

## Research Paper

# The Fibroblast of the Relationship Between *FGFR2* Gene Rs2981582 Polymorphism and Breast Cancer Risk



\*Ahmad Hamta<sup>1</sup> , Sahar Adl<sup>2</sup> 

1. Department of Biology, Faculty of Sciences, Arak University, Arak, Iran.



**Citation:** Hamta A, Adl S. [Evaluation of Relationship Between *FGFR2* Gene Rs2981582 Polymorphism and Risk of Breast Cancer (Persian)]. Journal of Arak University of Medical Sciences (JAMS). 2021; 24(1):122-135. <https://doi.org/10.32598/JAMS.24.1.5833.1>

 <https://doi.org/10.32598/JAMS.24.1.5833.1>



### Article Info:

Received: 26 Jan 2019

Accepted: 08 Sep 2020

Available Online: 01 April 2021

### Keywords:

Breast cancer, Fibroblast Growth Factor Receptor 2 (FGFR2), Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR - RFLP), Single nucleotide polymorphism

## ABSTRACT

**Background and Aim** Breast cancer is the most common cancer type and the leading cause of cancer-induced deaths in women, worldwide. The Fibroblast Growth Factor Receptor 2 (FGFR2) is a tyrosine kinase receptor that plays an essential role in the growth, invasion, movement, and angiogenesis of tumor cells. Several single nucleotide polymorphisms have been found in the intron 2 of the FGFR2 gene, i.e., associated with a high risk of breast cancer. Genetic variation in this receptor is a new risk factor for breast cancer. The current study aimed to evaluate the association of single-nucleotide polymorphism rs2981582C/T in women with breast cancer.

**Methods & Materials** In total, 80 women with breast cancer and 80 healthy women (controls) were selected from Markazi Province, Iran to participate in this research. Polymorphism rs2981582 was analyzed to investigate its association with breast cancer. DNA extraction from blood samples was performed using a kit. The presence of these single-nucleotide polymorphisms was determined by Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR - RFLP). Statistical analyses were performed by SPSS using Chi-squared test at  $P \leq 0.05$ .

**Ethical Considerations** This study was approved by the Ethics Committee of the Arak University (Code: IR.ARAKMU.REC.1395.28).

**Results** Significant differences were observed in the frequency of rs2981582 polymorphism in the FGFR2 gene between the control and patient groups ( $P=0.000$ ). In the patient group, the TT genotype was significantly associated with the risk of breast cancer ( $P=0.001$ ; OR=3.566). On the other hand, allele C indicated a protective role against the disease ( $P=0.000$ ).

**Conclusion** The obtained data revealed a significant relationship between rs2981582 C/T polymorphism and the risk of breast cancer; thus, this single-nucleotide polymorphism could be used as a biomarker to predict breast cancer.

## Extended Abstract

### 1. Introduction

**B**

reast cancer is the most common cancer type and the leading cause of cancer-related deaths in women, worldwide. Besides,

it accounts for 23% of cancers and 400000 deaths, annually [1]. The prevalence of breast cancer is approximately one-third of all cancers in women; it is the second most common cancer after lung cancer and the most frequent cause of cancer-induced death among women. Fibroblast Growth Factor Receptor 2 (FGFR2) is a tyrosine kinase receptor that plays an essential role in cell growth and differentiation.

### \* Corresponding Author:

Ahmad Hamta, PhD.

Address: Department of Biology, Faculty of Sciences, Arak University, Arak, Iran.

Tel: +98 (918) 3480646

E-mail: a-hamta@araku.ac.ir

**Table 1.** Genotypic and allele distribution of polymorphism RS2981582 gene FGFR2 extracted from this study

SNP & Genotype		Patient	Control	P	OR
rs2981582 allele	C	71	112	0.000	2.925
	T	89	48		
Genotype	CC	18	42	0.257	1.444
	CT	35	28		
	TT	27	10		
	Ct + TT	62	38		

The structure of these receptors has a second binding to the extracellular ligand, a second crossing the membrane, and a second intracellular tyrosine kinase. According to GWA studies, the FGFR2 gene was suggested as a gene susceptible to breast cancer [8]. Genetic diversity in this receptor is a new risk factor for breast cancer. This study aimed to evaluate the association of rs2981582C/T single nucleotide polymorphism with breast cancer in females.

## 2. Materials and Methods

In the present case-control study, the required blood samples were obtained from 80 patients referring to Aya-tollah Khansari Hospital in Arak City, Iran as well as 80 healthy individuals (controls). Moreover, written informed consent forms were collected from the explored individuals. Accordingly, 5cc of peripheral blood was collected in EDTA tubes; the samples remained at -20°C until DNA extraction. After completing the questionnaire, data, such as age, marital status, occupational status, diet, the number of children, the age of first menstruation, menopausal status, etc. were collected. All study patients were female with a mean age of 50 years. Iriazol (RENA biotechnologists) kit was used to extract DNA in this study. Extraction was performed according to the protocol of the kit. The quality, as well as the concentration of DNA extracted by spectrophotometer (V-US gene), the P electrophoresis of the samples, were performed on 1% agarose gel. The research samples were genotyped by Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR - RFLP) and *AciI* restriction enzyme at rs2981582 C/T locus. All statistical analyzes were performed using SPSS. To evaluate the association between disease and genotypes, Odds Ratio (OR) and Chi-squared test at a 95% Confidence Interval (CI) were used at  $P < 0.05$ .

## 3. Results

The obtained data suggested a confidence level of  $P = 0.000$ ; there was a significant relationship between rs2981582 and breast cancer. It was also observed that the T allele of this polymorphism was associated with the risk of breast cancer ( $P = 0.0003$ ; 95%CI: 2.925 or = 1.864-433). The frequency of the C allele in the patient and control groups was equal to 44.37% and 65.62%, respectively. Besides, the frequency of the T allele in the patient and control groups was measured as 55.62% and 34.37%, respectively. According to the relevant results, there was a significant relationship between TT genotype and disease ( $P = 0.001$ ; 95%CI: 566.3 or =1.589-8005). Additionally, the greater frequency of CC genotype in the control group of this genotype probably presents a protective effect on the disease. Furthermore, the risk of breast cancer in patients carrying CT + TT genotypes was about 3 times higher than that in the controls ( $P = 0.0003$ ; 95%CI: 545.1 or 807.921-7). The mean age of the examined patients and controls was 50 and 40 years, in sequence. There was a significant relationship between age and breast cancer ( $P = 0.000$ ). The familial history of breast cancer signified a significant relationship between this characteristic and the disease ( $P = 0.007$ ). However, marital status or the consumption of contraceptives indicated no significant relationship with breast cancer between the study groups (Tables 1 & 2).

