

بررسی همبستگی پلیمورفیسم ژن MTHFR (C677T) و سرطان کولورکتال غیر فامیلی

مهدی منظرحقیقی^{۱*}، روح‌ا... نجارصادقی^۱، دکتر سیدرضا محبی^۱، فاطمه خاتمی^۱، بیژن مقیمی دهکردی^۱،
دکتر سمیه غیاثی^۱، دکتر محمدرضا زالی^۱

^۱ مرکز تحقیقات گوارش و کبد، بیمارستان طالقانی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی.

چکیده

سابقه و هدف: سرطان کولورکتال، یکی از شایعترین سرطان‌ها در بین کشورهای در حال توسعه و توسعه‌یافته محسوب می‌شود. هم‌اکنون مطالعات زیادی در زمینه ارتباط این نوع سرطان، و ژن ۱۰ و ۵ متیلن ترا هیدرووفولات ردوکتاز (MTHFR) در دنیا در حال انجام است. این آنزیم، در متیلاسیون، سنتز و تعمیر DNA نقش دارد. علاوه بر آن، این آنزیم نقش مهمی را در متابولیسم فولات بر عهده دارد. حدود ۸۰٪ موارد سرطان کولورکتال، به صورت غیر ارشی است. بنابراین محتمل به نظر می‌رسد که پلیمورفیسم‌های این ژن، با انتیلوژی سرطان و از جمله سرطان کولورکتال غیر فامیلی که به صورت شایعتری دیده می‌شود، مرتبط باشند. از آنجا که این سرطان در کشور ما نیز شیوع بسیار بالایی دارد، ارتباط بین ژنتوتایپ‌های ژن MTHFR و احتمال خطر ابتلا به سرطان کولورکتال غیر فامیلی را در تعدادی از افراد مبتلا به این سرطان، مورد ارزیابی قرار دادیم.

روش بررسی: برای بررسی پلیمورفیسم ژنتوتایپ‌های ژن MTHFR در ۱۱۸ نمونه بیمار (با نتیجه کولونوسکوپی و پاتولوژی مثبت از نظر ابتلا به سرطان کولورکتال) و ۱۸۹ نمونه کنترل (که نتیجه کولونوسکوپی آنان از نظر ابتلا به سرطان کولورکتال، منفی بود) با Pyrosequencing روش بررسی شدند.

یافته‌ها: در نمونه‌های بیماران، فراوانی ژنتوتایپ‌های CC، CT و TT در ژن MTHFR به ترتیب ۵۱/۷٪، ۲۸٪ و ۲۰/۳٪ و فراوانی این پلیمورفیسم‌ها در نمونه‌های کنترل، به ترتیب ۴۷/۱٪، ۲۲٪ و ۲۵/۹٪ بود. فراوانی آلل T در نمونه‌های بیمار، ۳۴٪ و فراوانی آلل C، ۶۶٪ بود. همچنین فراوانی آلل T در نمونه‌های کنترل، ۳۹٪ و فراوانی آلل C، ۶۱٪ محاسبه شد.

نتیجه‌گیری: تحقیق حاضر، به طور جالبی، بین بروز سرطان کولورکتال و ژنتوتایپ TT، رابطه عکس را نشان داد. نتایج این یافته‌ها برای هر دو جنس، یکسان بود.

وازگان کلیدی: سرطان غیر فامیلی کولورکتال، آنزیم متیلن تتراهیدرووفولات ردوکتاز، پلیمورفیسم، Pyrosequencing

مقدمه

کولورکتال، پیچیده و چندعاملی می‌باشد و بدیهی است که چندین ژن در مسیرهای ژنتیکی در پیشرفت و توسعه سرطان دخالت دارند (۱-۲).

سرطان کولورکتال از طریق یک سری تغییرات بافتی که هر کدام با یک تغییر ژنتیکی خاص همراه است، ایجاد می‌شود. احتمالاً سرطان کولورکتال غیر فامیلی با پلیمورفیسم‌های موجود در لوکوس‌های ژن‌ها در ارتباط است. یکی از شایعترین پلیمورفیسم‌هایی که امروزه در تمام جهان برای تعیین ارتباط

سرطان کولون، چهارمین عامل مرگ‌های ناشی از سرطان در جهان است که توزیع جغرافیایی آن، بیشتر، بیماران کشورهای در حال توسعه را تحت تأثیر قرار می‌دهد. پاتوژن کارسینومای

