

Research Paper



Investigating the Association between rs712829 Polymorphism of EGFR Gene with Lung Cancer as a Predictive Marker in Iranian Population

Milad Pezeshki¹, Jamshid Ansari², Azam Ahmadi³

1. MSc in Genetic, Infectious Diseases Research Center (IDRC), Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.
2. Department of Oncology, Ayatollah Khansari Hospital, Arak university of Medical Sciences, Arak, Iran.
3. PhD of Genetics, Infectious Diseases Research Center (IDRC), Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.

Use your device to scan
and read the article online



Citation Pezeshki M, Ansari J, Ahmadi A. [Investigating the Association between rs712829 Polymorphism of EGFR Gene with Lung Cancer as a Predictive Marker in Iranian Population (Persian)]. *Jundishapur Journal of Medical Sciences*. 2024; 22(4):458-468. 10.22118/JSMJ.2023.399031.3147

doi <https://doi.org/10.22118/jsmj.2023.399031.3147>

ABSTRACT

Background and Objectives Lung cancer is the leading cause of cancer death globally. The epidermal growth factor receptor (EGFR) plays an important role in cell proliferation and signaling. In this study, we examined the association between EGFR (rs712829) gene polymorphism and lung cancer risk among the Iranian population.

Subjects and Methods A total of 100 patients with primary lung cancer and 100 matched healthy controls were recruited into this study. EGFR rs712829 single nucleotide polymorphism (SNP) were genotyped by PCR-RFLP techniques for this association with lung cancer risk.

Results A significant association was observed between the GG genotype ($P=0.039$, $OR=5.500$, $CI=95\%$; 1.710- 11.921) and also G ($P=0.001$, $OR=2.967$, $CI=95\%$; 1.557- 5.691) allele of rs712829 SNP with lung cancer risk, this was while the TT genotype and T allele of this polymorphism showed a protective role against risk of lung cancer.

Conclusion In conclusion, EGFR rs712829 was associated with a risk of lung cancer among Iranians. More studies in other Iranian populations are required to confirm the present findings.

Keywords Predictive marker, Lung cancer, Single nucleotide polymorphism rs712829, EGFR gene

Received: 25 May 2023

Accepted: 29 Nov 2023

Available Online: 19 Feb 2024

* **Corresponding Author:**

Jamshid Ansari

Address: Department of Radiotherapy, Ayatollah Khansari Hospital, Daneshgah St., Arak, Iran.

Tel: +98-86-33675001

E-Mail: Jamshidsa@yahoo.com

Extended Abstract

Introduction

Lung cancer (LC) is the cancer with the highest incidence and mortality rate in the world. In 2018, 2.09 million people were diagnosed with LC, and 1.76 million people died due to this disease. LC is the third most common type of cancer in Iran, and its prevalence is increasing rapidly. LC is classified into two major categories: non-small cell lung cancer (NSCLC) and small cell lung cancer (SCLC). Approximately 85-87% of lung cancers are of the NSCLC type. Despite its unclear etiology, the development of LC is known to be multifactorial. Genetic and environmental factors such as addiction to tobacco, radiation therapy, other lung diseases, race, and family history of LC play an important role in disease susceptibility.

Recent studies indicate that genetic factors such as single nucleotide polymorphisms (SNPs) may play a role in the risk of LC. Several studies on different populations have been published, suggesting that SNPs of the EGFR (-216G/T) are associated with LC risk. Epidermal growth factor receptor (EGFR), a trans-membrane glycoprotein with tyrosine kinase activity encoded by a gene located on 7p12, is a main regulator of different signaling pathways. EGFR is frequently overexpressed in many cancers including LC. Among variants of EGFR gene, rs712829 is a functional polymorphism in the EGFR promoter. The replacement of G by T at position -216 increases promoter activity by 30%, thereby resulting in a higher EGFR expression level and causes carcinogenesis. Several reports have investigated the role of single nucleotide polymorphism of EGFR (rs712829) genes in lung cancer risk in different ethnic populations. The aim of the present study was to evaluate the association between the rs712829 (EGFR) polymorphisms with the risk of lung cancer in a population of Markazi province.

Methods

This study was designed to assess the association between the EGFR -216G/T gene polymorphisms and the risk of lung cancer in the Iranian population. A total of 100 patients with lung cancer and 100 age- and gender-matched healthy controls were recruited for the study. The participants were selected from Ayatollah Khansari Hospital, Arak, Iran, from January 2020 to May 2022. Lung cancer was diagnosed by an oncologist and was confirmed by histopathology examination. The exclusion criterion of the control group was previous malignancy or genetic diseases. Clinical data were collected from the patients' medical records, and demographic information was collected using a questionnaire. The study was approved by the Research Ethics Committees of Arak University of Medical Sciences. DNA extraction of blood samples was done using DNG-plus kit (Cinna Gen, Iran) according to the manufacturer's instructions, and the

samples were stored at -20°C until molecular analysis. The SNPs of the EGFR (rs712829) gene were analyzed using PCR-RFLP method. The PCR products were studied after digestion with BseRI restriction enzyme (Fermentaz, USA) for -216G/T of EGFR gene (cut from 240 bp G type into 180 + 60 bp T type).

Digestion reaction conditions were performed following manufacturer recommendations, and the fragments obtained from enzymatic digestion were recorded with gel documentation system. Statistical analysis was performed using SPSS version 16. The $P < 0.05$ was considered statistically significant. The odd ratios (OR) with their corresponding 95% confidence intervals (CI) were calculated by binary logistic regression to study the associations of the SNPs studied with the risk of lung cancer.

Results

The PCR-RFLP results of the SNP studied are shown in [Figure 1](#). The age range of patients and healthy people was 44-88 (62.45 ± 11.47) and 33-81 (61.5 ± 10.70), respectively ($P=0.385$). As far as smoking status in the two groups was concerned, about 42% of the patients smoked cigarettes during their life, and this rate was 21% in the control group, indicating a significant difference between the two groups. In other words, smoking increased the risk of lung cancer ($P=0.004$).

According to [Table 1](#), the frequency of TT genotype in the patient and control groups was 15% and 55%, respectively. Statistical analysis showed that the TT genotype has a protective role against the risk of lung cancer. In contrast, the frequency of GG genotype in patients was higher than that in the control group, and it had a significant relationship with the risk of lung cancer ($P=0.039$, $OR=5.500$, $CI=95\%$; 1.710-11.921). Also, the frequency of GT genotype in patients was 2.2 times that of the control group and showed a significant relationship with the risk of lung cancer ($P=0.003$, $OR=6.682$, $CI=95\%$; 12.324-1.798). The frequency of G allele in patient and control groups was 57.5% and 31%, respectively.

