

بررسی وجود پلی‌مورفیسم در اگزون‌های ۲ و ۳ ژن DIRAS3 در زنان مبتلا به سرطان

پستان و دیابت

فاطمه اردلان مقدم آل و ابوالحسن رضایی*

ایران، تنکابن، دانشگاه آزاد واحد تنکابن، دانشکده علوم پایه، گروه ژنتیک

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۱/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۰۷

چکیده

ژن ARHI / NOEY2 / DIRAS3 یک ژن ایمپرینت شده با بیان پدری روی کروموزوم ۱ انسان است. بنابراین اگر ژن پدری بیان نشود، فرد در معرض خطر ابتلا به دو سرطان پستان و تخمدان قرار می‌گیرد. از طرفی هر اندازه خطر ابتلا به بیماری دیابت افزایش یابد به همان اندازه نیز احتمال ابتلا به سرطان پستان افزایش می‌یابد. هدف این پژوهش شناسایی جهش‌ها و پلی‌مورفیسم‌های اگزون ۲ و ۳ و ایترون ۲ ژن DIRAS3 در زنان مبتلا به سرطان پستان مجرای تهاجمی (IDC)، سرطان پستان مجرای تهاجمی (IDC) - دیابت و دیابت می‌باشد. در مطالعه حاضر چهار گروه از زنان (گروه‌های شاهد (۵۰ نفر)، سرطان پستان مجرای تهاجمی (IDC) (۲۰ نفر)، سرطان پستان مجرای تهاجمی - دیابت (۱۵ نفر) و دیابت (۱۵ نفر)) مورد مطالعه قرار گرفتند. پس از استخراج DNA، قطعه مورد نظر تکثیر و محصولات PCR روی ژل آگارز بررسی و سپس تعیین توالی گردیدند. خوانش ژنی به کمک نرم‌افزارهای Gene Runner و Chromas صورت گرفت. محاسبات آماری با استفاده از نرم افزارهای SNPalyze V.8.1، assotest و SPSS V.22 با سطح معناداری $P < 0.05$ انجام گرفت. پس از تعیین توالی یک نوع پلی‌مورفیسم در جایگاه c.332-3 T>C در ایترون ۲ یک بیمار سرطانی مشاهده شد، اما هیچ‌گونه پلی‌مورفیسم یا جهشی در محدوده اگزون ۲ مشاهده نگردید، در حالیکه یک نوع پلی‌مورفیسم در جایگاه 5'UTR c.331 G>A در اگزون ۳ بیماران سرطانی و افراد شاهد یافت شد. نتایج این تحقیق نشان داد که از بین پلی‌مورفیسم‌های موجود فقط پلی‌مورفیسم 5'UTR c.331 G>A با بیماری سرطان پستان در ارتباط می‌باشد ($P=0/04$).

واژه‌های کلیدی: سرطان پستان، دیابت، ژن DIRAS3، ژن NOEY2، ژن ARHI

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۱۲۹۳۵۱۵، پست الکترونیکی: a.rezaei@toniau.ac.ir

مقدمه

درد استخوان، غدد لنفاوی متورم، تنگی نفس، یا یرقان باشد (۲).

سرطان پستان بر اساس منشاء و اثری که دارد به انواع مختلفی تقسیم می‌شود که شایع‌ترین نوع سرطان پستان سرطان مهاجم با منشاء مجاری شیری است که از سلول‌های مجاری شیری منشاء می‌گیرد و به خارج از مجاری، یعنی بافت نگهدارنده اطراف آن‌ها انتشار پیدا می‌کند. با گذر زمان، ممکن است سلول‌های سرطانی از طریق سیستم

سرطان پستان یا سرطان سینه نوعی سرطان است که از بافت پستان شروع می‌شود. سرطان پستان مهم‌ترین و شایع‌ترین سرطان با خطر ۸ درصد تا ۱۰ درصد در زنان می‌باشد و ۲۵ درصد کل سرطان‌ها را شامل می‌شود (۱۵). علائم سرطان پستان می‌تواند یک توده در سینه، تغییر شکل سینه، گودی پوست، ترشح مایع از نوک سینه، یا پوسته شدن قسمتی از پوست باشد. در افرادی که بیماری در اندام‌های دیگر آن‌ها گسترش پیدا کرده است، این نشانه‌ها می‌تواند

طبیعی خود را داشته باشد. نقش اصلی انسولین پایین آوردن قند خون توسط سازوکارهای متفاوت است (۲۲). دیابت دو نوع اصلی دارد؛ در دیابت نوع یک، تخریب سلول‌های بتا در پانکراس منجر به نقص تولید انسولین می‌شود و در دیابت نوع دو، مقاومت پیش‌رونده بدن به انسولین وجود دارد که در نهایت ممکن است منجر به تخریب سلول‌های بتای پانکراس و نقص کامل تولید انسولین شود. در دیابت نوع دو مشخص است که عوامل ژنتیکی، چاقی و کم‌تحرکی نقش مهمی در ابتلاء فرد دارند (۴، ۵).

علائم دیابت عبارتند از: تشنگی، تغییرات بینایی، خستگی، پرادراری، عفونت و گرسنگی. عوارض دیابت نیز عبارتند از: بیماری عروق محیطی، رتینوپاتی، سکت، نروپاتی و نفروپاتی (۳، ۱۱).

در اشخاصی که سرطان پستان وجود دارد و درمان‌شان طولانی است، امکان ابتلا به دیابت وجود دارد، حتی در اشخاصی که قبلاً بیماری دیابت داشته‌اند، این بیماری با مبتلا شدن به سرطان پستان افزایش پیدا خواهد کرد. بعلاوه آمار نشان داده است که اشخاصی که مبتلا به دیابت هستند، امکان مبتلا شدن به سرطان پستان را نیز دارند و حدود ۲۰ درصد این اشخاص به سرطان پستان مبتلا می‌شوند. مقاومت استروژن در مراحل شیمی‌درمانی در افراد مبتلا به سرطان سینه به عنوان یکی از عوامل ایجاد کننده دیابت در این افراد در نظر گرفته می‌شود. مصرف برخی از داروها مانند گلوکوکورتیکوئید در شیمی‌درمانی باعث افزایش قند خون شخص می‌شود، مصرف این داروها جهت پیشگیری از التهاب و تهوع است. زمانی که بدن نسبت به انسولین مقاوم شود، مستعد گسترش بیماری دیابت و انواع سرطان‌ها می‌شود که در اشخاصی که مبتلا به سرطان پستان هستند این امر ممکن است رخ دهد همچنین در افراد دیابتی با افزایش سطح انسولین، بافت سینه‌ها دچار تغییراتی می‌شود که خطر مبتلا شدن به سرطان پستان را نیز

لنفوای یا جریان خون به غدد لنفاوی یا سایر اعضای بدن منتشر شوند. این نوع از بیماری تقریباً ۸۵ درصد از کل موارد سرطان پستان را شامل می‌شود. سرطان‌های مهاجم با منشاء لوبول‌های پستانی از داخل لوب‌های پستان که شیر را در مواقع مورد نیاز تولید می‌کنند، شروع می‌شوند و مانند نوع قبل می‌توانند توسط خون یا لنف به بخش‌های دیگر بدن انتشار یابند. حدود ۱۲ درصد از موارد سرطان پستان از لوبول‌ها یا لوب‌های پستان منشاء می‌گیرند و جزو این گروه می‌باشند (۱۳، ۶، ۲).

