

Study on association of Single Nucleotide Polymorphism in ESR α Gene rs2234693 With Breast Cancer in Markazi Province

Saadatmand S¹, Hamta A¹, Sadeghi A^{2*}, Mohaghhegh F³

1- Department of Biology, Arak University, Arak, Iran

2- Molecular and Medicine Research Center, Department of Biochemistry and Genetics, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

3- Department of Radiology and Ancology, Ayatollah Khansari Hospital, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

Received: 24 Nov 2014, Accepted: 28 Jan 2015

Abstract

Background: Estrogen hormone regulates cell proliferation in breast tissue physiologically. Evidences show that changes in estrogen signaling pathways, including the receptor alpha (ER α), happen during breast cancer progression. ER α is expressed in most breast tumors and its association with the development of low-grade tumors has been demonstrated. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes may differ in susceptibility to cancer and result in different respond to treatment in different populations. The present study aimed investigated the association between single nucleotide polymorphisms (rs2234693: C / T) in gene ESR α in patients with breast Cancer.

Materials and Methods: In this case-control study 150 women with breast cancer and 142 healthy women without a family history of breast cancer were enrolled. DNA was extracted from blood samples. After primer design, technique of PCR-RFLP was used and samples were genotyped by acrylamide gel electrophoresis. Statistical analyzes were performed using SPSS version 20 and chi square test and Final findings were specified.

Results: TT and CT genotypes for rs2234693: C/T site compared with the CC had 5.5 and 1.5-fold increased risk respectively. Statistically significant differences were found between cases and controls for fibrocystic disease and age at menarche.

Conclusion: We not found an association between C/T polymorphism and breast cancer. But CC and TT genotypes of this polymorphism in estrogen receptor alpha gene related with breast cancer that are consistent with the findings of some other researchers.

Keywords: Breast Cancer, Estrogen Receptor alpha, rs2234693, Single Nucleotide Polymorphism.

*Corresponding Author:

Address: Laboratory of Biochemistry and Genetics, Molecular and Medicine Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

Email: sadeghi@arakmu.ac.ir

بررسی همراهی پلی مورفیسم تک نوکلئوتید rs2234693 در ژن گیرنده آلفای استروژن با سرطان پستان در استان مرکزی

سمیه سعادت‌مند^۱، احمد همتا^۲، عبدالرحیم صادقی^{۳*}، فتح‌الله محقق^۴

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه اراک، اراک، ایران

۲- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه اراک، اراک، ایران

۳- استادیار، مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، گروه بیوشیمی و ژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

۴- استادیار، بخش انکولوژی، بیمارستان آیت‌الله خوانساری، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

تاریخ دریافت: ۹۳/۹/۳ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۱/۸

چکیده

زمینه و هدف: هورمون استروژن تنظیم‌کننده فیزیولوژیکی تکثیر بافت پستان محسوب می‌شود. شواهد نشان می‌دهد که تغییرات در مسیرهای سیگنالینگ استروژن، از جمله گیرنده آلفای آن، در طول سرطان پستان و پیشرفت آن اتفاق می‌افتد. گیرنده آلفا استروژن (ESRα) در بیشتر تومورهای پستان بیان شده و ارتباطش با پیشرفت تومورهای درجه پایین به اثبات رسیده است. پلی مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی (SNPs) در ژن‌ها می‌توانند به تفاوت در استعداد ابتلا به سرطان و پاسخ متفاوت به درمان در جمعیت‌های مختلف منجر شوند. در مطالعه حاضر بررسی همراهی پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی rs2234693:C/T در ژن ESRα، با سرطان پستان بررسی شد.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش مورد-شاهدی، ۱۵۰ خانم مبتلا به سرطان پستان و ۱۴۲ خانم سالم بدون سابقه خانوادگی سرطان پستان وارد مطالعه شدند. استخراج DNA از نمونه‌های خون انجام شد. بعد از طراحی پرایمرها، تکنیک PCR-RFLP استفاده شد و با الکتروفورز ژل اکریل آمید، نمونه‌ها ژنوتایپ شدند. از نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ و تست کای اسکور جهت بررسی آماری استفاده شد.

