

Hubungan Polimorfisme Gen Enzim Epoksid Hidrolase Tyr113His dengan Kejadian Kanker Paru yang Merokok

Lucia Aktalina¹, Amira Permatasari Tarigan², Noni Novisari Soeroso², Yahwardiah Siregar¹, Ozar Sanuddin³

¹Program Studi Magister Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara, Medan

²Departemen Pulmonologi dan Kedokteran Respirasi Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara/RSUP H. Adam Malik, Medan

³Departemen Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara/RSUP H. Adam Malik, Medan

Abstrak

Latar Belakang: Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hubungan polimorfisme gen enzim Epoksid Hidrolase (EPHX) Tyr113His dengan kecenderungan perokok untuk menderita kanker paru. Polimorfisme gen EPHX Tyr113His adalah perubahan satu basa nukleotida gen EPHX sehingga menghasilkan enzim dengan fungsi yang menurun sebesar 50%. EPHX berperan dalam metabolisme senyawa kimia asap rokok terutama Benzo(a)Pyren(BaP) menjadi karsinogen di dalam tubuh.

Metode: Penelitian ini merupakan rancangan studi kasus- kontrol yang dilakukan pada bulan Oktober 2016 sampai Februari 2017. Darah vena diambil dari 35 orang penderita kanker paru di RSUP H Adam Malik Medan dan 35 orang perokok sehat. Pemeriksaan genotif gen EPHX dilakukan dengan menggunakan metode PCR-RFLP di Laboratorium Terpadu FK USU.

Hasil: Frekuensi genotif heterozigot varian T/C dan homozigot varian C/C kelompok kasus masing-masing 83,3% dan 16,7%. Frekuensi alel T kelompok kasus 41,67% dan alel C 58,33%. Sedangkan pada kontrol frekuensi heterozigot varian T/C (80%) dan homozigot varian C/C (20%). Frekuensi alel T kelompok kontrol 40% dan alel C 60%. Tidak jumpai genotif homozigot wildtype T/T pada kedua kelompok. Tidak ada perbedaan yang bermakna dari distribusi genotif dan alel gen enzim EPHX antara kelompok kasus ($P=0,477$) dan kontrol ($P=0,840$).

Kesimpulan: Tidak ada hubungan antara polimorfisme gen enzim EPHX Tyr113His dengan kejadian kanker paru yang merokok. (*J Respir Indo* 2018; 38(2): 93-9)

Kata kunci: kanker paru, EPHX Tyr113His, polimorfisme, Benzo (a) Pyren (BaP)

The Relationship between Tyr113His Epoxidized Hydrolase Enzyme Gene Polymorphisms and the Incidence of Smoking Lung Cancer

Abstract

Background: This study aims to determine the relationship between the gene polymorphism of the enzyme Epoxid Hydrolase (EPHX) Tyr113His and the tendency of smokers to suffer from lung cancer. The EPHX Tyr113His gene polymorphism is a change in one nucleotide base of the EPHX gene to produce enzymes with decreased function by 50%. EPHX plays a role in the metabolism of chemical compounds in cigarette smoke, especially Benzo (a) Pyren (BaP), which becomes a carcinogen in the body.

Methods: This study is a case-control study design conducted from October 2016 to February 2017. Venous blood was taken from 35 people with lung cancer at RSUP H Adam Malik Medan and 35 healthy smokers. The genotype examination of the EPHX gene was carried out using the PCR-RFLP method in the USU FK Integrated Laboratory.

Results: The genotype frequency of heterozygous variant T/C and homozygous variant C/C in case groups was 83.3% and 16.7%, respectively. The frequency of the T allele in the case group was 41.67% and the C allele was 58.33%. Whereas in the control, the frequency was heterozygous variant T/C (80%) and homozygous variant C/C (20%). The frequency of the T allele in the control group was 40% and the C allele was 60%. There were no homozygous wildtype T/T genotypes in the two groups. There was no significant difference in the genetic distribution and allele distribution of the EPHX enzyme between case ($P=0.477$) and control ($P=0.840$) groups.