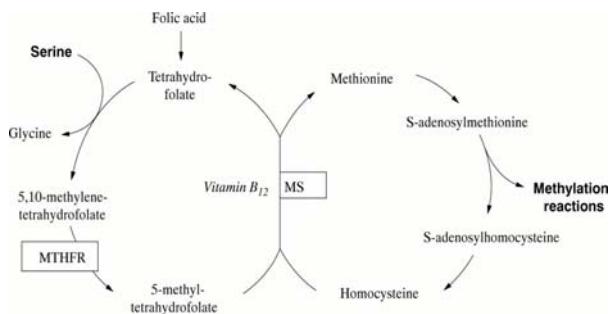
*نویسنده مسئول مکاتبات: مهدی منظرحقیقی؛ تهران، اوبن، بیمارستان آیت‌الله طالقانی، طبقه ششم، مرکز تحقیقات گوارش و کبد، پخش کانس؛ پست الکترونیک: mah_haghghi@hotmail.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۶/۱۰/۵

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۷/۵/۱۵

MTHFR بررسی همبستگی پلیمورفیسم زن

SNP‌های این زن‌ها که بیشترین پلیمورفیسم را در جوامع نشان داده‌اند، استفاده می‌کنند (۷). یک SNP مهم C677T (rs1801133) در این زن، C677T می‌باشد که دارای هتروزیگوتی بالا (۰/۴۰۹) بوده و ارتباط ژنتایپ TT این SNP با بیماری‌های مختلف از جمله بیماری‌های قلبی-عروقی، ناهنجاری‌های مادرزادی و سرطان کولورکتال در جوامع گوناگون مورد مطالعه قرار گرفته است (۸-۱۱).



شکل ۱) چرخه فولات و نقش آنزیم MTHFR

جهش C677T (آلانین به والین) سبب کاهش عملکرد آنزیم MTHFR می‌شود، که در نتیجه آن، متابولیسم فولات تغییر کرده و دسترسی به ۵ مetyl تراهیدروفولات برای واکنش‌های متیلاسیون ۵ و ۱۰ مetyl تراهیدروفولات لازم برای سنتز و تعمیر DNA کم می‌گردد که احتمالاً این تغییر به سرطان کولورکتال منجر می‌گردد (۱۵ و ۱۶).

همانطور که اشاره شد، جهش T→C در اگزون ۴ این زن، با کاهش فعالیت آنزیم MTHFR و در نتیجه با کاهش متابولیسم فولات مرتبط می‌باشد. در افراد واجد ژنتایپ 677 TT، فعالیت آنزیم تقریباً ۳۰٪ آنزیم در حالت نرمال (CC) و در افراد هتروزیگوت (CT)، ۶۵٪ فعالیت آنزیم در حالت نرمال می‌باشد (۱۶-۱۹). با توجه به موارد گفته شده بر آن شدیم که تا همبستگی پلیمورفیسم کدون T→677C را با سرطان کولورکتال غیر فamilی در بیماران مبتلا بررسی نماییم.

مواد و روش‌ها

انتخاب بیمار و کنترل: در این مطالعه، با استفاده از فرمول حجم نمونه جهت مطالعات مورد-شاهدی غیر همسان، تعداد حجم نمونه برای گروه‌های بیمار و کنترل، به ترتیب ۹۰ و ۱۸۰ (نسبت ۱ به ۲) محاسبه گردید. بیماران به صورت آینده‌نگر از افراد مراجعه‌کننده به بخش کولونوسکوپی بیمارستان طالقانی در دوره زمانی یک ساله از ۸۵/۱/۱ لغاًیت ۸۶/۱/۱، که نتیجه کولونوسکوپی در آنها از نظر وجود بافت