یافته‌ها: ژنوتیپ‌های TT و CT نسبت به CC در جایگاه rs2234693:C/T به ترتیب افزایش خطر ۵/۵ و ۱/۵ برابری را نشان دادند. بین دو گروه بیمار و سالم در برخی از ویژگی‌های بالینی از جمله پستان فیبروکیستیک و سن منارک تفاوت معنی‌دار آماری مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: یافته‌های ما حاکی از عدم ارتباط معنی‌دار بین پلی مورفیسم C/T و سرطان پستان است اما ارتباط ژنوتیپ‌های CC و TT این پلی مورفیسم در ژن گیرنده آلفای استروژن با سرطان پستان وجود دارد که با مطالعات برخی محققین دیگر مطابقت دارد.

واژگان کلیدی: سرطان پستان، گیرنده آلفای استروژن، پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی

*نویسنده مسئول: اراک، دانشگاه علوم پزشکی اراک، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی

Email: sadeghi@arakmu.ac.ir

مقدمه

در کشورهای صنعتی و در سراسر جهان، سرطان پستان، معمول ترین سرطان زنان است و سالانه با بیش از یک میلیون ابتلا و ۴۱۰ هزار مرگ و میر مهم ترین علت مرگ و میر ناشی از سرطان محسوب می شود (۱، ۲). مبتلایان به سرطان پستان در ایران در مقایسه با کشورهای غربی نسبتاً جوان ترند (۳) و حدود یک دهه زودتر مبتلا می شوند (۴). یکی از مهم ترین خطرات تعیین کننده برای سرطان پستان مربوط به سطح هورمون های درونی و وقایع اصلی تولید مثلی است (۵). مشخص شده است که سرطان پستان تیپیکال در سلول های لومینال اپیتلیال غدد پستانی رخ می دهد، این سلول ها دارای گیرنده های استروژن هستند که به استروژن تخمدانی برای رشد در غدد نرمال پستانی پاسخ می دهند (۶). بیان استروژن از طریق گیرنده استروژن تنظیم می شود (۷). گیرنده استروژن یکی از اهداف مولکولی شناخته شده برای درمان سرطان پستان است (۸). یکی از مهم ترین واسطه های پاسخ هورمونی در بافت های حساس به استروژن مثل پستان، گیرنده آلفای استروژن- α (Estrogen receptor alpha) است (۵) که به عنوان یک بیومارکر بالینی بسیار مفید برای پیشروی سرطان پستان محسوب می شود (۹). ژن α -ESR در موقعیت 6q24-27 واقع شده و از ۸ اگزون تشکیل شده است (۵، ۱۰). گیرنده ها در تنظیم عملکردهای سلولی موثرند و ایجاد تغییرات کوچک در ساختمان آنها نقش اساسی در عملکرد آنها دارند که این ممکن است به تدریج بر کیفیت پاسخ آنها تاثیر بگذارد (۱۱). پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی rs2234693: C/T در ۳۹۷ جفت بازی بالا دست اگزون ۲ این ژن واقع شده است. این پلی مورفیسم با فوتیپ بیماری های قلبی- عروقی، پوکی استخوان (۱۲)، سرطان های وابسته به هورمون مثل سرطان پستان، پروستات و آندومتریال همراهی نشان داده است (۱۳). در نقاط مختلف جهان و به ویژه آسیای شرقی مطالعات مشابهی انجام شده است، اطلاعات منتشر شده در مورد همراهی (Single Nucleotide SNPs Polymorphisms) در ژن ESR α با استعداد ابتلا به

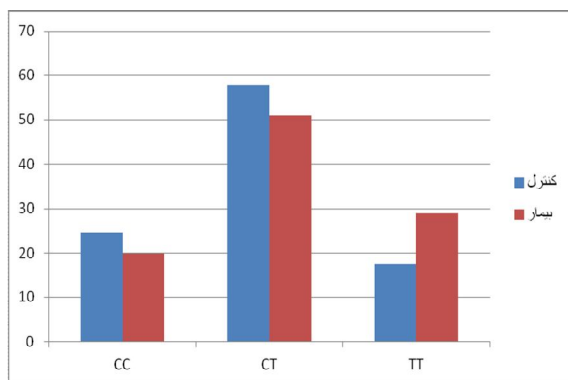
سرطان پستان نتایج متفاوتی داشته است (۲، ۱۰). از آنجا که تفاوت های نژادی و جغرافیایی در میزان خطر ابتلا و ویژگی های بالینی سرطان پستان موثر است، در مطالعه حاضر بررسی همراهی این پلی مورفیسم در ژن گیرنده آلفای استروژن با سرطان پستان در جمعیت زنان استان مرکزی هدف قرار گرفت.