## 4. Discussion and Conclusion

Genetic factors and the lifestyle of individuals impact breast cancer risk [13]. The FGFR2 gene, which belongs to the fibroblast growth factor receptor family is involved in mammary gland development; it has been identified as an important gene candidate in breast cancer [14]. This receptor is involved in several processes, including cell proliferation, angiogenesis, and migration [15]. The genetic

**Table 2.** The relationship between the study variables and breast cancer in the patient and control groups

Risk Factors	Abundance	P
Age, y	Mean age of the patients: 54	0.000
	Mean age of the controls: 42	
Marital status	Married (patient group): n=75	0.534
	Married (control group): n=70	
Family history	Patient group: n=9 Control group: n=1	0.007
Educational level	Diploma and BA	0.014
	Patient group: n=16 Control group: n=31	
Smoking	Patient group: n=5 Control group: n=1	0.042
Taking birth control pills	Patient group: n=38 Control group: n=35	0.078
The age of onset of menstruation, y	Menstruation under the age of 13 years	0.018
	Patient group: n=33	
	Control group: n=15	
Nutrition	Having an improper diet:	0.025
	Patient group: 26 subjects	
	Control group: 15 people	
The number of children	More than 2 children	0.000
	Patient group: 68 subjects Control group: 45 subjects	

variants of this gene are a risk factor for breast cancer [16]. The present study examined the effect of rs2981582 polymorphism in 80 patients and the same number of controls on breast cancer risk. Accordingly, the relevant data indicated a significant relationship between this polymorphism and generating the disease ( $P=0.000$ ). T allele of this single polymorphism nucleotides is more frequently present in patients than healthy individuals. Besides, the heterozygous minor (TT) genotype was significantly associated with the disease. The C allele presents a protective effect on the disease. Furthermore, individuals with at least one T allele in their genotype (CT + TT) are almost 3 times more prone to develop breast cancer ( $P=0.807$  or  $=0.0003$ ). The achieved results were consistent with those of numerous studies. For example, Fangmeng, in a similar study in southern China revealed that the heterozygous minor (TT) genotype of this polymorphism was associated with developing breast cancer. Moreover, Zamora et al. explored a population of Mexican women; they reported a significant association between the T allele of this polymorphism and the risk of breast cancer. At present, numerous attempts focus on targeting genet-

ic changes that cause breast cancer. Moreover, the FGFR2 gene involved in various human malignancies, including breast cancer, is considered a probable candidate. Due to the significance of rs2981582 single nucleotide polymorphism to breast cancer risk, this single nucleotide polymorphism can be used as a biomarker to predict breast cancer.

## Ethical Considerations

### Compliance with ethical guidelines

This study was approved by the Ethics Committee of the Arak University (Code: IR.ARAKMU.REC.1395.28).

### Funding

The paper was extracted from the MSc. thesis of the second author at the Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Arak.

### **Authors' contributions**

All authors met the writing standards based on the recommendations of the [International Committee of Medical Journal Publishers \(ICMJE\)](#).

### **Conflicts of interest**

The authors declared no conflict of interest.

### **Acknowledgements**

The authors express their gratitude to the medical staff of Shahid Khansari Hospital in Arak and the esteemed staff of the University New Biology Research Laboratory.

This Page Intentionally Left Blank

## مقاله پژوهشی

# بررسی ارتباط بین پلی مورفیسم rs2981582 ژن FGFR2 و خطر ابتلا به سرطان پستان

احمد همتا<sup>۱</sup>، سحر عدل<sup>۱</sup>

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک، ایران.

### اطلاعات مقاله:

تاریخ دریافت: ۰۶ بهمن ۱۳۹۷

تاریخ پذیرش: ۱۸ شهریور ۱۳۹۹

تاریخ انتشار: ۱۲ فروردین ۱۴۰۰

### چکیده

**زمینه و هدف:** سرطان پستان، شایع‌ترین نوع سرطان و علت اصلی مرگ‌ومیرهای ناشی از سرطان در زنان در سراسر جهان است. گیرنده فاکتور رشد فیبروبلاست ۲ (FGFR2) یک گیرنده تیروزین کینازی است که نقش مهمی در رشد، تهاجم، حرکت و آنژیوژنز سلول‌های توموری دارد. چندین پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی در ناحیه اینترون ۲ ژن FGFR2 یافت شده است که همراهی معناداری با خطر ابتلا به سرطان پستان نشان می‌دهند. تنوع ژنتیکی در این گیرنده یک عامل خطر جدید برای سرطان پستان است. هدف از این مطالعه، بررسی همراهی پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی rs2981582C/T در جمعیت زنان استان مرکزی با سرطان پستان بود.

**مواد و روش‌ها:** هشتاد زن مبتلا به سرطان پستان و هشتاد زن سالم (کنترل) از جمعیت زنان استان مرکزی انتخاب شدند. پلی مورفیسم rs2981582 جهت بررسی همراهی با سرطان پستان تجزیه و تحلیل شد. استخراج DNA از نمونه‌های خونی افراد از طریق کیت انجام شد. حضور این چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی از طریق تکنیک RFLP-PCR مشخص شد. آنالیزهای آماری توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ (آزمون آماری کای اسکور) انجام شد و مقادیر  $P \leq 0/05$  معنادار در نظر گرفته شدند.

**ملاحظات اخلاقی:** این مطالعه با کد اخلاق IR.ARAKMU.REC.۱۳۹۵/۲۸۸ در کمیته اخلاق پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک به تصویب رسیده است.

**یافته‌ها:** تفاوت آماری معناداری در فراوانی پلی مورفیسم rs2981582 در ژن FGFR2 بین گروه کنترل و بیمار مشاهده شد ( $P=0/000$ ). در گروه بیمار ژنوتیپ TT به میزان قابل توجهی با خطر ابتلا به سرطان پستان مرتبط بود ( $P=0/000$ ;  $OR=566/3$ ). از طرفی آلل C یک نقش حفاظتی در برابر ابتلا به بیماری از خود نشان داد ( $P=0/000$ ).

**نتیجه‌گیری:** مطالعه ما ارتباط معناداری میان پلی مورفیسم rs2981582C/T و خطر ابتلا به سرطان پستان نشان داد و پیشنهاد می‌کند که این پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی می‌تواند به عنوان یک بیومارکر جهت پیشگویی سرطان پستان مورد استفاده قرار گیرد.

