

# تشخیص ژنتیکی سرطان: اهمیت تشخیص جهش در ژن‌های BRCA1 و BRCA2 در سرطان سینه (پستان)

● دکتر صادق ولیان بروجنی

متخصص ژنتیک پزشکی، استاد ژنتیک دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم و تکنولوژی  
گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی و میکروبیولوژی، بخش ژنتیک

[svallian@sci.ui.ac.ir](mailto:svallian@sci.ui.ac.ir)

## □ خلاصه

دامنه وسیعی از سلول‌ها و بافت‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد. ارتباط ژنتیک با سرطان اولین بار در اوایل قرن بیستم بیان شد و این ارتباط یکی از پایه‌های تحقیقات سرطان به شمار می‌رود. اکنون جهش‌هایی که بیان ژن را تغییر می‌دهند به عنوان ویژگی مشترک همه سرطان‌ها شناخته می‌شوند. در اکثر سرطان‌ها، جهش‌ها در سلول‌های بدنی به وجود می‌آیند و از طریق سلول‌های زاینده به نسل‌های بعدی منتقل نمی‌گردند. اما، در حدود ۱ درصد از موارد سرطانی، جهش‌های سلول‌های زاینده به زاده‌ها انتقال می‌یابند و عامل آسیب‌پذیری به سرطان محسوب می‌شوند. گرچه فراوانی چنین مواردی پایین است، این جهش‌ها اطلاعاتی در مورد خاستگاه‌های سرطان فراهم کرده‌اند. برای وقوع سرطان، وجود جهش ارثی کافی نیست و باید یک جهش بدنی دیگر در جایگاه هومولوگ صورت گیرد تا حالت جهش یافته هوموزیگوس پدید آید. امروزه از سرطان به عنوان یک اختلال ژنتیکی در سطح سلولی یاد می‌شود.

جهش‌های مرتبط با سرطان می‌توانند تغییراتی در مقیاس کوچک، مانند جانمایی تک نوکلئوتیدی، یا رویدادهای در سطح وسیع، مانند بازآرایی کروموزومی، کسب یا از دست دادن کروموزوم، یا حتی الحاق ژنوم‌های ویروسی به جایگاه‌های کروموزومی را شامل شوند. تغییرات ژنومی در سطح وسیع، ویژگی متداول در سرطان به شمار می‌روند. اکثر تومورهای انسانی با وجود تغییرات

طی دو دهه اخیر موفقیت‌های چشمگیر در زیست‌شناسی مولکولی و ژنتیک موجب شگفتی دنیا شده است. به طوری که اکنون امکان تعیین توالی‌های کامل ژنی (whole genome sequencing) برای یک فرد و تشخیص احتمال ابتلای او به بیماری‌های مختلف مانند بیماری قلبی و سرطان‌ها تا حدود زیادی فراهم شده است. اما این موفقیت‌ها، محدودیت‌های مهم و مسائل اخلاقی عمیقی را به دنبال دارند که غالباً در میان شور و اشتیاق ما برای فن‌آوری‌های جدید نادیده گرفته می‌شوند. موضوع آزمایش ژنتیکی سرطان نشان می‌دهد که ما چگونه باید پیش‌بینی‌های خود را با عدم قطعیت تعدیل کنیم. در این نوشتار برخی از واقعیت‌های پشت پرده آزمایش‌های ژنتیک مربوط به سرطان پستان (سینه) به چالش کشیده می‌شود. این چالش می‌تواند به سایر بیماری‌های ژنتیک و سرطان نیز تعمیم داده شود.

**کلمات کلیدی:** سرطان پستان، آزمایش‌های ژنتیک،

تعیین توالی کامل ژنی، بیماری‌های ژنتیک

## □ مقدمه

گرچه سرطان اغلب به عنوان یک بیماری منفرد تلقی می‌شود، اما در واقع گروه پیچیده‌ای از بیماری‌هاست که



می‌کنند و ژن‌های تنظیم‌کننده این ویژگی‌ها در نظر گرفته شوند. سلول‌های سرطانی دو ویژگی مشترک دارند: (۱) رشد کنترل نشده و (۲) توانایی متاستاز<sup>۳</sup> یا گسترش، از جایگاه اولیه خود به سایر نواحی در بدن. تقسیم سلولی در سلول‌هایی روی می‌دهد که چرخه سلولی را پشت سر گذارده‌اند؛ در سلول‌های سرطانی، کنترل بر چرخه سلولی از بین می‌رود و سلول‌ها به سرعت تکثیر می‌شوند. تحقیقات بر روی تنظیم ژنتیکی چرخه سلولی دیدگاه‌هایی را در مورد مکانیسم‌های سرطان فراهم می‌کنند.