Statistical analysis of allele frequency in both patient and control groups showed that the G allele of EGFR gene polymorphism rs712829 had a significant relationship with the risk of lung cancer ($P=0.001$, $OR=2.967$, $CI=95\%$; 1.557-5.691), and unlike the T allele, this polymorphism acts as a protective factor. The relationship of rs712829 polymorphic genotypes of EGFR gene with tumor grade (T), lymph node involvement status (N) and metastasis status (M) was investigated. There was no significant relationship between the studied polymorphism genotypes and tumor grade (T1+T2 vs. T3+T4), lymph node status (involvement vs. non-involvement), and metastasis status (presence vs. absence).

Table 1. The frequency of the alleles and genotypes for the SNP studied in patient and control groups.

Gene	SNP	Genotype	Cases, n (%)	Controls, n (%)	OR*	95% CI*	P*	
EGFR	rs712829	TT	15 (15)	55 (55)	1.00	1.00		
		GT	55 (55)	25 (25)	6/682	1/798-12/324	0/003	
		GG	30 (30)	20 (20)	5/500	1/710-11/921	0/039	
		Alleles						
		T	85 (42/5)	138 (69)	1.00	1.00		
		G	115 (57/5)	62 (31)	2/976	1/557-5/691	0.001	

*P-value < 0.05



Figure 1. Results of PCR-RFLP analysis of the EGFR rs712829 polymorphism with BseRI restriction enzyme at 37°C/3 hr.

Conclusion

In the present study, the relationship between rs712829 EGFR gene polymorphism and lung cancer risk in an Iranian population was investigated using PCR-RFLP technique. The results showed that the rs712829 polymorphism of the EGFR gene has a significant relationship with the risk of lung cancer. Comparing the frequencies of genotypes and alleles of rs712829 polymorphism in both control and patient groups showed that the TT genotype and the mentioned polymorphic T allele have a protective role against the risk of lung cancer and against the presence of the 2.9 G allele, which exposes a person to a higher risk of lung cancer compared to the T allele. Also, people with the GG genotype are about 5.5 times more likely to develop lung cancer than people who carry the TT genotype. The results of investigating the relationship between rs712829 EGFR gene polymorphism and the risk of lung cancer in our study are consistent with those of other studies conducted on different populations.

This study identified that there is a significant association between rs712829 of EGFR gene polymorphisms and the risk of susceptibility to lung cancer. Therefore, this polymorphism can be used as a biomarker in personalized medicine for clinical prediction of the risk of lung cancer. To confirm the role of studied polymorphisms in the risk of lung cancer, more studies with larger sample sizes and different ethnic groups are required.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

This study was done in accordance with Helsinki declaration. This study was approved by ethical

committee of the university (IR.ARAKMU.).

Funding

This study was supported by the Research Affair of Arak University of Medical Sciences.

Authors contributions

MP: Main idea, data collection, and supervision of thesis, and revision of draft of the manuscript, Data analysis, revision of the draft of the manuscript and final approval.

JA: Literature search, revision of the manuscript, and final approval.

AH: Writing proposal, data collection, and writing a draft of the manuscript.

Conflicts of interest

Nothing to declare.

Acknowledgements

This study was approved by research affair of Arak University of Medical Sciences(IR.ARAKMU.).

مقاله پژوهشی

بررسی ارتباط چند شکلی rs712829 ژن EGFR با سرطان ریه به عنوان یک مارکر پیشگویی در جمعیت ایرانی

میلاذ پزشکی^۱، جمشید انصاری^۲، اعظم احمدی^۳

۱. کارشناسی ارشد ژنتیک، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران.
۲. استادیار، بخش انکولوژی، بیمارستان آیت الله خوانساری، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران.
۳. دکترای تخصصی ژنتیک، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران.

Use your device to scan
and read the article online

Citation Pezeshki M, Ansari J, Ahmadi A. [Investigating the Association between rs712829 Polymorphism of EGFR Gene with Lung Cancer as a Predictive Marker in Iranian Population (Persian)]. *Jundishapur Journal of Medical Sciences*. 2024; 22(4):458-468. 10.22118/JSMJ.2023.399031.3147

doi <https://doi.org/10.22118/jsmj.2023.399031.3147>

چکیده

زمینه و هدف: سرطان ریه عامل اصلی مرگ و میر ناشی از سرطان در جهان است. گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی (EGFR) نقش مهمی در تکثیر سلولی و سیگنال دهی دارد. هدف از انجام این مطالعه بررسی ارتباط بین چند شکلی rs712829 ژن EGFR و خطر ابتلا به سرطان ریه در جمعیت ایرانی است.

روش بررسی: در این مطالعه مورد-شاهدی، ارتباط پلی مورفیسم rs712829 ژن EGFR با خطر ابتلا به سرطان ریه در ۱۰۰ بیمار مبتلا به سرطان ریه و ۱۰۰ فرد سالم که از نظر سن و جنسیت میج شده بودند، با استفاده از تکنیک PCR-RFLP مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: ارتباط معنی داری میان ژنوتیپ GG (1.710- 11.921) و همچنین آلل G (P= 0.001, OR= 2.967, CI=95% ; 1.557- 5.691) پلی مورفیسم rs712829 ژن EGFR با خطر ابتلا به سرطان ریه مشاهده گردید. این در حالی بود که ژنوتیپ TT و آلل T این پلی مورفیسم یک نقش محافظتی در برابر خطر ابتلا به سرطان ریه از خود نشان داد.

نتیجه گیری: با توجه به نتایج حاصل، چند شکلی rs712829 ژن EGFR با خطر ابتلا به سرطان ریه مرتبط می باشد. برای تایید یافته‌های حاضر، مطالعات بیشتری در سایر جمعیت‌های ایرانی مورد نیاز است.

کلیدواژه‌ها: مارکر پیشگویی، سرطان ریه، چندشکلی تک نوکلئوتیدی rs712829، ژن EGFR



تاریخ دریافت: ۰۴ خرداد ۱۴۰۲

تاریخ پذیرش: ۰۸ آذر ۱۴۰۲

تاریخ انتشار: ۳۰ دی ۱۴۰۲

نویسنده مسئول:

جمشید انصاری

نشانی: بخش انکولوژی، بیمارستان آیت الله خوانساری، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران.

