

Evaluation of the association between Val158Met polymorphism of COMT gene from estrogen metabolism pathway and risk of breast cancer

Maryam Sadat Shirkhorshidi¹, Zahra Tahmasebi Fard^{*2}, Farzaneh Tafvizi³

1. Department of Genetics, Domghan Branch, Islamic Azad University, Domghan, Iran

2. Department of Biology, Roudehen Branch, Islamic Azad University, Roudehen, Iran

3. Department of Biology, Parand Branch, Islamic Azad University, Parand, Iran

(Received: 2019/10/22

Accepted: 2020/06/16)

Abstract

Background: Breast Cancer (BC) is the most common cancer in women. Polymorphisms of some genes have been implicated in many diseases such as breast cancer. COMT involved in estrogen metabolism reduces activity by three to four times by altering valine amino acid to methionine and may be at risk for breast cancer. The aim of the present study was to investigate the association between Val158Met polymorphism of COMT gene and BC in a group of Iranian women.

Materials and Methods: In the current case-control study, 96 patients and 96 healthy individuals were selected. The DNA of their white blood cells was extracted using salt saturation method and the genotypes of the participants were determined via RFLP-PCR. The data were analyzed using chi-square and logistic regression tests.

Results: There was no statistically significant relationship between mean age and cigarette smoking. The AA mutant genotype had a statistically significant relationship between the two groups. Examination of dominant and recessive genetic models also revealed that this polymorphism is associated with a high risk of BC and increases the risk of breast cancer by 3.1 and 2.8, respectively, compared with the control group. Also, carriers of allele A were 3 times more likely to develop BC.

Conclusion: This polymorphism appears to be related to the risk of breast cancer in Iranian women and the presence of the A allele may be considered as one of the risk factors for breast cancer.

Keywords: Breast cancer; Polymorphism; COMT gene; Restriction Fragment Length Polymorphisms

*Corresponding author: Zahra Tahmasebi Fard

Email: ztahmasebi@riau.ac.ir; ztahmasebifard@yahoo.com

بررسی ارتباط بین پلی مورفیسم Val158Met ژن COMT از مسیر متابولیسمی استروژن با خطر ابتلا به سرطان پستان

مریم سادات شیرخورشیدی^۱، زهرا طهماسبی فرد^{۲*}، فرزانه تفویضی^۳

۱. گروه ژنتیک، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران
۲. گروه زیست شناسی، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی، رودهن، ایران
۳. گروه زیست شناسی، واحد پرند، دانشگاه آزاد اسلامی، پرند، ایران

پذیرش: ۱۳۹۹/۳/۲۷

دریافت: ۱۳۹۸/۷/۳۰

چکیده:

سابقه و هدف: سرطان پستان شایع ترین سرطان در زنان بوده و در ۳۲ درصد از موارد سرطان زنان دیده می شود. پلی مورفیسم های برخی از ژن ها، از عوامل دخیل در بسیاری از بیماری ها مثل سرطان پستان معرفی شده اند. آنزیم COMT یکی از آنزیم های دخیل در متابولیسم استروژن است که با تغییر اسید آمینه والین به متیونین، کاهش سه تا چهار برابری در فعالیت داشته و می تواند در خطر بروز سرطان پستان دخیل باشد. هدف از این مطالعه، بررسی ارتباط پلی مورفیسم Val158Met از ژن COMT با سرطان پستان گروهی از زنان ایرانی بود.

مواد و روش ها: در این مطالعه موردی-شاهدی، ۹۶ بیمار مبتلا به سرطان پستان و ۹۶ فرد سالم زیر نظر پزشک متخصص انتخاب شدند. DNA گلبول های سفید آن ها، به روش تمک اشباع استخراج شد و ژنوتایپ افراد مطالعه شده با تکنیک RFLP-PCR تعیین شد. داده های به دست آمده با آزمون های آماری کای دو و رگرسیون لجستیک بررسی شدند.