### کلیدواژه‌ها:

پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی، سرطان پستان، FGFR2، RFLP-PCR

### مقدمه

بوده است [۳]. بر اساس پژوهش انجام شده در استان مرکزی بین سال‌های ۱۳۸۵-۱۳۸۰ از بین سرطان‌های شایع استان، سرطان پستان در رتبه اول و سپس سرطان پوست، از جمله شایع‌ترین سرطان‌ها بوده است [۴].

سرطان گروهی از بیماری‌ها را شامل می‌شود که ویژگی اصلی آنها رشد سلولی تنظیم‌نشده، تهاجم و انتشار سلول‌ها از جایگاه اصلی خود به نقاط دیگر بدن است [۵]. سرطان پستان در نتیجه تجمع آسیب‌های ژنتیکی در سلول‌های اپیتلیال بافت سازنده شیر و کسب فنوتیپ‌های بدخیم توسط این سلول‌ها بروز می‌کند [۶].

سن، فاکتورهای تولیدمثلی، سابقه شخصی یا خانوادگی بیماری‌های سینه، زمینه ژنتیکی و عوامل محیطی با افزایش خطر ابتلا به سرطان پستان مرتبط هستند [۷]. در بیش از نیمی

سرطان پستان، شایع‌ترین نوع سرطان و علت اصلی مرگ‌ومیرهای ناشی از سرطان در زنان در سراسر جهان است که ۲۳ درصد از سرطان‌ها و چهارصد هزار مرگ‌ومیر سالانه را تشکیل می‌دهد [۱]. شیوع سرطان پستان حدود یک سوم از تمامی سرطان‌های زنان را تشکیل می‌دهد و دومین سرطان شایع بعد از سرطان ریه و شایع‌ترین علت مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در بین زنان است [۲].

طبق آمار مرکز ملی سرطان ایران طی یک بررسی در بازه زمانی ۲۰۱۰-۲۰۰۰ تعداد ۵۲،۱۶۷ بیمار مبتلا به سرطان پستان شناسایی شد که ۹۱/۷ درصد آن‌ها مربوط به خانم‌ها

\* نویسنده مسئول:

دکتر احمد همتا

نشانی: اراک، دانشگاه اراک، دانشکده علوم پایه، زیست شناسی.

تلفن: ۳۴۸۰۶۴۶ (۹۱۸) ۰۹۸+

پست الکترونیکی: a-hamta@araku.ac.ir



از موارد سرطان پستان، شیوه زندگی و نقش فاکتورهای محیطی در ایجاد بیماری مهم هستند [۸]. عوامل رشد فیبروبلاستی مختلف و رسپتورهای مرتبط با آنها بیان ویژه بافتی دارند. الگوی بیان ویژه بافتی و تمایز در اتصال، میان کنش اختصاصی رسپتور لیگاند را نشان می‌دهد. این ویژگی همچنین توسط پیرایش تنظیم می‌شود [۹].

رسپتورها در حالت عادی در بافت‌ها بیان می‌شوند و در رشد سلولی، تمایز و تکامل تعدادی از بافت‌ها، از جمله پستان و کلیه نقش دارند [۱۰]. این خانواده رسپتوری دارای چهار عضو است. چهار ژن در موقعیت‌های مختلف کروموزومی شناسایی می‌شوند که پروتئین‌های مشابه خانواده گیرنده فاکتور رشد فیبروبلاستی را کد می‌کنند [۱۱].

گیرنده‌های فاکتور رشد فیبروبلاستی در سرطان‌زایی نقش دارند و در تحقیقات اخیر برای اهداف دارویی در سرطان پستان بررسی شده‌اند و از طریق چندین مکانیسم باعث ایجاد بدخیمی‌ها و تکثیر تومور می‌شوند. در بیشتر موارد تکثیر ژن‌ها، افزایش بیان یا موتاسیون رسپتورهای تیروزین کیناز باعث سرطانی شدن می‌شوند.

با تغییر در سطح گیرنده‌های فاکتور رشد فیبروبلاستی در اثر موتاسیون نقطه‌ای، بیان افزایش می‌یابد و یا پیرایش متفاوت باعث تغییر سیگنال گیرنده فاکتور رشد فیبروبلاستی می‌شود و در تومورهای متنوعی از انسان شناسایی شده است. برای مثال، افزایش بیان گیرنده فاکتور رشد فیبروبلاستی در تعدادی از بافت‌ها شامل پستان، پروستات، ملانوما و تیروئید مشاهده شده است [۶].

گیرنده فاکتور رشد فیبروبلاستی ۲، یک گیرنده تیروزین کینازی است که نقش مهمی در رشد و تمایز سلول‌ها بر عهده دارد. ساختار این رسپتورها دارای یک دومین متصل شونده به لیگاند خارج سلولی، یک دومین عبوری از غشا و یک دومین درون سلولی تیروزین کینازی است. با اتصال عوامل رشد فیبروبلاستی به رسپتور و دایمیریزاسیون رسپتور، چندین مسیر سیگنالی در پایین دست فعال می‌شوند. مهم‌ترین مسیرهای فعال شده، RAS-MAPK (RAS- mitogen activated protein kinase) و PI3K (Phosphoinositide 3-kinase) هستند که با انتقال سیگنال باعث فعال شدن عوامل رونویسی می‌شوند.

ترکیب گیرنده فاکتور رشد فیبروبلاستی، فاکتور رشد فیبروبلاستی و پروتئین‌های آداپتور یک شبکه سیگنالیینگ پیچیده را ایجاد می‌کنند که نقش‌های اساسی در تکامل، ارگان‌زایی، تمایز سلول، رگ‌زایی و پیشرفت تومور دارند [۶]. بر اساس مطالعات GWA، ژن گیرنده فاکتور رشد فیبروبلاستی ۲ به عنوان ژن مستعد در سرطان پستان پیشنهاد شده است [۸]. چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی نقش مهمی در ژنتیک

پزشکی دارند و به طور عمده در زمینه مطالعات ارتباطی در مورد بسیاری از سرطان‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند [۱]. چندین پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی در ناحیه اینترون ۲، ژن گیرنده فاکتور رشد فیبروبلاستی ۲ یافت شده است که همراهی معناداری با خطر ابتلا به سرطان پستان نشان می‌دهند [۸]. توالی اینترون ۲ در ژن گیرنده فاکتور رشد فیبروبلاستی ۲، یک ناحیه تنظیمی است. چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی سایت‌های اتصال فاکتورهای رونویسی را تغییر می‌دهند و در نتیجه سطح بیان گیرنده فاکتور رشد فیبروبلاستی ۲ را تنظیم می‌کنند. تفاوت در تمایل اتصال فاکتورهای رونویسی باعث افزایش بیان گیرنده فاکتور رشد فیبروبلاستی ۲ با آل‌هایی با ریسک بالا می‌شود [۹، ۱۰].