تلفن: ۰۸۶- ۳۳۶۷۵۰۰۱

رایانامه: Jamshidsa@yahoo.com

جندی شاپور

مقدمه

روی این ژن قرار دارد اما بسیاری از مطالعات نشان می‌دهد که چندشکلی‌های مرتبط با خطر ابتلا به سرطان ریه بیشتر در پرو موتور این ژن قرار دارند که از میان این چند شکلی‌ها، واریانت rs712829 مهم‌ترین چند شکلی است که در بسیاری از مطالعات ارتباط آن با خطر ابتلا به سرطان ریه و سرطان‌های دیگر گزارش شده‌است. وجود این چندشکلی منجر به جانشینی باز گوانین به جای تایمین در کدون 216 ژن EGFR شده و با افزایش بیان ژن EGFR باعث بروز سرطان در ریه می‌گردد [۱۳]. چندین گزارش در جمعیت‌های مختلف منتشر شده‌است که نشان می‌دهد که چند شکلی EGFR 216G/T- با خطر ابتلا به سرطان ریه مرتبط است [۱۴]. در مطالعه‌ای که توسط Haisheng و همکاران در سال ۲۰۱۳ در جمعیت چینی‌ها صورت گرفت، ارتباط معنی داری میان چندشکلی rs712829 ژن EGFR با خطر ابتلا به آدنومای ریه مشاهده گردید [۱۳]. در دیگر مطالعه موردی-شاهدی که توسط Nabil و همکاران در سال ۲۰۱۸ در کشور اردن، ارتباط چندشکلی‌های ژن EGFR با خطر ابتلا به سرطان ریه مورد بررسی گرفت که در نتیجه آن ارتباط معنی‌داری میان چندشکلی rs712829 و خطر ابتلا به سرطان ریه مشاهده گردید. به گونه‌ای که می‌توان از این چندشکلی به‌عنوان بیومارکر در مطالعات پیش‌گویی بالینی در ارتباط با خطر ابتلا به سرطان ریه استفاده نمود [۱۵]. گزارشات متعدد در جمعیت‌های مختلف مبنی بر نقش کلیدی چند شکلی مذکور در سرطان ریه از یک سوء و مرگ و میر بالای این بیماری به‌همراه تشخیص در مراحل پیشرفته از سوی دیگر ما را مجاب به بررسی ارتباط این چند شکلی در جمعیت کشورمان نمود. به‌گونه‌ای که هدف از انجام این مطالعه بررسی ارتباط چندشکلی rs712829 ژن EGFR با خطر ابتلا به سرطان ریه به‌عنوان یک مارکر پیشگویی و همچنین بررسی ارتباط ژنوتیپ‌های مختلف این چند شکلی با سیستم مرحله‌بندی TNM در جمعیت ایرانی می‌باشد.

روش بررسی

این مطالعه موردی-شاهدی در فاصله زمانی بهمن ۱۳۹۸ تا خرداد ۱۴۰۱ در جمعیت مبتلا به سرطان ریه و افراد سالم واقع در استان مرکزی، شهر اراک پس از دریافت کد اخلاق (IR.ARAKMU.REC.1398.205) از کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی اراک در مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی دانشگاه علوم پزشکی اراک انجام شد. ۱۰۰ نمونه خون از جامعه بیماران مبتلا به سرطان ریه (سرطان ریه نوع سلول کوچک و نوع سلول غیر کوچک) بیمارستان آیت‌الله خوانساری شهر اراک به‌همراه ۱۰۰ نمونه خون از افراد سالمی که جهت انجام آزمایشات چکاب به کلینیک امام‌رضا شهر اراک مراجعه کرده‌بودند، جمع‌آوری گردید. اندازه جامعه مورد مطالعه بر اساس فرکانس آلی پلی مورفیسم مذکور در دیگر مطالعات صورت گرفته در جمعیت کشورهای آسیایی تعیین شد. بر این اساس حجم نمونه

سرطان ریه سرطانی است که بیشترین میزان کشندگی در سراسر جهان داشته [۲، ۱] و بیماران معمولاً در مراحل پیشرفته شناسایی می‌شوند [۲]. اکثر بیماران مبتلا به سرطان ریه با وضعیت متاستازی شناسایی شده و کمتر از ۲۰ درصد به‌صورت غیر پیشرفته تشخیص داده می‌شوند [۴]. در سال ۲۰۱۸، ۲/۰۹ میلیون نفر مبتلا به سرطان ریه تشخیص داده شدند و حدود ۱/۷۶ میلیون نفر بر اثر ابتلا به این بیماری جان خود را از دست دادند [۵]. سرطان ریه سومین نوع سرطان شایع در ایران است و شیوع آن به‌سرعت در حال افزایش است [۶]. سرطان ریه به دو دسته کلی تقسیم بندی می‌گردد: گروه اول سرطان ریه نوع سلول غیر کوچک بوده که شامل آدنوکارسینوم، کارسینوم سلول سنگفرشی و کارسینوم سلول بزرگ است. گروه دوم سرطان ریه نوع سلول کوچک است که تهاجم بیشتر و بقا کمتری نسبت به گروه اول دارد. سرطان ریه نوع سلول غیر کوچک حدود ۸۵ تا ۸۷ درصد کل سرطان ریه تشکیل می‌دهد [۳-۵، ۷]. علت اصلی سرطان ریه تاکنون نامشخص بوده و به‌عنوان یک بیماری چند عاملی شناسایی می‌گردد. عوامل ژنتیکی و محیطی نظیر استعمال دخانیات، پرتوهای یونیزان، سابقه ابتلا به بیماری‌های ریوی، نژاد و سابقه خانوادگی نقش مهمی در ابتلا به این بیماری دارند [۴]. مطالعات اخیر نشان می‌دهد که تنوعات ژنتیکی نظیر چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی می‌توانند در خطر ابتلا به سرطان ریه نقش داشته‌باشد [۸]. کشندگی بالای سرطان ریه به‌همراه تشخیص در مراحل پیشرفته باعث شده که کشف نشانگرهای ژنتیکی مرتبط با افزایش خطر ابتلا به این سرطان یک موضوع مهم تحقیقاتی پژوهشگران محسوب گردد [۹]. ژن گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی (EGFR) یک گلیکوپروتئین غشایی است که دارای فعالیت تیر وزین کینازی بوده و عضوی از خانواده ErbB از گیرنده‌های تیر وزین کی نازی به‌شمار می‌آید. EGFR نقش مهمی در تنظیم و کنترل بسیاری از مسیرهای مختلف سیگنالینگ نظیر رشد، تکثیر سلولی، چسبندگی سلولی، تمایز، مهاجرت و بقا ایفا می‌کند. این ژن در جایگاه کروموزومی 7p12.1-12.3 قرار داشته و از ۲۸ اگزون تشکیل شده‌است [۱۰].

فعال سازی EGFR در نتیجه اتصال فاکتور رشد اپیدرمی منجر به فعال شدن آبشارهای سیگنالینگ داخل سلولی می‌شود که این آبشارها منجر به تنظیم و کنترل فرایندهای طبیعی سلول می‌شوند. چندین مطالعه صورت گرفته نشان می‌دهد که وجود برخی از چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی در ژن EGFR منجر به افزایش بیان این ژن شده و موجب تبدیل پرتوانکوژن EGFR به انکوژن EGFR می‌گردد و با فرایند سرطان‌زایی در ریه مرتبط می‌باشد [۱۱، ۱۲]. بیان بیش از حد ژن EGFR در سلول‌های بافت ریه نقش مهمی در ایجاد سرطان ریه ایفا می‌کند. چندشکلی‌های متعددی بر