یافته ها: دو گروه از نظر میانگین سنی و متغیر مصرف سیگار رابطه آماری معناداری نداشتند. با رگرسیون لجستیک مشخص شد که ژنوتایپ موتانت AA بین دو گروه مطالعه شده رابطه آماری معناداری داشت. بررسی مدل های ژنتیکی غالب و مغلوب هم مشخص کرد که این پلی مورفیسم با خطر ابتلا به سرطان پستان مرتبط است و به ترتیب ۳/۱ و ۲/۸ برابر شانس ابتلا به سرطان پستان را در مقایسه با افراد شاهد افزایش می داد. حاملان آلل A به میزان ۳ برابر شانس بیشتر برای مبتلا شدن به سرطان پستان داشتند.

نتیجه گیری: به نظر می رسد این پلی مورفیسم با خطر ابتلا به سرطان پستان در زنان ایرانی مرتبط است و می توان حضور آلل A را به عنوان یکی از عوامل افزایش دهنده خطر ابتلا به سرطان پستان در نظر گرفت.

واژگان کلیدی: سرطان پستان، پلی مورفیسم، ژن COMT، RFLP

مقدمه:

سطح سرمی استروژن (۱۷- بتا استرادیول) از عوامل دخیل در ایجاد و گسترش سرطان پستان معرفی شده است (۱ و ۴). استرادیول هورمون اصلی زنان در سنین باروری است که پس از ترشح از تخمدان ها به سرعت اکسید شده و به استرون تبدیل می شود. از سوی دیگر، تعادل شیمیایی بین استرادیول و استرون در گردش خون برقرار شده به گونه ای که استرون در اثر هیدراتاسیون به استرادیول تبدیل می شود (۵). از آنجا که سلول های اپی تلیال مجرای غدد پستانی، حاوی گیرنده های استروژنی هستند، به استروژن مترشح شده از تخمدان ها برای رشد طبیعی غده پستانی پاسخ می دهند (۶). تحقیق ها حاکی از آن است که زنان مبتلا به سرطان پستان سطح سرمی استرادیول بیشتری نسبت به سایرین دارند. همچنین زنان یائسه ای که تحت استروژن درمانی هستند، احتمال بیشتری برای مبتلا شدن به سرطان پستان دارند (۷).

سرطان پستان ۱۸ درصد از سرطان های زنان و یکی از بدخیمی های شایع بین زنان است (۱). در ایران نیز از مهم ترین عوامل مرگ و میر در زنان است. در چهارده اخیر، میزان بروز آن کمتر از دیگر نقاط آسیا بوده، در حالی که سن ابتلا حداقل یک دهه جوان تر از سن ابتلای زنان کشورهای پیشرفته گزارش شده است (۲). دلیل اصلی ایجاد سرطان پستان ناشناخته بوده، اما تخمین زده شده که یک چهارم موارد می تواند منشأ ارثی داشته باشد (۱) عوامل اتیولوژی از جمله قرار گرفتن طولانی مدت در معرض استروژن به خصوص ۱۷-بتا استرادیول (۱)، عوامل تغذیه، شیوه زندگی، مواد شیمیایی سرطان زای محیط و همچنین استرس اکسیداتیو و کربونیل نقش مهمی در پاتوژنز و پیشرفت سرطان بازی می کنند (۳).

نویسنده مسئول: زهرا طهماسبی فرد

پست الکترونیک: ztahmasebifard@yahoo.com; ztahmasebifard@riau.ac.ir

تعیین ژنوتیپ افراد:

برای تعیین ژنوتایپ افراد، ابتدا پرایمر های اختصاصی رفت 3' -CGAGGCTCATCACCATCGAGATC- 5' و برگشت 3' -CTGACAACGGGTCAGGCATGCA- 5' طراحی شدند سپس برای انجام واکنش PCR، ۱۰ μl از مستر میکس تجاری Amplicon، ۱۰ μl آب مقطر، ۱ μl از پرایمر رفت (۱۰ پیکومول) و ۱ μl از پرایمر برگشت (۱۰ پیکومول) و ۵۰ ng از DNAی هر نمونه، با هم مخلوط شدند تا طبق برنامه دستگاه ترموسایکلر (Bio Rad, USA) شامل مرحله واسرشت اولیه C ۹۴° برای ۵ دقیقه، بعد ۳۵ سیکل در C ۹۴° برای ۱ دقیقه، C ۶۲/۵° برای ۳۰ ثانیه و C ۷۲° برای ۳۰ ثانیه و در نهایت تنها در یک سیکل C ۷۲° برای ۵ دقیقه تکثیر شوند و قطعه ۱۰۸ جفت بازی روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد مشاهده شود.

