

REPUBLIC OF IRAQ
MINISTRY OF HIGHER EDUCATION AND SCIENTIFIC RESEARCH
UNIVERSITY OF AL-QADISIYAH
COLLEGE OF EDUCATION/ CHEMISTRY DEPARTMENT



***Influence of Pharmacogenetics of Some Genes on
Response and Toxicity of Chemotherapy Treated
Patients with Breast Cancer***

A Thesis

Submitted to the Council College of Education University of Al-Qadisiyah in
Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Doctorate Philosophy
in Chemistry/ Biochemistry

By

Wisam Hindawi Hoidy

B.Sc in Chemistry (University of Al-Qadisiyah, 1993)

M.Sc (University Putra Malaysia, 2010)

Supervised By

Prof. Dr. Ferdous Abbas Jabir

February 2018 A.D

Jamadi Alakhar 1438 A.H



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة القادسية
كلية التربية
قسم الكيمياء

تأثير الوراثة الدوائية لبعض الجينات على الاستجابة والسمية الخلوية للعلاج الكيماوي في المرضى المصابين بسرطان الثدي

أطروحة مقدمة إلى

مجلس كلية التربية/جامعة القادسية

وهي جزء من متطلبات نيل درجة دكتوراه فلسفة في الكيمياء/ الكيمياء الحياتية

مقدمة من قبل

وسام هندراوي هوردي

بكلوريوس علوم في الكيمياء (جامعة القادسية , ١٩٩٣)

ماجستير علوم كيمياء (جامعة UPM ٢٠١٠)

بإشراف

أ.د. فردوس محاسن جابر

شباط ٢٠١٨ م

جمادي الآخر ١٤٣٨ هـ

Summary

Pharmacogenetics is the branch of pharmacology and it is also a branch of clinical biochemistry which deals with the influence of genetic variation on drug response in patients by correlating gene expression or single-nucleotide polymorphisms with a drug's efficacy or toxicity. It aims to develop rational means to optimize drug therapy, with respect to the patient's genotype, to ensure maximum efficacy with minimal adverse effects. Such approaches promise the advent of 'personalized medicine', in which drugs and drug combinations are optimized for each individual's unique genetic makeup.

Breast cancer is the commonest cancer affecting women worldwide. Different studies have dealt with the etiological factors of that cancer aiming to find a way for early diagnosis and satisfactory therapy. The present study investigated the relationship between genetic polymorphisms of SOD2, CYP2C19 and FCGR2A genes and evaluation of some etiological risk factors among breast cancer patients in Iraq. This investigation was carried out on 50 patients (all were females) who were confirmatory for breast cancer by histopathological examinations attended from AL-Dewaniyah Teaching Hospital in Al-Diwaniyah city and 25 of apparently healthy women were used as a control, in addition there are 10 samples of relatives of patients (mother, sister and daughter).

This study included three parts, the first involving a study of the effect of some genes on the risk of breast cancer and the prescription of drugs. The second part involves the study of some hormone receptors. The third part involves the study of the level of enzyme P53 and its effect on reduce of breast cancer.

DNA was extracted from fresh blood of patients with breast cancer and normal individuals. The purity of isolated DNA ranged from (1.7–1.9). The extracted DNA was successfully used in amplification of SOD2, CYP2C19 and FCGR2A genes by PCR, and use sequencing for all cases to appear the genotypes and alleles for all.

Genotyping of rs4880, rs4244285 and rs1801274, were examined in association with breast cancer of Iraqi women. We found that individuals carrying the

CT genotype of rs4880 manifested an increased risk of breast cancer in comparison with those carrying the TT genotype (OR=0.171, 95%CI=0.053-0.551, P=0.002). In dominant model, we observed that CT&CC genotype of rs4880 showed an increased risk of breast cancer compared with the TT genotype (OR=0.248, 95%CI=0.089-0.690, P=0.006). Moreover, subjects with the GA genotype of rs4244285 presented a high risk of breast cancer than the GG genotype (OR=0.256, 95%CI=0.066-0.987, P=0.038) and dominant models (OR= 0.025, 95%CI=0.054-0.775, P=0.013). The analysis revealed that rs1801274 showed linkage disequilibrium and decreased risk with breast cancer. our study suggests that rs4880 and rs4244285 polymorphisms play an important role in development of breast cancer in Iraqi population, and no significant association between rs1801274 and breast cancer.