Conclusion: There is no relationship between EPHX Tyr113His enzyme gene polymorphisms and the incidence of lung cancer in smoking. (*J Respir Indo* 2018; 38(2): 93-9)

Keywords: lung cancer, EPHX Tyr113His, polymorphism, Benzo (a) Pyren (BaP)

PENDAHULUAN

Beberapa dekade terakhir ini, kanker paru merupakan jenis kanker dengan insiden tertinggi pada laki-laki, sebesar 1,8 juta jiwa dan angka kematian sekitar 1,31 juta jiwa. Indonesia menempati urutan ketiga setelah Cina dan India dengan jumlah penderita kanker paru mencapai kira-kira 25.322 kasus.¹

Diketahui bahwa 90,4% penderita kanker paru adalah perokok sehingga perokok berisiko 10 kali lebih besar menderita kanker paru dibandingkan dengan yang tidak merokok.^{2,3} Asap rokok terdiri dari 4000 senyawa kimia, salah satunya adalah *Polisiklik Aromatik Hidrokarbon* (PAH).⁴ Salah satu PAH seperti *Benzo(a)Pyrene* (BaP) merupakan senyawa yang bersifat karsinogenik terhadap manusia. BaP akan masuk kedalam sel epitel paru dan kemudian dimetabolisme oleh enzim-enzim metabolisme xenobiotic termasuk salah satunya enzim EPHX.⁵

EPHX memiliki dua fungsi berbeda tergantung dari substratnya. EPHX akan mendetoksifikasi epoksida aktif dari asap rokok menjadi senyawa yang kurang reaktif dan larut dalam air sehingga mudah diekskresikan.⁶ Akan tetapi EPHX juga akan mengaktifkan senyawa BaP sehingga menghasilkan metabolit aktif yang sangat reaktif dan mutagenik yaitu *BP-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide* (BPDE).⁷ BPDE dapat berikatan dengan DNA sehingga terbentuk DNA *adduct* sehinggadapat memicu terjadinya mutasi pada gen. Apabila mutasi terjadi pada gen pengatur siklus sel seperti gen P53 dan *Kirsten-Ras* (KRAS) protoonkogen, maka dapat memicu proses inisiasi terjadinya kanker paru.⁵

Menurut data penelitian hanya 10-15% yang berkembang menjadi kanker paru.⁸ Adanya interaksi antara faktor genetik dan lingkungan dapat meningkatkan risiko seorang perokok untuk menderita kanker paru. Polimorfisme gen enzim metabolisme xenobiotik dari asap rokok terlibat dalam kemungkinan seseorang menderita kanker paru, salah satunya adalah polimorfisme gen EPHX.⁹ Terdapat dua polimorfisme yang paling dominan mempengaruhi aktifitas EPHX yaitu polimorfisme gen EPHX Tyr113His dan His139Arg.¹⁰

EPHX dikodekan oleh gen EPHX yang terletak pada kromosom 1.q42, berukuran 35.48 kb terdiri dari 9 ekson dan 8 intron serta mengkode 445 asam amino.⁹ Polimorfisme gen EPHX Tyr113His terletak pada ekson 3 menghasilkan perubahan asam amino *Tyrosin* (Tyr) menjadi *Histidine* (His) pada kodon 113 sehingga menyebabkan aktifitas enzim EPHX turun hingga 50%.¹⁰ Genotif homozigot varian C/C dan heterozigot varian T/C memiliki aktifitas EPHX yang lebih rendah dibandingkan genotif homozigot *wild type* T/T.¹¹ Aktifitas EPHX yang menurun akan menyebabkan kadar BPDE yang berikatan dengan DNA akan berkurang sehingga risiko terjadinya mutasi DNA akan menurun.^{9, 11}

Banyak penelitian tentang polimorfisme gen EPHX Tyr113His memperoleh hasil yang berbeda-beda. Beberapa peneliti menemukan perokok dengan polimorfisme gen EPHX Tyr113His memiliki risiko lebih rendah terhadap terjadinya kanker paru.^{11,12} Namun hasil berbeda diperoleh pada populasi India, polimorfisme EPHX Tyr113His mempunyai hubungan yang erat dengan kejadian kanker paru dan memiliki prognosis buruk dengan *Odds Ratio* 4,52.^{10,13} Penelitian lain memberikan hasil bahwa individu dengan polimorfisme gen EPHX Tyr113His yang terpapar asap rokok baik secara aktif atau pasif berisiko 2,9 kali lebih tinggi untuk menderita kanker.⁹

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hubungan polimorfisme gen enzim EPHX Tyr113His dengan kejadian kanker paru yang merokok. Penelitian ini dapat digunakan sebagai dasar informasi untuk melakukan penyuluhan kesehatan sehingga dapat menumbuhkan kesadaran masyarakat untuk menurunkan risiko terjadinya kanker paru pada perokok.