بخشی از قطعه های تکثیر شده تحت تاثیر آنزیم محدودالتر *NlaIII* (10U) (New England BioLabs, Beverly, MA) به مدت ۱۶-۱۸ ساعت در بن ماری ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. در نهایت، محصول نهایی روی ژل آگارز ۳ درصد الکتروفورز شد تا روی ژل، باند bp ۱۰۸ نشان دهنده ژنوتایپ COMT-LL(AA)، دو باند bp ۹۲bp & bp ۱۰۸bp و باند های HH(GG) و باند های COMT-HL(AG) مشاهده شوند. توزیع ژنوتیپ ها و آلل ها در گروه های مورد مطالعه طبق تعادل هاردی-واینبرگ، بررسی شد.

تجزیه و تحلیل آماریک

با استفاده از نرم افزار IBM SPSS 23.0 و به کمک آزمون آماری رگرسیون لجستیک، رابطه بین پلی مورفیزم و خطر ابتلا به سرطان پستان با مدل های مختلف ژنتیکی بررسی شد و نتایج با مقادیر نسبت شانس (ORs) و فاصله اطمینان ۹۵ درصد گزارش شد. از آزمون X² برای بررسی رابطه بین ژنوتایپ ها و متغیرهای سن و BMI نیز استفاده شد. دو گروه از نظر شاخص های دموگرافیکی نیز به کمک آزمون کای دو بررسی شدند و میانگین متغیرهای سن و BMI با آزمون t-test محاسبه شد تا با $\pm$ انحراف معیار گزارش شود. $P < 0.05$ به عنوان یک ضریب آماری معناداری در نظر گرفته شد.

نتایج:

سن در گروه مورد ۵۴/۳ ± ۸/۳ سال و در گروه کنترل ۵۵/۵ ± ۱۰/۷ سال بود و اختلاف معناداری نداشتند ($p = 0.378$). اما میزان BMI در گروه مورد ۲۴/۹ ± ۲ m² و در گروه کنترل ۲۴/۳ ± ۱/۶ Kg/m² بود که تفاوت معناداری داشتند ($p = 0.029$). بررسی پرونده پاتولوژی بیماران نشان داد که ۱۳/۵ درصد در گرید I، ۳۹/۶ درصد در گرید II، ۳۵/۴ درصد در گرید III و ۱۱/۵ درصد در گرید IV قرار داشتند.

نتایج در جدول ۱ نشان داده شده است. بررسی فراوانی آللی در دو گروه بیمار و کنترل نشان داد که آلل A به عنوان آلل ریسک پذیر در گروه بیمار با بیشترین فراوانی برابر ۳۵/۴ در حالی که در گروه کنترل ۱۵/۶ بود. برعکس، فراوانی آلل G در بیماران با ۶۴/۶ فراوانی کمتری نسبت به گروه کنترل با ۸۴/۴ داشت.

جدول ۱: توزیع فراوانی ژنوتایپ ها و آلل ها در دو گروه مطالعه شده با رگرسیون لجستیک

ژنوتایپ	بیمار	کنترل	OR (95%) CI	P-Value
GG (COMT-HH)	۵۹ (%۶۱/۵)	۸۰ (%۸۳/۳)	رفرنس	۱
COMT-HH				
AA (COMT-LL)	۳۱ (%۳۲/۳)	۱۴ (%۱۴/۶)	۳ (۱/۵ - ۶/۱)	۰/۰۰۳
AG (COMT-HL)	۶ (%۶/۲)	۲ (%۲/۱)	۴/۱ (۰/۸ - ۲۰/۹)	۰/۰۹
G	۱۳۴	۱۶۲	رفرنس	۱
A	۶۸	۳۰	۳ (۱/۸ - ۴/۹)	۱/۴ × ۱۰ ^{-۵}