Green Viewer ران شده و سپس با استفاده از دستگاه ژل داک مشاهده و عکس برداری شدند. برای تشخیص قطعات تکثیر شده از لدر ۱۰۰ جفت بازی (SinaClon BioScience Co., Karaj, Iran) استفاده شد. نمونه‌ها پس از استخراج با به کارگیری روش Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) در جایگاه چندشکلی rs712829 ژن EGFR توسط آنزیم محدودگر BseRI (New England Biolab, Hitchin, United Kingdom) تعیین ژنوتیپ شدند. واکنش برش آنزیمی در حجم ۱۵ میکرولیتر حاوی ۰/۴ میکرولیتر آنزیم MseI، ۱/۵ میکرولیتر بافر مخصوص این آنزیم، ۵/۶ میکرولیتر آب استریل و ۷/۵ میکرولیتر محصول PCR آماده گردید و در دمای °C ۳۷ به مدت ۲ ساعت مورد برش آنزیمی قرار گرفت. در حضور آلل موتانت T، برش آنزیمی دو قطعه ۶۰ و ۱۸۰ و در حضور آلل وحشی G جایگاه برش وجود نخواهد داشت و باند ۲۴۰ جفت بازی حاصل خواهد شد و در صورت هتروزیگوت بودن هر سه قطعه گفته شده حاصل می‌گردد.

پس از برش آنزیمی، محصولات حاصل با استفاده از ژل آگارز ۳٪ حاوی ماده فلورسانس DNA Green Viewer (SinaClon BioScience Co., Karaj, Iran) الکتروفورز گردید. جهت بررسی ارتباط چند شکلی مورد مطالعه با خطر ابتلا به سرطان ریه از نرم افزار SPSS software, version 20 (IBM SPSS, Armonk, NY, USA) روش آماری رگرسیون لجستیک دوتایی و محاسبه P value (با در نظر گرفتن مقدار $P < 0.05$) و محاسبه خطر نسبی (OR) با فاصله اطمینان (۹۵٪) CI صورت گرفت.

بر اساس آلفا ۵ درصد، پاور ۸۰ درصد، نسبت برابر دو گروه و برابر درصد وجود پلی مورفیسم در دو گروه به ترتیب ۶۰ و ۴۰ در در افراد بیمار و سالم با استفاده از فرمول مقایسه نسبت‌ها حدود صد نفر در هر گروه محاسبه گردید. افراد دو گروه بیمار و سالم از نظر سن و جنسیت مچ شدند و سپس داده‌های دموگرافی دو گروه مذکور و پاتولوژی بیماران در قالب یک پرسش‌نامه جمع آوری شد. (جدول ۱). در این مطالعه از هر فرد شرکت کننده ۲ میلی لیتر خون گرفته شد و سپس در لوله‌های CBC محتوی EDTA ریخته و سپس جهت استخراج به در شرایط دمایی من‌های ۲۱ درجه انتقال داده شد. استخراج DNA براساس پروتکل کیت DNG-Plus (SinaClon BioScience Co., Karaj, Iran) انجام گردید. سپس کیفیت و کمیت DNA استخراج شده و مقدار خلوص آن با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و بارگذاری بر روی ژل آگارز مشخص گردید. جهت انجام واکنش PCR و تکثیر مناطق ژنومی محتوی چند شکلی مذکور از پرایمرهای موجود در جدول ۲ استفاده گردید. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر، شامل ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس، ۱/۵ میکرولیتر پرایمر فوروارد و ۱/۵ میکرولیتر پرایمر ریورز (Pishgam BioScience Co., Tehran, Iran)، ۷ میکرولیتر آب دو بار تقطیر و ۵ میکرولیتر DNA استخراج شده انجام گرفت. تکثیر قطعه مورد نظر با استفاده از یک مرحله ابتدایی و اسرشته‌سازی در دمای °C ۹۴ به مدت ۴۵ ثانیه، دمای اتصال آغازگرها °C ۶۲ به مدت ۴۵ ثانیه و دمای تکثیر °C ۷۲ به مدت ۴۵ ثانیه و یک دمای تکثیر نهایی °C ۷۲ به مدت ۷ دقیقه استفاده شد. محصولات PCR روی ژل آگارز ۲ درصد که حاوی DNA

جدول ۱. مشخصات دموگرافی گروه کنترل و بیمار به همراه اطلاعات پاتولوژی بیماران.

متغیر	شده حالت تعریف	گروه بیمار (فراوانی)	گروه کنترل (فراوانی)	P value* مقدار
سن (سال)	کمتر از ۶۰	۵۴	۴۸	۰/۴۲۹
	بیشتر یا مساوی ۶۰	۴۶	۵۲	
	میانگین (انحراف معیار)	۶۲/۴۵ (۱۱/۴۷)	۶۱/۵۰ (۱۰/۷۰)	
جنس	مرد	۷۴	۶۸	۰/۷۵۳
	زن	۲۶	۳۲	
وضعیت مصرف سیگار	بله	۴۲	۲۱	۰/۰۰۴
	خیر	۵۸	۷۹	
اطلاعات پاتولوژی بیماران	نوع سرطان ریه	درجه تومور (T)	گره لنفاوی (N)	وضعیت متاستاز (M)
فراوانی (تعداد)		T1۱۲ =	N0۴۰ =	مثبت = ۷۰
		T2۲۸ =	N1۲۲ =	منفی = ۳۰
		T3۲۵ =	N2۱۷ =	
		T4۳۵ =	N3۲۱ =	

* سطح معنی داری کمتر از $P < 0.05$ ، SCLC: سرطان ریه نوع سلول کوچک، NSCLC: سرطان ریه نوع سلول غیر کوچک.

جدول ۲. توالی پرایمرهای استفاده شده جهت تکثیر چندشکلی rs712829 ژن EGFR.

ژن	چند شکلی	جایگاه	توالی آغازگر (۳'-۵')	اندازه محصول
EGFR	rs712829 (-216G/T)	پرو موتور (5UTR)	F: 5'- GAGCTAGACGTCGGGCA -3' R: 5'- GCTCTCCGATCAATACTGGA -3'	۲۴۰ جفت باز