محصولات ژنی که بر روی سطح سلولی قرار دارند، متاستاز سلول‌های سرطانی را کنترل می‌کنند. ژنتیک متاستاز با درک چگونگی برهمکنش سلول‌ها با ماتریکس خارج سلولی و با سلول‌های مجاور از طریق مولکول‌های سطح سلولی ارتباط دارد. از آنجا که این موضوع نسبت به مطالعه چرخه سلولی کمتر توسعه یافته است، به تازگی اطلاعاتی را در مورد رویدادهای ثانویه در پیشرفت تومور به دست می‌دهد.

#### □ جهش‌هایی که زمینه‌ایجاد سرطان را فراهم می‌کنند

آشکار است که دو ویژگی اصلی سرطان، تقسیم سلولی کنترل نشده و متاستاز، از جهش‌ها ناشی می‌شوند. همان‌طور که قبلاً ذکر گردید، این جهش‌ها می‌توانند ناپایداری‌های ژنومی وسیع، از دست دادن کروموزوم، بازآرایی کروموزوم، یا دخول توالی‌های DNA خارجی (اغلب ویروسی) به جایگاه‌های ژنی را در بر گیرند. جهش‌هایی که در مقیاس کوچک‌تر روی می‌دهند، شامل جانشینی‌های نوکلئوتیدی یا حذف‌ها یا تغییرات جزئی تر، تنها بر مقدار یک محصول ژنی یا مدت زمان فعالیت ژن اثر می‌گذارند.

عموماً، کنترل تقسیم سلولی به دو روش صورت می‌گیرد: (۱) توسط ژن‌هایی که به طور طبیعی برای سرکوب تقسیم سلولی عمل می‌کنند و (۲) توسط ژن‌هایی که به طور طبیعی برای وقوع تقسیم سلولی فعالیت دارند. اولین گروه

کروموزومی قابل مشاهده شناسایی می‌گردند. برخی از این تغییرات کروموزومی، به ویژه در لوسمی، به حدی بارزند که می‌توان از آن‌ها در تشخیص اختلال و پیشگویی در مورد شدت و درجه بیماری استفاده کرد.

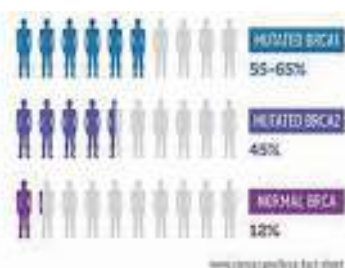
سرطان‌هایی که در خانواده‌ها شایع هستند بیش از ۲۰۰ سال شناخته شده‌اند. در اکثر موارد، الگوی توارث مشخصی را نمی‌توان برای این حالت‌های فAMILIAL تعیین کرد؛ زیرا افراد مبتلا در این خانواده‌ها تنها یک آلل جهش یافته را به ارث می‌برند که آن‌ها را مستعد ابتلا به سرطان می‌کند. در چنین مواردی، احتمال این که در نهایت یک فرد سرطان را نشان دهد به چندین عامل بستگی دارد: کدام ژن جهش می‌یابد، جهش‌ها در سایر ژن‌ها و همچنین عوامل محیطی. این متغیرها بر سن بروز و شدت بیماری اثر دارند. طبق مطالعات سرطان‌های فAMILIAL، می‌توان گروهی از ژن‌ها را به نام ژن‌های آسیب‌پذیری به سرطان<sup>۱</sup> شناسایی کرد که خطر ابتلا به سرطان را افزایش می‌دهند. آلل‌های جهش یافته این ژن‌ها نقش مهمی در سرطان‌های تک‌گیر و اشکال فAMILIAL سرطان دارند.