علل و عوامل اصلی دخیل در سرطان پستان می‌توان به جنسیت، سن، عوامل فردی، سابقه خانوادگی مثبت، نولی‌پارایته (نداشتن زایمان)، یائسگی بعد از ۵۵ سالگی، اختلاف جغرافیایی، بی‌تحرکی، ابتلا به سایر سرطان‌ها، رژیم غذایی (چربی و گوشت)، چاقی، مصرف الکل و سیگار، بیماری‌های خوش‌خیم پستان، ویروس‌ها، تابش اشعه یونیزان (بوئزه در ناحیه فقسه سینه)، نوع بافت پستانی، شخصیت فرد، هورمون‌تراپی، منارک زودرس (قاعدگی زودتر از موعد و زیر ۱۲ سالگی)، حاملگی در سنین بالا، دانسیته پستان، نژاد، تغییرات ژنی و شغل اشاره کرد (۱۶، ۲۱، ۲۶).

ژن‌هایی که در ارتباط با سرطان پستان بوسیله فرآیند اپی‌ژنتیک خاموش می‌شوند عبارتند از: ژن ممانعت‌کننده سیکل سلولی (P16INK4a)، ژن ترمیم DNA در BRCA1، آنزیم‌های متابولیک (GSTP1)، ژن‌های خوشه HOXA و Snai، رسپتور پروژسترون و استروژن (ER) و PR، ژن‌های درگیر در چسبندگی سلولی و فرآیند متاستاز E-Cadherin (CDH1) و H-Cadherin (CDH13) و ژن پروآپوپتوز TMS1 (۲).

دیابت یا بیماری قند یک اختلال سوخت‌وسازی متابولیک در بدن است. در این بیماری توانایی تولید هورمون انسولین در بدن از بین می‌رود یا بدن در برابر انسولین مقاوم می‌شود و بنابراین انسولین تولیدی نمی‌تواند عملکرد

ژن NOEY2 به یک منطقه از کروموزوم 1P31 نقشه‌یابی شده است که در افراد مبتلا به سرطان پستان بخش‌های مهمی از این ژن حذف شده است. نتایج نشان داده است که 1P31 ناحیه‌هایی است که Loss of heterozygosity (LOH) به طور مکرر در سرطان‌های تخمدان دیده می‌شود. مطالعات قبلی LOH در مورد کروموزوم 1P در سرطان پستان، دو منطقه حذف شده به خوبی تعریف شده را یافته است (1P31 و 1P36). ژن NOEY2 بالاترین میزان LOH را نشان می‌دهد، که مبین این مسئله است که NOEY2 بیشترین جایگاه ژنی حذف شده را در 1P31 در سرطان‌های پستان و تخمدان دارد. از آنجایی که ارتباط ژن‌های تنظیم‌کننده رشد با LOH وجود لوکوس‌های سرکوب‌کننده تومور را سیگنال‌رسانی می‌کند، NOEY2 کاندیدای منطقی به عنوان یک ژن سرکوب‌کننده تومور در 1P31 در این بدخیمی‌هاست. این ژن می‌تواند نقش مهمی از لحاظ فیزیولوژیکی در تنظیم رشد سلول‌ها از طریق تنظیم بیان سیکلین‌ها و مهارکننده‌های کیناز وابسته به سیکلین داشته باشد (۲۹).

همانطور که ذکر شد ژن ARHI / NOEY2 / DIRAS3، احتمالاً یک ژن سرکوب‌کننده تومور است. برای روشن شدن اهمیت بالینی mRNA این ژن در سرطان پستان، بررسی شد که غیر فعال شدن این ژن سبب ایجاد تومورهای سرطان پستان می‌شود. در نتیجه تجزیه و تحلیل بیان ژن NOEY2 / ARHI با استفاده از تکنیک real time PCR، بیان در تمام نمونه‌های بافت غیرسرطانی پستان صورت گرفت، اما در تقریباً نیمی از نمونه‌های بافت سرطانی، ژن NOEY2 / ARHI بیان نشد یا بیان آن به طور قابل توجهی کاهش یافته بود (۱۴).

در مطالعه‌ای میزان بیان ژن گیرنده انسولین به منظور وجود ارتباط بین دیابت، سرطان پستان و تخمدان مورد بررسی قرار گرفت (۲۵).

افزایش می‌دهد. آمار نشان داده است که اشخاصی که سرطان پستان پیشرفته دارند، و همزمان بیماری دیابت دارند نسبت به سایر اشخاص مبتلا به سرطان پستان، تومورهای بزرگتری دارند و در این اشخاص امکان انتشار بیماری (هم دیابت هم سرطان) بیشتر است (۹، ۱۷، ۱۸).

در یک پژوهش در مورد ارتباط بین دیابت ملیتوس و خطر ابتلا به سرطان پستان نتایج نشان داد که دیابت می‌تواند به عنوان یک عامل خطر برای سرطان پستان محسوب شود. علاوه بر آن، وضعیت قاعدگی و همچنین توزیع جغرافیایی می‌تواند این رابطه تحت تاثیر قرار دهد (۱۹).

ژن NOEY2، یک ژن با بیان پدری درج شده بر روی کروموزوم یک انسانی می‌باشد. این ژن دارای ۴ اگزون، ۳ اینترون و یک پروموتور است. ژن NOEY2 یکی از اعضای خانواده بزرگ Ras است که ۵۴ درصد تا ۶۲ درصد همولوژی آمینواسیدی را با Ras و Rap به اشتراک می‌گذارد. وجود یک دومین متمایزکننده موثر نشان می‌دهد که عملکرد NOEY2 ممکن است با پروتئین Ras و Rap متفاوت باشد. مطالعات نشان داده است که اعضای خانواده بزرگ Ras، به ویژه ژن‌های مرتبط با Rap، می‌توانند فعال شدن Ras و انتقال سیگنال در برخی از انواع سلول‌ها را مهار کنند. داده‌ها نشان می‌دهد که بیان NOEY2 ممکن است سیگنال‌رسانی را از طریق پروتئین کیناز فعال شده توسط Ras یا میتوزن ایجاد شده توسط عوامل رشد را قطع کند (۲۹، ۳۲).