METODE

Jenis penelitian ini adalah studi perbandingan kasus dan kontrol. Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Oktober 2016 sampai Februari 2017. Sampel penelitian kelompok kasus berjumlah 35 orang pasien kanker paru yang merokok di RSUP H Adam Malik Medan. Kelompok kontrol terdiri dari 35 orang

perokok sehat yang berasal dari lingkungan RSUP H. Adam Malik, Medan. Pengambilan sampel dilakukan dengan tehnik *consecutive sampling*. Kriteria inklusi kelompok kasus yaitu laki-laki, telah terdiagnosa secara sitologi/histopatologi menderita kanker paru. Pasien kanker paru yang tidak ada riwayat merokok dan dijumpai adanya metastase dieksklusikan.

Kriteria inklusi kelompok kontrol antara lain laki-laki, merokok, tidak ada gejala klinis pada sistem pernafasan, gambaran foto toraks dalam batas normal, tidak memiliki riwayat kanker paru pada keluarga. Jika dijumpai gambaran foto toraks yang tidak jelas maka tidak diikutsertakan dalam penelitian. Seluruh subjek penelitian sudah diberikan penjelasan tentang penelitian dan menandatangani *informed consent*. Pencatatan data kelompok kasus dan kontrol meliputi umur, suku, jenis pekerjaan, jenis rokok, *indeks brinkman* dan sitologi/histopatologi kanker paru.

Seluruh subjek penelitian dari kelompok kasus dan kontrol diambil darah vena sebanyak 3 ml yang dimasukkan ke dalam tabung EDTA dan dibawa ke Laboratorium Terpadu FK USU untuk dilakukan isolasi DNA. Isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan *DNA Purification Kit* Promega®. Kemudian isolat DNA disimpan didalam kulkas dengan suhu 20°C sampai seluruh sampel terkumpul

Analisa Polimorfisme Gen EPHX Tyr113His

Amplifikasi gen EPHX dilakukan dengan menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Untuk mendapatkan gen enzim EPHX yang berukuran 163 bp digunakan primer foward 5'-GAT CGA TAA GTT CCG TTT CAC C-3' dan primer reverse 5'-ATC CTT AGT CTT GAA GTG AGG AT-3'(Macrogen®). Campuran untuk reaksi PCR terdiri dari 2 ul DNA template, 1ul primer reverse, 1 ul primer foward, 12,5 ul *Go Taq Green Master Mix* Promega® dan 8,5 ul *nuclease free water*. Amplifikasi gen EPHX dilakukan sebanyak 35 siklus dengan suhu *initial denaturation* 94°C selama 5 menit, *denaturation* 94°C selama 30 detik, *annealing* 55°C selama 30 detik, *extention* 72°C selama dan *final extention* selama 7

menit. Hasil elektroforesis produk PCR terlihat pada Gambar 1.

Metode *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) dilakukan dengan menggunakan enzim restriksi *EcoR V* Promega® sebanyak 5 IU yang ditambahkan kedalam 10 ul produk PCR. Kemudian diinkubasi di dalam *waterbath* dengan suhu 37°C selama 2 jam. Kemudian divisualisasi melalui proses elektroforesis dengan menggunakan agarose 4% dengan tegangan 100 Volt selama 60 menit. Genotif homozigot *wildtype* T/T akan tampak 2 band berukuran 140 bp dan 23 bp. Genotif heterozigot varian T/C akan tampak 3 band berukuran 163 bp, 140 bp dan 23 bp. Genotif homozigot varian C/C akan tampak 1 band yang tidak terpotong berukuran 163 bp. Band berukuran 23 bp tidak tampak pada visualisasi dengan agarose oleh karena ukurannya yang terlalu kecil. Hasil elektroforesis produk RFLP terlihat pada Gambar 2.

Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan program komputer SPSS versi 17.00. Uji statistik dilakukan dengan menggunakan uji *Chi-Square* dan uji alternatif menggunakan uji *Fisher's* dengan nilai $P < 0,005$ sebagai batas signifikansi.

HASIL

Karakteristik subjek penelitian meliputi usia, jenis pekerjaan, suku, jenis rokok, *indeks brinkman* dan sitologi/histopatologi sel kanker paru. Penderita kanker paru paling banyak berumur ≥ 60 tahun dan 50-59 tahun yaitu masing-masing sebanyak 17 orang (47,2%) dan 14 orang (38,9%). Kelompok yang tidak kanker paru paling banyak dijumpai berumur 30-39 tahun (80,0%).

Subjek penelitian ini berasal dari berbagai macam suku. Suku yang paling banyak dijumpai pada kelompok penderita kanker paru dan tidak kanker paru adalah suku batak yaitu masing-masing 26 orang (72,2%) dan 22 orang (62,9%). Petani adalah jenis pekerjaan yang paling banyak ditemukan pada penderita kanker paru yaitu 14 orang (36,1%). Jenis pekerjaan yang paling banyak pada

kelompok kontrol adalah pegawai negeri/swasta yaitu sekitar 32 orang (45,1%).

Indeks Brinkman yang paling banyak ditemui pada penderita kanker paru adalah kategori berat yaitu sebanyak 30 orang (83,3%) dan pada kelompok kontrol adalah kategori sedang sebanyak 19 orang (54,3%). Penderita kanker paru dan yang tidak kanker paru paling banyak menggunakan jenis rokok kretek, masing-masing 32 orang (91,4%) dan 16 orang (44,4%). Jenis histopatologi sel kanker paru paling banyak ditemui adalah jenis adenokarsinoma yaitu 29 kasus (80,6%)

Tabel 1. Karakteristik Subjek Penelitian

Variabel	Kelompok Penelitian	
	Kontrol	Kasus
Umur		
30-39 tahun	28 (80%)	0 (0%)
40-49 tahun	5 (14,3%)	5 (13,9%)
50-59 tahun	2 (5,7%)	14 (38,9%)
≥60 tahun	0 (0%)	17 (47,2%)
Suku		
Batak	22 (62,9%)	26 (72,2%)
Mandailing	2 (5,7%)	0 (0)
Jawa	7 (20%)	7 (19,4%)
Minang	4 (11,4%)	0 (0%)
Karo	0 (0%)	1 (2,8%)
Aceh	0 (0%)	1 (2,8%)
Melayu	0 (0%)	1 (2,8%)
Pekerjaan		
Petani	1 (2,9%)	13 (36,1%)
Pegawai Negeri/swasta	32 (91,4%)	8 (22,2%)
Wiraswasta	0 (0%)	10 (29,8%)
Lain-lain	2 (5,7%)	5 (13,9%)
<i>Indeks Brinkman</i>		
Ringan	6 (17,1%)	0 (0%)
Sedang	19 (54,3%)	6 (16,7%)
Berat	10 (28,6)	30 (83,3%)
Jenis rokok		
Kretek	32 (91,4%)	16 (44,4%)
Putih	1 (2,9%)	12 (33,3%)
Campuran	2 (5,7%)	8 (22,2%)
Jenis Sitologi/Histopatologi sel Kanker		
Adenokarsinoma	-	29 (80,6%)
Karsinoma sel skuamosa	-	7 (19,4%)

Distribusi frekuensi genotif paling banyak dijumpai adalah jenis heterozigot varian T/C baik pada penderita kanker paru ataupun tidak kanker paru. Frekuensi heterozigot varian T/C pada kelompok penderita kanker paru dan kontrol masing masing 80,0% dan 83,3% dan homozigot varian C/C masing-masing 16,7% dan 20,0%. Tidak dijumpai genotif homozigot *wildtype* pada kedua kelompok. Hasil uji *Fisher* diperoleh nilai $P > 0,05$, hal ini menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan distribusi genotif polimorfisme gen EPHX Tyr113His antara

kelompok penderita kanker paru dengan yang tidak kanker paru.