آن با سرطان‌ها و بیماری‌های گوناگون مورد مطالعه قرار می‌گیرد SNP می‌باشد (۳-۴). SNP‌ها، تغییراتی در سکانس DNA هستند که از تغییر در یک نوکلیوتید (A, T, C یا G) ایجاد می‌شوند. به عنوان مثال ممکن است توالی DNA از ATGGCTAA به AAGGCTAA تغییر کند. برای اینکه یک تغییر به عنوان SNP در نظر گرفته شود، باید حداقل در ۱٪ از تمام SNPs در نظر گرفته شود، باشد. SNPs که حدود ۹۰٪ از تمام تغییرات ژنتیکی انسان را شامل می‌شوند، در هر ۱۰۰ تا ۳۰۰ باز اتفاق می‌افتد. دو سوم از SNPs، از جایگزینشدن سیتوزین به جای تیمین ایجاد می‌شوند. SNPs می‌توانند در مناطق کدکننده و غیر کدکننده زن‌ها وجود داشته باشند. بسیاری از SNPs، تأثیری بر عملکرد سلول ندارند؛ ولی داشتنمدان معتقدند که برخی از آنها می‌توانند فرد را مستعد ابتلا به بیماری کرده و یا پاسخ به درمان آنها را تحت تأثیر قرار دهند. یافتن ارتباط بین بیماری‌ها و SNP با روش‌های معمول مشکل است؛ زیرا یک زن ممکن است تنها نقش کوچکی در روند بیماری‌زایی داشته باشد. افرادی که SNP خاص و یا تعدادی از SNPs را دارا هستند، ممکن است هنگامی که در معرض مواد سرطان‌زا مانند پرتوهای سرطان زا قرار می‌گیرد حساستر باشند. یک SNP به تهایی می‌تواند خطر سرطان را افزایش دهد؛ اما وجود چند منطقه پلیمورفیک، افزایش بیشتر احتمال بروز سرطان را به دنبال دارد.

آنژیم ۵ و ۱۰ مetyl تراهیدروفولات ردوکتاز که توسط ژن (5,10 Methylenetetrahydrofolate reductase) MTHFR کد می‌شود و بر روی کروموزوم ۱ (1p36.3) قرار دارد، در تبدیل ۵ و ۱۰ مetyl تراهیدروفولات به ۵-مetyl تراهیدروفولات نقش دارد؛ که این محصول، یک سوبسترای مناسب است برای تبدیل هموسیستئین به متیونین. همانطور که می‌دانیم، متیونین هم پیش‌سازی است برای تولید S-آدنوزیل متیونین (SAM) که اصلی‌ترین دهنده مetyl در بدنه برای متیلاسیون DNA است (نمودار ۱). علاوه بر این، به ۵ و ۱۰ مetyl تراهیدروفولات سوبسترای MTHFR برای ساخت پورین و تیمیدیلات مورد نیاز می‌باشد (شکل ۱) (۵-۶).

همانطور که اشاره شد، به وضوح مشخص شده که زن‌ها نقش کلیدی در ایجاد سرطان کولورکتال دارند. اما اینکه مشخصاً چه زنی بیشترین نقش را به خود اختصاص می‌دهد، هنوز معلوم نشده است. بنابراین، برای تعیین این زن‌ها، محققان در سراسر دنیا به مطالعه ژنتایپ زن‌های کاندید در ایجاد این سرطان نظیر MTHFR می‌پردازند و برای این منظور، از

الگو تشییت شده و محلول‌های حاوی نوکلوتیدهای T, A, C و G به طور مرتب اضافه می‌شوند. در واقع، در تکنیک Pyrosequencing، پیروفسفات‌ها (PPi) حاصله از سنتز DNA در طی چند واکنش آنزیمی پی در پی سبب ساطع شدن نور می‌شود. بدین صورت که ابتدا PPi بوسیله آنزیم ATP سولفوریلаз (ATP Sulfurylase)، به ATP تبدیل می‌شود و ATP حاصله نیز از آنزیم لوسیفراز که لوسیفرین را به اکسی لوسیفرین تبدیل می‌کند، استفاده کرده و نور تولید می‌گردد. بنابر این نور وقتی تولید می‌شود که فقط نوکلئوتید محلول، مکمل اولین باز باشد و با توجه به نور و سیگنالی که تولید می‌شود می‌توان توالی DNA مورد نظر را تعیین کرد.

Pyrosequencing دارای مزایای زیادی می‌باشد نظیر دقیق، انعطاف‌پذیر و پردازش بطور موازی؛ بطوری که این قابلیت را دارد که آنالیز ۹۶ نمونه را تنها در مدت زمان ۲۰ دقیقه انجام دهد و نیازی به پرایمر و نوکلئوتید نشاندار و الکتروفورز ندارد (۲۱). در این مطالعه، Pyrosequencing با استفاده از محصول

PCR و یک پرایمر Sequencing انجام شد (جدول ۱). آنالیز SNP مورد نظر با استفاده از نرم‌افزار مخصوص (SNP Software) صورت گرفت. بدین صورت که پیک‌های حاصله بر اساس الگوی پاچش (dispensation)، ارزیابی و تعیین ژنتوتایپ بوسیله نرم‌افزار PSQ96MA V2.1.1 PCR صورت گرفت.