به دلیل مقدار زمینه‌ای جهش خودبخودی، همواره میزان پایه‌ای از سرطان وجود خواهد داشت. بالاتر و بیشتر از این میزان پایه، عوامل محیطی که جهش را افزایش می‌دهند نیز می‌توانند بر میزان سرطان اثر بگذارند. تقریباً همه کارسینوزن‌های<sup>۲</sup> محیطی شناخته شده (عوامل ایجادکننده سرطان)، مانند تابش یونیزه، مواد شیمیایی و ویروس‌ها، با ایجاد جهش‌ها عمل می‌کنند. با توجه به این که جهش‌ها نقش اساسی در سرطان دارند، در این فصل، بررسی می‌شود که چگونه جهش‌ها سلول‌های طبیعی را به تومورهای بدخیم تبدیل می‌کنند، کدام ژن‌های جهش یافته با احتمال بیشتری منجر به سرطان می‌شوند و چگونه وقوع بسیاری جهش‌ها برای ایجاد سرطان ضرورت دارد.

به منظور پاسخ به این پرسش‌ها، باید ویژگی‌های سلول‌های سرطانی که آن‌ها را از سلول‌های طبیعی متمایز

- 1 - Cancer susceptibility genes
- 2 - Carcinogens
- 3 - Metastasis

به شمار می‌رود. هر ساله، بیش از ۱۸۰۰۰۰ مورد جدید در ایالات متحده تشخیص داده می‌شوند. سرطان سینه تنها به زنان اختصاص ندارد؛ حدود ۱۴۰۰ مرد مبتلا نیز شناسایی گردیده‌اند. احتمال ایجاد سرطان سینه قبل از ۳۵ سالگی پایین است اما بعد از این سن افزایش می‌یابد. احتمال ابتلا به سرطان سینه در طول زندگی یک زن حدود ۱۰ درصد است.



شکل ۱: ارتباط بین جهش‌های ژن‌های BRCA1 و BRCA2 و سرطان پستان

حدود ۵ تا ۱۰ درصد از سرطان‌های سینه، فامیلی هستند که با وجود چندین مورد از سرطان سینه یا تخمدان در بین خویشاوندان خونی و با بروز زودرس بیماری شناخته می‌شوند. تجمع سرطان‌های سینه و تخمدان در خانواده‌های معین نشان می‌دهد که جهش‌های ژنتیکی در ایجاد این سرطان‌ها نقش دارند. در ۱۹۹۴، دو ژن شناسایی شدند که به نظر می‌رسد با سرطان‌های سینه فامیلی ارتباط داشته باشند. جهش‌های رده زاینده این دو ژن (BRCA1 و BRCA2) در اکثر سرطان‌های سینه فامیلی دیده می‌شوند و احتمالاً جهش‌های چندین ژن دیگر نیز در این سرطان نقش دارند. عملکردهای مولکولی BRCA1 و BRCA2 هنوز نامشخص است، گرچه آن‌ها احتمالاً در ترمیم DNA آسیب دیده یا تنظیم رونویسی ژن‌ها پاسخ دهنده به هورمون عمل می‌کنند. جهش در این ژن‌ها

از ژن‌های تنظیم کننده، ژن‌های سرکوبگر تومور<sup>۴</sup> خوانده می‌شوند. هنگامی که این ژن‌ها بیان شوند، عبور از چرخه سلولی را متوقف و از میتوز جلوگیری می‌کنند. برای وقوع تقسیم سلولی، این ژن‌ها یا محصولات آن‌ها (یا هر دو) باید غیر فعال یا حذف شوند. اگر ژن‌های سرکوبگر تومور به طور دائم با ایجاد جهش غیر فعال یا حذف گردند، کنترل بر تقسیم سلولی از بین می‌رود و سلول‌های جهش یافته به صورت کنترل نشده شروع به تکثیر می‌کنند.

ژن‌هایی که به طور طبیعی سبب تقسیم سلولی می‌شوند، پروتئوکوزن‌ها<sup>۵</sup> نام دارند. این ژن‌ها می‌توانند «روشن» یا «خاموش» گردند و هنگامی که آن‌ها «روشن» هستند، منجر به تقسیم سلولی می‌شوند. برای توقف میتوز، این ژن‌ها یا محصولات آن‌ها (یا هر دو) باید غیر فعال گردند. اگر این ژن‌ها به طور دائم روشن باشند، تقسیم سلولی کنترل نشده روی می‌دهد و به تشکیل تومور می‌انجامد. انواع جهش یافته پروتئوکوزن‌ها، انکوژن‌ها<sup>۶</sup> خوانده می‌شوند. در بخش‌های بعدی، بررسی می‌گردد که چگونه جهش در ژن‌های سرکوبگر تومور می‌تواند از دست دادن کنترل چرخه سلولی و ایجاد سرطان را در پی داشته باشد. سپس نقش پروتئوکوزن‌ها و انکوژن‌ها بیان می‌گردد.