تعداد زیادی از ژن های مرتبط با انواع مختلفی از سرطان ها، حاوی پلی مورفیزم تک نوکلئوتیدی (SNP) هستند. SNP ها در پروموتور ژن ها، اکزون ها، اینترون ها و همچنین مناطق ۵' و ۳' ترجمه نشده ژن ها (UTRs) قرار دارند و با مکانیسم های مختلف، بر بیان ژن تأثیر می گذارند. شناخت مکانیسم های تحت تأثیر SNP که سبب ایجاد حساسیت به سرطان می شود، برای درک پاتوژنز مولکولی سرطان های مختلف بسیار مهم است. از دیدگاه بالینی، SNP ها نشانگرهای زیستی تشخیصی و درمانی بالقوه در بسیاری از انواع سرطان به حساب می آیند. مکانیسم های ژنتیکی و اپی ژنتیکی که زمینه ساز استعداد ابتلا به سرطان های مرتبط با SNP هستند، سبب شده، تا SNP ها به عنوان نشانگرهای زیستی بالقوه سرطان به حساب آیند (۸). مطالعه ها نشان داده پلی مورفیزم های رایج در ژن های دخیل در متابولیسم استروژن و پروژسترون و اثر متقابل بین آن ها، با خطر ابتلا به سرطان پستان مرتبط است (۹).

ژن COMT یا کاتکول -O-متیل ترانسفراز در جایگاه ژنی بازوی بلند کروموزوم ۲۲ (۲۲q۱۱) قرار دارد و در بافت های انسانی همچون کلیه، کبد، پستان و همچنین گلبول های قرمز خون به میزان بالایی بیان می شوند (۱۰). این آنزیم با انتقال متیل به کاتکول استروژن سبب غیرفعال شدن آن ها می شود. کاتکول استروژن یک ترکیب سرطان زای تولید شده در مسیر متابولیسمی استروژن است (۱۱) که از طریق آسیب زدن به DNA و همچنین تولید رادیکال های آزاد (ROS) می تواند در القای سرطان نقش داشته باشد (۱۲) در حالی که متوکسی استروژن (فرم خنثی شده)، سبب تحریک آپوپتوز، مهار رگ زایی، مهار رشد تومور و در نتیجه کاهش خطر ابتلا به سرطان می شود (۱۳). در انسان، یک کپی از COMT هر دو فرم محلول (S-COMT) و COMT غشاء (COMT (MB-COMT را کد می کند که از طریق فعالیت دو پروموتور جداگانه حاصل می شود. یک تغییر در باز گوانین به باز آدنین در کدون 108 (S-COMT) یا 158 (MB-COMT) سبب تغییر اسید آمینه والین به متیونین در هر دو فرم پروتئین می شود (۱۴). این پلی مورفیزم اشکال متعدد رونویسی از ژن، نظیر بیان زیاد (والین/والین H/H)، متوسط (والین/متیونین H/L) و یا کم (متیونین / متیونین L/L) را ایجاد می کند که سبب اختلاف ۳ تا ۴ برابری در فعالیت آنزیم بین بیان زیاد و کم ژن ها می شود (۱۵). به دلیل نقش تغییرهای ژنی نظیر پلی مورفیزم Val158Met روی میزان فعالیت آنزیم، فرض بر این بود که این تغییر ژنی، بر میزان ابتلا به سرطان پستان نیز موثر است. از این رو هدف این مطالعه، بررسی ارتباط بین تغییر ژنتیکی Val158Met در ژن COMT از مسیر متابولیسمی استروژن با خطر ابتلا به سرطان پستان در گروهی از زنان ایرانی بود.

مواد و روش ها:

جامعه مورد مطالعه

مطالعه حاضر از نوع مورد-شاهدی بود. افراد شرکت کننده در طرح، از مراجعان به بیمارستان شهدای تجریش تهران بودند. گروه مورد، ۹۶ زن مبتلا به سرطان پستان زیر نظر پزشک متخصص و بررسی های ماموگرافی انتخاب شدند. گروه کنترل نیز در همان طیف سنی افراد بیمار قرار داشتند و پس از اطمینان از نداشتن بیماری هایی نظیر فشار خون، دیابت، سرطان (به خصوص سرطان پستان در خویشاوندان درجه یک) انتخاب شدند. افراد انتخاب شده از نظر طیف سنی مشابه بودند. افراد شرکت کننده در محدوده سنی ۲۲-۳۲ سال قرار داشتند. مشارکت تمامی افراد در طرح منوط به کسب رضایت نامه آگاهانه بود.