جندی شاپور

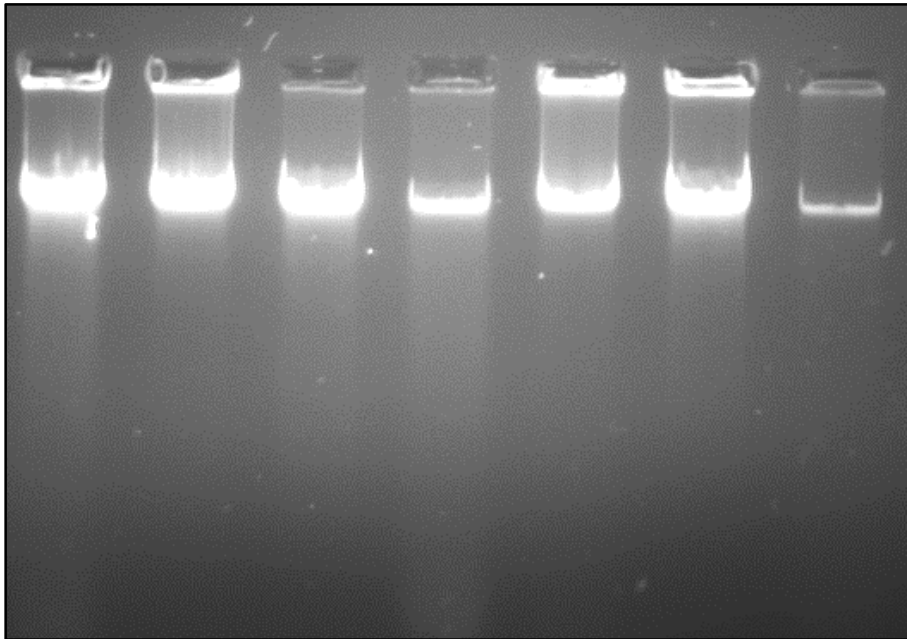
در مقابل تنها ۲۱ درصد از افراد گروه کنترل در طول زندگی خود سابقه مصرف سیگار داشته‌اند. بررسی‌های آماری نشان داد که اختلاف معناداری میان مصرف سیگار در دو گروه وجود داشت، به عبارت دیگر مصرف سیگار خطر ابتلا به سرطان ریه را افزایش می‌دهد ($P=0.004$).

در شکل ۱ کیفیت نمونه‌های DNA استخراج شده بر روی ژل آگارز ۱ درصد نشان داده شده‌است.

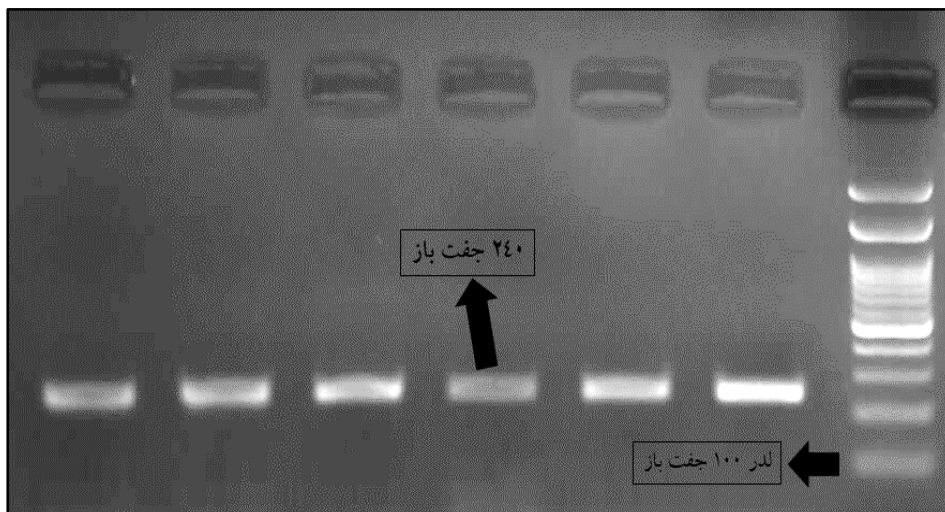
نتایج حاصل از انجام PCR و هضم آنزیمی به ترتیب در شکل ۲ و ۳ آورده شده‌است.

یافته‌ها

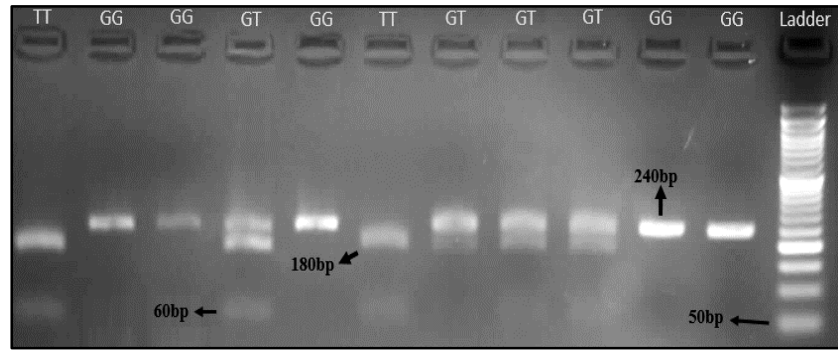
رده سنی در بیماران و افراد سالم به ترتیب $(۶۲/۴۵ \pm ۱۱/۴۷)$ و $(۶۱/۵ \pm ۱۰/۷۰)$ بود. مطابق جدول ۱، مقایسه رنج سنی در دو گروه بیمار و سالم اختلاف معنی داری را نشان نداد ($P=0.429$). همچنین متغیر جنسیت در افراد مورد مطالعه از لحاظ میچ بودن در هر دو گروه مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که اختلاف معنا داری میان جنسیت در دو گروه کنترل و بیمار وجود ندارد ($P=0.385$). اطلاعات مربوط به وضعیت مصرف سیگار در دو گروه نشان داد که حدود ۴۲ درصد بیماران در طول زندگی خود سیگار مصرف نموده‌اند



شکل ۱. نتایج حاصل از استخراج DNA از نمونه‌های خونی مورد مطالعه.



شکل ۲. توالی تکثیر شده مربوط به پلی مورفیسم rs712829 EGFR بر روی ژل آگارز.



شکل ۳. تصویر ژل حاصل از هضم آنزیمی پلی مورفیسم مذکو با آنزیم محدودگر BseRI.

جدول ۳. بررسی ارتباط ژنوتیپها و آللهای پلی مورفیسم مورد مطالعه با خطر ابتلا به سرطان ریه.

ژنوتیپ	فراوانی در گروه بیمار (درصد)	فراوانی در گروه کنترل (درصد)	خطر نسبی	ضریب اطمینان ۹۵٪	P value*
TT	۱۵ (۱۵)	۵۵ (۵۵)	۱/۰۰	۱/۰۰	
GT	۵۵ (۵۵)	۲۵ (۲۵)	۶/۶۸۲	۱/۷۹۸ - ۱۲/۳۳۴	۰/۰۰۳
GG	۳۰ (۳۰)	۲۰ (۲۰)	۵/۵۰۰	۱/۷۱۰ - ۱۱/۹۲۱	۰/۰۳۹
فراوانی کل آلل	۱۰۰	۱۰۰			
T	۸۵ (۴۲/۵)	۱۳۸ (۶۹)	۱/۰۰	۱/۰۰	
G	۱۱۵ (۵۷/۵)	۶۲ (۳۱)	۲/۹۶۷	۱/۵۵۷ - ۵/۶۹۱	۰/۰۰۱
فراوانی کل	۲۰۰	۲۰۰			

* سطح معنی داری کمتر از $P < 0.05$

حفاظتی در برابر خطر ابتلا به سرطان ریه دارد. در مقابل فراوانی ژنوتیپ GG در بیماران بیشتر از گروه کنترل بوده به طوری که ارتباط معنی داری با خطر ابتلا به سرطان ریه داشت ($P = 0.039$, $OR = 5.500$, $CI = 95\%$; $1.710 - 11.921$).

