp rate로 실험시간 단축 (Max. 5°C/sec)
- Reference dye가 필요없어 5-multiplex PCR 가능
- 9 log 이상의 넓은 dynamic range



AccuOligo® is manufactured in clean-room under strict ISO 9001 to confirm DNase/RNase and DNA free environment

ملحق رقم (4) أنواع البوادي المستخدمة في الدراسة

BIONEER
Innovation • Value • Discovery

Bioneer Corporation
8-11 Munpyeongseong-ro, Daedeok-gu
Daejeon, 34302, Republic of Korea
Tel: +82-42-930-8777 (Korea: 1588-9788)
Fax: +82-42-930-8688
E-mail: sales@bioneer.com

Bioneer Inc.
1301 Marina Village PKWY, Suite 110
Alameda, CA 94501, USA
Toll Free: +1-877-264-4300
Fax: +1-510-865-0350
E-mail: order.usa@bioneer.us.com

Bioneer R&D Center
Korea Bio Park BLDG #B-702
700 Daewangangyo-ro, Bundang-gu, Seongnam-si
Gyeonggi-do, 13488, Republic of Korea
Tel: +82-31-628-0500
Fax: +82-31-628-0555

Bioneer Oligo Synthesis Report

Dr. Almusai b _ 160926

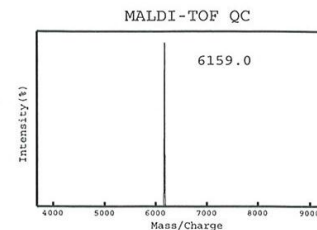
Order No. : 10013877

The mass of each oligonucleotide, indicated by the MALDI-TOF mass spectrum, may differ from the theoretical value by 0.2~0.6%

noor Exon4 10 F

CTG TTT GCT CAC AGA AGG AG

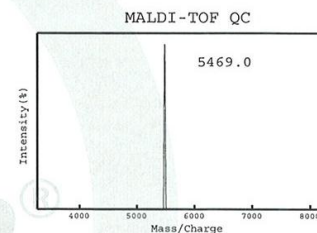
Optical Density	2.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	10.3 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	50.0 %
Length	20mer	Molecular Weight	6156.9 g/mole
Tm	55.4 C	Volume for 100 pmoles/ul	103.3 ul



noor Exon1 10 R

GAT TCA GGT ACC TCT GTC

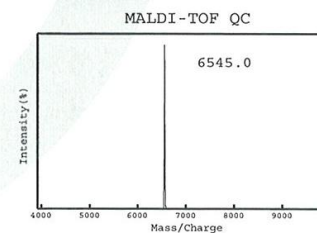
Optical Density	2.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	12.0 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	50.0 %
Length	18mer	Molecular Weight	5465.5 g/mole
Tm	50.0 C	Volume for 100 pmoles/ul	119.5 ul



noor Exon 11 F

AGT GAA TGT GAT TGA TGG TAC

Optical Density	3.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	13.9 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	38.1 %
Length	21mer	Molecular Weight	6540.1 g/mole
Tm	52.7 C	Volume for 100 pmoles/ul	138.9 ul



5-multiplex 기능과 빠른 cycling이 가능한 최고 성능의 Real-Time PCR 장비!

Exicycler™ 96 (ver.4)

- 높은 민감도와 정확도 (Ct variation < 0.3 cycle)
- 빠른 ramp rate로 실험시간 단축 (Max. 5°C/sec)
- Reference dye가 필요없어 5-multiplex PCR 가능
- 9 log 이상의 넓은 dynamic range



AccuOligo® is manufactured in clean-room under strict ISO 9001 to confirm DNase/RNase and DNA free environment

ملحق رقم (5) أنواع البوادي المستخدمة في الدراسة

BIONEER
Innovation • Value • Discovery

Bioneer Corporation
8-11 Munpyeongseo-ro, Daedeok-gu
Daejeon, 34302, Republic of Korea
Tel: +82-42-930-8777 (Korea: 1588-9788)
Fax: +82-42-930-8688
E-mail: sales@bioneer.com

Bioneer Inc.
1301 Marina Village PKWY, Suite 110
Alameda, CA 94501, USA
Toll Free: +1-877-264-4300
Fax: +1-510-865-0350
E-mail: order.usa@bioneer.us.com