استخراج DNA:

از همه داوطلبان ۵ ml خون گرفته شد و به لوله های حاوی ماده ضد انعقاد EDTA ۵۰۰ μl (۰/۵ میلی مولار) منتقل شد و تا زمان استخراج DNA در فریزر -۷۰ درجه سانتی گراد ذخیره شدند. سپس DNA های ژنومی با استفاده از روش نمک اشباع (salting out) جدا شدند. سپس غلظت و کیفیت آن ها توسط دستگاه نانودراپ و ژل آگاروز بررسی شد (۱۶).

جدول ۲: بررسی ارتباط بین پلی مورفیسم Val¹⁵⁸Met از ژن COMT با خطر ابتلا به سرطان پستان در مدل های ژنتیکی غالب و مغلوب به کمک رگرسیون لجستیک

مدل ژنتیکی	ژنوتایپ	بیماران	کنترل	p-value	نسبت شانس (CI95%)
غالب	GG	۵۹	۸۰	رفرنس	۱
	AA+AG	۳۷	۱۶	۰/۰۰۱	۳/۱ (۶/۲ - ۱/۶)
مغلوب	GG+AG	۶۵	۸۲	رفرنس	۱
		۳۱	۱۴	۰/۰۰۵	۲/۸ (۵/۷ - ۱/۴)

جدول ۳: متغیرهای سن و BMI با ژنوتایپ پلی مورفیسم Val¹⁵⁸Met از ژن COMT با آزمون کای دو

ژنوتایپ	سن				BMI			
	≤۵۰	>۵۰	p-value	کنترل	مورد	کنترل	مورد	p-value
GG	۱۶	۴۳	۱	۵۱	۳۲	۲۷	۲۹	۰/۳
AA	۱۲	۱۹	۰/۵	۱۱	۱۸	۱۳	۳	۰/۲
AG	۱	۵	۰/۶	۲	۲	۴	۰	۰/۱

را تحریک کند و آن‌ها را حساس به اشتباه‌های ژنتیکی در همانندسازی DNA نماید تا اغلب فتوتیپ‌های بدخیم به دلیل عدم تصحیح اشتباه‌های همانندسازی به وجود آید (۲۸). بنابر این، ژن‌های تنظیم‌کننده رونویسی و ترجمه در مسیر بیوسنتز و متابولیسم استروژن می‌توانند بر عملکرد استروژن تأثیرگذار باشند و حساسیت به سرطان پستان را منجر شوند (۲۹). یکی از این ژن‌های دخیل در متابولیسم استروژن، ژن COMT است. آنزیم COMT در تبدیل OH-۲ و OH-۴ کاتکول استروژن‌ها به متوکسی استروژن‌ها نقش دارد تا قدرت تخریبی آن‌ها را روی DNA کم کند (۳۰). تحقیق‌ها نیز نشان داده که افزایش دو متوکسی استروژن به عنوان یک متابولیت ضدسرطان (با مهار رگ‌زایی و میتوز) در ارتباط با سرطان‌های پستان، ریه و لوکمی است (۳۱-۳۳).

از محدودیت‌های تحقیق، بررسی تغییر ژنتیکی COMT Val158Met روی حجم نمونه کم بود که به دلایل مالی و اجرایی، تعداد محدودی از بیماران برای مطالعه در نظر گرفته شدند. از موارد دیگر می‌توان به در دسترس نبودن قومیت‌های متفاوت ایرانی از جمله بلوچ و کرد اشاره کرد که به احتمال از نظر ژنتیکی تفاوت‌هایی با دیگر اقوام ایرانی داشته باشند. به دلیل بررسی نشدن این تغییر ژنتیکی در زنان ایرانی این مطالعه برای نخستین بار تأثیر پلی مورفیسم COMT Val158Met را روی بیماران ایرانی نشان داد که در تایید این نتایج پیشنهاد می‌شود با حجم نمونه بالاتر، تأثیر این تغییر ژنتیکی روی فعالیت آنزیمی در قومیت‌های متفاوت، مطالعه‌هایی انجام شود تا بتوان پلی مورفیسم COMT Val158Met را به عنوان یک بیومارکر معرفی کرد. از آنجا که مکانیسم‌های مرتبط با پلی مورفیسم ژن و حساسیت به سرطان بسیار پیچیده‌اند، زیرا به دلیل تغییر در ساختار ژن، بر پایداری mRNA، متیلاسیون و بیان آلل خاص تأثیرگذار هستند، بنابراین مکانیسم‌های عملکردی آن‌ها به بررسی بیشتر و دقیق‌تری نیاز دارد.