نتایج حاصل از آنالیز آماری ارتباط ژنوتیپها و آللهای پلی مورفیسم مورد مطالعه با خطر ابتلا به سرطان ریه در جدول ۳ نشان داده شده است. مطابق جدول ۳، فراوانی ژنوتیپ TT در گروه بیمار و کنترل به ترتیب ۱۵ و ۵۵ درصد بود. آنالیزهای آماری نشان داد که ژنوتیپ TT دارای نقش

جدول ۴. بررسی ارتباط ژنوتیپهای پلی مورفیسم مورد مطالعه با سیستم مرحله بندی (TNM).

ژنوتیپ	درجه تومور (T)		خطر نسبی	ضریب اطمینان ۹۵٪	P value*
	فراوانی T1+T2	فراوانی T3+T4			
TT	۲	۱۳	۱/۰۰	۱/۰۰	
GT	۲۴	۳۱	۰/۸۹۸	۰/۳۳۰ - ۱/۴۴۲	۰/۸۳۳
GG	۱۴	۱۶	۰/۲۳۶	۰/۰۴۲ - ۱/۳۱۷	۰/۱۰۰
ژنوتیپ	گره لنفاوی (N)		خطر نسبی	ضریب اطمینان ۹۵٪	P value*
	عدم درگیری (N-)	درگیری (N+)			
TT	۵	۱۰	۱/۰۰	۱/۰۰	
GT	۲۳	۳۲	۰/۹۶۹	۰/۳۵۳ - ۱/۶۶۱	۰/۹۵۲
GG	۱۲	۱۸	۰/۷۰۰	۰/۱۶۴ - ۱/۴۸۱	۰/۶۲۹
ژنوتیپ	وضعیت متاستاز (M)		خطر نسبی	ضریب اطمینان ۹۵٪	P value*
	منفی (M-)	مثبت (M+)			
TT	۳	۱۲	۱/۰۰	۱/۰۰	
GT	۱۷	۳۸	۰/۹۳۳	۰/۳۳۳ - ۱/۶۹۳	۰/۸۹۸
GG	۱۰	۲۰	۰/۴۰۰	۰/۰۷۰ - ۲/۲۷۷	۰/۳۰۲

* سطح معنی داری کمتر از $P < 0.05$

جندی شاپور

مورفیسیم rs712829 در دو گروه کنترل و بیمار نشان داد که ژنوتیپ TT و آلل T چند شکلی مذکور دارای یک نقش حفاظتی در مقابل خطر ابتلا به سرطان ریه دارد و در مقابل وجود آلل G ۲/۹ برابر بیشتر فرد را در معرض خطر ابتلا به سرطان ریه نسبت به آلل T قرار می‌دهد به‌گونه‌ای که افراد با ژنوتیپ GG حدود ۵/۵ برابر بیشتر در معرض خطر ابتلا به سرطان ریه نسبت به افرادی که حامل ژنوتیپ TT هستند، قرار دارند. نتایج حاصل از بررسی ارتباط چند شکلی rs712829 ژن EGFR با خطر ابتلا به سرطان ریه در مطالعه ما با دیگر مطالعات صورت گرفته در جمعیت‌های مختلف همخوانی دارد [۱۴]. در مطالعه‌ای که توسط Haisheng و همکاران در سال ۲۰۱۳ در جمعیت چینی‌ها بر روی افراد مبتلا به سرطان ریه و افراد سالم صورت گرفت، ارتباط چند شکلی rs712829 ژن EGFR با خطر ابتلا به سرطان ریه صورت گرفت، ارتباط چند شکلی rs712829 ژن EGFR با خطر ابتلا به سرطان ریه صورت گرفت که در نتیجه آن ارتباط معنی‌داری میان چند شکلی مذکور با خطر ابتلا به سرطان ریه مشاهده گردید که با نتایج حاصل در این مطالعه همخوانی دارد [۱۳].

در دیگر مطالعه موردی-شاهدی که توسط Nabil و همکاران در سال ۲۰۱۸ در کشور اردن به‌منظور بررسی چند شکلی‌های ژن EGFR و خطر ابتلا به سرطان ریه بر روی ۱۲۹ فرد مبتلا به سرطان ریه و ۱۲۹ فرد سالم به‌عنوان کنترل صورت گرفت، ارتباط معنی‌داری میان آلل G چند شکلی rs712829 ژن مذکور با خطر ابتلا به سرطان ریه مشاهده گردید. در این مطالعه همانند نتایج به‌دست آمده در مطالعه ما، آلل T دارای نقش محافظی در مقابل خطر ابتلا به سرطان ریه داشت [۱۴]. مطالعات دیگری در مورد ارتباط چند شکلی rs712829 با خطر ابتلا به سایر سرطان‌ها صورت گرفته است. در مطالعه‌ای که توسط Torres و همکاران در سال ۲۰۱۸ در جمعیت مکزیکی‌ها صورت گرفت، ارتباط چند شکلی‌های ژن EGFR با خطر ابتلا به سرطان معده در جمعیتی شامل ۶۸ فرد مبتلا به سرطان معده و ۱۰۲ فرد سالم مورد بررسی قرار گرفتند. که در پایان این مطالعه چند شکلی rs712829 ارتباط معنی‌داری با خطر ابتلا به سرطان معده نشان داد [۱۰]. در مطالعه‌ی دیگر که توسط Jan و همکاران در سال ۲۰۱۲ در آلمان صورت گرفت، ارتباط این چند شکلی با خطر ابتلا به سرطان سر و گردن گزارش گردید [۱۱]. نتایج به‌دست آمده در مطالعه حاضر و همچنین سازگاری این نتایج حاصل با دیگر مطالعات نشان می‌دهد که وجود آلل G چند شکلی rs712829 در ژن EGFR موجب جانشینی باز گوانین به‌جای تایمین در کدون ۲۱۶ ژن EGFR شده و با افزایش بیان ژن EGFR باعث بروز سرطان در ریه می‌گردد. وجود این چند شکلی منجر به جانشینی باز گوانین به‌جای تایمین در کدون ۲۱۶ ژن EGFR شده و با افزایش بیان ژن EGFR باعث بروز سرطان در ریه می‌گردد [۱۳]. تغییر ایجاد شده در این ژن ناشی از وجود پلی‌مورفیسیم مذکور در ناحیه پرو موتور موجب بیان بیش از حد این ژن و تبدیل پروتئوکوزن EGFR به یک آنکوژن شده و موجب افزایش سرعت تکثیر سلولی و القاء رفتار سرطانی در سلول‌های ریوی می‌شود (۱۷، ۱۸). پلی‌مورفیسیم rs712829 در دومین کاتالیکی کیناز قرار داشته و با افزایش فعالیت فسفوریلاسیون EGFR منجر به بروز سرطان در