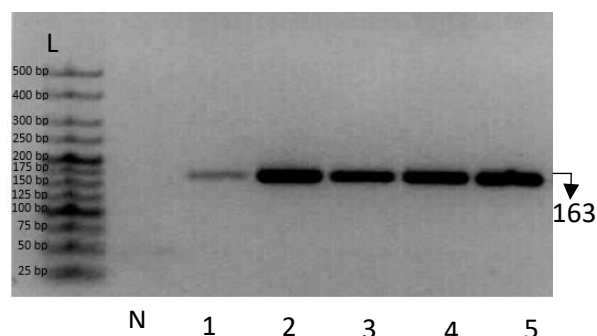
Distribusi alel T pada kelompok kasus dijumpai sebesar 41,67% dan alel C sebesar 58,33%. Sedangkan pada kelompok kontrol frekuensi alel T dan alel C masing-masing 40% dan 60%. Berdasarkan uji *Chi-square* yang dilakukan diketahui bahwa tidak ada perbedaan yang bermakna dari distribusi alel polimorfisme gen enzim EPHX Tyr113His antara kelompok penderita kanker paru dan yang tidak kanker paru.

Tabel 2. Distribusi Genotif polimorfisme Gen EPHX Tyr113His

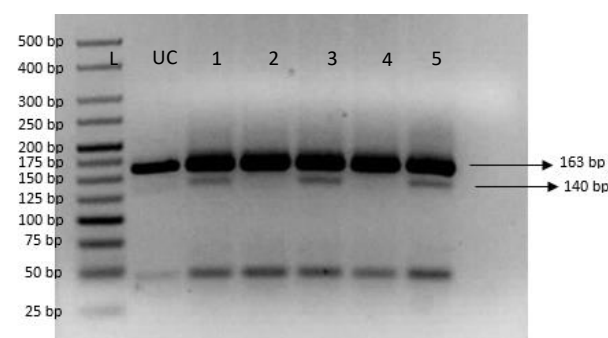
Genotif	Kelompok			P
	Kontrol	Kasus	Total	
TC	28 (80%)	30 (83%)	58 (81.7%)	0.477
CC	7 (20%)	6 (16.7%)	13 (18.3%)	

Tabel 3. Distribusi Alel polimorfisme Gen EPHX Tyr113His

Alel	Kelompok			P
	Kontrol	Kasus	Total	
Alel T	28 (40%)	30 (41.67%)	58 (40.8%)	0.840
Alel C	42 (60%)	42 (58.33%)	13 (59.2%)	



Gambar 1. Hasil elektroforesis produk PCR gen EPHX. L (marker DNA), N (kontrol negatif). Pada sumur 1-5 tampak band DNA berukuran 163 bp



Gambar 2. Hasil elektroforesis produk RFLP gen EPHX Tyr113His. L (marker DNA), UC (UnCut Product). Pada sumur 1, 3 dan 5 adalah genotif heterozigot varian T/C tampak fragmen DNA yang terpotong menjadi 140 bp dan 163 bp. Band ukuran 23 bp tidak tampak pada elektroforesis karena ukurannya yang terlalu kecil. Sumur 2 dan 4 adalah genotif homozigot varian C/C tampak fragmen DNA tidak terpotong, berukuran 163 bp

PEMBAHASAN

Hasil analisa polimorfisme gen enzim EPHX Tyr113His diperoleh frekuensi heterozigot varian T/C dan homozigot varian C/C pada kelompok kasus adalah 88,3% dan 16,7%. Sedangkan kelompok kontrol memiliki frekuensi heterozigot varian T/C sebesar 80,% dan homozigot varian C/C sebesar 20%. Genotif homozigot *wildtype*T/T tidak dijumpai pada kedua kelompok.

Distribusi genotif polimorfisme gen enzim EPHX Tyr113His pada penelitian tidak menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna antara penderita kanker paru dan kontrol. Hubungan antara polimorfisme gen enzim EPHX Tyr113His dengan kanker paru diuji dengan menggunakan uji *Fisher's*. Tidak terdapat perbedaan yang signifikan dari polimorfisme gen enzim EPHX Tyr113His antara penderita kanker paru dan kelompok kontrol.