### □ ژن‌های سرکوبگر تومور به طور طبیعی از تقسیم سلولی ممانعت می‌کنند

مطالعات انجام شده تعدادی از ژن‌ها را شناسایی کرده‌اند که وقتی جهش می‌یابند، زمینه ایجاد سرطان‌های خاصی را فراهم می‌کنند. یک نمونه از این زمینه‌های ارثی برای سرطان در ارتباط با رتینوبلاستوما، سرطان ارثی سلول‌های شبکیه چشم، بیان می‌شود.

### □ سرطان سینه

سرطان سینه شایع‌ترین نوع سرطان در بین زنان و دومین عامل مرگ‌های ناشی از سرطان (بعد از سرطان ریه)

- 4 - Tumor-suppressor genes
- 5 - protooncogenes
- 6 - oncogenes



می‌آورند)، BRCA1 فسفریله می‌شود (علامت فعال سازی مولکولی). تلاش‌های کنونی بر شناسایی پروتئین‌های کینازی که این فسفریلاسیون را انجام می‌دهند، تمرکز دارند تا پروتئین‌های BRCA1 و BRCA2 را در مسیری مرتبط با ترمیم DNA قرار دهند.

شواهد اخیر نشان می‌دهند که پروتئین BRCA1 می‌تواند به وسیله دو کیناز مختلف فسفریله شود و هر یک از این کینازها بر اثر شکست‌های دو زنجیره‌ای DNA فعال می‌گردند. در این مدل، آسیب DNA، ATM، کیناز یا Chk2 کیناز (یا هر دو) را فعال می‌کند. این کینازها، سبب فسفریلاسیون پروتئین‌های p53 و BRCA1 می‌شوند. پروتئین p53 فعال شده، همانند سازی طی مرحله S را متوقف می‌کند تا ترمیم DNA صورت گیرد. پروتئین BRCA1 فعال شده در ترمیم DNA با پروتئین BRCA2، پروتئین mRAD51 و سایر پروتئین‌های هسته‌ای درگیر در ترمیم شرکت می‌کند.

### تشخیص ژنتیکی سرطان پستان

اخیراً، آزمایش‌های ژنتیکی برای جهش در ژن‌های BRCA1 و BRCA2 در خانواده‌هایی که احتمال ابتلا به سرطان سینه فامیلی بالاست، انجام می‌شود. این آزمایش‌ها بسیار دقیق هستند و هر یک از صدها جهشی را که در منطقه کد کننده این ژن‌ها می‌تواند روی دهد، شناسایی می‌کنند. اما آزمایش‌های مذکور، محدودیت‌هایی دارند. آن‌ها قادر به تعیین جهش‌ها در مناطق تنظیمی که خارج از ناحیه کد کننده قرار دارند و می‌توانند سبب بیان غیرطبیعی این ژن‌ها شوند، نخواهند بود. همچنین، در مورد این که چگونه یک جهش معین خود را به صورت خطر ابتلا به سرطان نشان می‌دهد در حالی که نفوذ از فاکتورهای محیطی و برهمکنش بین ژن‌های مستعد دیگر تأثیر می‌پذیرد، دانش ما اندک است.

برخی از بیماران مبتلا به سرطان سینه فامیلی و خانواده‌های آن‌ها در صدد بر می‌آیند که آزمایش‌های ژنتیکی BRCA1 و BRCA2 را انجام دهند. این بیماران انتظار دارند که نتایج آزمایش به آن‌ها کمک کند تا از عود بیماری جلوگیری نمایند، آن‌ها را در تصمیم برای

به صورت غالب اتوزومی با نفوذ متغیر انتقال می‌یابد. زنانی که جهش‌هایی در BRCA1 دارند، در طول زندگی خود با احتمال ۵۰ تا ۸۰ درصد به سرطان سینه و ۲۰ تا ۴۰ درصد به سرطان تخمدان مبتلا می‌گردند. از سوی دیگر، احتمال ابتلا به سرطان سینه در مردانی که جهش‌های رده زاینده در BRCA2 دارند، ۶ درصد تعیین می‌شود (افزایش ۱۰۰ برابر نسبت به کل جمعیت مردان) (شکل ۱).