همچنین فراوانی ژنوتیپ GT در بیماران ۲/۲ برابر گروه کنترل بوده و ارتباط معنی‌داری با خطر ابتلا به سرطان ریه از خود نشان داد ($P=0.003$, $OR=6.682$, $CI=95\%$; $1.798-12.324$). فراوانی آلل G در گروه بیمار و کنترل به‌ترتیب ۵/۵ و ۳۱ درصد بود. بررسی آماری فراوانی آللی در دو گروه بیمار و کنترل نشان داد که آلل G پلی‌مورفیسیم rs712829 ژن EGFR با خطر ابتلا به سرطان ریه ارتباط معنی‌داری داشته ($P=0.001$, $OR=2.967$, $CI=95\%$; $1.557-5.691$) و در مقابل آلل T این پلی‌مورفیسیم به‌عنوان یک فاکتور حفاظتی ایفای نقش می‌نماید. ارتباط میان ژنوتیپ‌های چند شکلی rs712829 ژن EGFR با درجه تومور (T)، وضعیت درگیری گره‌های لنفاوی (N) و وضعیت متاستاز (M) مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج به‌دست آمده در جدول ۴ هیچ‌گونه ارتباط معنی‌داری میان ژنوتیپ‌های پلی‌مورفیسیم مورد مطالعه با درجه توموری (T1+T2 در برابر T3+T4)، وضعیت گره لنفاوی (درگیری در برابر عدم درگیری) و وضعیت متاستاز (وجود در برابر عدم وجود) وجود نداشت.

بحث

در میان همه سرطان‌ها، سرطان ریه با بیش از ۱/۳ میلیون مرگ در سال جزء کشنده‌ترین سرطان‌ها محسوب می‌گردد. در ایران سرطان ریه سومین نوع سرطان شایع بوده و شیوع آن به‌سرعت در حال افزایش است [۶، ۱۵]. میزان بالای مرگ و میر به این دلیل است که بیماران اغلب در مراحل پیشرفته بیماری تشخیص داده می‌شوند. بنابراین وجود مارکرهای مولکولی جهت تشخیص زودهنگام سرطان ریه ضروری است. مطالعات نشان دادند که واریانت‌های ژنتیکی زیادی وجود دارد که به‌طور قابل توجهی با بروز سرطان ریه مرتبط هستند [۳، ۹].

چند شکلی‌های تک نوکلئوتیدی رایج‌ترین تغییرات ژنتیکی در انسان هستند که می‌توانند با خطر ابتلا به سرطان ریه در ارتباط باشند. وجود این چند شکلی‌ها در پروتئوکوزن‌ها، ژن‌های سرکوب‌کننده تومور و ژن‌های تعمیر DNA به‌ترتیب منجر به ایجاد آنکوژن‌ها، فقدان عملکرد پروتئین حاصل از ژن‌های سرکوبگر توموری و از بین رفتن یا کاهش ظرفیت تعمیری در ژن‌های تعمیر کننده DNA شده و منجر به بروز سرطان ریه می‌گردد. شناسایی چند شکلی‌های دخیل در بروز سرطان ریه می‌تواند به عنوان بیومارکرهای زیستی در حوزه پیش‌آگهی خطر ابتلا به سرطان ریه مورد استفاده قرار گیرد (۱۶). ژن EGFR نقش مهمی در رشد، تکثیر سلولی، چسبندگی سلولی، تمایز، مهاجرت و بقا ایفا می‌کند. چندین مطالعه صورت گرفته نشان می‌دهد که وجود پلی‌مورفیسیم rs712829 در ژن EGFR منجر به افزایش بیان این ژن شده و موجب سرطان‌زایی در ریه می‌گردد [۱۰-۱۲]. در مطالعه حاضر ارتباط میان چند شکلی rs712829 ژن EGFR با خطر ابتلا به سرطان ریه در جمعیت ایرانی با استفاده از تکنیک PCR-RFLP مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل مشخص کرد که چند شکلی rs712829 ژن EGFR ارتباط معنی‌داری با خطر ابتلا به سرطان ریه دارد. بررسی نتایج حاصل از مقایسه فراوانی‌های ژنوتیپ‌های و آلل‌های پلی

نوشتن پیش نویس مقاله: اعظم احمدی.

اصلاح مقاله: میلاد پزشکی، جمشید انصاری.

نهایی سازی: جمشید انصاری، میلاد پزشکی.

نوشتن پروپوزال: اعظم احمدی.

تعارض منافع

در این مقاله تعارض منافع وجود ندارد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش بخشی از طرح تحقیقاتی با عنوان " بررسی ارتباط پلی مورفیسیم‌های ژن‌های EGFR و EXO1 با خطر ابتلا به سرطان ریه در جمعیت ایرانی" در سال ۱۳۹۹ و کد اخلاق IR.ARAKMU. REC.1398.205 است که با حمایت دانشگاه علوم پزشکی اراک و پرسنل بیمارستان آیت‌الله خوانساری شهر اراک اجرا شده است. در ضمن از تمامی پرسنل بیمارستان آیت‌الله خوانساری شهر اراک و افراد شرکت کننده در این مطالعه تشکر و قدردانی می‌شود.

سلول‌های ریوی می‌شود [۱۴]. سازگاری نتایج به دست آمده در مطالعه ما با مطالعات متعدد صورت گرفته در جمعیت‌های مختلف جهان حاکی از نقش کلیدی این چند شکلی در فرایند سرطان زایی است. بررسی ارتباط ژنوتیپ‌های چند شکلی rs712829 ژن EGFR با سیستم مرحله‌بندی TNM می‌تواند منعکس کننده خصوصیات تومور هر ژنوتیپ خاص باشد این در حالی بود که هیچ‌گونه ارتباط معنی داری میان ژنوتیپ‌های پلی مورفیسیم مذکور با درجه تومور، وضعیت گره‌های لنفاوی و وضعیت متاستاز وجود نداشت. با توجه به خصوصیات منحصر به فرد فرکانس آلی چند شکلی‌های تک نوکلئوتید هر منطقه در کشورمان و متفاوت بودن شرایط محیطی پیشنهاد می‌شود که چندشکلی مذکور در دیگر جمعیت‌های کشورمان با جامعه آماری بالاتر مورد بررسی قرار گیرد تا یافته‌های حاصل اطلاعات شفاف تری در مورد نقش کلیدی این چندشکلی با خطر ابتلا به سرطان ریه حاصل گردد.

نتیجه گیری

در این مطالعه‌ی موردی-شاهدی که بر روی ۱۰۰ فرد مبتلا به سرطان ریه و ۱۰۰ فرد سالم صورت گرفت، ارتباط معنی داری میان ژنوتیپ‌های GT و GG و همچنین آلل G پلی مورفیسیم rs712829 ژن EGFR با خطر ابتلا به سرطان ریه مشاهده گردید به گونه‌ای که این چند شکلی پتانسیل تبدیل به یک بیومارکر پیشگویی در ارتباط با خطر ابتلا به سرطان ریه را دارد، هرچند مطالعات بیشتری با جامعه آماری بالا در جمعیت‌های مختلف کشور مورد نیاز است.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این مطالعه در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی اراک با شماره کد اخلاق: IR.ARAKMU. به تصویب رسیده است.