نتیجه گیری:

نتایج ما نشان داد که تغییر ژنتیکی در COMT Val158Met در بیماران سرطان پستان بیشتر از افراد کنترل بود و به احتمال این تغییر ژنتیکی، یکی از فاکتورهای موثر در خطر ابتلا به سرطان پستان در زنان ایرانی است. تحقیق‌های بیشتر در آینده به تایید نتایج این تحقیق و معرفی این تغییر ژنتیکی به عنوان یک بیومارکر شناسایی‌کننده سرطان پستان کمک خواهد کرد.

برای تعیین نقش پلی مورفیسم بر خطر ابتلا به سرطان پستان از مدل های ژنتیکی غالب و مغلوب استفاده شد تا با رگرسیون لجستیک علاوه بر بررسی رابطه آماری بین ژنوتایپ‌ها و سرطان پستان، شانس ابتلا نیز محاسبه شود. نتایج جدول ۲ نشان دهنده ارتباط بین تغییر Val¹⁵⁸Met از ژن COMT با شانس ابتلا ۳/۱ برابر در مدل ژنتیکی غالب و ۲/۸ برابر در مدل ژنتیکی مغلوب بود.

در بررسی دیگری رابطه بین شاخص سن و BMI با ژنوتایپ‌های پلی مورفیسم Val¹⁵⁸Met ارزیابی شد. اما ارتباط معناداری مشاهده نشد. نتایج در جدول ۳ آورده شده است.

بحث:

نتایج مطالعه حاضر در راستای سایر مطالعه‌ها، نشان داد که در حاملان AA (COMT-LL) با کم‌ترین فعالیت آنزیم، شانس ابتلا به سرطان پستان، به میزان سه برابر افزایش می‌یابد. در افراد هتروزیگوت AG (COMT-HL) با فعالیت متوسط آنزیم COMT رابطه معناداری بین گروه سرطانی و گروه کنترل مشاهده نشد اما شانس ابتلا به سرطان پستان ۴/۱ برابر بود. در مطالعه‌های متعدد پیشین نیز، پلی مورفیسم COMT Val158Met با اثر کاهش فعالیت آنزیم، مرتبط با خطر ابتلا به سرطان پستان در جمعیت‌های مختلف گزارش شده بود (۱۸-۲۴). در مطالعه متاآنالیزی Guo-Xing Wan، و همکارانش ۱۴ مطالعه انجام شده در ارتباط با پلی مورفیسم Val¹⁵⁸Met و سرطان پستان تجزیه و تحلیل آماری شد و نتایج نشان داد که این پلی مورفیسم با خطر ابتلا به سرطان پستان به خصوص با زنان یائسه مرتبط است. از آنجا که پلی مورفیسم کدون ۱۵۸ از ژن COMT می‌تواند آلل‌های COMT-H و COMT-L را به وجود آورد. تصور بر این است که در حالت COMT-Met (COMT-A) به دلیل تشکیل و تجمع کارسینوژن‌های کاتکول استروژن، خطر بالایی برای ابتلا به سرطان پستان وجود دارد. شواهد متعددی از این فرضیه حمایت می‌کند. زیرا تغییر آمینواسیدی سبب کاهش فعالیت COMT و عدم تنظیم متابولیسم استروژن می‌شود (۲۵).

در تضاد با مطالعه‌های پیشین و مطالعه حاضر، Ding H (۲۶) و Mao C (۲۷) همکاران‌شان ارتباط معناداری بین پلی مورفیسم COMT Val158Met و خطر ابتلا به سرطان پستان مشاهده نکردند که شاید حجم نمونه کم و یا ژنتیک متفاوت قومیت‌های مختلف بر نتایج به دست آمده تأثیرگذار باشد. تحقیق‌های جدید نشان می‌دهد که استروژن می‌تواند تکثیر سلول‌های اپی‌لیال

منابع:

- 1- Yasuda MT., Sakakibara H, and Shimoi K. Estrogen- and stress-induced DNA damage in breast cancer and chemoprevention with dietary flavonoid. *Genes Environ.* 2017; 39: 10.
- 2- Mousavi SM, Montazeri A, Mohagheghi MA, Jarrahi AM, Harirchi I, Najafi M, et al. Breast cancer in Iran: an epidemiological review. *Breast J.* 2007;13(4):383-91.
- 3- Rohrmann S, Lukas Jung SU, Linseisen J, Pfau W. Dietary intake of meat and meat-derived heterocyclic aromatic amines and their correlation with DNA adducts in female breast tissue. *Mutagenesis.* 2009; 24(2):127-22.
- 4- Gomes-Rochette NF, Souza LS, Tommasi BO, Pedrosa DF, Eis SR, Fin ID, et al. Association of PvuII and XbaI polymorphisms on estrogen receptor alpha (ESR1) gene to changes into serum lipid profile of post-menopausal women: Effects of aging, body mass index and breast cancer incidence. *PLoS One.* 2017 ; 12(2):e0169266.
- 5- Yue W, Wang JP, Li Y, Fan P, Liu G, Zhang N, et al. Effects of estrogen on breast cancer development: role of estrogen receptor independent mechanisms. *Int J Cancer.* 2010 ;127(8): 1748-1757.
- 6- Anderson E. The role of oestrogen and progesterone receptors in human mammary development and tumorigenesis. *Breast Cancer Res.* 2002;4(5):197-201.
- 7- Cummings SR, Duong T, Kenyon E, Cauley JA, Whitehead M, Krueger KA. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation (MORE) Trial. Serum estradiol level and risk of breast cancer during treatment with raloxifene. *JAMA.* 2002;287(2):216-20.
- 8- Deng N, Zhou H, Fan H and Yuan Y. Single nucleotide polymorphisms and cancer susceptibility. *Oncotarget.* 2017; 8 (66): 110635-110649.
- 9- Diergaarde B, Potter JD, Jupe ER, Manjeshwar S, Shimasaki CD, Pugh TW, et al. Polymorphisms in genes involved in sex hormone metabolism, estrogen plus progestin hormone therapy use, and risk of postmenopausal breast cancer. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers.* 2008;17(7): 1751-1759.
- 10- Grossman MH, Emanuel BS and Budarf ML. Chromosomal mapping of the human catechol-O-methyltransferase gene to 22q11. 1→q11. *Genomics.* 1992;12(4): 822-825.
- 11- Lajin B, Hamzeh AR, Ghabreau L, Mohamed A, A Moustafa AE, Alachkar A. Catechol-O-methyltransferase Val 108/158 Met polymorphism and breast cancer risk: a case control study in Syria. *Breast Cancer.* 2013 ; 20(1):62-6.
- 12- Wen Ch, Wu L, Fu L, Wang B, Zhou H. Unifying mechanism in the initiation of breast cancer by metabolism of estrogen (Review). *Molecular Medicine Reports.* 2017;16 (2): 1001-1006 .
- 13- Zhu BT and Conney AH: Is 2-methoxyestradiol an endogenous estrogen metabolite that inhibits mammary carcinogenesis? *Cancer Res.* 1998; 58:2269-2277.
- 14- Lachman HM, Papolos DF, Saito T, Yu YM, Szumlanski CL, Weinshilboum RM. Human catechol-O-methyltransferase pharmacogenetics: description of a functional polymorphism and its potential application to neuropsychiatric disorders. *Pharmacogenetics.* 1996 ; 6(3):243-50.
- 15- Weinshilboum RM, Otterness DM, Szumlanski CL. Methylation pharmacogenetics: Catechol O-methyltransferase, thiopurine methyltransferase, and histamine N-methyltransferase. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1999;39:19-52.
- 16- Mehri F, Tahmasebi Fard Z, and Ghoraiean P. The Investigation of Functional Genetic Variation in COMT Gene Promoter (rs2020917 & rs2075507) in Iranian Patients with Breast Cancer. *Int J Cancer Manag.* 2019;12(12):e92008.
- 17- Bassam Lajin, Amal Alachkar. Detection of catechol-O-methyltransferase (COMT) Val158Met Polymorphism by a New Optimized PCR-RFLP Method. *Am. J. Biomed. Sci.* 2011; 3(3): 170-175.