حذف بیان ژن NOEY2 ارتباط مستقیم با افزایش ریسک ابتلا به سرطان تخمدان و سرطان پستان دارد و در ۴۱ درصد سرطان‌های پستان و تخمدان پروتئین رونویسی شده توسط آن تولید نمی‌شود و یک ژن سرکوبگر تومور به شمار می‌رود، بنابراین در افرادی که هر دو کروموزوم مادری را به ارث می‌برند این ژن بیان نشده و فرد در معرض خطر ابتلا به دو سرطان پستان و تخمدان قرار می‌گیرد (۱۴، ۳۲، ۳۳).

از هماهنگی با آزمایشگاه، بدین گونه صورت گرفت که پس از دریافت رضایت‌نامه کتبی از هر یک از بیماران مورد مطالعه و مذاکره با آنان به منظور تشریح موضوع پژوهش، نمونه‌گیری از بانوان بیمار پس از هر مرحله شناسایی بانوان بیمار توسط پرسنل آزمایشگاه و بتدریج انجام گرفت، ضمن آن که به ایشان توضیح داده شده که نتایج تحقیق پس از طی مراحل آزمایشگاهی و جمع‌بندی اطلاعات بدست آمده در قالب گزارش در اختیار همگان قرار داده خواهد شد، و اطلاعات بیماران کاملاً محرمانه باقی خواهد ماند.

جدول ۱- خلاصه اطلاعات دموگرافیک افراد مورد مطالعه

سال	DIC	-DIC	دیابتی	دیابتی
میانگین وزن	۷۴/۴۵	۸۰/۹۳	۷۸/۰۶	۵۵/۳
میانگین سن	۴۷/۳	۶۴/۲	۶۰/۶	۷۸/۷۴

از هر بیمار و فرد سالم ۳ میلی‌لیتر خون وریدی به منظور استخراج DNA گرفته شد. استخراج DNA با استفاده از کیت (Company Molecular IVD PZP) انجام گرفت و در میکروتیوب در دمای ۲۰- سانتیگراد نگهداری شد. کیت مذکور حاوی چهار نوع بافر متفاوت با نام‌های Wash buffer، (W) Binding buffer، (B) Elution buffer (E) و Removal buffer (R) همراه با پودر پروتئیناز k بود. مراحل استخراج طبق پروتوکول ذکر شده انجام شد و قطعه مورد نظر با تکنیک PCR-Sequencing تکثیر گردید. مواد به کار گرفته شده در تهیه میکس PCR نمونه‌ها با توجه به غلظت‌های ذکر شده در جدول ۲، با حجم کل ۲۵ میکرولیتر آماده گردید.

پرایمرهای مورد نظر به کمک نرم‌افزار Oligo7 طراحی گردید و به کمک نرم‌افزار بلاست در سایت NCBI تایید گردید.

در تحقیق حاضر هدف بررسی پارامترهای زیر می‌باشد: با توجه به اینکه ژن DIRAS3 بعنوان یک کاندیدای مداخله‌گر در سرکوب تومورها به اثبات رسیده است، آیا می‌تواند بعنوان یک ژن نشانگر در بیماران مبتلا به سرطان پستان در افراد مورد مطالعه نقش داشته باشد؟ علاوه بر آن با توجه به تحقیقات محققین مبنی بر ارتباط بین سرطان پستان و دیابت در حضور سایر ژن‌ها نظیر INSR، آیا در آگزون ۲، اینترون ۲ و آگزون ۳ ژن DIRAS3 جهش یا پلی‌مورفیسم وجود دارد؟ آیا میان این جهش‌ها و پلی‌مورفیسم‌ها (در صورت وجود) و خطر ابتلا به دیابت و سرطان پستان به طور همزمان ارتباط وجود دارد؟

مواد و روشها

پس از تأیید کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی تنکابن، و کسب رضایت آگاهانه از بیماران و افراد سالم، و رعایت همه موارد اخلاقی در جمع‌آوری نمونه‌ها، همراه با کد اخلاق با شماره IR.IAU.TON.REC.1398.002، بطور کلی ۵۰ زن بیمار مبتلا به سرطان پستان، سرطان پستان-دیابت و دیابت مراجعه‌کننده به مراکز درمانی شهر رشت (بیمارستان رازی، بیمارستان پارس، بیمارستان فامیلی و آزمایشگاه تامین اجتماعی) در ماه‌های تیر ۹۷ - دی ۹۷ به عنوان گروه مورد و ۵۰ زن سالم که هیچ‌گونه سابقه خانوادگی ابتلا به سرطان پستان و سایر علائم نئوپلاستیکی را نداشتند و همچنین فاقد سابقه دیابت بوده‌اند به عنوان گروه شاهد انتخاب شدند. زنانی که رحم خود را برداشته‌اند (عمل هیسترکتومی)، یا یائسگی مصنوعی داشته و یا در طول زندگی خود در معرض نوعی از پرتودهی یا شیمی‌درمانی قرار گرفته‌اند از این مطالعه موردی-شاهدی کنار گذاشته شده‌اند. خلاصه اطلاعات دموگرافیک مربوط به زنان بیمار (سرطان پستان مجرای تهاجمی (IDC) (۲۰ نفر)، سرطان پستان مجرای تهاجمی-دیابت (۱۵ نفر) و دیابت (۱۵ نفر)) و سالم مورد مطالعه در جدول ۱ قرار داده شده است. در مرحله تهیه نمودن خون از بیماران پس

بعد از انجام PCR محصولات جهت انجام الکتروفورز و تعیین توالی در فریزر نگهداری شدند (جدول ۳).

محصول PCR به وسیله‌ی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد و کارایی واکنش تکثیر با استفاده از دستگاه عکسبرداری از ژل (Gel doc) مشاهده گردید. سپس نمونه‌های دارای باند مناسب از نظر کیفی و کمی تعیین‌توالی گردیدند (جدول ۴).