In the second part of the study, hormone receptors include (ER, PR & HER-2). The breast tumor (malignant) patients were further distributed according to the IHC expression of both receptors (ER and PR), and accordingly four groups (ER+ivePR+ive, ER+ivePR-ive, ER-ivePR+ive and ER-ivePR-ive) were evaluated. Exactly 50% of malignant patients were positive for both receptors (ER+ivePR+ive), and 20% were negative for both receptors (ER-ivePR-ive), the rest were distribute (ER+ivePR-ive) and (ER-ivePR+ive) 16% and 14%, respectively. The patients who appeared to them (ER+ivePR+ive, ER+ivePR-ive and ER-ivePR+ive) who represent 40 out of 50 malignant cases 80%, where they are considered to have positive receptors should be given tamoxifen or other drug which closes these receptors so that the cancer does not return again and is given for five years according to American protocol of medicine.

The third part of the research, P53 is a key tumor suppressor and transcription factor protecting us from cancer. The wild type P53 protein functions as a regulatory protein, triggering a variety of cellular responses to different signals. Activation of P53 can lead to cell division arrest, DNA repair, or apoptosis. More than 60% of all human cancers contain p53 mutations. The aim of the study is to evaluate serum P53 concentrations in patients with malignant breast tumors and healthy. Level of total

tumor protein 53 has been estimated in fifty serological samples of Iraqi women breast cancer patients, twenty five of healthy volunteers and ten samples as relatives of patients by using ELISA technique. The mean value of P53 concentration in patients with breast cancer, apparently healthy and relatives groups were (47 ± 33.5 U/ml), (27.9 ± 12.7 U/ml) and (32.9 ± 7.8), respectively. Estimation of P53 level showed no significantly difference ($p=0.294, 0.372$) of the concentration among the sera of recurrent breast cancer in comparison with other group.

الخلاصة

علم الوراثة الدوائي هو فرع من علم الادوية وهو ايضا فرع من الكيمياء الحياتية السريرية والذي يتعامل مع فروق التباين الوراثي على استجابة الدواء في المرضى عن طريق ربط التعبير الجيني أو واحد النوكليوتيدات متعدد الاشكال مع فعالية الدواء أو سمية. ويهدف إلى تطوير وسائل لتحسين العلاج بالعقاقير التي تؤثر على التركيب الجيني للمريض، لضمان أقصى قدر من الكفاءة مع الحد الأدنى من الآثار السلبية. هذه النوع من التداوي تعد بظهور "الطب الشخصي"، حيث يتم الجمع بين الأدوية والتركيب الجيني لكل فرد.

يعتبر سرطان الثدي من أكثر أنواع السرطان شيوعا في العالم. وقد تناولت دراسات مختلفة العوامل المسببة لهذا السرطان كما تناولت إيجاد وسائل التشخيص المبكر والعلاج. وفي هذه الدراسة تم تناول العلاقة بين تعدد الأشكال الوراثية للجينات SOD2 و CYP2C19 و FCGR2A وتأثيرها على الإصابة بسرطان الثدي اضافة الى دراسة وصف الادوية المناسبة للمرض والابتعاد عن اعطاء كميات كبيرة من الادوية ليس لها تأثير. تم إجراء هذا الدراسة على ٥٠ مريضا (جميعهم من الإناث) كانوا مصابين بسرطان الثدي عن طريق الفحوص النسيجية التي اجريت لهم في مختبرات مستشفى الديوانية التعليمي في مدينة الديوانية، و ٢٥ من النساء غير المصابات بالمرض ظاهريا كمجموعة سيطرة، بالإضافة إلى 10 عينات من أقارب المرضى (الأم والأخت والابنة).