بنابراین در این مطالعه با روش Pyrosequencing که یک دستاوردهای جدید برای تعیین ژنتوتایپ از طریق روش جدید bioluminometric است و بدون احتیاج به الکتروفورز، سکانس قابلیت تعیین فراوانی آل‌های در نمونه‌ها، آنالیز موتاسیون، آنالیز متیلاسیون، هاپلوتایپینگ ملکولی، مطالعات همبستگی و کشف SNP‌ها می‌باشد.

این مطالعه، اولین تحقیق برای بررسی بین پلی‌مورفیسم‌های ژن MTHFR و ابتلاء سرطان کولون در ایران است. علاوه بر این، برای تعیین ژنتوتایپ‌ها، برای اولین بار در بین کشورهای خاورمیانه، از تکنیک Pyrosequencing استفاده شد.

آنالیز آماری: ۱۴۷ نمونه بیمار و ۱۹۳ نمونه سالم برای انجام این مطالعه انتخاب شدند. از میان آنها، ۲۹ بیمار و ۴ کنترل، حاضر به شرکت در این مطالعه نشدند. بنابراین، در مطالعه حاضر، ژنتوتایپ C677T مربوط به ۱۱۸ نمونه بیمار و ۱۸۹ نمونه کنترل بوسیله Pyrosequencing مورد بررسی قرار گرفت که از این تعداد، ۷۳ نفر مرد و ۴۵ نفر زن در نمونه‌های بیمار، و ۱۰۸ نفر مرد و ۸۱ نفر زن در نمونه‌های کنترل قرار داشتند. برای آنالیز آماری، از تکنیک‌های استاندارد مطالعات

تمورال با استفاده از آزمایش‌های پاتولوژی نیز تأیید شده بود، انتخاب شدند؛ و در نهایت، تعداد ۱۱۸ بیمار به عنوان گروه مورد، وارد مطالعه شدند. گروه کنترل نیز از سایر افراد مراجعه کننده به بخش فوق در همان دوره زمانی و با توجه به نتیجه کولونوسکوپی منفی در ایشان وارد مطالعه شدند. بیماران و کنترل‌ها با سابقه فامیلی ابتلاء سرطان کولورکتال در بستگان درجه اول (پدر، مادر، برادر، خواهر و فرزند) و درجه دوم (پدریزرگ، مادریزرگ، عمه، خاله، عمو، دایی و نوه) از مطالعه خارج شدند. به کلیه بیماران و کنترل‌ها، در مورد نحوه استفاده از نتایج و داوطلبانه بودن حق شرکت یا عدم شرکت در این مطالعه توضیح داده شد و از داوطلبین شرکت در مطالعه، رضایت‌نامه آگاهانه کتبی اخذ گردید. فرم رضایت‌نامه اخلاقی شرکت افراد در مطالعه، توسط کمیته اخلاق مرکز تحقیقات گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهریبد بهشتی تصویب شده و مورد استفاده قرار گرفت. کلیه بیماران، توسط پزشک آموزش‌دیده، مورد مشاوره قرار گرفته و اطلاعات دموگرافیک، کلینیکی و شرح حال ایشان کسب گردید و در فرم‌های اطلاعاتی مربوطه وارد شد. از تمامی بیماران و کنترل‌ها، نمونه خون محیطی به میزان ده سی سی شهید انجام آزمایشات ژنتیکی اخذ شد.

انجام PCR: با استفاده از DNA استخراج شده از خون محیطی (با استفاده از روش استاندارد فتل-کلروفروم) ناحیه مورد نظر از ژن MTHFR (شماره دستیابی ژن NC-000001) توسط یک جفت پرایمر که یکی از آنها (پرایمر فوروارد) بیوتینه شده بود، تکثیر یافت. مشخصات مربوط به پرایمراه در جدول ۱ آمده است. شرایط PCR برای یک واکنش با حجم نهایی ۲۵ µl به این شرح بود: ۱µl از DNA ژنومی (۱۰۰ ng)، ۲۰ µM از هر پرایمر، ۰/۲ mmol dNTP از هر ۰/۲ µM PCR Ampli taq Gold پلیمراز. ۰/۰۲ U/µl ۰/۰۲ MgCl₂