جدول ۲- مواد مورد استفاده در تهیه میکس PCR	
غلظت	اجزای واکنش
متغیر	آب مقطر (DDW)
Pmol ^{۱۰}	پرایمر فوروارد (Forward Primer)
X _۲	مستر میکس (Master mix)
Pmol ^{۱۰}	پرایمر ریورس (Reverse Primer)
Ng ^{۳۰۰-۲۵۰}	DNA الگو (Template DNA)

جدول ۳- برنامه PCR ژن DIRAS3

تعداد سیکل	مراحل واکنش زنجیره‌ای پلیمرز	زمان (برحسب ثانیه)	دما (برحسب درجه سلسیوس)
۱	Denaturation اولیه	۳۰۰	۹۵
	Denaturation	۶۰	۹۵
۳۵	Annealing	۶۰	۶۲
	Extension	۶۰	۷۲
۱	Extension نهایی	۴۲۰	۷۲

جدول ۴- اطلاعات مربوط به پرایمرها و سایز محصولات ژنی

Alleles and fragment size	TM	Sequence of the forward and reverse primers	Location	SNP ID and the base change	SNP
۶۳۵ bp	۶۲°C	5'-CTCGTCACAGTTATATCTAGCCA-3 5'-ACAACCTCGCCATAAACTTCTAC-3	Intron 2	rs6682360 (T>C)	۱
۶۳۵ bp	۶۲°C	5'-CTCGTCACAGTTATATCTAGCCA-3 5'-ACAACCTCGCCATAAACTTCTAC-3	Exon 3	rs72668850 (G>A)	۲

DIRAS3) در نمونه‌های بیمار با توزیع فراوانی این سه ژنوتیپ در نمونه‌های شاهد از آزمون‌های مجذور کای، Odds Ratio و P-value استفاده شد، و طبق جدول ۵، $P < 0.05$ به عنوان سطح معنادار در نظر گرفته شد.

جدول ۵- نتایج آزمون بررسی برقراری تعادل هاردی واینبرگ

P-Value	X ²	Case
۰/۱۵۷	۲/۰۰۰	Case
۰/۰۰۰	۱۸/۴۷۴	Control
۰/۰۰۰	۲۰/۴۷۴	Both

نتایج

پس از انجام واکنش PCR و مشاهده باند مناسب، محصولات تعیین‌توالی گردیدند. قطعات تعیین‌توالی شده

لازم به ذکر است علاوه بر نمونه‌های مورد پژوهش نمونه‌های کنترل مثبت و کنترل منفی نیز در کنار سایر نمونه‌ها، PCR و سپس در ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شدند. نمونه مورد استفاده در کنترل مثبت، نمونه‌ای بود که از قبل قطعه مورد نظر در آن تشخیص داده و باند مناسب دیده شده بود.

به منظور تعیین‌توالی (Sequencing) محصولات PCR، محصولات به شرکت "Techazma" واقع در تهران ارسال شد. سپس داده‌های تعیین‌توالی شده با استفاده از نرم‌افزارهای Chromas و Gene Runner مورد تجزیه تحلیل قرار گرفتند. برای مقایسه توزیع فراوانی سه ژنوتیپ مختلف در جایگاه یافت شده (rs72668850 ژن

هتروزیگوت می‌باشد. توزیع ژنوتیپ‌ها و آلل‌های مختلف پلی‌مورفیسم $G>A$ با rs72668850 گروه شاهد و بیمار در جدول ۶ نشان داده شده است.

همانطور که در جدول ۶ فراوانی ژنوتیپی بخشی از ژن DIRAS3 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته است، در گروه بیماران ۳۰ نفر (۶۰ درصد) دارای ژنوتیپ هموزیگوت G/G ، ۱۵ نفر (۳۰ درصد) ژنوتیپ هتروزیگوت G/A و ۵ نفر (۱۰ درصد) دارای ژنوتیپ هموزیگوت A/A می‌باشند.

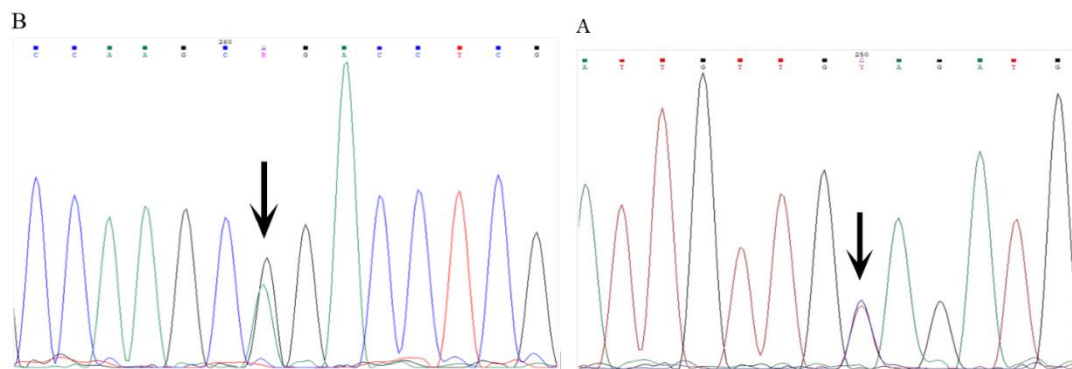
همچنین در گروه شاهد ژنوتیپ G/G در ۴۰ نفر (۸۰ درصد)، ژنوتیپ A/G در ۵ نفر (۱۰ درصد) و ژنوتیپ A/A در ۵ نفر (۱۰ درصد) مشاهده گردید؛ با توجه به اینکه P بدست آمده ($P=0.04$) کوچک‌تر از ۰/۰۵ است، در نتیجه تفاوت معناداری بین دو گروه بیمار سرطانی و شاهد برای پلی‌مورفیسم $G>A$ با rs72668850 را نشان می‌دهد و ارتباط معناداری بین پلی‌مورفیسم در اگزون ۳ ژن DIRAS3 و بیماری سرطان پستان وجود دارد.

فراوانی آللی نیز در جدول ۵ برای پلی‌مورفیسم $G>A$ با rs72668850 مورد بررسی قرار گرفته است. همانطور که مشاهده می‌شود P بدست آمده ($P=0.07$) بزرگ‌تر از ۰/۰۵ است، اما همچنان ارتباط معناداری بین پلی‌مورفیسم در اگزون ۳ ژن DIRAS3 و بیماری سرطان پستان وجود دارد. به این دلیل که آلل‌ها در کل نسبت به یکدیگر سنجیده می‌شوند و در جمعیت اختلاف زیادی از نظر تعادلی و بیماری‌زایی نشان نمی‌دهند.