شملت هذه الدراسة ثلاثة أجزاء، الأولى تنطوي على دراسة لتأثير بعض الجينات على خطر الإصابة بسرطان الثدي ووصف الأدوية المناسبة على حسب الاستقبال الجيني للدواء والذي يختلف من شخص لآخر. أما الجزء الثاني من الدراسة فيتضمن دراسة مستقبلات الهرمون ومدى تأثيرها على عودة المرض بعد الشفاء والادوية المستخدمة. الجزء الثالث يتضمن دراسة مستوى انزيم P53 وتأثيره على الحد من سرطان الثدي. تم استخلاص الحامض النووي (DNA) لكل من المرضى والأصحاء والأقارب. تراوحت درجة نقاء الحمض النووي المعزول من (١.٧-١.٩). تم تضخيم الحامض النووي بواسطة جهاز (PCR) باستخدام البرايمرات الخاصة بكل جين. ثم تم فحص الترتيب النيكلوتيدي لكل حامض نووي.

اظهرت النتائج بالنسبة للجين SOD2 للتغاير rs4880, ان الاشخاص الحاملين للنمط الجيني CT هم اكثر عرضه للإصابة بسرطان الثدي مقارنة بالاشخاص حاملي النمط الجيني TT (OR=0.171,95%CI=0.053-0.551,P=0.002). اما بالنسبة للتغاير rs٤٢٤٤٢٨٥ للجين CYP2C19 فقد وجد ان النمط الجيني GA له علاقة قوية للإصابة بسرطان الثدي مقارنة بالنمط الجيني GG, OR=0.248, (95%CI=0.089-0.690, P=0.006). اما التغاير الثالث rs1801274 للجين FCGR2A فلم يظهر اي تأثير لخطر الإصابة بمرض السرطان. اي ان دراستنا توصلت الى ان التغاير الاول والثاني rs4880 و


rs4244285 لها دور مهم في تطور الإصابة بسرطان الثدي عند النساء العراقيات فيما لم يظهر التغيرات الثالث rs1801274 اي علاقة للإصابة بسرطان الثدي.

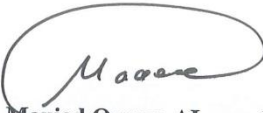
في الجزء الثاني من البحث تم دراسة مستقبلات الهرمون (ER, PR & HER-2) ومدى تأثيرها على الادوية المعطاة لمرضى سرطان الثدي لمنع عودة المرض مرة اخرى. هنالك اربع مجاميع لمستقبلات الهرمون ER و PR وهي (ER+vePR+ve, ER+vePR-ve, ER-vePR+ve and ER-vePR-ve) تم تقييمها للمرضى. وجد ان ٥٠% من المرضى كانت نتائج التحليل لهم (ER+vePR+ve) و ٢٠% كانت نتائجهم (ER-vePR-ve) اما بقية المرضى فكان ١٦% تحاليلهم اعطت (ER+vePR-ve) و ١٤% (ER-vePR+ve). اي ان المرضى الذين ظهرت لهم نتائج التحليل ((ER+vePR+ve, ER+vePR-ve and ER-vePR+ve) يمثلون ٤٠ من اصل ٥٠ مريض اي مايعادل ٨٠% حيث يعتبر مستقبلات الهرمون لديهم موجبه وهؤلاء يجب عليهم اخذ عقاقير تغلق هذه المستقبلات مثل عقار التيموكسوفين لضمان عدم عودة المرض مرة اخرى. ويعطى هذا العقار لمدة خمس سنوات. بينما اظهرت نتائج فحص HER-2 ان ١٤ من اصل ٥٠ مريض اي بنسبة ٢٨% كانت نتائجهم ايجابية اي ان عليهم اخذ عقاقير لغلق هذا المستقبل مثل عقار trastuzumab.