Bioneer R&D Center
Korea Bio Park BLDG #B-702
700 Daewangpangyo-ro, Bundang-gu, Seongnam-si
Gyeonggi-do, 13488, Republic of Korea
Tel: +82-31-628-0500
Fax: +82-31-628-0555

Bioneer Oligo Synthesis Report

Dr. Almusai b_160926

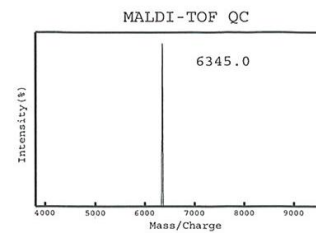
Order No.: 10013877

The mass of each oligonucleotide, indicated by the MALDI-TOF mass spectrum, may differ from the theoretical value by 0.2~0.6%

noor Exon 11 R

CAT GCT GCA GCC AAG ACC TCT

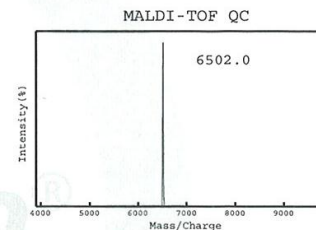
Optical Density	3.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	15.7 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	57.1 %
Length	21mer	Molecular Weight	6351.0 g/mole
Tm	62.0 C	Volume for 100 pmoles/ul	157.0 ul



noor Exon1 11 F

AAG ATG TAT GTG CTT TAA ATG

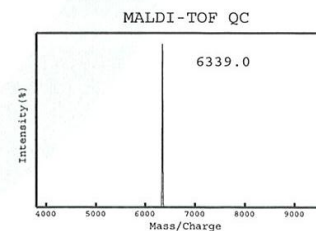
Optical Density	3.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	14.0 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	28.6 %
Length	21mer	Molecular Weight	6499.1 g/mole
Tm	49.2 C	Volume for 100 pmoles/ul	139.8 ul



noor Exon1 11 R

CTC CTC TGC AAG AAC ATA AAC

Optical Density	3.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	14.9 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	42.9 %
Length	21mer	Molecular Weight	6343.1 g/mole
Tm	53.6 C	Volume for 100 pmoles/ul	148.5 ul



5-multiplex 가능과 빠른 cycling이 가능한 최고 성능의 Real-Time PCR 장비!

Exicycler™ 96 (ver.4)

- 높은 민감도와 정확도 (Ct variation < 0.3 cycle)
- 빠른 ramp rate로 실험시간 단축 (Max. 5°C/sec)
- Reference dye가 필요없어 5-multiplex PCR 가능
- 9 log 이상의 넓은 dynamic range



AccuOligo® is manufactured in clean-room under strict ISO 9001 to confirm DNase/RNase and DNA free environment

ملحق رقم (7) عدة استخلاص الدنا

gSYNC™ DNA Extraction Kit Quick Protocol*For research use only***Catalogue Number**

GS004, GS100, GS300

Instruction Manual Download

When using this product for the first time, or if you are unfamiliar with the procedure, please scan the QR code and download the complete instruction manual.

Geneaid

Instruction Manual Download

IMPORTANT BEFORE USE!

1. Add absolute ethanol (see the bottle label for volume) to Wash Buffer then mix by shaking for a few seconds. Check the box on the bottle. Be sure and close the bottle tightly after each use to avoid ethanol evaporation.
2. Add ddH₂O pH7.0-8.5 (see the bottle label for volume) to Proteinase K then vortex to ensure it is completely dissolved. Check the box on the bottle. Once it is dissolved completely, centrifuge for a few seconds to spin down the mixture. For extended periods, the ddH₂O and Proteinase K mixture should be stored at 4°C. Use only fresh ddH₂O as ambient CO₂ can quickly cause acidification.
3. Prepare Phosphate Buffered Saline (PBS, pH7.2) for blood, serum, plasma, cultured cells and FFPE tissue samples.
4. Prepare Xylene for FFPE tissue samples.
5. Yield and quality of DNA will be higher when fresh samples or samples which have been flash frozen and stored at -20°C or -70°C are used. DNA in FFPE or tissue which has been repeatedly frozen and thawed may be degraded.
6. Optionally prepare RNase A (50 mg/ml) for RNA-free DNA when performing sensitive downstream reactions. However, residual RNA will not affect PCR.