پلی‌مورفیسم یافت شده در ایترون ۲ با rs6682360 در جایگاه $c.332-3 T>C$ یا $g.831 T>C$ یک نمونه بیمار سرطانی، به عبارتی ۳ نوکلئوتید بالادست ۳۳۲امین نوکلئوتید در ایترون ۲ یا ۸۳۱امین نوکلئوتید در ایترون ۲ که باز T به باز C تبدیل شده است، می‌باشد. از آن جایی که تعداد نمونه‌های مورد سنجش کم بود، ارتباط معناداری بین ایجاد بیماری‌های سرطان پستان و دیابت و وجود این پلی‌مورفیسم یافت نشد.

به کمک نرم‌افزار Chromas و Gene Runner مورد خوانش و تجزیه و تحلیل قرار گرفتند، علاوه بر آن نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS و asstest SNPalyze V.8.1 و SPSS V.22 با سطح معناداری $P < 0.05$ از نظر آللی و ژنوتیپی مورد بررسی قرار گرفتند. در مطالعه حاضر به منظور بررسی ارتباط بین پلی‌مورفیسم‌های اگزون ۲ و ۳ و ایترون ۲ ژن DIRAS3، سرطان پستان و دیابت، به تعداد ۱۰۰ نمونه از افراد مبتلا به دیابت، دیابت-سرطان پستان، سرطان پستان و سالم تعیین‌توالی گردید. پس از تعیین‌توالی محصولات PCR از تعداد ۵۰ نمونه سالم، ۵ فرد بصورت هموزیگوت و ۵ فرد بصورت هتروزیگوت، و از تعداد ۵۰ نمونه بیمار، ۱۵ فرد مبتلا به سرطان پستان مجرای ته‌اجمی (IDC) بصورت هتروزیگوت و ۵ نفر بصورت هموزیگوت دارای یک نوع پلی‌مورفیسم در اگزون ۳ در جایگاه $5'UTR c.331 G>A$ بودند. همچنین یک فرد سرطانی نیز در ایترون ۲ دارای یک پلی‌مورفیسم بصورت هتروزیگوت در جایگاه $c.332-3 T>C$ بود ولی هیچگونه پلی‌مورفیسمی در اگزون ۲ یافت نشد.

محصولات PCR برای انجام روش تعیین‌توالی و بارگذاری در ژل آگارز در یخچال نگهداری شدند. سپس جهت مطالعه توالی‌ها به کمک نرم‌افزارهای Chromas خوانش ژنی صورت گرفت و به کمک نرم افزار Gene Runner همدیفی با توالی مرجع انجام گرفت. شکل ۱- A (جایگاه ۲۵۰) مربوط به پلی‌مورفیسم با rs6682360، در جایگاه $c.332-3 T>C$ یا $g.831 T>C$ ژن DIRAS3 بصورت هتروزیگوت می‌باشد که نوکلئوتید T در ایترون ۲ نمونه بیمار سرطانی به C تبدیل شده است. شکل ۱- B نیز نتیجه تجزیه و تحلیل الکتروفورگرام نمونه بیمار سرطانی بعد از تعیین‌توالی را نشان می‌دهد. در این شکل (جایگاه ۲۶۱) پلی‌مورفیسم در جایگاه $5'UTR c.331 G>A$ یافت شده است به عبارت دیگر در ۳۳۱امین نوکلئوتید در اگزون ۳ که باز G به باز A تغییر یافته است و همانطور که از نمودار پیداست، پلی‌مورفیسم یافت شده بصورت



شکل ۱- الکتروفورگرام بیمار سرطانی (A) با پلی مورفیسم T>C در ایترون ۲ و (B) با پلی مورفیسم G>A در اگزون ۳

جدول ۶- نتایج آزمون بررسی فراوانی ژنوتیپی و آلی پلی مورفیسم G>A با rs72668850

Recessive model		Co-dominant model		Dominant model		P-value	Allele (%)		Genotype (%)			Subjects	SNP	
OR (95% CI)	P-value	OR (95% CI)	P-value	OR (95% CI)	P-value		Genotype	Allele	A	G	AA			AG
1	NA	1/6	0/12	0/37	0/29	0/04	0/07	25	75	5	15	30	Case	rs72668850
(0/27-3/69)	(1)	(0/86-2/96)		(0/15-0/91)				(25%)	(75%)	(10%)	(30%)	(60%)		
								15	85	5	5	40	Control	G>A
								(15%)	(85%)	(10%)	(10%)	(80%)		

دیگری بین دو گروه دیابتی و DIC، تنها سن اختلاف معناداری از نظر آماری بین دو گروه نشان داد، $P < 0.001$ ، $(OR=13.3, CI 95\% [10.49-16.15])$ با این حال وزن اختلاف معناداری را بین دو گروه مورد بررسی نشان نداد $(P=0.49)$. نهایتاً، آنالیز independent t-test بر روی سن و وزن دو گروه افراد DIC دار دیابتی و افراد DIC دار اختلاف معناداری را در ارتباط با وزن ($P < 0.001$)، $(OR=16.9, CI 95\% [14.03-19.76])$ و سن ($P=0.001$)، $(OR=6.48, CI 95\% [2.9-10.2])$ نشان داد.

بررسی‌های ژنوتیپی بین دو گروه مورد و شاهد توسط SPSS به وسیله روش one way ANOVA انجام شد. نتایج Tukey's test نشان داد که ارتباط معناداری بین ژنوتیپ GG در مقایسه با ژنوتیپ‌های GA و AA وجود دارد $(P=0.03)$. به دلیل فاصله زیاد بین گروه‌های ژنوتیپی Games-Howell test نتایج قابل اعتمادتری را گزارش می‌کند که در این بررسی $P=0.024$ برای ژنوتیپ

نتایج آنالیز آماری SPSS ver. 22: در گروه سالم میانگین سنی 55.1 ± 4.57 و میانگین وزنی 78.74 ± 5.54 بود. در گروه دیابتی (دیابتی بدون DIC و دیابتی‌های DIC دار)، میانگین سنی 62.4 ± 3.15 و میانگین وزنی 79.5 ± 4.93 بود. در گروه DIC (افراد دیابتی DIC دار و افراد بدون دیابت (DIC)، میانگین سنی 54.54 ± 9.41 و میانگین وزنی 77.11 ± 5.98 بود.