مطابق با برنامه زیر انجام گرفت:

۵ دقیقه	۹۴ درجه سانتی‌گراد
۳۰ ثانیه	۹۴ درجه سانتی‌گراد
۳۵ سیکل	۶۲ درجه سانتی‌گراد
۴۰ ثانیه	۷۲ درجه سانتی‌گراد
۱۰ دقیقه	۷۲ درجه سانتی‌گراد

Pyrosequencing: این تکنیک، یک روش جدید و دقیق برای تعیین چندشکلی‌های تکنوکلوتیدی Single Nucleotide Polymorphism (SNP) می‌باشد. اساس این روش، توالی‌یابی DNA تکرشته‌ای از طریق ساخت رشته مکمل آن می‌باشد و DNA تشخیص اینکه کدام باز در هر مرحله اضافه شده است. DNA

میانگین سنی برای گروه مبتلا به سرطان، $69/3$ و برای گروه شاهد، $57/1$ بود. ۲۴ نمونه بیمار ($20/20$) و 49 نمونه سالم ($26/26$) برای ژنتوتایپ TT هموزایگوت بودند. جدول شماره 3 ، نمایانگر رابطه عکس بین ژنتوتایپ TT و سرطان کولون می‌باشد. فراوانی ژنتوتایپ‌های 677TT، 677CT و 677CC در بیماران، به ترتیب $20/3$ ، $28/28$ و $51/7$ درصد بود. فراوانی ژنتوتایپ 677TT در بین بیماران در مقایسه با نمونه‌های کنترل کمتر بود ($P<0.05$).

مورد- شاهدی حالت غیر همسان (Unmatch) استفاده شد. تجزیه و تحلیل متغیرهای گروه‌بندی شده با آزمون مجدور کای و متغیرهای کمی، با آزمون t-student صورت پذیرفت. همچنین نسبت شانس (OR) و حدود اطمینان 95% توسط رگرسیون لجستیک محاسبه گردید. هموزایگوت‌های TT، به عنوان گروه مواجهه (exposure) و مجموع هموزایگوت‌های (CC) نرمال به همراه هتروزایگوت‌های CT، به منظور افزایش توان آنالیز آماری به عنوان گروه عدم مواجهه (unexposed) در نظر گرفته شدند (22). همبستگی بین ژنتوتایپ‌های ژن MTHFR و سرطان کولورکتال در تمام افراد در این مطالعه مورد ارزیابی قرار گرفت. تمام P-values، دوطرفه و از نظر آماری، $P<0.05$ ، معنی‌دار در نظر گرفته شدند.

جدول (۱) پرایمرهای PCR و Pyrosequencing استفاده شده

MTHFR در ژنتوتایپ C677T ژن

پرایمر	مشخصات	توالی	n	Tm
Forward	GAGGCTGACCTGAAGCACTTGA	۲۲	۶۵/۱	
Reverse	ATGCCTTCACAAAGCCCAAGA	۲۱	۶۵	
Sequencing	CGTGATGATGAAATCG	۱۶	۵۱	

جدول (۲) مشخصات افراد بیمار و کنترل در جمعیت مورد مطالعه

P	کنترل		P	بیمار		ریسک فاکتور سن(میانگین±حراف معیار)
	TT	CT/CC		TT	CT/CC	
$0/28$	$58/3\pm6/8$	$59/5\pm6/6$	$0/11$	$61/2\pm7/2$	$58/4\pm5/8$	
$0/84$	$23(12/2)$	$68(36)$	$0/68$	$10(8/47)$	$35(29/67)$	مرد
	$26(13/7)$	$72(38/1)$		$14(11/86)$	$59(50)$	زن
-	-	-	$0/52$	$15(12/7)$	$52(44/1)$	دیستال
	-	-		$9(35/6)$	$42(7/6)$	پروکسیمال

جدول (۳) شیوع ژنتوتایپ C677T و اثرات اصلی در بیماران ایرانی

مبتلا به سرطان کولورکتال غیر فامیلی

مبتلا به اطمینان 95%	OR ^a	فاصله اطمینان 95%	کنترل	بیمار	ژنتوتایپ
مرجع	۱		۸۹	۶۱	CC
$0/59-0/98$	$0/96$		۴۹	۲۴	TT
$0/77-1/07$	$1/12$		۵۱	۳۳	CT
$0/73-1/95$	$1/15$		$49/140$	$24/94$	TT/CT+CC

a: تطبیق یافته برای سن و جنس

کولورکتال در افراد واجد ژنتوتایپ 677TT، حدود 38% نسبت به افراد واجد ژنتوتایپ 677CC کمتر است؛ و این همبستگی در هر دو جنس مشابه بود. علاوه بر این مشخص شد که رابطه معنی‌داری بین محل تومور و بیماران واجد ژنتوتایپ 677TT