Tissue, FFPE, Insect and Sperm Protocol Procedure**1A. Tissue Sample Dissociation**

Transfer **up to 25 mg of fresh animal tissue (0.5 cm mouse tail x 2 or 0.5 cm rat tail x 1)** to a 1.5 ml microcentrifuge tube. If the tissue has a higher number of cells (e.g. spleen or liver), reduce the starting material to 10 mg. Add **200 µl of GST Buffer and 20 µl of Proteinase K** then vortex thoroughly. Incubate at 60°C overnight or until the sample lysate becomes clear. During incubation, transfer the required volume of Elution Buffer (200 µl/sample) to a 1.5 ml microcentrifuge tube and heat to 60°C (for Step 5 DNA Elution).

1B. FFPE Sample Preparation

Cut up to **25 mg sections of FFPE** and transfer to a 1.5 ml microcentrifuge tube. Using a sterile blade is recommended. Add **1 ml of xylene** then mix by shaking vigorously. Incubate at room temperature for approximately 10 minutes (shake occasionally during incubation). Centrifuge at 14-16,000 x g for 3 minutes then remove the supernatant. Add **1 ml of absolute ethanol** to wash the sample pellet and mix by inverting. Centrifuge at 14-16,000 x g for 3 minutes then remove the supernatant. Open the tube and incubate at 37°C for 15 minutes to evaporate ethanol residue. Add **200 µl of GST Buffer and 20 µl of Proteinase K** then vortex thoroughly. Incubate at 60°C overnight or until the sample lysate becomes clear. During incubation, transfer the required volume of Elution Buffer (200 µl/sample) to a 1.5 ml microcentrifuge tube and heat to 60°C (for Step 5 DNA Elution).

1C. Insect Sample Preparation

Transfer up to 50 mg of insect tissue to a mortar. Add liquid nitrogen to the mortar and grind the tissue thoroughly using a pestle. Refill the mortar occasionally with liquid nitrogen to keep the sample frozen. Transfer the tissue powder to a 1.5 ml microcentrifuge tube. Add **200 µl of GST Buffer and 20 µl of Proteinase K** then vortex thoroughly. Incubate at 60°C for 1-3 hours or until the sample lysate becomes clear. During incubation, invert the tube occasionally and transfer the required volume of Elution Buffer (200 µl/sample) to a 1.5 ml microcentrifuge tube and heat to 60°C (for Step 5 DNA Elution).

1D. Sperm Sample Preparation

Add RNase-free water to DTT powder (see the bottle label for volume) then vortex to dissolve. Spin down the solution. The solution should be stored at -20°C. Transfer **900 µl of Sperm Lysis Buffer** into a 1.5 ml microcentrifuge tube. Add 80 µl of DTT solution and 20 µl of Proteinase K immediately before use. Mix well by vortex.

NOTE: Sperm Lysis Buffer and DTT can be purchased directly from Geneaid.

Add 100 µl of sperm and 100 µl of fresh prepared Sperm Lysis Buffer (containing DTT and proteinase K) into a new 1.5 ml microcentrifuge tube, mix by vortex then incubate at 60°C for 1 hour to dissolve the sample. During incubation, invert the tube occasionally and transfer the required volume of Elution Buffer (200 µl/sample) to a 1.5 ml microcentrifuge tube and heat to 60°C (for Step 5 DNA Elution).



2. Cell Lysis

If insoluble material remains following incubation, centrifuge for 2 minutes at 14-16,000 x g then carefully transfer the supernatant to a new 1.5 ml microcentrifuge tube. Add **200 µl of GSB Buffer** and shake vigorously for 10 seconds.

NOTE: It is essential that the sample and GSB Buffer are mixed thoroughly to yield a homogeneous solution.

Optional RNA Removal Step

For RNA-free gDNA, following GSB Buffer addition, add 5 µl of RNase A (50 mg/ml) and mix by shaking vigorously. Incubate at room temperature for 5 minutes to ensure efficient RNA degradation.

3. DNA Binding

Add **200 µl of absolute ethanol** to the sample lysate and mix **IMMEDIATELY** by shaking vigorously for 10 seconds. If precipitate appears, break it up as much as possible with a pipette. Place a **GS Column in a 2 ml Collection Tube**. Transfer all of the mixture (including any insoluble precipitate) to the GS Column. Centrifuge at 14-16,000 x g for 1 minute. Following centrifugation, if the mixture did not flow through the GS Column membrane, increase the centrifuge time until it passes completely. Discard the 2 ml Collection Tube containing the flow-through then transfer the GS Column to a new 2 ml Collection Tube.