Beberapa penelitian lain juga memperoleh hasil yang sama.¹⁴⁻¹⁶ Tidak terdapat perbedaan prevalensi risiko terhadap kerentanan untuk terjadinya kanker paru (OR:1.00; CI 95%:0.74–1.34) (OR: 0,88; CI 95%: 0,56-1,38). Namun beberapa penelitian lain menyatakan bahwa terdapat hubungan antara polimorfisme gen enzim EPHX Tyr113His dengan kemungkinan seseorang menderita kanker paru.^{9-10,13} Perbedaan hasil yang diperoleh diantara beberapa peneliti dapat dipengaruhi beberapa faktor seperti adanya perbedaan ras, metode pemeriksaan, karakteristik subjek, jumlah sampel yang digunakan dan keterlibatan gen-gen enzim xenobiotik lainnya.

Beberapa studi mengenai hubungan polimorfisme gen enzim EPHX Tyr113His dengan kejadian kanker paru menunjukkan hipotesa yang berbeda-beda. Beberapa studi menyatakan bahwa seseorang yang memiliki alel C pada gen EPHX di ekson 3 akan meningkatkan risiko menderita kanker paru. Fathy *et al* mendapatkan bahwa individu yang memiliki alel C berisiko 2,9 kali lebih besar untuk menderita kanker paru.⁹ Hasil yang sama juga didapatkan Erkisi *et al* dan Tilak *et al* bahwa polimorfisme gen EPHX Tyr113His dapat meningkatkan risiko terjadinya kanker paru.^{10,13}

Enzim EPHX yang memiliki dua fungsi yang berlawanan yaitu detoksifikasi dan aktivasi tergantung dari substratnya.⁵ Enzim EPHX akan melakukan fungsi detoksifikasi apabila substratnya adalah senyawa epoksid yang banyak terdapat didalam asap rokok.^{5,11} Epoksida adalah senyawa yang bersifat elektrofilik sehingga sangat mudah bereaksi dengan DNA dan membentuk *DNA-Adduct*.⁷ Jika senyawa-senyawa ini tidak didetoksifikasi dapat berinteraksi dengan DNA, RNA, protein dan lemak sehingga dapat menimbulkan efek sitotoksik dan genotoksik yang berbahaya. Beberapa penelitian memiliki hipotesa yang berlawanan dengan penelitian diatas. Mereka melaporkan bahwa polimorfisme gen enzim EPHX Tyr113His menurunkan risiko terjadinya kanker paru.^{11,12,16,17} Genotif homozigot varian C/C dari polimorfisme gen EPHX Tyr113His memiliki efek protektif terhadap kanker paru.¹⁸ Individu yang memiliki alel C dapat menurunkan risiko terjadinya kanker paru (OR:0,68; CI 95%:0.49 - 0.94). Hal ini berkaitan dengan aktifitas enzim EPHX dalam proses metabolisme BaP.¹⁸

BaP dapat masuk kedalam tubuh melalui banyak cara, yang paling utama melalui inhalasi asap rokok.⁵ BaP yang telah diaktifasi akan menghasilkan metabolit antara yaitu BPDE yang bersifat elektrofilik sehingga dapat dengan mudah bereaksi dengan DNA.¹⁹ Penelitian menunjukkan bahwa DNA dapat berikatan dengan dengan BPDE melalui ikatannya dengan basa *Guanin* dari gen P53 terutama pada kodon 157, 248 dan 273.^{5,11} Enzim EPHX dengan aktifitas yang rendah akan menurunkan metabolisme BaP sehingga BPDE yang terbentuk juga menurun.^{17,18} Jika BPDE menurun maka terbentuknya *DNA Adduct* juga akan menurun sehingga dapat menurunkan risiko terjadinya kanker paru pada perokok.¹⁷

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian diperoleh bahwa tidak ada hubungan antara polimorfisme gen EPHX Tyr113His dengan kejadian kanker paru yang merokok. Untuk melihat sejauh mana hubungan polimorfisme gen EPHX Tyr113His dengan kejadian

kanker paru yang merokok sebaiknya juga diperiksa kadar BaP dan BPDE di dalam darah. Untuk mengetahui lebih luas tentang keterlibatan genetik terhadap kejadian kanker paru pada perokok perlu dilakukan penelitian tentang gen enzim metabolisme xenobiotik yang lainnya seperti gen enzim *Sitokrom P-450*, *Glutation Transferase*, dan *Aldo-Keto Reduktase*.