افزایش بیان گیرنده فاکتور رشد فیبروبلاستی ۲ باعث افزایش سیگنال پایین دست می‌شود؛ بنابراین مسیرهایی که در تکثیر سلولی، تمایز، مهار آپاپتوز و مهاجرت نقش دارند، فعال می‌گردند [۹]. در این پژوهش ارتباط پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی rs2981582 ژن گیرنده فاکتور رشد فیبروبلاستی ۲ و ارتباط آن با سرطان پستان در جمعیت زنان استان مرکزی مورد مطالعه قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

در مطالعه آزمایشی کنترلی حاضر نمونه خون از هشتاد فرد بیمار که به بیمارستان آیت‌الله خوانساری شهر اراک مراجعه کرده بودند و همچنین هشتاد فرد سالم (کنترل) با تکمیل رضایت‌نامه کتبی افراد گرفته شد. پنج سی‌سی خون محیطی در لوله‌های EDTA جمع‌آوری شدند. نمونه‌ها به فریزر ۲۰- انتقال داده شدند و تا زمان استخراج DNA در این دمانگهداری شدند.

پس از تکمیل فرم پرسش‌نامه توسط این افراد اطلاعاتی مثل سن، وضعیت تأهل، شغل، رژیم غذایی، تعداد فرزندان، سن اولین قاعدگی، وضعیت یائسگی و... جمع‌آوری شد. تمام بیماران حاضر در این مطالعه زن بودند و میانگین سنی آن‌ها پنجاه سال بود.

## استخراج DNA و تعیین ژنوتیپ rs2981582

برای استخراج DNA در این مطالعه از کیت Iriazol (زیست‌فناوران رنا) استفاده شد. استخراج بر اساس پروتکل مربوط به کیت انجام شد. تعیین کیفیت و همچنین غلظت DNA استخراج شده از طریق دستگاه اسپکتروفتومتر (ژن‌وی آمریکا) و همچنین الکتروفورز نمونه‌ها روی ژل آگارز یک درصد انجام شد.

نمونه‌ها به روش RFLP-PCR و به واسطه آنزیم محدودکننده Acil در جایگاه rs2981582 C/T تعیین ژنوتایپ شدند. در این تکنیک جهت تکثیر قطعه حاوی پلی مورفیسم مورد نظر از یک جفت پرایمر فوروارد و ریورس استفاده شد. در جدول شماره ۱ مشخصات این پرایمرها نشان داده شده است.

قبل از انجام واکنش زنجیره‌ای پلی مرارز، پرایمرها در حجم

جدول ۱. توالی پرایمرهای استفاده شده در تکثیر FGFR2

پلی مورفیسیم	جایگاه	توالی آغازگر ۳' - ۵'	اندازه قطعه تکثیری
rs2981582	اینترون ۲	F: 5'- CCCTTGGGAGACAACGTGAGC R: 5'- GCACGAGATGTGTTCCAGAG	۲۵۱ جفت باز



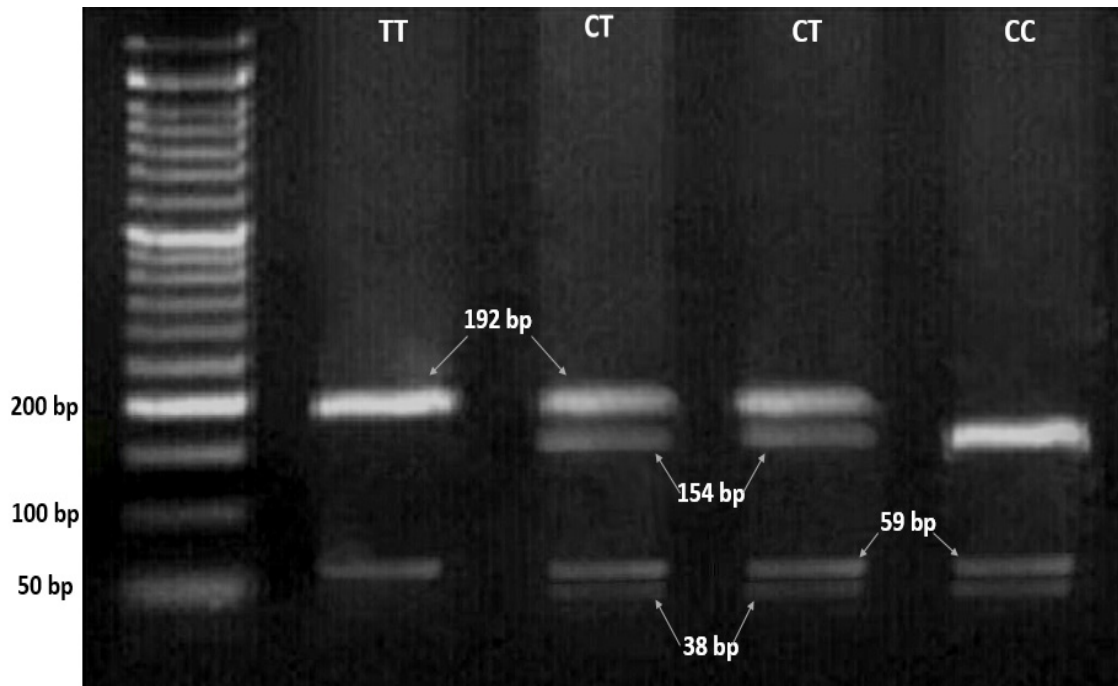
بعد از تأیید صحت اندازه باند تکثیری مورد نظر توسط الکتروفورز روی ژل آگارز ۲ درصد، محصولات PCR توسط آنزیم Acil تحت عمل هضم آنزیمی قرار گرفتند. این واکنش در حجم نهایی پانزده میکرولیتر شامل ۰/۲ میکرولیتر از آنزیم محدودکننده، ۱/۵ میکرولیتر بافر همراه آنزیم، ۸/۳ میکرولیتر آب مقطر و پنج میکرولیتر از محصول PCR در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت هشت ساعت انجام شد. سپس محصولات حاصل روی ژل الکتروفورز ۳ درصد الکتروفورز شدند (تصویر شماره ۱).