پس از بررسی سن و وزن بین دو گروه سالم و دیابتی (دیابتی بدون DIC و دیابتی‌های DIC دار) توسط روش independent t-test، نتایج آماری تفاوت معناداری را در ارتباط با سن بین دو گروه نشان داد ($P < 0.001$)، هرچند ارتباط معناداری در ارتباط با وزن بین دو گروه مشاهده نشد $(P=0.54)$. پس از بررسی سن و وزن بین دو گروه سالم و DIC (بدون دیابت و دیابتی) توسط روش independent t-test، نتایج آماری تفاوت معناداری را نه با سن ($P=0.72$) و نه با وزن ($P=0.2$) بین دو گروه نشان نداد. طی بررسی

GG در مقایسه با دیگر ژنوتیپ‌ها بین دو گروه مورد و شاهد بود.

برای اطمینان از نتایج گزارش شده و به دلیل تخصصی‌تر بودن نرم افزار تحت وب ASSOTEST در بررسی‌های ژنوتیپی نتایج ژنوتیپی در این نرم افزار نیز مورد آنالیز واقع شد، نتایج نشان داد که تنها در مدل وراثتی غالب تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($P=0.028$, $OR=2.67$ $CI95\%$) $(1.09-6.52)$.

بحث

امروزه در تحقیقات مختلف مشخص شده است که دیابت ملیتوسی باعث افزایش خطر ابتلا بسیاری از سرطان‌ها از جمله سرطان‌پستان، کبد، پانکراس، روده بزرگ، اندومتریوم، کلیه و مثانه می‌شود (۲۷، ۲۴، ۲۳). بعلاوه بیشتر بیماری‌های مرتبط بین دیابت و سرطان‌ها با مقاومت انسولین، کاهش کنترل چربی، استرس‌های اکسیدانیومی و تغییرات در سیستم ایمنی بدن ارتباط دارند (۳، ۲). همچنین استفاده مداوم از داروهای دیابتی و مکمل‌های آن‌ها ظاهراً در سرطان‌ها دخیل‌اند (۲۸، ۸).

مقاومت انسولین به طور مستقل با سرطان‌پستان در زنان پس از یائسگی در ارتباط است و خطر مقاومت به انسولین در سرطان‌پستان در میان زنان افزایش یافته است (۱۲).

زنان مبتلا به اضافه وزن یا چاق، اما مقاوم به انسولین، خطر ابتلا به سرطان‌پستان را در مقایسه با زنان دارای وزن طبیعی ندارند؛ درحالی‌که زنان دارای وزن طبیعی با مقاومت به انسولین در معرض خطر ابتلا به سرطان‌پستان در مقایسه با زنان دارای اضافه وزن با مقاومت به انسولین می‌باشند (۱۰).

هیپرانسولینمی با مقاومت به انسولین یک عامل خطر مهم برای سرطان‌پستان مستقل از چاقی عمومی یا توزیع چربی بدن است (۷).

سرطان‌پستان ارتباط معناداری با سطح بالای مقاومت به انسولین در زنان دارای اضافه وزن قبل از یائسگی یا زنان دارای چاقی قبل از یائسگی دارد، اما با زنان با وزن نرمال قبل از یائسگی یا زنان با وزن نرمال بعد از یائسگی ارتباطی ندارد (۲۰).

خطر ابتلا به سرطان‌پستان در بین بیماران دیابتی ۲۳ درصد و خطر مرگ بر اثر این بیماری در مقایسه با بیماران غیر دیابتی ۳۸ درصد افزایش یافته است. همچنین خطر ابتلا به سرطان کولون در افراد دیابتی ۲۶ درصد و خطر مرگ در اثر این نوع سرطان در مقایسه با افراد غیر دیابتی ۳۰ درصد افزایش یافته است (۳۰).

در ارتباط بین سندرم تخمدان پلی کیستیک، سرطان آندومتر، تخمدان و پستان، نتایج نشان داد که در زنان مبتلا به PCOS احتمال ابتلا به سرطان آندومتر افزایش می‌یابد ولی هیچ ارتباطی بین PCOS و خطر ابتلا به سرطان تخمدان و پستان وجود ندارد (۱۰).

در بررسی پلی‌مورفیسم‌های موجود در ژن گیرنده انسولین (INSR) و ارتباط آن با سندرم تخمدان پلی‌کیستیک (PCOS)، دیابت و سرطان‌پستان در بین زنان ایرانی نتایج نشان داد هیچ ارتباطی بین آن‌ها وجود ندارد (۲۵).

ژن NOEY2 به یک منطقه از کروموزوم 1P31 تعلق دارد که در بخش قابل توجهی از سرطان‌های پستان حذف شده‌اند (۳۱). کاهش بیان mRNA NOEY2 / ARHI ممکن است نقش مهمی در پاتوژنز سرطان‌پستان بازی کند (۱۴). این ژن از طریق مادری ایمپرینت می‌شود و در ۴۱ درصد از موارد سرطان تخمدان و پستان هتروزیگوسیتی خود را از دست می‌دهد، بنابراین یک ژن سرکوب‌کننده تومور است که عملکرد آن در سرطان تخمدان و پستان از دست رفته است (۳۲).

مشابه تحقیق حاضر، Julun Yang و همکاران در سال ۲۰۰۹ در آزمایشی دریافتند که "پروموتور" و "ناحیه آگزون

با توجه به نقش این ژن در ایجاد سرطان پستان در جمعیت‌های مختلف، در این آزمایش برای اولین بار جمعیتی از بیماران شهر رشت مورد مطالعه قرار گرفته است و نتیجه‌ی آن، ارتباط این ژن با بیماری سرطان پستان بود. در این پژوهش با استفاده از روش تعیین‌توالی، دقت و سرعت مطالعه نسبت به دیگر روش‌های معمول مانند ARMS-PCR و غیره بیشتر بوده و احتمال اشتباه و خطا نیز کمتر شده است.

نتیجه‌گیری

در مطالعات مختلف ثابت شده است که جهش‌ها و پلی‌مورفیسم‌های ژن DIRAS3 در ایجاد سرطان پستان و سرطان تخمدان دخیل هستند. در این مطالعه، نمونه‌های مورد بررسی ۵۰ فرد سالم و ۵۰ فرد بیمار بودند، از بین افراد بیمار در خصوص توالی اگزون ۲ ژن DIRAS3 هیچ‌گونه پلی‌مورفیسمی مشاهده نشد درحالی‌که از بین تمام نمونه‌ها یک پلی‌مورفیسم در ایترون ۲ در یک بیمار سرطانی در جایگاه c.332-3 T>C یا g.831 T>C و یک نوع پلی‌مورفیسم در اگزون ۳ (هم در افراد سرطانی و هم در افراد شاهد) در جایگاه 5'UTR c.331 G>A مشاهده گردید. نتایج این تحقیق نشان داد که از بین پلی‌مورفیسم‌های موجود فقط پلی‌مورفیسم 5'UTR c.331 G>A با بیماری سرطان پستان در ارتباط می‌باشد (P=0/04).