NOTE: It is important that the lysate and ethanol are mixed thoroughly to yield a homogeneous solution.

4. Wash

Add **400 µl of W1 Buffer** to the **GS Column**. Centrifuge at 14-16,000 x g for 30 seconds then discard the flow-through. Place the GS Column back in the 2 ml Collection Tube. Add **600 µl of Wash Buffer (make sure absolute ethanol was added)** to the GS Column. Centrifuge at 14-16,000 x g for 30 seconds then discard the flow-through. Place the GS Column back in the 2 ml Collection Tube. Centrifuge again for 3 minutes at 14-16,000 x g to dry the column matrix.

5. DNA Elution

Transfer the dried GS Column to a clean 1.5 ml microcentrifuge tube. Add **100 µl of pre-heated Elution Buffer**, TE Buffer or water into the **CENTER** of the column matrix. Let stand for at least 3 minutes to allow Elution Buffer, TE Buffer or water to be completely absorbed. Centrifuge at 14-16,000 x g for 30 seconds to elute purified DNA.

Hair Protocol Procedure

1. Cell Lysis

Cut off a **0.5-1 cm piece from at least 10 hair bulbs, including follicle cells** and transfer to a 1.5 ml microcentrifuge tube. Add **200 µl of GST Buffer** and **20 µl of Proteinase K (making sure the hair is completely submerged)** and mix by shaking. Incubate at 60°C for 30 minutes to lyse the sample. During incubation, shake the tube every 5 minutes and transfer the required volume of Elution Buffer (200 µl/sample) to a 1.5 ml microcentrifuge tube and heat to 60°C (for Step 4 DNA Elution). Add **200 µl of GSB Buffer** and mix vigorously. Incubate at 60°C for 20 minutes. During incubation, shake the tube every 5 minutes.

Optional RNA Removal Step

For RNA-free gDNA, following GSB Buffer addition and 60°C incubation, add 5 µl of RNase A (50 mg/ml) and mix by shaking vigorously. Incubate at room temperature for 5 minutes to ensure efficient RNA degradation.

Following incubation, centrifuge for 5 minutes at 3,000 x g then transfer the supernatant to a new 1.5 ml microcentrifuge tube.

2. DNA Binding

Add **200 µl of absolute ethanol** to the sample lysate and mix **IMMEDIATELY** by shaking vigorously for 10 seconds. If precipitate appears, break it up as much as possible with a pipette. Place a **GS Column in a 2 ml Collection Tube**. Transfer all of the mixture (including any insoluble precipitate) to the GS Column. Centrifuge at 14-16,000 x g for 1 minute. Following centrifugation, if the mixture did not flow through the GS Column membrane, increase the centrifuge time until it passes completely. Discard the 2 ml Collection Tube containing the flow-through then transfer the GS Column to a new 2 ml Collection Tube.

NOTE: It is important that the lysate and ethanol are mixed thoroughly to yield a homogeneous solution.

Kit Components

Geneaid

Component	GS004	GS100	GS300
GST Buffer	3 ml	30 ml	75 ml
GSB Buffer	4 ml	40 ml	75 ml
W1 Buffer	2 ml	45 ml	130 ml
Wash Buffer ¹ (Add Ethanol)	1 ml (4 ml)	25 ml (100 ml)	50 ml (200 ml)
Proteinase K ² (Add ddH ₂ O)	1 mg (0.10 ml)	11 mg x 2 (1.10 ml)	65 mg (6.50 ml)
Elution Buffer	1 ml	30 ml	75 ml
GS Columns	4	100	300
2 ml Collection Tubes	8	200	600

1. Add absolute ethanol (see the bottle label for volume) to Wash Buffer then mix by shaking for a few seconds. Check the box on the bottle. Be sure and close the bottle tightly after each use to avoid ethanol evaporation.
2. Add ddH₂O pH7.0-8.5 (see the bottle label for volume) to Proteinase K then vortex to ensure Proteinase K is completely dissolved. Check the box on the bottle. Once it is dissolved completely, centrifuge for a few seconds to spin down the mixture. For extended periods, the ddH₂O and Proteinase K mixture should be stored at 4°C. Use only fresh ddH₂O as ambient CO₂ can quickly cause acidification.