قطعه تکثیری دارای دو جایگاه برش برای آنزیم مورد نظر بوده که فقط یکی از آن‌ها مربوط به پلی مورفیسیم مورد نظر است. در صورت وجود آلل C (وحشی) برش انجام شده، اما در صورت وجود آلل T (موتانت) برش صورت نمی گیرد. در جدول شماره ۲ اندازه و تعداد قطعات مربوط به هر ژنوتیپ نشان داده شده است.

در این مطالعه آزمایشی کنترلی از آزمون کای اسکوتر با فاصله اطمینان ۹۵ درصد با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۹ استفاده

معینی از آب دو بار تقطیر اتوکلاو شده، حل شده و به نسبت یک به ده در آب دو بار تقطیر رقیق شدند. در این واکنش بسته به تعداد نمونه مخلوطی از اجزای واکنش PCR، شامل ۱۵/۶ میکرولیتر آب مقطر، ۰/۴ میکرولیتر پرایمر F و R، ۰/۵ میکرولیتر MgCl<sub>2</sub>، ۰/۴ میکرولیتر dntp، ۲/۵ میکرولیتر بافر و ۰/۲ میکرولیتر آنزیم Taq در یک میکروتیوب ۱/۵ تهیه شد.

پس از تهیه مسترمیکس مادر، مقدار بیست میکرولیتر از آن، به هریک از تیوب‌های حاوی پنج میکرولیتر DNA افزوده شده تا حجم کل مخلوط واکنش در هر تیوب به ۲۵ میکرولیتر برسد. قطعه مورد نظر طی مراحل واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت پنج دقیقه، واسرشته سازی در دمای ۹۴ درجه به مدت سی ثانیه، اتصال پرایمرها در دمای ۵۶ درجه به مدت سی ثانیه، گسترش یا تکثیر در دمای ۷۲ درجه به مدت سی ثانیه و مرحله گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه به مدت ده دقیقه انجام شد. محصول تکثیری مورد نظر قطعه‌ای به طول ۲۵۱ جفت باز بود.



تصویر ۱. تصویر ژل محصول PCR پس از هضم آنزیمی

CC: برش خورده با طول‌های ۱۵۴، ۵۹ و ۳۸ جفت باز؛ CT: به صورت هتروزیگوت برش خورده با طول‌های ۱۹۲، ۱۵۴، ۵۹ و ۳۸ جفت باز؛ TT: برش نخورده با طول‌های ۱۹۲ و ۵۹ جفت باز.





جدول ۲. قطعات حاصل از هضم محصول پلی مورفیسیم rs2981582 توسط آنزیم Acil

اندازه و تعداد قطعات حاصل	نوع ژنوتیپ
۵۹-۳۸-۱۵۴	CC
۵۹-۳۸-۱۵۴-۱۹۲	CT
۵۹-۱۹۲	TT



و یا مصرف قرص ضدبارداری در دو گروه هیچ ارتباط معناداری با سرطان پستان نشان ندادند. نتایج حاصل از آزمون آماری کای اسکوئر برای بررسی معناداری برخی از متغیرهای مربوط به سرطان پستان در جدول شماره ۵ آمده است.

### بحث

سرطان پستان شایع‌ترین نوع سرطان و علت اصلی مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در زنان در سراسر جهان است [۱۲]. در ایران نیز این نوع از سرطان در میان زنان از شیوع بالایی برخوردار است [۶]. عوامل ژنتیکی و شیوه زندگی افراد در خطر ابتلا به سرطان پستان نقش دارند [۱۳].

نقش عوامل ژنتیکی در توسعه سرطان پستان به خوبی اثبات شده است. در میان این ژن‌ها، ژن گیرنده فاکتور رشد فیبروبلاستی ۲، متعلق به خانواده گیرنده‌های فاکتور رشد فیبروبلاست و درگیر در رشد و نمو غده پستانی، به عنوان یک نامزد برجسته در سرطان پستان شناخته شده است [۱۴].

این گیرنده در چندین فرایند شامل تکثیر، رگ‌زایی و مهاجرت سلول‌ها نقش دارد [۱۵]. حدود ۵-۱۰ درصد از موارد تومورهای پستان به بیان بیش‌ازحد و یا تقویت ژن گیرنده فاکتور رشد فیبروبلاستی ۲ مرتبط است. واریانت‌های ژنتیکی این ژن نیز یک عامل خطر برای سرطان پستان محسوب می‌شوند [۱۶].

در مطالعه حاضر که اثر پلی مورفیسیم rs2981582 در هشتاد بیمار و به همین تعداد، کنترل روی خطر ابتلا به سرطان پستان بررسی شده است، محاسبات آماری انجام‌شده ارتباط معناداری بین این پلی مورفیسیم و بیماری نشان داد ( $P=0/000$ ) در این بررسی مشخص شد که آلل T، این پلی مورفیسیم تک نوکلئوتیدی در افراد بیمار با فرکانس بیشتری نسبت به افراد سالم وجود دارد

شد. همچنین همراهی بین بیماری و ژنوتیپ‌ها با استفاده از نسبت شانس (OR) محاسبه شد. سطح معناداری (P-value) کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

همان‌طور که در جدول شماره ۳ نشان داده شده است، انجام آزمون حدود اطمینان  $P=0/000$  را نشان داد و مشخص شد ارتباط آماری معناداری بین rs2981582 و سرطان پستان وجود دارد. طبق جدول شماره ۴، آلل T این پلی مورفیسیم با خطر ابتلا به سرطان پستان مرتبط است ( $P=0/000$ ;  $OR=1/864$ ;  $CI=0/633-4/633$ ). فراوانی آلل C در گروه بیمار و کنترل به ترتیب ۹۵ درصد ( $OR=2/925$ )، فراوانی آلل T در گروه بیمار و کنترل به ترتیب ۴۴/۳۷ و ۶۵/۶۲ درصد و فراوانی آلل T در گروه بیمار و کنترل به ترتیب ۳۴/۳۷ و ۵۵/۶۲ درصد محاسبه شد.

نتایج حاصل از توزیع ژنوتیپی rs2981582 در جدول شماره ۴ ارائه شده است. بر اساس محاسبات انجام‌شده ارتباط معناداری بین ژنوتیپ TT و ابتلا به بیماری وجود دارد ( $P=0/005$ ;  $OR=1/589$ ;  $CI=0/105-8/105$ ). از طرفی، به علت فراوانی ۹۵ درصد ( $OR=3/566$ ;  $P=0/001$ )، به علت فراوانی بیشتر ژنوتیپ CC در گروه کنترل این ژنوتیپ احتمالاً اثر محافظتی بر ابتلا به بیماری دارد. همچنین خطر ابتلا به سرطان پستان در بیماران حامل ژنوتیپ‌های CT+TT حدود سه برابر بود ( $P=0/000$ ;  $OR=3/807$ ;  $CI=1/921-7/545$ ).