- 18- Hong CC, Thompson HJ, Jiang C, Hammond GL, Tritchler D, Yaffe M. et al. Val158Met Polymorphism in Catechol-O-methyltransferase Gene Associated with Risk Factors for Breast Cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention.* 2003; 12(9): 838-47.
- 19- Tan W, Qi J, Xing DY, Miao XP, Pan KF, Zhang L, et al. Relation between single nucleotide polymorphism in estrogen-metabolizing genes COMT, CYP17 and breast cancer risk among Chinese women. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi.* 2003;25(5):453-6.
- 20- Wang Q, Wang YP, Li JY, Yuan P, Yang F, Li H. Polymorphic catechol-O-methyltransferase gene, soy isoflavone intake and breast cancer in postmenopausal women: a case-control study. *Chin J Cancer.* 2010;29(7):683-8.
- 21- Lavigne JA, Helzlsouer KJ, Huang HY, Strickland PT, Bell DA, Selmin O., et al. An association between the allele coding for a low activity variant of catechol-O-methyltransferase and the risk for breast cancer. *Cancer Res.* 1997;57: 5493-5497.
- 22- Millikan RC, Pittman GS, Tse CK, Duell E, Newman B, Savitz D. et al. Catechol-O-methyltransferase and breast cancer risk. *Carcinogenesis (Lond.).* 1998;19: 1943-1947.
- 23- Yim DS, Parkb SK, Yoo KY, Yoon KS, Chung HH, Kang HL, et al. Relationship between the Val158Met polymorphism of catechol O-methyl transferase and breast cancer. *Pharmacogenetics.* 2001;11: 279-286.
- 24- Kocabas NA, Sardas S, Cholerton S, Daly AK, Karakaya AE. Cytochrome P450 CYP1B1 and catechol-O-methyltransferase (COMT) genetic polymorphisms and breast cancer susceptibility in a Turkish population. *Arch. Toxicol.* 2002; 76: 643-649.
- 25- Wan GX, Cao YW, Li WQ, Li YC, and Li F. The Catechol-O-Methyltransferase Val158Met Polymorphism Contributes to the Risk of Breast Cancer in the Chinese Population: An Updated Meta-Analysis. *J Breast Cancer.* 2014; 17(2): 149-156.
- 26- Ding H, Fu Y, Chen W, Wang Z. COMT Val158Met polymorphism and breast cancer risk: evidence from 26 case-control studies. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;123: 265-270.
- 27- Mao C, Wang XW, Qiu LX, Liao RY, Ding H, Chen Q. Lack of association between catechol-O-methyltransferase Val108/158Met polymorphism and breast cancer risk: a meta-analysis of 25,627 cases and 34,222 controls. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;121:719-725.
- 28- Lin WY, Chou YC, Wu MH, Jeng YL, Huang HB, You SL, et al. Polymorphic catechol-O-methyltransferase gene, duration of estrogen exposure, and breast cancer risk: a nested case-control study in Taiwan. *Cancer Detect Prev.* 2005;29:427-432.
- 29- Qin X, Peng Q, Qin A, Chen Z, Lin L, Deng Y, et al. Association of COMT Val158Met polymorphism and breast cancer risk: an updated meta-analysis. *Diagn Pathol.* 2012;7:136.
- 30- Cavalieri EL, Stack DE, Devanesan PD, Todorovic R, Dwivedy I, Higginbotham S. et al. Molecular origin of cancer: Catechol estrogen-3,4-quinones as endogenous tumor initiators. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94:10937-10942.
- 31- Lakhani NJ, Sarkar MA, Venitz J, Figg WD. 2-Methoxyestradiol, a promising anticancer agent. *Pharmacotherapy.* 2003;23:165-172.

- 32- Dalvai M, Bystricky K. Cell Cycle and Anti-Estrogen Effects Synergize to Regulate Cell Proliferation and ER Target Gene Expression. PLoS ONE. 2010; 5(6): e11011.
- 33- Napoli N, Donepudi S, Sheikh S, Rini GB, and Armamento-Villareal R. increased 2-Hydroxylation of Estrogen in Women with a Family History of Osteoporosis. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2005;90(4):2035–2041