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از پایان‌نامه کارشناسی ارشد ژنتیک مولکولی خانم فاطمه اردلان می‌باشد و هیچگونه حمایت مالی در خصوص انجام آن صورت نگرفته است. بدین وسیله از معاونت‌های پژوهشی دانشگاه آزاد تنکابن و کلیه عزیزانی که در انجام مراحل مختلف پایان‌نامه با کمک‌های علمی و معنوی خود یاری رساندند تشکر و قدردانی می‌شود.

دو "ژن NOEY2 نقاط داغ جهش در این ژن هستند و جهش‌هایی که در منطقه کدگذاری اگزون ۲ و بخشی از پروموتور رخ می‌دهند ممکن است بیان NOEY2 را تغییر دهند. حضور جهش‌های NOEY2 در سرطان پستان نشان می‌دهد که جهش‌های NOEY2 ممکن است تا حدی با تولید تومور پستان ارتباط داشته باشند. آن‌ها ابتدا DNA 100نمونه (۵۰ عدد بافت سرطان پستان و بافت مجاور سینه همراه با ۵۰ عدد ضایعه خوش‌خیم سینه) را استخراج کرده و توالی‌یابی نمودند. بعد از تجزیه و تحلیل داده‌ها، ۲۱ مورد از ۵۰ مورد (۴۲٪) جهش‌ها در بافت سرطان پستان (در پروموتور، ۱۱ مورد و در اگزون ۲، ۷ مورد در منطقه بدون ترجمه و ۳ مورد در منطقه کدگذاری) و ۱۷ مورد از ۵۰ مورد (۳۴٪) جهش‌ها در بافتهای مجاور سینه (در پروموتور ۶ مورد و در اگزون ۲، ۱۰ مورد در منطقه عدم ترجمه و ۱ مورد در منطقه کدگذاری) شناسایی شدند، و هیچ جهشی در بافتهای خوشخیم پستان شناسایی نشد (۳۳).

جهش‌های ژنی NOEY2 با سن بیمار، انواع بافت‌شناسی، اندازه تومور، رده‌های بافتی، مراحل بالینی، متاستازهای گره لنفاوی زیر بغل و یا وضعیت بیان گیرنده هورمون (ER، PR) و عملکرد HER2 ارتباطی نداشتند (۳۳).

در تحقیقی دیگر مشابه تحقیق حاضر، کرجی‌بانی در سال ۱۳۹۷ در آزمایشی تحت عنوان "غربالگری حضور پلی‌مورفیسم ژرم‌لاین اگزون ۱ ژن NOEY2 در زنان مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کستیک و دیابت در ایران با تکنیک PCR-Sequencing" اگزون ۱ ژن NOEY2 را در بیماران مبتلا به دیابت، دیابت-پلی‌کیستیک، پلی‌کیستیک و سالم مورد سنجش قرار داد و تنها در بیمار مبتلا به دیابت جهش را مشاهده نمود، و در سایر بیماران مبتلا به دیابت، پلی‌کیستیک و سالم تنها پلی‌مورفیسم یافت (۱).

منابع

- ۱- کرجی‌بانی، پ.، رضایی، ا. (۱۳۹۸). غربالگری حضور پلی‌مورفیسم ژرم‌لاین‌اگزون ۱ زن NOEY2 در زنان مبتلا به سندرم تخمدان
- ۲- Abbasi, B., Ansari Nejad, N., Fardad, F., Nasiripour, S., Ramim, T. (2016). Breast cancer epigenetics. *Tehran University Medical Journal TUMS Publications*. 74(8):535-44.
- ۳- Afkhami Ardakani, M., Rashidi, M.A. (2005). Type 2 diabetes and its risk factors. *Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences*. 4(4):348-65.
- ۴- Alberti, K.G., Zimmet, P., Shaw, J. (2006). Metabolic syndrome a new world-wide definition. A consensus statement from the international diabetes federation. *Diabetic medicine*. 23(5):469-80.
- ۵- Alberti, K.G., Zimmet, P., Shaw, J. (2007). International diabetes federation: a consensus on type 2 diabetes prevention. *Diabetic Medicine*. 24(5):451-63.
- ۶- Aminisepehr, F., Babaei, E., Hosseinpour Feizi, M. (2018). Study of the expression of miR-4270 in plasma of patients with breast invasive ductal carcinoma. *Journal of Genetic Resources*. 4(2): 85-89.
- ۷- Bruning, P.F., Van Doorn, J., Bonfrère, J.M., Van Noord, P.A., Korse, C.M., Linders, T.C., Hart, A.A. (1995). Insulin-like growth-factor-binding protein 3 is decreased in early-stage operable pre-menopausal breast cancer. *International Journal of Cancer*. 62(3):266-70.
- ۸- De Bruijn, K.M., Arends, L.R., Hansen, B.E., Leeftang, S., Ruiter, R., Van Eijck, C.H. (2013). Systematic review and meta-analysis of the association between diabetes mellitus and incidence and mortality in breast and colorectal cancer. *British Journal of Surgery*. 100(11):1421-9.
- ۹- Devrajani, B.R., Shah, S.Z., Soomro, A.A., Devrajani, T. (2010). Type 2 diabetes mellitus: A risk factor for *Helicobacter pylori* infection: A hospital based case-control study. *International journal of diabetes in developing countries*. 30(1):22.
- ۱۰- Ding, D.C., Chen, W., Wang, J.H., Lin, S.Z. (2018). Association between polycystic ovarian syndrome and endometrial, ovarian, and breast cancer: A population-based cohort study in Taiwan. *Medicine*. 97(39).
- ۱۱- Forbes, J.M., Cooper, M.E. (2013). Mechanisms of diabetic complications. *Physiological reviews*. 93(1):137-88.
- ۱۲- Garmendia, M.L., Pereira, A., Alvarado, M.E., Atalah, E. (2007). Relation between insulin resistance and breast cancer among Chilean women. *Annals of epidemiology*. 17(6):403-9.
- ۱۳- Hinshelwood, R.A., Clark, S.J., (2008). Breast cancer epigenetics: normal human mammary epithelial cells as a model system. *Journal of molecular medicine*. 86(12):1315-28.
- ۱۴- Hisatomi, H., Nagao, K., Wakita, K., Kohno, N. (2002). ARHI/NOEY2 inactivation may be important in breast tumor pathogenesis. *Oncology*. 62(2):136-40.
- ۱۵- Hosseinzadeh Colagar, A., Moradi Firouzjah, H., Halalkhor, S. (2015). Vitamin D Receptor Poly (A)-microsatellite Polymorphism and Serum Levels of 25-hydroxyvitamin D: Association with Susceptibility to Breast cancer. *Journal of Breast Cancer*. 18(2):119-125.
- ۱۶- Kheiriloom, A., Silvestrini, M.T., Ingham, E.S., Mahakian, L.M., Tam, S.M., Tumbale, S.K., Foiret, J., Hubbard, N.E., Borowsky, A.D., Ferrara, K.W. (2019). Combining activatable nanodelivery with immunotherapy in a murine breast cancer model. *Journal of Controlled Release*. 303:42-54.
- ۱۷- Larsson, S.C., Mantzoros, C.S., Wolk, A. (2007). Diabetes mellitus and risk of breast cancer: a meta-analysis. *International journal of cancer*. 121(4):856-62.
- ۱۸- Legro, R.S., Kunesman, A.R., Dodson, W.C., Dunaif, A. (1999). Prevalence and predictors of risk for type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in polycystic ovary syndrome: a prospective, controlled study in 254 affected women. *Journal of clinical endocrinology & metabolism*. 84(1):165-9.
- ۱۹- Liao, S., Li, J., Wei, W., Wang, L., Zhang, Y., Li, J., Wang, C., Sun, S. (2011). Association between diabetes mellitus and breast cancer risk: a meta-analysis of the literature. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 12(4):1061-5.
- ۲۰- Luque, R.M., López-Sánchez, L.M., Villa-Osaba, A., Luque, I.M., Santos-Romero, AL.,