بر اساس اطلاعات جمعیت‌شناختی افراد این مطالعه، متوسط سن افراد بیمار پنجاه و متوسط سن افراد گروه کنترل چهل سال بود. نتایج حاصل از بررسی فاکتور سن دو گروه نشان داد که ارتباط معناداری بین سن و ابتلا به سرطان پستان وجود دارد ( $P=0/000$ ) بررسی وضعیت سابقه فامیلی سرطان پستان بین دو گروه نیز ارتباط معناداری بین این فاکتور و ابتلا به بیماری نشان داد ( $P=0/007$ )، اما بررسی فاکتورهای مثل وضعیت تأهل

جدول ۳. محاسبه آزمون کای اسکوئر پلی مورفیسیم rs2981582

P	کنترل	بیمار
۰/۰۰۰	۸۰	۸۰



جدول ۴. توزیع ژنوتیپی و آللی پلی مورفیسیم rs2981582 ژن FGFR2 در بیماران مبتلا به سرطان پستان و افراد کنترل

متغیرها	بیمار	کنترل	p	OR
آل rs2981582				
C	۷۱	۱۱۲		
T	۸۹	۴۸	۰/۰۰۰	۲/۹۲۵
ژنوتیپ				
CC	۱۸	۴۲		
CT	۳۵	۲۸	۰/۲۵۷	۱/۴۴۴
TT	۲۷	۱۰	۰/۰۰۱	۳/۵۶۶
CT+TT	۶۲	۳۸	۰/۰۰۰	۳/۸۰۷



(T) در سلول های سرطانی و تومورها موجب افزایش بیان گیرنده فاکتور رشد فیبروبلاستی ۲ می شود [۱۰].

همچنین طبق مطالعه میر و همکاران در سال ۲۰۰۸ پلی مورفیسیم rs2981582 در سرطان پستان مهم است. میر و همکاران نشان دادند که هاپلوتایپ آلل مینور rs2981582 باعث رونویسی بیشتری از ژن گیرنده فاکتور رشد فیبروبلاستی ۲ در رده های توموری و سلولی می شود و این افزایش بیان، خطر ابتلا به سرطان پستان را افزایش می دهد.

ناحیه پلی مورفیک rs2981582 در محل اتصال گیرنده استروژن واقع شده است و احتمال می رود که سرطان پستان در ER+ نسبت به ER- بیشتر تظاهر پیدا کند [۲۰].

تمامی این نتایج با نتایج حاصل در مطالعه هم خوانی دارند و این پلی مورفیسیم تک نوکلئوتیدی را به عنوان یک نشانگر حساس ژنتیکی برای سرطان پستان پیشنهاد می کنند.

درواقع مطالعات روی بیان ژن گیرنده فاکتور رشد فیبروبلاستی ۲ نشان دادند که در سلول هایی با هاپلوتایپ های مینور میزان بیان ژن گیرنده فاکتور رشد فیبروبلاستی ۲ افزایش می یابد به دلیل اینکه عوامل رونویسی Oct1/ runx2 و C/EBPβ (protein βCCAAT/enhancer binding) با تمایل بالاتری به آلل هموزیگوت مینور در ناحیه اینترون ۲ متصل می شوند و باعث بیان ژن گیرنده فاکتور رشد فیبروبلاستی ۲ می شوند. افزایش بیان ژن گیرنده فاکتور رشد فیبروبلاستی ۲ خطر ابتلا به سرطان پستان را افزایش می دهد [۲۰].

مطالعات دیگری نیز وجود دارند که در جمعیت مورد مطالعه ارتباط معناداری میان این چندشکلی تک نوکلئوتیدی و ریسک ابتلا به سرطان پستان پیدا نشد، مانند مطالعه اوز گوز و همکاران در سال ۲۰۱۳ پلی مورفیسیم rs2981582 را مورد بررسی قرار دادند.

و ژنوتیپ هتروزیگوت مینور (TT) با بیماری همراهی نشان داد. از طرفی آلل C اثر محافظتی بر ابتلا به بیماری دارد. همچنین افراد دارای حداقل یک آلل T در ژنوتیپ خود (CT+TT) تقریباً سه برابر بیشتر در معرض خطر ابتلا به سرطان پستان هستند (P=۰/۰۰۰؛ OR=۳/۸۰۷).

در مقایسه این نتایج با مطالعات پیشین باید گفت که سال ۲۰۱۲ Fangmeng با مطالعه ای که روی ۱۱۸ فرد مبتلا به سرطان پستان و ۱۰۴ فرد سالم برای بررسی اثر پلی مورفیسیم rs2981582 در جنوب کشور چین انجام داد، مشخص شد که ژنوتیپ هتروزیگوت مینور (TT) از این پلی مورفیسیم با ابتلا به سرطان پستان ارتباط دارد [۱۷].

مطالعه صدیقی و همکاران در سال ۲۰۱۴ نیز این ارتباط را تأیید کرد [۱۸]. همچنین در مطالعه زامورا و همکاران در سال ۲۰۱۶ که روی جمعی از زنان مکزیک انجام شد، ارتباط معناداری بین آلل T این پلی مورفیسیم و خطر ابتلا به سرطان مشاهده شد [۱۹]. بویارشیخ و همکاران در سال ۲۰۰۹ مطالعه ای جهت بررسی پلی مورفیسیم rs2981582 انجام دادند و پس از حصول نتایج متوجه شدند که بین این پلی مورفیسیم و خطر ابتلا به سرطان پستان ارتباط وجود دارد [۱۰].

همچنین در سال ۲۰۱۳ لیو و همکاران پلی مورفیسیم rs2981582 به همراه سه پلی مورفیسیم دیگر از ژن گیرنده فاکتور رشد فیبروبلاستی ۲ را بررسی کردند و نتیجه گرفتند که ارتباط معناداری بین rs2981582 و خطر ابتلا به سرطان پستان وجود دارد [۱].