مواد و روش ها

مطالعه حاضر یک مطالعه مورد- شاهدی بوده و گروه مورد شامل ۱۵۰ خانم مراجعه کننده به بیمارستان آیت الله خوانساری اراک با تایید ابتلا به سرطان پستان توسط انکولوژیست و گروه شاهد شامل ۱۴۲ خانم سالم بدون سابقه سرطان در خود و هم چنین عدم سابقه خانوادگی سرطان پستان در بستگان درجه اول و دوم، با میانگین سنی مشابه با گروه مورد بودند. اطلاعات دموگرافیک و فاکتورهای هورمونی افراد شامل سن، تاهل، شغل، تعداد فرزندان، رژیم غذایی، فعالیت بدنی، عوارض بارداری، سن اولین زایمان، سابقه خانوادگی سرطان پستان، سن اولین قاعدگی، وضعیت سیکل ماهانه و یائسگی و... در قالب یک پرسش نامه جمع آوری شد. ۲۴ نفر از آنها نیز تا سال ۱۳۹۳ فوت شده بودند. سپس با رضایت کتبی افراد و طبق اصول اخلاقی پژوهش، ۲ میلی لیتر خون محیطی در لوله های حاوی EDTA جمع آوری و تا انجام مراحل بعدی در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت DNG-PLUS شرکت سیناژن و طبق پروتکل انجام شد. بررسی کیفیت DNA توسط ژل آگارز ۱ درصد و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید تایید شد. برای ژنوتایپینگ نمونه ها در جایگاه پلی مورفیسم rs2234693 C/T: از روش PCR-RFLP و آنزیم برش گر PVUII استفاده شد. پرایمر رفت (Forward) شامل 5' TTTTCTGTGTTCTGATTTTCACG 3' و پرایمر برگشت (Reverse) شامل 5' TGCAGCAAAGGTGTTGCCTATTATAT 3' بود. برنامه PCR طی یک چرخه واسرشت اولیه به

یافته‌ها

توزیع ژنوتیپی پلی مورفیسم C/T: rs2234693 برای بیماران سرطانی و کنترل به ترتیب برای ژنوتیپ CC، ۲۰ و ۲۴/۶ درصد، TT ۲۹ و ۱۷/۶ درصد و CT ۵۱ و ۵۷/۷ درصد محاسبه شد (نمودار ۱). افزایش خطر استعداد ابتلا به سرطان پستان در دو ژنوتیپ TT و CT نسبت به ژنوتیپ اجدادی CC، به ترتیب $OR=5/54$ و $OR=1/5$ را نشان داد. به طور کلی فراوانی آلل موتانت T در گروه بیمار نسبت به کنترل کمی بیشتر بود (جدول ۱).



نمودار ۱. درصد فراوانی‌های ژنوتیپ‌های ژن $ESR\alpha$ در جایگاه پلی مورفیسم rs2234693

مدت ۴ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، سپس ۳۰ چرخه واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شامل واسرشت به مدت ۴۵ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال پرایمر به مدت ۴۵ ثانیه در ۶۶ درجه سانتی‌گراد، طولیل شدن زنجیره به مدت ۴۵ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و در آخر یک چرخه بازآرایی نهایی به مدت ۱۰ دقیقه بهینه سازی شد. بعد از تایید باند ۷۲۲ جفت بازی حاصل از PCR، برنامه برش آنزیمی PVUII طبق دستور و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت انکوبه انجام شد. در حضور آلل موتانت T برش آنزیمی دو قطعه ۴۷۰ و ۲۵۲ جفت بازی و در حضور آلل وحشی C جایگاهی برای برش آنزیم وجود نداشت. از ژل اکریل آمید ۸ درصد و رنگ آمیزی آن با نیترات نقره برای دیدن باندهای مدنظر استفاده شد. تست آماری X^2 برای ارزیابی اثر پلی مورفیسم بر ویژگی‌های سرطان پستان مورد استفاده قرار گرفت. آنالیز رگرسیون لجستیک با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ انجام شد. برای محاسبه شانس نسبی (Odd Ratio) با فاصله اطمینان ۹۵ درصد و بررسی اثر پیش بینی کننده هر فاکتور روی سرطان پستان، سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