- Yubero-Serrano, E.M., Cara-García, M., Álvarez-Benito, M. (2017). Breast cancer is associated to impaired glucose/insulin homeostasis in premenopausal obese/overweight patients. *Oncotarget*. 8(46):81462.
- 21- Nikfarjam, A., Pornour, M., Sohrabi, M., Vaseghi, H. (2019). Correlation between expression of hsa-miR-490-5p and NFAT5 in peripheral blood mononuclear cell obtained from breast cancer patients. *Journal of Genetic Resources*. 5(1): 31-37.
- 22- Olefsky, J.M., Courtney, C.H. (2005). Type 2 diabetes mellitus: etiology, pathogenesis, and natural history. *Endocrinology*. 1093-117.
- 23- Papatheodorou, K., Papanas, N., Banach, M., Papazoglou, D., Edmonds, M. (2016). Complications of diabetes 2016. *Journal of diabetes research*. 2016: 6989453.
- 24- Parsonnet, J. 1999. Helicobacter pylori and gastric adenocarcinoma. Microbes and malignancy. Infection as a cause of Human Cancer. 372-408.
- 25- Rezaei, A., Akhshabi, S., Sadeghi, F. (2016). Evaluation of exon 17 of insulin receptor (INSR) gene and its relationship with diabetes type 2 in an Iranian population. *Banat's Journal of Biotechnology*. 7(13):61-9.
- 26- Ruddy, K.J., Ganz, P.A. (2019). Treatment of Nonmetastatic Breast Cancer. *Journal of the American Medical Association*. (17):1716-7.
- 27- Taal, B.G., Hartog Jager, F.C., Hageman, P.C., Delemarre, J.F., Bonfrère, J.M. (1992). Metastatic ovarian or colonic cancer: a clinical challenge. *European Journal of Cancer*. 28(2-3):394-9.
- 28- Vijayabaskar, P., Shiyamala, V. (2012). Antioxidant properties of seaweed polyphenol from *Turbinaria ornata* (Turner) J. Agardh, 1848. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2(1):S90-8.
- 29- Weber, G.F. (2007). Molecular mechanisms of cancer. Springer Science & Business Media. 49-115.
- 30- White, N.D. (2017). Alcohol uses in young adults with type 1 diabetes mellitus. *American journal of lifestyle medicine*. 11(6):433-5.
- 31- Yang, J., Hu, A., Wang, L.I., Li, B., Chen, Y., Zhao, W., Xu, W., Li, T. (2009). NOEY2 mutations in primary breast cancers and breast hyperplasia. *The Breast*. 18(3):197-203.
- 32- Yu, Y., Xu, F., Peng, H., Fang, X., Zhao, S., Li, Y., Cuevas, B., Kuo, W.L., Gray, J.W., Siciliano, M., Mills, G.B. (1999). NOEY2 (ARHI), an imprinted putative tumor suppressor gene in ovarian and breast carcinomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 96(1):214-9.
- 33- Yuan, J., Luo, R.Z., Fujii, S., Wang, L., Hu, W., Andreeff, M., Pan, Y., Kadota, M., Oshimura, M., Sahin, A.A., Issa, J.P. (2003). Aberrant methylation and silencing of ARHI, an imprinted tumor suppressor gene in which the function is lost in breast cancers. *Cancer Research*. 63(14):4174-80.

Investigation of the presence of polymorphism in exons 2 and 3 of the DIRAS3 gene in women with breast cancer and diabetes

Ardalan Moghadam Al F. and Rezaei A*

Dept. of Genetics, School of Basic Science, Islamic Azad University, Tonekabon Branch, I.R. of Iran.

Abstract

The DIRAS3 / NOEY2 / ARHI gene is an imprinting gene with paternal expression on human chromosome 1. Therefore, in individuals whose paternal gene is not expressed the person is at risk for two breast and ovarian cancers. On the other hand, as much as the risk of diabetes increases, the risk of breast cancer increases as well. The purpose of this study is to identify mutations and polymorphisms of exon 2 and 3 and intron 2 of DIRAS3 gene in women with invasive ductal breast cancer, invasive ductal breast cancer-diabetes and diabetes. In this study, four groups of women (control (50), invasive ductal breast cancer (20), invasive ductal breast cancer-diabetes (15) and diabetes (15) were studied. After DNA extraction, PCR products were loaded onto agarose gel and sequenced then. The gene reading was done with the help of Gene Runner and Chromas software. Statistical calculations were performed using SNPalyze V.8.1, assotest and SPSS V.22 software with a significance level of $P < 0.05$. After sequencing, there was observed a type of polymorphism at c.332-3 T > C locus in Intron 2 of a cancer patient, but no polymorphisms or mutations were found in Exon 2, whereas one type of polymorphism was found at locus 5'UTR c.331 G>A in Exon 3 of cancer patients and control persons. The results of this study showed that among the available polymorphisms, only 5'UTR c.331 G>A polymorphism is associated with breast cancer ($P = 0.04$).

Key words: breast cancer, diabetes, DIRAS3 gene, NOEY2 gene, ARHI gene