### ژن‌های سرطان سینه

جهش‌ها در BRCA1، روی بازوی بلند کروموزوم ۱۷، با استعداد ابتلا به سرطان سینه ارتباط دارند. این استعداد به صورت صفت غالب اتوزومی به ارث می‌رسد. حدود ۸۵ درصد از زنانی که یک آلل BRCA1 جهش یافته را حمل می‌کنند، جهشی در دومین آلل خواهند داشت و در این صورت به سرطان سینه مبتلا می‌شوند. در این زنان، خطر ابتلا به سرطان تخمدان نیز افزایش می‌یابد.

دومین ژن سرطان سینه، BRCA2، بر روی بازوی بلند کروموزوم ۱۳، نیز با الگوی توارث غالب اتوزومی زمینه ابتلا به سرطان سینه را ایجاد می‌کند، اما با افزایش خطر ابتلا به سرطان تخمدان ارتباط ندارد. به طور کلی، این ژن‌ها عامل بسیاری از سرطان‌های سینه مرتبط با زمینه ژنتیکی (حدود ۱۰ درصد از تمام موارد سرطان سینه) به شمار می‌روند. انواع جهش یافته این ژن‌ها در موارد تک‌گیر سرطان سینه که ۹۰ درصد از تمام موارد را تشکیل می‌دهند، نقشی ندارند.

هر دو BRCA1 و BRCA2، پروتئین‌های بزرگی را کد می‌کنند که به هسته محدود می‌شوند و در بسیاری بافت‌ها بیان می‌گردند. بیان آن‌ها در مرحله S چرخه سلولی بالاترین میزان را دارد. شواهد ضمنی، شامل الگوی مشترک بیان آن‌ها، فنوتیپ مشابه آلل‌های جهش یافته (سرطان سینه)، موقعیت سلولی و شواهد تجربی حاصل از مطالعات بر روی موش‌ها، نشان می‌دهند که هر دو ژن عملکرد مشابهی دارند و در ترمیم DNA مؤثرند. شواهد مستقیم برای نقش پروتئین BRCA1 در ترمیم DNA نیز وجود دارد. در سلول‌هایی که در معرض تابش یونیزه کننده قرار می‌گیرند (که شکست‌های دو زنجیره‌ای DNA را به وجود

بچه دار شدن راهنمایی کند و اعضایی از خانواده که در خطر ابتلا قرار دارند را آگاه سازد. اما این موارد، مزایای مثبت آزمایش‌های مذکور به شمار نمی‌روند. زانی که نتایج آزمایش آن‌ها منفی است آرامش می‌یابد که «آن‌ها به سرطان سینه فامیلی مبتلا نمی‌شوند.» اما، خطر ایجاد سرطان سینه در آن‌ها هنوز ۱۰ درصد است (خطر ابتلا به بیماری در جمعیت) و آن‌ها باید به مراقبت و کنترل در ارتباط با این بیماری ادامه دهند. همچنین آزمایش‌های BRCA1 و BRCA2 منفی این احتمال را رد نمی‌کند که بیمار یک جهش سرطان سینه فامیلی در ژن ناشناخته دیگری داشته باشد یا این که جهش‌های BRCA1 یا BRCA2 وجود دارند اما خارج از مناطق کد کننده بوده و به وسیله آزمایش‌های ژنتیکی کنونی، شناسایی نمی‌شوند. افرادی که آزمایش آن‌ها مثبت است نیز با مشکلاتی روبه‌رو می‌شوند. راهکارهای درمانی، نسبتاً ضعیف هستند که مراقبت دقیق، پستان برداری به عنوان اقدام پیشگیری کننده، افرکتومی<sup>۷</sup> (برداشتن سینه‌ها و تخمدان‌ها) و استفاده از قرص‌های کنترل بارداری یا تاموکسیفن<sup>۸</sup> را در بر می‌گیرند. جراحی پیشگیری کننده می‌تواند خطرات را کاهش دهد اما آن‌ها را از بین نمی‌برد و سرطان هنوز در بافت‌هایی که بعد از عمل باقی می‌مانند، ایجاد می‌گردد. با مصرف داروهایی مانند تاموکسیفن نیز از احتمال ابتلا کاسته می‌شود اما اثرات جانبی دارند. آزمایش‌های ژنتیکی نه تنها بر بیمار بلکه بر کل خانواده او نیز اثر می‌گذارند. افراد اغلب با دانستن اینکه حامل یک بیماری ژنتیکی هستند، ترس، نگرانی و گناه را تجربه می‌کنند. مطالعات نشان می‌دهند حتی افرادی که نتایج آزمایش ژنتیکی را نمی‌پذیرند نیز از افزایش نگرانی رنج می‌برند. راز داری یک مسئله اساسی است. بیماران می‌ترسند که اطلاعات ژنتیکی آن‌ها برای کارمندان یا شرکت‌های بیمه فاش شود و چشم‌انداز آن‌ها را در مورد شغل و بیمه تندرستی مناسب به مخاطره اندازد. مسئله آزمایش ژنتیکی به قدری تازگی دارد که سیستم سلامت از این دانش عقب افتاده است. از آنجا که نتایج