جدول ۱. فراوانی‌های آللی ژن $ESR\alpha$ در جایگاه پلی مورفیسم rs2234693

نوع آلل	درصد آللی در گروه کنترل		Sig	درصد آللی در گروه بیمار	Odd ratio	CI=%۹۵ Lower Upper
	n=۱۴۲	n=۱۰۰				
C	۵۳/۵۲	۴۵/۵	۰/۱۳	۰/۸۲		
T	۴۶/۴۷	۵۴/۵				

گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نداشت. گروه بیماران سرطانی از نظر مشکلات هورمونی زمینه‌ای به ویژه پستان فیروکیستیک دارای تفاوت معنی‌دار آماری نسبت به گروه کنترل بود ($p=0/03$). در مورد سن اولین قاعدگی (منارک) نیز بین گروه کنترل و بیمار تفاوت معنی‌دار وجود داشت ($p=0/004$). هم‌چنین تفاوت معنی‌دار آماری در سطح تحصیلات دو گروه با $p=0/011$ مشاهده شد (جدول ۲).

حدود ۸۵ درصد از بیماران توزیع سنی بین ۶۰-۴۰ سال داشتند و میانگین سنی بیماران ۴۵/۲۹ سال به دست آمد که در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معنی‌دار آماری نداشت. ۱۵ درصد از بیماران حداقل در یکی از بستگان درجه اول یا دوم خود ابتلا به سرطان پستان را ذکر نمودند. ۲۲ درصد از بیماران سابقه مصرف بیش از ۵ سال قرص‌های ضد بارداری را داشتند که در مقایسه با میانگین مصرف در

جدول ۲. ویژگی‌های هورمونی و دموگرافیکی در دو گروه بیمار و کنترل

متغیرها	P	Df	X ²
بیماری‌های هورمونی زمینه‌ای *	۰/۰۳	۷	۱۵/۴۷
سابقه عوارض طی بارداری	۰/۱۱۳	۱۱	۱۶/۸۲
سن منارک *	۰/۰۰۴	۳	۱۳/۵۹
سن در تولد اولین فرزند	۰/۲۹	۱۹	۲۱/۷۶
سابقه مدت مصرف قرص ضد بارداری	۰/۷	۱۷	۱۳/۴۸
وضعیت یائسگی	۰/۰۷	۲	۵/۱۴
سن	۰/۰۵۷	۴۱	۵۶/۲۲
شاخص توده بدنی (BMI)	۰/۴۳	۱۸۹	۱/۹۱
سطح تحصیلات *	۰/۰۱۱	۴	۱۳/۱۴
وضعیت شغلی	۰/۶۱	۲	۰/۹۸
وضعیت تاهل	۰/۴	۱	۰/۲۴

* اختلاف بین دو گروه معنی دار بود (p < ۰/۰۵)

بحث

به طور کلی بین پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی مذکور و سرطان پستان همراهی وجود نداشت (p < ۰/۰۵) اما افزایش خطر برای برخی ژنوتیپ‌ها و آلل‌ها وجود دارد. برای ژنوتیپ‌های TT و CT، افزایش خطر وجود داشت که با مطالعه کای و همکاران هم‌خوانی دارد (۱۴). مدوگنو و همکاران نیز به افزایش خطر در واجدین آلل T که زایمان نداشتند اشاره کرده‌اند (۱۳). شن و همکاران نیز، افزایش خطر در زنان واجد این دو ژنوتیپ که سابقه خانوادگی سرطان پستان داشتند را بیان می‌کنند (۱۵).