The gSYNC™ DNA Extraction Kit Functional Test Data

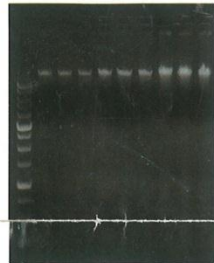


Figure 1. Genomic DNA from 50, 100 and 200 µl whole blood samples was extracted using the gSYNC™ DNA Extraction Kit. 10 µl from 100 µl eluates of purified genomic DNA was analyzed by electrophoresis on a 0.8% agarose gel.

1-3 = 50 µl whole blood sample
4-6 = 100 µl whole blood sample
7-9 = 200 µl whole blood sample
M = Geneaid 1 Kb DNA Ladder

Volume	Yield	260/280
50 µl	1.54 µg	1.85
100 µl	2.70 µg	1.87
200 µl	5.56 µg	1.90

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9

Troubleshooting

Improper sample homogenization.

Yield and quality of DNA will be higher when fresh samples or samples which have been flash frozen and stored at -20°C or -70°C are used. DNA in FFPE or tissue which has been repeatedly frozen and thawed may be degraded. Fresh blood is recommended. However, frozen or blood treated with anticoagulants can also be used. Increased storage length decreases DNA yield. If using nucleated blood (e.g. bird or fish) use up to 10 µl then adjust volume to 200 µl with PBS. Hair samples should completely submerged in GST Buffer and Proteinase K.

Incomplete buffer preparation.

Add absolute ethanol (see the bottle label for volume) to Wash Buffer then mix by shaking for a few seconds. Check the box on the bottle. Be sure and close the bottle tightly after each use to avoid ethanol evaporation. Add ddH₂O pH7.0-8.5 (see the bottle label for volume) to Proteinase K then vortex to ensure Proteinase K is completely dissolved. Check the box on the bottle. Once it is dissolved completely, centrifuge for a few seconds to spin down the mixture. For extended periods, the ddH₂O and Proteinase K mixture should be stored at 4°C. Use only fresh ddH₂O as ambient CO₂ can quickly cause acidification.

Incorrect DNA elution step.

Ensure that Elution Buffer, TE or water is added into the **CENTER** of the GS Column matrix and is completely absorbed. Use pre-heated Elution Buffer, TE, or water (60~70°C). If using water for elution, ensure the water pH is between 7.0 and 8.5. ddH₂O should be fresh as ambient CO₂ can quickly cause acidification. Elute twice to increase the DNA recovery.

Residual ethanol contamination.

Following the Wash step, dry the GS Column with additional centrifugation at 14-16,000 x g for 5 minutes to ensure the GS Column membrane is completely dry.

Clogged column.

Use the recommended amount of starting material or separate into multiple tubes. Add additional Proteinase K and extend the incubation time in the Lysis step. Following the Lysis step, centrifuge for 2 minutes at 14-16,000 x g to remove sample debris. Transfer the supernatant to a new microcentrifuge tube and proceed with the DNA Binding step. If precipitate formed at the DNA Binding step reduce the sample material. Following ethanol addition, break up any precipitate as much as possible prior to loading GS Column.



3. Wash

Add **400 µl of W1 Buffer to the GS Column**. Centrifuge at 14-16,000 x g for 30 seconds then discard the flow-through. Place the GS Column back in the 2 ml Collection Tube. Add **600 µl of Wash Buffer (make sure absolute ethanol was added)** to the GS Column. Centrifuge at 14-16,000 x g for 30 seconds then discard the flow-through. Place the GS Column back in the 2 ml Collection Tube. Centrifuge again for 3 minutes at 14-16,000 x g to dry the column matrix.

4. Elution

Transfer the dried GS Column to a clean 1.5 ml microcentrifuge tube. Add **100 µl of pre-heated Elution Buffer**, TE Buffer or water into the **CENTER** of the column matrix. Let stand for at least 3 minutes to allow Elution Buffer, TE Buffer or water to be completely absorbed. Centrifuge at 14-16,000 x g for 30 seconds to elute purified DNA.

Blood, Cultured Cell, Amniotic Fluid Protocol Procedure

1A. Blood Sample Preparation

Transfer up to **200 µl of whole blood, serum, plasma, buffy coat or body fluids to a 1.5 ml microcentrifuge tube**. Adjust the volume to **200 µl with PBS**. Add **20 µl of Proteinase K** then mix by pipetting. Incubate at 60°C for 5 minutes.