بحث

در این مطالعه، ارتباط میان ژنتوتایپ C677T از ژن MTHFR و سرطان کولورکتال غیر فامیلی در جمعیت بیمار و سالم بررسی شد و مشخص گردید که ریسک بروز سرطان

(dNTP) که می‌تواند منجر به تغییرات ژنتیکی منتج به سرطان شود، قرار می‌گیرند. بعنوان مثال، کاهش سطح متیل می‌تواند سبب افزایش سطح یوراسیل و بالتبع، باعث افزایش شکستهای کروموزومی در DNA لوکوسیت‌ها شود (۲۵-۲۶). سرطان کولورکتال غیر فامیلی، پس از انتشار بیماری به روده بزرگ چندان قابل درمان نیست. وجود آلل C می‌تواند علت مرگ و میر بالای سرطان کولورکتال غیر فامیلی به ویژه در جمعیت‌های با سطح پایین فولات رژیم غذایی باشد. همچنین مشخص شده است که آلل TT در آمریکایی‌های آفریقاًی تبار و هاوایی تبارها، فرکانس کمتری دارد. این آلل، به طور ویژه‌ای، اثر محافظتی در برابر سرطان کولورکتال دارد و با تظاهرات دیرهنگام و بقای پایین‌تر (که در این اقوام دیده می‌شود) توأم است (۳۰-۳۶).

بطور کلی، یافته‌های این مطالعه نتایج قبلی را مبنی بر همبستگی معکوس بین ژنوتایپ 677TT ژن MTHFR با سرطان کولورکتال غیر فامیلی به ویژه در صورت مصرف بالای فولات، تأیید می‌کند. در خاتمه، لازم به یادآوری است که ما در انجام این تحقیق با محدودیت‌هایی روبرو بودیم؛ از جمله عدم اطلاع دقیق از مصرف الكل در افراد مورد مطالعه و همچنین عدم اندازه‌گیری میزان فولات پلاسمما و فولات درون گلبول‌های قرمز و فولات موجود در رژیم غذایی. لذا پیشنهاد می‌شود محققان دیگر برای انجام مطالعه مشابه، این متغیرها را نیز در نظر بگیرند. از دیگر محدودیت‌های مطالعه حاضر می‌توان به تعداد نسبتاً کم نمونه‌های مورد بررسی، به دلیل محدودیت‌های اجرایی اشاره نمود. لذا با پیش‌فرض قابل تعمیم‌بودن مطالعه، نتایج حاصله می‌باشد با احتیاط تفسیر شوند. انجام مطالعات مشابه با تعداد نمونه بیشتر در جهت تأیید یا رد نتایج مطالعه حاضر پیشنهاد می‌گردد.

وجود ندارد. این یافته، خلاف نتایج به دست آمده از یک مطالعه دیگر بود که در ایتالیا انجام شده است. در این مطالعه، رابطه معنی‌داری بین محل تومور پروکسیمال و ژنوتایپ 677TT گزارش شده است (۲۳). لذا پیشنهاد می‌گردد برای بررسی دقیق‌تر، این مطالعه با حجم نمونه بیشتری انجام شود (جدول ۲).