آزمایش‌های ژنتیکی، اثرات جانبی روان شناختی و ابهامات پزشکی دارند، مشاوره ژنتیکی برای بیماران و خانواده‌های آن‌ها ضروری به نظر می‌رسد. اما تعداد مشاوران ژنتیکی کار آزموده که در زمینه این آزمایش‌ها تجربه دارند، کافی نیست و این موارد هنوز برای افراد واجد صلاحیت پیچیده و مشکل است. پزشکان غالباً دانش کمی در مورد ژنتیک کلینیکی انسان دارند و احساس می‌کنند کفایت لازم را برای مشاوره بیماران خود ندارند، و شرکت‌های بیمه هنوز باید خط مشی‌های خود را در ارتباط با آزمایش‌ها و اطلاعات ژنتیکی تعیین کنند. دولت‌ها باید قوانین و استانداردهایی را برای امنیت و کارایی آزمایش‌های ژنتیکی و نیز برای کاربردهای اطلاعات ژنتیکی به وجود آورند تا یکپارچگی لازم ایجاد و راز داری رعایت شود. ارائه تفسیر مبهم از آزمایش‌های ژنتیکی BRCA1/2، راهکارهای درمانی نسبتاً غیرمؤثر و اثرات جانبی اجتماعی و روانی بالقوه همگی دلایل ناخوشایندی هستند که سبب می‌شوند تنها حدود ۶۰ درصد از بیماران مبتلا به سرطان سینه فامیلی و خانواده‌های آن‌ها آزمایش‌های ژنتیکی را انجام دهند.

## ❑ پرسش‌های بدون پاسخ در مورد آزمایش‌های ژنتیکی BRCA1/2

خطراتی که با هر یک از جهش‌ها ارتباط دارند کدامند؟ کدام نوع سرطان در اثر کدام یک از جهش‌ها به وجود می‌آید؟ آیا تمامی افراد باید اجازه آزمایش‌های BRCA1/2 را داشته باشند؟ آیا می‌توان به روش‌های درمانی مؤثر برای این بیماری‌ها دست یافت؟ چگونه می‌توان اطمینان پیدا کرد که قیمت بالای آزمایش‌های ژنتیکی و مشاوره، این فن آوری جدید را به گروه خاصی از افراد محدود نمی‌کند؟ درگیری با این پرسش‌ها و انواع مشابه آن‌ها از زمانی آغاز می‌شود که آزمایش‌های ژنتیکی برای تعداد بیشتر و بیشتری از بیماری‌ها طی چند دهه آتی به وجود آیند.

7 - Oophorectomy

8 - Tamoxifen





## *References*

- 1- Lee A, Moon BI, Kim TH *BRCA1/BRCA2 Pathogenic Variant Breast Cancer: Treatment and Prevention Strategies. Ann Lab Med.* 2020 Mar;40(2):114-121. doi: 10.3343/alm.2020.40.2.114.
- 2- Yuichiro H, Maho T, Mikiko M and Akira H. *Molecular Trajectory of BRCA1 and BRCA2 Mutations. Front. Oncol.*, 25 March 2020. doi:10.3389/fonc.2020.00361.
- 3- Charlotte A. Spencer, William S. Klug, Michael A. Palladino, Michael R. Cummings. *Concepts of Genetics*, 2013, 12th edition, Pearson Education Limited.