1B. Cultured Cell Sample Preparation

Trypsinize adherent cells prior to harvesting. Transfer **cells (up to 1×10^7)** to a 1.5 ml microcentrifuge tube then centrifuge for 5 minutes at 300 x g. Discard the supernatant then resuspend cells in **200 µl of PBS** by pipette. Add **20 µl of Proteinase K** then mix by pipetting. Incubate at 60°C for 5 minutes.

1C. Amniotic Fluid Sample Preparation

Transfer up to **15 ml of amniotic fluid** to a 15 ml centrifuge tube. Centrifuge for 3 minutes at 14-16,000 x g then discard the supernatant. Add **200 µl of GST Buffer** to resuspend the pellet and transfer the mixture to a 1.5 ml microcentrifuge tube. Add **10 µl of Proteinase K** and shake vigorously. Incubate at 60°C for 30 minutes. During incubation, invert the tube every 5 minutes.

2. Cell Lysis

Add **200 µl of GSB Buffer** then mix by shaking vigorously. For blood and cell samples, incubate at 60°C for 5 minutes, inverting the tube every 2 minutes. For amniotic fluid samples, incubate at 60°C for at least 20 minutes, inverting the tube every 5 minutes. During incubation, transfer required volume of Elution Buffer (200µl/sample) to a 1.5 ml microcentrifuge tube and heat to 60°C (for Step 5 DNA Elution).

Optional RNA Removal Step

For RNA-free gDNA, following GSB Buffer addition and 60°C incubation, add 5 µl of RNase A (50 mg/ml) and mix by shaking vigorously. Incubate at room temperature for 5 minutes to ensure efficient RNA degradation.

3. DNA Binding

Add **200 µl of absolute ethanol** to the sample lysate and mix **IMMEDIATELY** by shaking vigorously for 10 seconds. If precipitate appears, break it up as much as possible with a pipette. Place a **GS Column in a 2 ml Collection Tube**. Transfer all of the mixture (including any insoluble precipitate) to the GS Column. Centrifuge at 14-16,000 x g for 1 minute. Following centrifugation, if the mixture did not flow through the GS Column membrane, increase the centrifuge time until it passes completely. Discard the 2 ml Collection Tube containing the flow-through then transfer the GS Column to a new 2 ml Collection Tube.

NOTE: It is important that the lysate and ethanol are mixed thoroughly to yield a homogeneous solution.

4. Wash

Add **400 µl of W1 Buffer to the GS Column**. Centrifuge at 14-16,000 x g for 30 seconds then discard the flow-through. Place the GS Column back in the 2 ml Collection Tube. Add **600 µl of Wash Buffer (make sure absolute ethanol was added)** to the GS Column. Centrifuge at 14-16,000 x g for 30 seconds then discard the flow-through. Place the GS Column back in the 2 ml Collection Tube. Centrifuge again for 3 minutes at 14-16,000 x g to dry the column matrix.

5. Elution

Transfer the dried GS Column to a clean 1.5 ml microcentrifuge tube. Add **100 µl of pre-heated Elution Buffer**, TE Buffer or water into the **CENTER** of the column matrix. Let stand for at least 3 minutes to allow Elution Buffer, TE Buffer or water to be completely absorbed. Centrifuge at 14-16,000 x g for 30 seconds to elute purified DNA.

Abstract

This study aimed to measure some blood informant and chemical of biology and marker, of Breast cancer disease in Diyala Governorate . The study include 100 specimens which divided to 50 women whom infected with breast cancer disease . Their ages are (40-70) years , and 50 women Not infected with hereditary blood diseases . Their ages (40-70) years Which was considered a control group collected samples through period from September 2016 to May 2017 .

The studies result showed when making a comparative with ages of women whom infected with breast cancer disease with a control group , There is no significant difference of statistical significance at $p>0,05$, But there is significant difference with statistical significance at very high in $p>0,001$. When the ages of women with the disease were compared between them .

The genetic condition, the results showed no significant difference at a potential level $p>0,05$.When complete the comparative between a group of women whom infected with breast cancer disease with a control group according to sub-district of Diyala Governorate . But the results showed that Baquba sub-district More infections from where the rate of infection of disease . So there is significant difference with statistical significance at very high in at a possibility level $p>001$, when compare between Diyala Sub-districts for women group whom infected with breast cancer .