یافته‌های ما نشان داد که زنان مبتلا به پستان فیروکیستیک دارای تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل هستند به طوری که در گروه بیمار، مشکلات زمینه‌ای بیشتری وجود دارد و این مورد در مطالعات شن و همکاران (۱۵) و کای و همکاران (۱۴) نیز دیده شده است. در مطالعه حاضر تفاوت معنی‌دار بین سن منارک در دو گروه بیمار و کنترل مشاهده شد به طوری که گروه بیمار با داشتن منارک زودرس در خطر بیشتر قرار می‌گیرند که با مطالعه یو و همکاران (۱۶) در کره شباهت دارد که به افزایش خطر ۲/۵ برابری سرطان پستان در ازای منارک قبل از ۱۴ سال اشاره کرده است. نتایج ما با فاضلی و همکاران (۴) و نیز اکبری و

همکاران (۱۷) از نظر میانگین سن تشخیص هم‌خوانی وجود نداشت اما با نتایج بختیاری و همکاران (۱۸) در بابل و نیز فولادی و همکاران (۱۹) در اردبیل مبنی بر سن حدود ۴۵ سال تطابق بیشتری دارد. به دلیل نمونه‌گیری ما در دو بازه زمانی و با توجه به سن تشخیص و شروع درمان در بیماران و هم‌چنین تعداد فوت شدگان تا تابستان ۱۳۹۳، حداقل میزان بقای پنج ساله بیماران ۷۴/۷۴ درصد به دست آمد که با مطالعه فاضلی و همکاران (۴) در استان مرکزی هم‌خوانی ندارد اما با مطالعه اکبری و همکاران (۱۷) در تهران مبنی بر ۷۶/۶ درصد هماهنگی بیشتری دارد. نتایج مطالعه ما از نظر سن و درصد وقوع یائسگی در بیماران با مطالعه فاضلی و همکاران (۴) در استان مرکزی کاملاً توافق دارد.

پاتوژنز سرطان و عوامل شناخته و ناشناخته محیطی و ژنتیکی دخیل در آن پیچیده است. واقع شدن پلی مورفیسم مورد مطالعه در اینترون به دلایلی در خطر بالقوه سرطان پستان موثر است زیرا پلی مورفیسم rs2234693 ممکن است با تغییرات سایر ژن‌های ناشناخته مجاور با ESRα که خطر سرطان پستان را می‌افزایند، پیوسته باشد؛ تغییرات اینترونی در توالی ژن ممکن است فشاری روی بیان ژن‌های دیگر به وسیله تاثیر بر رونویسی و یا پایداری mRNA ی آنها داشته باشند و هم‌چنین برخی از اینترون‌ها توالی‌های تنظیمی مانند تقویت‌کننده‌ها دارند که بر سطح بیان ژن از طریق تنظیم رونویسی اثر می‌گذارند (۱۵).

نتیجه‌گیری

اگرچه بین این پلی مورفیسم و سرطان پستان در این مطالعه، ارتباط آماری معنی‌دار مشاهده نشد اما در مورد افزایش خطر در برخی ژنوتیپ‌ها و ویژگی‌های بالینی بیماران با این خزانه ژنی در استان مرکزی نتایج قابل ملاحظه‌ای حاصل شد. برای تکمیل این مطالعه بررسی میزان بیان ژن ESRα و درجه‌بندی تومور در ارتباط با نوع آلل در فرد و نیز انجام همین طرح در سایر نقاط کشور با تعداد بیشتر جمعیت و طبقه‌بندی بر اساس نژاد و قومیت پیشنهاد می‌شود.

remarkably distinct gene expression patterns. *Cancer research*. 2001;61(16):5979-84.

8. Di Leo A, Malorni L. Polyendocrine Treatment in Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer: A "FACT" Yet to Be Proven. *Journal of Clinical Oncology*. 2012;30(16):1897-900.

9. Fuqua SA, Schiff R, Parra I, Moore JT, Mohsin SK, Osborne CK, et al. Estrogen Receptor β Protein in Human Breast Cancer Correlation with Clinical Tumor Parameters. *Cancer research*. 2003;63(10):2434-9.

10. Bond GL, Hu W, Bond EE, Robins H, Lutzker SG, Arva NC, et al. A single nucleotide polymorphism in the MDM2 promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans. *Cell*. 2004;119(5):591-602.