براساس یافته‌های این تحقیق، بین بروز سرطان کولورکتال غیر فامیلی و ژنوتایپ TT، رابطه عکس وجود دارد؛ و در واقع این ژنوتایپ باعث یک اثر محافظتی در مقابل سرطان می‌شود. این نتیجه قبلاً نیز در دو تحقیق گزارش شده بود (۲۴-۲۵). از ۵ مطالعه مورد-شاهدی، ۴ مطالعه ارتباط بین فولات و ژنوتایپ TT را نشان داده‌اند. همچنین این بررسی‌ها مشخص کردند که این پیوستگی معکوس، در افرادی بیشتر است که میزان جذب فولات بالاتری از رژیم غذایی داشته‌اند و یا سطح بالاتری از فولات پلاسمما را نشان دادند (۲۵). فرضیه‌ای که برای علت این پیوستگی معکوس بین سرطان کولورکتال غیر فامیلی با ژنوتایپ TT ژن MTHFR وجود دارد این است که فعالیت کم MTHFR منجر به افزایش ۵ و ۱۰ متیلن تترا هیدروفولات می‌شود که این امر به نوبه خود باعث افزایش تبدیل دی‌اکسی‌بوریدین مونوفسفات (dTUMP) به دی‌اکسی‌تیمیدین مونوفسفات (dTMP) می‌گردد و به دنبال آن احتمالاً کاهش تجمع دی‌اکسی‌بوریدات سبب آسیب کمتری به DNA می‌شود. در افراد واجد ژنوتایپ 677TT (والین/والین) آنزیم MTHFR در تبدیل ۱۰ و ۵ متیلن تترا هیدروفولات به ۵ متیلن تترا هیدروفولات، چندان مؤثر نمی‌باشد. بنابراین میزان ذخیره ۱۰ و ۵ متیلن تترا هیدروفولات بالا می‌رود که متعاقباً برای ساخت نوکلئوتیدهای مورد نیاز سنتز DNA استفاده می‌گردد. در نتیجه، سلول‌های واجد ژنوتایپ TT کمتر در معرض استرس ناشی از کاهش داکسی‌نوکلئوتید تری فسفات

REFERENCES

1. Giovannucci E, Rimm EB, Ascherio A, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC. Alcohol, Low-Methionine-Low-Folate Diets, and Risk of Colon Cancer in Men. *J. Nati. Cancer Inst* 1995;87:265-73.
2. Fearon ER, Vogelstein BA. A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis. *Cell* 1990;61:759-67.
3. Issa JP, Ottaviano YL, Celano P, Hamilton SR, Davidson NE, Baylin SB. Methylation of the Oestrogen Receptor CpG Island Links Aging and Neoplasia in Human Colon. *Nat Genet* 1994;7:536-40.
4. Greenblau MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: Clues to Cancer Etiology and Molecular Pathogenesis. *Cancer Res* 1994;54:4855-78.
5. Goodman JE, Mechanic LE, Luke BT, Ambs S, Chanock S, Harris CC. Exploring SNP-SNP Interactions and Colon Cancer Risk Using Polymorphism Interaction Analysis. *Int J Cancer* 2006;118(7):1790-7.