About Hormone of thyroid , the result showed there is High in Hormone T3, T4 as fellow

$\text{nmol/L} 111.59 \pm 31.90 = \text{T4}$, $\text{nmol/L} 2.75 \pm 0.75 = \text{T3}$ The rate of these hormones for control group $\text{nmol/L} 78.19 \pm 11.29 = \text{T4}$, $\text{nmol/L} 1.97 \pm 0.70 = \text{T3}$. About Hormone TSH the results shows that low in significant of this Hormone .

The rate of women whom infected with breast cancer $\text{uU/mL} 1.40 \pm 1.17$ and for control group 3.47 ± 1.38 The result show for this study there are very high Statistically significant in a possibility level $p<0.001$.

For a kidney indicators and function the result of study shows there is simple high in rate of glucose , Uric acid and Keratin , the rate of group of women are whom infected with breast cancer disease continually.

Glucose= $\text{mmo1/L} 11.66 \pm 4.63$ Uric = $\text{mmo1/L} 1 \pm 9.40 \pm 10.91$ Keratin = $\text{umo1/L} 44.91 \pm 28.57$

The control group the rate of Glucose = mmol/L 6.16 ± 1.93 Uric = mmol/L 3.91 ± 0.60 Keratin = umol/L 55.13 ± 28.57 . There is a high significant difference with statistical significance in $p > 0.001$ to level of Glucose and significant difference in < 0.01 Uric so significant difference in $p = 0.02$.

For Lipid profile indicators this study includes each of Cholesterol, high-density lipids, low-density lipids and triglycerides, the rate of information for women whom infected with breast cancer disease as follow:

Cholesterol = mmol/L 4.29 ± 1.11 high-density lipids = mmol/L 1.36 ± 0.51

low-density lipids = mmol/L 2.63 ± 0.95 triplicate lipids = mmol/L 1.84 ± 1.01 . showed

there is low in Cholesterol in level $p < 0.01$, low-density lipids in likely level $p = 0.009$. There is no significant difference for each lipids high, low and triplicate lipids.

For the blood's indicators there is no significant difference Statistically significant when making comparative between the women whom infected with breast cancer disease with a control group for each of Red blood cells, hemoglobin, platelets, and capillaries, and rate of erythrocyte accretion in $p > 0.05$ except erythrocyte. We find that there is little high of this indicator for women whom infected with breast cancer disease comparative with control group in possibility level $p = 0.02$ as follow:

Leukocyte = $\times 10^9/L$ 8.15 ± 4.39 Erythrocytes = $\times 10^9/L$ 5.34 ± 1.49 hemoglobin = 11.69 ± 2.10 g/dL, capillaries = $\times 10^9/L$ 4313.1 ± 76.93 . The rate of accretion Erythrocytes = $41.02\% \pm 7.89$, but the rate account of the indicator of control group as follow:

Leukocytes = $\times 10^9/L$ 9.01 ± 2.72 Erythrocytes = $\times 10^9/L$ 4.79 ± 0.84 hemoglobin = g/dl 11.19 ± 1.83 , capillaries = $\times 10^9/L$ 320.12 ± 45.25 . The rate of accretion of Erythrocytes = $39.21\% \pm 10.91$.

For molecular genetic study performance Chromosome DNA was isolated from the blood of women whom infected with breast cancer disease and with the women whom no effected with this disease as control group, using the extraction tools Genomic DNA mini kit blood protocol. Using 10 Exon to discover the mutation drops, which include these Exon the results (2.20.1103.5) gene BRCA1 and all (2.4.1.35) gene BRCA2, the result shows that the more common mutations in Diyala Governorate are from exon 20, 11 from gene BRCA1 and exon 2.4 from gene BRCA2. So we make Nucleotide sequence for gene BRCA for women effected with disease with other perfect, we find that their are mutation drops from type of delete in Gene BRCA for effected women with breast cancer disease.

**Republic of Iraq
Ministry of Higher Education
And Scientific Research
Diyala University
College of Education for Pure Sciences
Department of Biology**



**Studying the Some Molecular and Physiological
Markers of Breast Cancer patieents in Diyala
Province**

A Thesis submitted

To

**Council college of Education for Pure Science Diyala
University Partial In Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master In Biology\Zoology**

By

Noor jassim mohammed AL-shammari

Bachelors of Biology 2014

Supervised by

Assisst .prof.Dr.

Ammar Ahmed Sultan AL-Qeraqouly

F.I.B.M.S. Fadhil Ahmed Dalaf

A.D2017

A.H1438