11. Császár A, Ábel T. Receptor polymorphisms and diseases. *European journal of pharmacology*. 2001;414(1):9-22.

12. Schuit SC, de Jong FH, Stolk L, Koek WNH, van Meurs JB, Schoofs MW, et al. Estrogen receptor alpha gene polymorphisms are associated with estradiol levels in postmenopausal women. *European Journal of Endocrinology*. 2005;153(2):327-34.

13. Modugno F, Zmuda JM, Potter D, Cai C, Ziv E, Cummings SR, et al. Association of estrogen receptor α polymorphisms with breast cancer risk in older Caucasian women. *International journal of cancer*. 2005; 116(6): 984-91.

14. Cai Q, Shu X-O, Jin F, Dai Q, Wen W, Cheng J-R, et al. Genetic Polymorphisms in the Estrogen Receptor α Gene and Risk of Breast Cancer Results from the Shanghai Breast Cancer Study. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2003;12(9):853-9.

15. Shen Y, Li D-K, Wu J, Zhang Z, Gao E. Joint effects of the CYP1A1 MspI, ER α PvuII, and ER α XbaI polymorphisms on the risk of breast cancer: results from a population-based case-control study in Shanghai, China. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2006; 15(2):342-7.

16. Yoo KY, Kang D, Park SK, Kim SU, Shin A, Yoon H, et al. Epidemiology of breast cancer in Korea: occurrence, high-risk groups, and

تشکر و قدردانی

این مطالعه حاصل بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد رشته ژنتیک است که با هزینه شخصی دانشجو و در آزمایشگاه تحقیقات بیوشیمی، ژنتیک و آزمایشگاه تحقیقات پزشکی مولکولی انجام شده است. در اینجا از معاونت تحقیقات و فن آوری دانشگاه علوم پزشکی اراک و پرسنل بیمارستان آیت الله خوانساری اراک و تمام بیماران و افراد کنترل شرکت کننده در مطالعه سپاسگزاری می‌گردد.

منابع

- Giacinti L, Claudio PP, Lopez M, Giordano A. Epigenetic information and estrogen receptor alpha expression in breast cancer. *The oncologist*. 2006;11(1):1-8.
- Li L-W, Xu L. Menopausal status modifies breast cancer risk associated with ESR1 PvuII and XbaI polymorphisms in Asian women: a HuGE review and meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012;13:5105-11.
- Azimi C, Abbasi S. Genetic polymorphisms in the estrogen receptor- α Gene codon 325 (CCC} CCG) and risk of breast cancer among Iranian women: a case control study. *Medical Journal of the Islamic Republic of Iran*. 2009; 23(2):75-82.
- Fazeli Z, Najafian-Zade M, Eshrati B, Almasi-Hashiani. [Five-year evaluation of epidemiological, geographical distribution and survival analysis of breast cancer in Markazi Province, 2007-11]. *Arak Medical University Journal (AMUJ)*. 2014;16(80):72-
- Ladd AG-Z, Vásquez AA, Rivadeneira F, Siemes C, Hofman A, Stricker BC, et al. Estrogen receptor α polymorphisms and postmenopausal breast cancer risk. *Breast cancer research and treatment*. 2008; 107(3): 415-9.
- Abbasi S. Estrogen receptor-beta gene polymorphism in women with breast cancer at the Imam Khomeini Hospital Complex, Iran. *BMC medical genetics*. 2010;11(1):109-10.
- Gruvberger S, Ringnér M, Chen Y, Panavally S, Saal LH, Borg Å, et al. Estrogen receptor status in breast cancer is associated with

prevention. Journal of Korean medical science. 2002; 17(1):1-2.

17. Akbari M, Mirzaei H, Soori H, et al. 5 year survival of breast cancer in Shohada-e- Tajrish and Jorjani hospitals Hakim. 2006; 9(2):39-44.[persian]

18. Bakhtiari A, HajiAhmadi M, et al. 5 Year Assessment of Breast Cancer Rajaii Hospital,

Babolsar. The Iranian Journal of Obstetrics, Gynecology and Infertility. 2006; 9(1):47-52.[persian]

19. Fouladi N, Amani F, Harghi A, Nayebyazdi N. Five year survival of women with breast cancer in Ardabil, north-west of Iran. Pac J Cancer Prev. 2011; 12(7):1799-80.[persian]