در واقع پلی مورفیسیم rs2981582 که در بالادست اینترون ۲، ژن گیرنده فاکتور رشد فیبروبلاستی ۲ قرار گرفته با سرطان پستان ارتباط قوی نشان می دهد و آلل مینور این پلی مورفیسیم

جدول ۵. نتایج حاصل از ارتباط متغیرها با سرطان پستان در گروه بیمار و کنترل

فاکتورهای خطر	فراوانی	P
سن	میانگین سن گروه بیماران: ۵۴ میانگین سن گروه کنترل: ۴۲	۰/۰۰۰
وضعیت تأهل	متأهل گروه بیمار: ۷۵ متأهل گروه کنترل: ۷۰	۰/۵۳۴
سابقه فامیلی	گروه بیمار: ۹ نفر گروه کنترل: ۱ نفر	۰/۰۰۷
تحصیلات	تحصیلات دیپلم و بالاتر گروه بیمار: ۱۶ نفر گروه کنترل: ۳۱ نفر	۰/۰۱۴
مصرف دخانیات	گروه بیمار: ۵ نفر گروه کنترل: ۱ نفر	۰/۰۴۲
مصرف قرص ضدبارداری	گروه بیمار: ۳۸ نفر گروه کنترل: ۳۵ نفر	۰/۰۷۸
سن شروع قاعدگی	قاعدگی زیر ۱۳ سال گروه بیمار: ۳۳ نفر گروه کنترل: ۱۵ نفر	۰/۰۱۸
تغذیه	داشتن رژیم غذایی نامناسب: گروه بیمار: ۲۶ نفر گروه کنترل: ۱۵ نفر	۰/۰۲۵
تعداد فرزندان	داشتن بیش از ۲ فرزند گروه بیمار: ۶۸ نفر گروه کنترل: ۴۵ نفر	۰/۰۰۰



در این مطالعه، همچنین متغیرهایی مثل سن، سابقه فامیلی، تحصیلات، پایین بودن سن شروع قاعدگی نیز با سرطان پستان همراهی نشان دادند. با افزایش سن احتمال ابتلا به بیماری افزایش یافته و داشتن سابقه فامیلی سرطان پستان در ابتلا به بیماری مؤثر است. از طرفی بالا رفتن میزان تحصیلات افراد در سطح جامعه موجب آگاهی بیشتر افراد نسبت به وضعیت سلامت خود شده و افراد با تحصیلات دانشگاهی برای پیدا کردن علائم سرطان پستان، عوامل خطر، خودآزمایی پستان و روش‌های تشخیصی زودرس در خودآگاهی و تمایل بیشتری نسبت به سایرین دارند.

### نتیجه‌گیری

بدخیمی‌های اپی‌تلیالی سینه از شایع‌ترین علل سرطان در زنان به شمار می‌روند. به دلیل بهبود روش‌های درمان و تشخیص در مراحل ابتدایی‌تر، مرگ‌ومیر ناشی از سرطان پستان به میزان زیادی رو به کاهش گذاشته است.

در این مطالعه ۶۱ فرد مبتلا به سرطان پستان و پنجاه فرد سالم با تکنیک توالی یابی تعیین ژنوتایپ شدند. بر اساس محاسبات انجام‌شده ارتباط معناداری بین پلی‌مورفیسم rs2981582 و خطر ابتلا به سرطان پستان مشاهده نشد ( $P > 0.05$ ). گرچه در این مطالعه مشخص شد که فرکانس ژنوتایپ CT و همچنین آلل T در گروه بیمار نسبت به گروه کنترل بیشتر است و نویسندگان این‌طور بیان کردند که ژنوتایپ CT و آلل T می‌توانند با سرطان پستان مرتبط باشند [۲۱].

همچنین پان و همکاران در سال ۲۰۱۶ مطالعه‌ای را برای بررسی اسنیپ rs2981582 روی ۳۴۰ بیمار و ۴۰۰ فرد سالم از جمعیت چین انجام دادند و نتایج حاصل بیانگر عدم ارتباط معنادار بین این پلی‌مورفیسم و افزایش خطر ابتلا به سرطان پستان بود ( $P = 0.29$ ;  $OR = 0.79$ ). طبق این پژوهش اسنیپ یادشده نمی‌تواند مارکر مناسبی جهت پیشگویی و پیش‌بینی سرطان پستان باشد [۲۲].

علاوه بر عوامل محیطی عوامل ژنتیکی نیز از اهمیت زیادی برخوردار هستند. تغییرات ژنتیکی در برخی از ژن‌ها می‌توانند موجب افزایش حساسیت نسبت به این بیماری شوند.

مطالعه حاضر بر پایه مطالعه آزمایشی کنترلی جهت بررسی دو پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی از ژن گیرنده فاکتور رشد فیبروبلاستی ۲ روی هشتاد بیمار مبتلا به سرطان پستان و هشتاد فرد سالم در جمعیت زنان استان مرکزی انجام شد. در حال حاضر تلاش‌های زیادی روی هدف قرار دادن تغییرات ژنتیکی اضافی که موجب سرطان پستان می‌شوند، متمرکز شده است و ژن گیرنده فاکتور رشد فیبروبلاستی ۲ که در انواع مختلف بدخیمی‌های انسانی، از جمله سرطان پستان دخیل است، یک کاندیدای احتمالی در نظر گرفته می‌شود. با توجه به معنادار بودن پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی rs2981582 در ارتباط با سرطان پستان، این پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی می‌تواند به عنوان یک بیومارکر جهت پیشگویی سرطان پستان مورد استفاده قرار گیرد.

## ملاحظات اخلاقی

### پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این مطالعه با کد اخلاق IR.ARAKMU.REC.1395/288 در کمیته اخلاق پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک به تصویب رسیده است.

### حامی مالی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه مقطع کارشناسی ارشد نویسنده دوم در دانشگاه علوم پزشکی اراک است.

### مشارکت نویسندگان

تلمی نویسنده‌گان معیارهای استاندارد نویسنده‌گی براساس پیشنهادات کمیته بین‌المللی ناشران مجلات پزشکی (ICMJE) را دارا بودند.

### تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافی توسط نویسندگان بیان نشده است.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان مراتب قدردانی خود را از کادر درمانی بیمارستان شهید خوانساری اراک و کادر محترم آزمایشگاه تحقیقات نوین زیست‌شناسی دانشگاه ابراز می‌دارند.