DAFTAR PUSTAKA

1. International Agency for Research on Cancer. Lung Cancer Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. p.2012
2. Soeroso NN, Soeroso L, Syafiuddin T. Kadar *Carcinoembryogenic Antigen* (CEA) Serum Penderita Kanker Paru Karsinoma Bukan Sel Kecil di RSUP Adam Malik. *J Respir Indo*. 2014;34:17-25
3. Danaei G. Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *Lancet*. 2005;366:1784-93.
4. Osgood RS, Upham BL, Hill TIII, Helms KL, Velmuruga K, Babica P, et al. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Induced Signaling Events Relevant to Inflammation and Tumorigenesis in Lung Cells Are Dependent on Molecular Structure. *Plos One*. 2013;8:e65150.
5. Moorthy B, Chu C, Carlin DJ. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Toxicological Sciences*. 2015;145:5-15
6. Li H, Fu W, and Hong Z. Microsomal epoxide hydrolase gene polymorphisms and risk of chronic obstructive pulmonary disease: A comprehensive meta-analysis. *Oncology letters*. 2013;1022-30.
7. Goldman R, Enewold L, Pellizzari E, Beach JB, Bowman ED, Krishnan SS, et al. Smoking increases carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in human lung tissue. *Cancer Research*. 2001;61:6367-71.
8. Reid BC, Ghazarian AA, DeMarini DM, Sapkota A, Jack D, Lan Q, et al. Research opportunities for cancer associated with indoor air pollution from solid-fuel combustion. *Environ. Health Perspect*. 2012;120:1495-18.
9. Fathy M, Hamed M, Youssif O, Fawzy N, and Ashour W. Association between environmental tobacco smoke exposure and lung cancer susceptibility: modification by antioxidant enzyme genetic polymorphisms. *Mol Diagn Ther*. 2014;18:55-62
10. Tilak AR, Kumar S, Jain M, Pan MC, Das BC, Guleria R, et al. Association of functionally important polymorphism of microsomal. *Cancer Investigation*. 2011;29:411-8.
11. Benhamou S, Reinikainen M, Bouchardy C, Dayer P, Hirvonen A. Association between lung cancer and microsomal epoxide hydrolase genotypes. *Cancer Research*. 1998;58:5291-3.
12. Gsur A, Zidek T, Schnattinger K, Feik E, Haidinger G, Hollaus P, et al. Association of microsomal epoxide hydrolase polymorphisms and lung cancer risk. *British Journal of Cancer*. 2003;89:702-6.
13. Erkisi Z, Yaylim-Eraltan I, Turna A, Görmüş U, Camlica H, Isbir T. Polymorphisms in the microsomal epoxide hydrolase gene: role in lung cancer susceptibility and prognosis. *Tumori*. 2010;96:756.
14. Pinarbasi H, Silig Y, and Pinarbasi E. Microsomal epoxide hydrolase polymorphisms. *Molecular Medicine Reports*. 2010;3:723-7.
15. Zhao H, Spitz MR, Gwyn KM, and Wu X. Microsomal epoxide hydrolase polymorphisms and lung cancer risk in non-Hispanic whites. *Molecular carcinogenesis*. 2002;33:99-104.
16. Zhou W, Thurston SW, Liu G, Xu LL, Miller DP, Wain JC, Christiani DC. The interaction between microsomal epoxide hydrolase polymorphisms and cumulative cigarette smoking in different histological subtypes of lung cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2001;10:461-6.
17. London SJ, Smart J, Daly AK. Lung cancer risk in relation to genetic polymorphisms of microsomal epoxide hydrolase among African-

Americans and Caucasians in Los Angeles County.
Lung Cancer. 2000;28:147–55.

18. Vohno A, Metsola K, Anttila S, Impivaara O, Järvisalo J, Vainio H, Hirvonen A. EPHX1 gene polymorphisms and individual susceptibility to lung cancer. *Cancer Letters*. 2006;237:102-8.
19. Satterwhite JE, Hvastkovs E, Burns CS, Danell AS, Farwell M, Yang Y. Electrochemical detection of benzo[a]pyrene metabolite dna damage: implications of nucleobase sequence and adduct stereochemistry. North Carolina: East Carolina University; 2011.