حامی مالی

این مطالعه با حمایت دانشگاه علوم پزشکی اراک به چاپ رسیده است.

مشارکت نویسندگان

ایده اولیه: میلاد پزشکی.

نظارت: میلاد پزشکی.

جمع آوری داده‌ها: میلاد پزشکی، اعظم احمدی.

جستجوی منابع: جمشید انصاری.

تحلیل آماری: میلاد پزشکی.

References

- [1] Pezeshki M, Ansari J, Esfandyari M, Tamjidi E, Ahmadi A, Komijani D. Investigating the Importance of the Role of Key Genes in the Diagnosis and Treatment of Lung Cancer: A Review Article. *Paramedical Sciences and Military Health*. 2023 Oct 10;18(1):61-77. [[Link](#)]
- [2] Pezeshki M, Hosseini SM, Ansari J, Ahmadi A. Investigating the importance of Exo1 (K589E) and LEP (- 2548G/A) gene polymorphisms with risk of lung cancer as potential diagnostic biomarker in Iranian population. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*. 2023 Sep 23;24(1):55. [[link](#)]
- [3] Grenda A, Błach J, Szczyrek M, Krawczyk P, Nicoś M, Kuźnar Kamińska B, Jakimiec M, Balicka G, Chmielewska I, Batura-Gabryel H, Sawicki M. Promoter polymorphisms of TOP2A and ERCC1 genes as predictive factors for chemotherapy in non-small cell lung cancer patients. *Cancer Medicine*. 2020 Jan;9(2):605-14. [[10.1002/cam4.2743](#)] [[PMID](#)]
- [4] Jonas DE, Reuland DS, Reddy SM, Nagle M, Clark SD, Weber RP, Enyioha C, Malo TL, Brenner AT, Armstrong C, Coker-Schwimmer M. Screening for lung cancer with low-dose computed tomography: updated evidence report and systematic review for the US Preventive Services Task Force. *Jama*. 2021 Mar 9;325(10):971-87. [[10.1001/jama.2021.0377](#)] [[PMID](#)]
- [5] Chetan MR, Gleeson FV. Radiomics in predicting treatment response in non-small-cell lung cancer: current status, challenges and future perspectives. *European radiology*. 2021 Feb;31:1049-58. [[10.1007/s00330-020-07141-9](#)] [[PMID](#)]
- [6] Bab S, Abdifard E, Moradi Y, Faraj A, Heidari M. Lung cancer incidence trends in Iran and in six geographical regions of the country (2000-2005). *Shiraz E Medical Journal*. 2016;17(6). [[Link](#)]
- [7] Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JH, Beasley MB, Chirieac LR, Dacic S, Duhig E, Flieder DB, Geisinger K. The 2015 World Health Organization classification of lung tumors: impact of genetic, clinical and radiologic advances since the 2004 classification. *Journal of thoracic oncology*. 2015 Sep 1;10(9):1243-60. [[10.1097/JTO.0000000000000630](#)] [[PMID](#)]
- [8] Rahal Z, El Nemr S, Sinjab A, Chami H, Tfayli A, Kadara H. Smoking and lung cancer: a geo-regional perspective. *Frontiers in oncology*. 2017 Sep 1;7:194. [[10.3389/fonc.2017.00194](#)] [[PMID](#)]
- [9] Yang IA, Holloway JW, Fong KM. Genetic susceptibility to lung cancer and co-morbidities. *Journal of thoracic disease*. 2013 Oct;5(Suppl 5):S454. [[10.3978/j.issn.2072-1439.2013.08.06](#)] [[PMID](#)]
- [10] Torres-Jasso JH, Marín ME, Santiago-Luna E, Leoner JC, Torres J, Magaña-Torres MT, Perea FJ, Ibarra B, Sánchez-López JY. EGFR gene polymorphisms-216G> T and-191C> A are risk markers for gastric cancer in Mexican population. *Genetics and Molecular Research*. 2015 Mar 13;14(1):1802-7. [[10.4238/2015.March.13.8](#)] [[PMID](#)]
- [11] Stoehlmacher-Williams J, Obermann L, Ehninger G, Goekkurt E. Polymorphisms of the epidermal growth factor receptor (EGFR) and survival in patients with advanced cancer of the head and neck (HNSCC). *Anticancer research*. 2012 Feb 1;32(2):421-5. [[PMID](#)]
- [12] Wee P, Wang Z. Epidermal growth factor receptor cell proliferation signaling pathways. *Cancers*. 2017 May 17;9(5):52. [[10.3390/cancers9050052](#)] [[PMID](#)]
- [13] Guo H, Xing Y, Liu R, Chen S, Bian X, Wang F, Yang C, Wang X. -216G/T (rs712829), a functional variant of the EGFR promoter, is associated with the pleural metastasis of lung adenocarcinoma. *Oncology Letters*. 2013 Sep 1;6(3):693-8. [[10.3892/ol.2013.1442](#)] [[PMID](#)]
- [14] Bashir NA, Ragab ES, Khabour OF, Khassawneh BY, Alfaqih MA, Momani JA. The association between epidermal growth factor receptor (EGFR) gene polymorphisms and lung cancer risk. *Biomolecules*. 2018 Jul 13;8(3):53. [[10.3390/biom8030053](#)] [[PMID](#)]
- [15] Ribeiro R, Araújo AP, Coelho A, Catarino R, Pinto D, Araújo A, Calçada C, Lopes C, Medeiros R. A functional polymorphism in the promoter region of leptin gene increases susceptibility for non-small cell lung cancer. *European Journal of Cancer*. 2006 May 1;42(8):1188-93. [[10.1016/j.ejca.2006.02.004](#)] [[PMID](#)]
- [16] Jo UH, Han SG, Seo JH, Park KH, Lee JW, Lee HJ, Ryu JS, Kim YH. The genetic polymorphisms of HER-2 and the risk of lung cancer in a Korean population. *BMC cancer*. 2008 Dec;8(1):1-9. [[10.1186/1471-2407-8-359](#)] [[PMID](#)]
- [17] Cruz-Lopez O, Conejo-Garcia A, C Nunez M, Kimatrai M, E Garcia-Rubino M, Morales F, Gomez-Perez V, M Campos J. Novel substituted quinazolines for potent EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Current medicinal chemistry*. 2011 Mar 1;18(7):943-63. [[10.2174/092986711794940824](#)] [[PMID](#)]
- [18] Araujo A, Ribeiro R, Azevedo I, Coelho A, Soares M, Sousa B, Pinto D, Lopes C, Medeiros R, Scagliotti GV. Genetic polymorphisms of the epidermal growth factor and related receptor in non-small cell lung cancer—a review of the literature. *The oncologist*. 2007 Feb 1;12(2):201-10. [[10.1634/theoncologist.12-2-201](#)] [[PMID](#)]