في الجزء الثالث من البحث، P53 هو كبت الورم الرئيسي والحماية من السرطان. نوع البروتين p53 العادي يعمل كبروتين تنظيمي، مما يفقد لمجموعة متنوعة من الاستجابات الخلوية لإشارات مختلفة. تفعيل p53 يمكن أن يؤدي إلى تقييد انقسام الخلايا، وإصلاح الحمض النووي، أو موت الخلايا المبرمج. أكثر من ٦٠% من جميع سرطان الإنسان تحتوي على طفرات p53. وكان الهدف من الدراسة تقييم تركيز P53 مصلى الدم في المرضى الذين يعانون من أورام الثدي الخبيثة والناس الاصحاء ظاهريا. وقد تم تقدير تركيز البروتين ٥٣ في خمسين عينة مصلية من النساء العراقيات المصابات بسرطان الثدي وخمس وعشرين من المتطوعين الأصحاء ظاهريا، وعشر عينات من اقارب المرضى باستخدام تقنية الاليزا. وجد ان متوسط قيم تركيز P53 للمرضى والاصحاء والاقارب كانت (47±33.5 U/ml) و (27.9±12.7 U/ml) و (32.9±7.8) على التوالي. ولم يظهر تقدير تركيز P53 اختلافا معنويا بين تراكيز المرضى والاصحاء (P=0.294) من جهة وبين الاقارب والاصحاء من جهة اخرى (P=0.372) وتختلف هذه النتائج عن نتائج معظم الدراسات التي أجريت في أماكن أخرى من العراق والعالم.


Examination Committee Certification

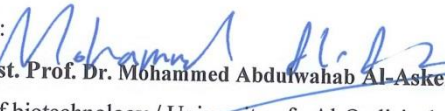
We chairman and members of the discussion committee, certify that we have studied this thesis " *INFLUENCE OF PHARMACOGENETIC OF SOME GENES ON RESPONSE AND TOXICITY OF CHEMOTHERAPY TREATED PATIENTS WITH BREAST CANCER*" presented by the student (*Wisam Hindawi Hoidy*) and examined her in it's contents and that, we have found its worthy to be accepted for the *Degree of Doctorate philosophy in chemistry / biochemistry* with (Excellent)


Signature: 
Name: **Prof. Dr. Fadhil Jawad AL- Tu'ma**
College of Medicine /University of Karbala'a
(Chairperson)
Date: 18/3 / 2018

Signature: 
Name: **Prof. Dr. Mouiad Omran AL-qazali**
College of Medicine / University of Babylon
(Member)
Date: 18/3 / 2018


Signature: 
Name: **Prof. Dr. Nabeel A. A. AL-Radha**
College of Science /University of Al-Qadisiyah
(Member)
Date: 18/3 / 2018

Signature: 
Name: **Prof. Dr. Ahmed M. Issa**
College of Medicine / University of Jabir bin Haian
(Member)
Date: 18/3 / 2018

Signature: 
Name: **Asst. Prof. Dr. Mohammed Abdulwahab AL-Askeri**
College of biotechnology / University of Al-Qadisiyah
(Member)
Date: 19/ 3 / 2018

Signature: 
Name: **Prof. Dr. Ferdous Abbas Jabir**
College of Medicine/ University of Al-Qadisiyah
(Supervisor)
Date: 18/3 / 2018

I have certified upon the discussion of the examining committee

Signature: 
Name: **Prof. Dr. Khalid Jawad Al-adilee**
Address: Dean of the College of Education
University of Al-Qadisiyah
Date: 19/ 3 / 2018

Supervision Certification

I certify that this dissertation((Influence of Pharmacogenetics of Some Genes on Response and Toxicity of Chemotherapy Treated Patients with Breast Cancer)) was prepared by **Wisam H. Hoidy**, under my supervision at the College of Education at the University of Al-Qadisiyah, as a partial requirement for the degree of doctorate philosophy in Chemistry/Biochemistry

Signature: 
Supervisor: Prof. Dr. Ferdous Abbas Jabir

College of Medicine/ University of Al-Qadisiyah

10/10/2018

Report of the Head of Department of Chemistry

I certify that this dissertation was carried out in the Department of Chemistry, I nominate it to be presented to discussion.

Signature: 

Name: Assist. Prof. Dr. Layth Samir Jasim

Date: 10/10/2018