## Reference

- [1] Liu CL, Hu XP, Guo WD, Yang L, Dang J, Jiao HY. Case-control study on the fibroblast growth factor receptor 2 gene polymorphisms associated with breast cancer in Chinese Han women. *J Breast Cancer*. 2013; 16(4):366-71. [DOI:10.4048/jbc.2013.16.4.366] [PMID] [PMCID]
- [2] Asgarian F, Mirzaei M, Asgarian S, Jazayeri M. [Epidemiologic study of breast cancer and age distribution of patients in a ten-year interval (Persian)]. *Iran J Breast Dis*. 2016; 9(1):31-6. <http://ijbd.ir/article-1-507-fa.html>
- [3] Jazayeri SB, Saadat S, Ramezani R, Kaviani A. Incidence of primary breast cancer in Iran: Ten-year national cancer registry data report. *Cancer Epidemiol*. 2015; 39(4):519-27. [DOI:10.1016/j.canep.2015.04.016] [PMID]
- [4] Mohaghegh F, Hamta A. [The study of cancer incidence and cancer registration in Markazi province between 2001-2006 and comparison with national statistics, Iran (Persian)]. *Arak Med Univ J*. 2008; 11(2):84-93. <https://www.sid.ir/en/journal/ViewPaper.aspx?ID=118837>
- [5] Pecorino L. *Molecular biology of cancer: Mechanisms, targets, and therapeutics*. 3<sup>rd</sup> ed. United Kingdom: Oxford university press; 2012. <https://www.amazon.com/Molecular-Biology-Cancer-Mechanisms-Therapeutics/dp/019957717X>
- [6] Motovali Bashi M, Gholampour M. [The association of A/G Polymorphism in Intronic region of FGFR2 gene and breast cancer (Persian)]. *J Isfahan Med Sch*. 2014; 32(279). <https://www.sid.ir/FA/Journal/ViewPaper.aspx?id=221808>
- [7] Shah R, Rosso K, Nathanson SD. Pathogenesis, prevention, diagnosis and treatment of breast cancer. *World J Clin Oncol*. 2014; 5(3):283-98. [DOI:10.5306/wjco.v5.i3.283] [PMID] [PMCID]
- [8] Schultz PN, Klein MJ, Beck ML, Stava C, Sellin RV. Breast cancer: Relationship between menopausal symptoms, physiologic health effects of cancer treatment and physical constraints on quality of life in long-term survivors. *J Clin Nurs*. 2005; 14(2):204-11. [DOI:10.1111/j.1365-2702.2004.01030.x] [PMID]
- [9] Tenhagen M, van Diest PJ, Ivanova IA, van der Wall E, van der Groep P. Fibroblast growth factor receptors in breast cancer: Expression, downstream effects, and possible drug targets. *Endocr Relat Cancer*. 2012; 19(4):R115-29. [DOI:10.1530/ERC-12-0060] [PMID]
- [10] Martin AJ, Grant A, Ashfield AM, Palmer CN, Baker L, Quinlan PR, et al. FGFR2 protein expression in breast cancer: Nuclear localisation and correlation with patient genotype. *BMC Res Notes*. 2011; 4:72. [DOI:10.1186/1756-0500-4-72] [PMID] [PMCID]
- [11] Turner N, Grose R. Fibroblast growth factor signalling: From development to cancer. *Nat Rev Cancer*. 2010; 10(2):116-29. [DOI:10.1038/nrc2780] [PMID]
- [12] Sun C, Olopade OI, Di Rienzo A. rs2981582 is associated with FGFR2 expression in normal breast. *Cancer Genet Cytogenet*. 2010; 197(2):193-4. [DOI:10.1016/j.cancergencyto.2009.11.006] [PMID] [PMCID]
- [13] Boyarskikh UA, Zarubina NA, Biltueva JA, Sinkina TV, Voronina EN, Lazarev AF, et al. Association of FGFR2 gene polymorphisms with the risk of breast cancer in population of West Siberia. *Eur J Hum Genet*. 2009; 17(12):1688-91. [DOI:10.1038/ejhg.2009.98] [PMID] [PMCID]
- [14] Saadatian Z, Gharepouran J, Ghojzadeh M, Ghohari-Lasaki S, Tarkeh-Esfahani N, Ardebili SM. Association of rs1219648 in FGFR2 and rs1042522 in TP53 with premenopausal breast cancer in an Iranian Azeri population. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014; 15(18):7955-8. [DOI:10.7314/APJCP.2014.15.18.7955] [PMID]
- [15] Wolff MS, Weston A. Breast cancer risk and environmental exposures. *Environ Health Perspect*. 1997; 105(S 4):891-6. [DOI:10.1289/ehp.97105s4891] [PMID] [PMCID]
- [16] Taskin II, Tekin MA, Pektanc G, Munzuroglu O, Kandemir SI. Polymorphism in the second intron of the FGFR2 gene rs1219648 associated with the early-onset breast cancer in Turkish population. *Int J Clin Exp Med*. 2017; 10(7):10989-94. <http://www.ijcem.com/files/ijcem0045279.pdf>
- [17] Fu F, Wang C, Huang M, Song C, Lin S, Huang H. Polymorphisms in second intron of the FGFR2 gene are associated with the risk of early-onset breast cancer in Chinese Han women. *Tohoku J Exp Med*. 2012; 226(3):221-9. [DOI:10.1620/tjem.226.221] [PMID]
- [18] Siddiqui S, Chattopadhyay S, Akhtar MS, Najm MZ, Deo SV, Shukla NK, et al. A study on genetic variants of Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) and the risk of breast cancer from North India. *PLoS One*. 2014; 9(10):e110426. [DOI:10.1371/journal.pone.0110426] [PMID] [PMCID]
- [19] Murillo-Zamora E, Moreno-Macias H, Ziv E, Romieu I, Lazcano-Ponce E, Angeles-Llerenas A, et al. Association between rs2981582 polymorphism in the FGFR2 gene and the risk of breast cancer in Mexican women. *Arch Med Res*. 2013; 44(6):459-66. [DOI:10.1016/j.arcmed.2013.08.006] [PMID] [PMCID]
- [20] Meyer KB, Maia AT, O'Reilly M, Teschendorff AE, Chin SF, Caldas C, et al. Allele-specific up-regulation of FGFR2 increases susceptibility to breast cancer. *PLoS Biol*. 2008; 6(5):e108. [DOI:10.1371/journal.pbio.0060108] [PMID] [PMCID]
- [21] Özgöz A, Şamlı H, Öztürk KH, Orhan B, İçduygu FM, Aktepe F, et al. An investigation of the effects of FGFR2 and B7-H4 polymorphisms in breast cancer. *J Cancer Res Ther*. 2013; 9(3):370-5. [DOI:10.4103/0973-1482.114434] [PMID]
- [22] Pan Z, Bao Y, Zheng X, Cao W, Cheng W, Xu X. Association of polymorphisms in intron 2 of FGFR2 and breast cancer risk in Chinese women. *Cytol Genet*. 2016; 50:312-7. [DOI:10.3103/S009545271605008X]

This Page Intentionally Left Blank