6. Loïc Le Marchand, Lynne R Wilkens, Laurence N Kolonel, Brian E Henderson. The MTHFR C677T Polymorphism and Colorectal Cancer: The Multiethnic Cohort Study. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 2005; 14:1198-203.
7. Ulrich CM, Kampman E, Bigler J, Schwartz SM, Chu Chen, Bostick R, et al. Lack of association between the C677T MTHFR polymorphism and colorectal hyperplastic polyps. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 2000;9:427-33.
8. Abee L, Boyles, Allen J, Wilcox, Jack A, Taylor, Klaus Meyer, Åse Fredriksen, Per Magne Ueland, et al. Folate and One-Carbon Metabolism Gene Polymorphisms and Their Associations With Oral Facial Clefts. *Am J Med Genet A* 2008;146(4):440-49.
9. Konings EJ, Goldbohm RA, Brants HA, Saris WH, van den Brandt PA. Intake of dietary folate vitamers and risk of colorectal carcinoma: results from The Netherlands Cohort Study. *Cancer* 2002;95:1421-33.
10. Slattery ML, Potter JD, Samowitz W, Schaffer D, Leppert M. Methylenetetrahydrofolate reductase, diet, and risk of colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999;8:513-8.
11. Su LJ, Arab L. Nutritional status of folate and colon cancer risk: evidence from NHANES I epidemiologic follow-up study. *Ann Epidemiol* 2001;11:65-72.
12. Jiang Q, Chen K, Ma X, Li Q, Yu W, Shu G, et al. Diets, polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase, and the susceptibility of colon cancer and rectal cancer. *Cancer Detect Prev* 2005;29:146-54.
13. Harnack L, Jacobs DR Jr, Nicodemus K, Lazovich D, Anderson K, Folsom AR. Relationship of folate, vitamin B-6, vitamin B-12, and methionine intake to incidence of colorectal cancers. *Nutr Cancer* 2002;43:152-8.
14. Frosst P, Blom HJ, Milos P, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat. Genet* 1995;10:111-3.
15. Starinsky S, Figer A, Ben-Asher E, Geva R, Flex D, Fidder HH, et al. Genotype phenotype correlations in Israeli colorectal cancer patients. *Int J Cancer* 2005;114:58-73.
16. Choi SW, Mason JB. Folate and carcinogenesis: an integrated scheme. *J Nutr* 2000;130:129-32.
17. Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani R, Rozen R. A second polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab* 1998;64:169-72.
18. Temitope Keku, Robert Millikan, Kendra Worley, Scott Winkel, Allison Eaton, Lorna Biscocho, et al. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase codon 677 and 1298 polymorphisms and colon cancer in African Americans and whites. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;11:1611-21.
19. Lievers KJ, Boers GH, Verhoef P, den Heijer M, Kluijtmans LA, van der Put NM, et al. A second common variant in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene and its relationship to MTHFR enzyme activity, homocysteine, and cardiovascular disease risk. *J Mol Med* 2001;79:522-8.
20. T. langaee, M.Ronaghi .Genetic variation analysis by Pyrosequencing. *Mutation Research* 2005;573:96-102.
21. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase [letter]. *Nat Genet* 1995;10:111-13.
22. Mostafa Ronaghi. Pyrosequencing Sheds Light on DNA Sequencing. *Genome Res* 2001; 11: 3-11.
23. Giuseppe Toffoli, Roberta Gafà, Antonio Russo, Giovanni Lanza, Riccardo Dolcetti, Franca Sartor, et al. Methylenetetrahydrofolate Reductase 677C→T Polymorphism and Risk of Proximal Colon Cancer in North Italy. *Clin Cancer Res* 2003; 9:743-8.
24. Ma J, Stampfer MJ, Giovannucci E, Artigas C, Hunter DJ, Fuchs C, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, dietary interactions and risk of colorectal cancer. *Cancer Res* 1997;57:1098-102.
25. Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, Ellison RC, Eckfeldt JH, Rosenberg IH, et al. Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation* 1996;93:7-9.
26. Levine AJ, Siegmund KD, Ervin CM, Diep A, Lee ER, Frankl HD et al. The methylenetetrahydrofolate reductase 677C→T polymorphism and distal colorectal adenoma risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9:657-63.
27. Marugame T, Tsuji E, Inoue H, Shinomiya S, Kiyohara C, Onuma K, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and risk of colorectal adenomas. *Cancer Lett* 2000;151:181-6.

28. Delgado-Enciso I, Martinez-Garza SG, Rojas-Martinez A, Ortiz-Lopez R, Bosques-Padilla F, Calderon-Garciduenas AL, et al. 677T mutation of the MTHFR gene in adenomas and colorectal cancer in a population sample from the Northeastern Mexico. Preliminary results. *Rev Gastroenterol Mex* 2001;66:32-7.
29. Giovannucci E, Chen J, Smith-Warner SA, Rimm EB, Fuchs CS, Palomeque C, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase, alcohol dehydrogenase, diet, and risk of colorectal adenomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003;12:970-9.
30. Chen VW, Fenoglio-Preiser CM, Wu XC, Coates RJ, Reynolds P, Wickerham DL, et al. Aggressiveness of colon carcinoma in blacks and whites. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997;6:1087-93.
31. Wegner EL, Kolonel LN, Nomura AMY, Lee J. Racial and socioeconomic status differences in survival of colorectal cancer patients in Hawaii. *Cancer* 1982;49:2208-16.
32. Eaton AM, Sandler R, Carethers JM, Millikan RC, Galanko J, Keku TO. 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase 677 and 1298 polymorphisms, folate intake, and microsatellite instability in colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14:2023-9.
33. Le Marchand L, Donlon T, Hankin JH, Kolonel LN, Wilkens LR, Seifried A. B-vitamin intake, metabolic genes and colorectal cancer risk. *Cancer Causes Control* 2002;13:239-48.
34. Slattery ML, Potter JD, Samowitz W, Schaffer D, Leppert M. Methylenetetrahydrofolate reductase, diet, and risk of colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999;8:513-8.
35. Pagano IS, Morita SY, Dhakal S, Hundahl SA, Maskarinec G. Time dependent ethnic convergence in colorectal cancer survival in Hawaii. *BMC Cancer* 2003; 3:1-10.
36. Poirier L, Wise C, Delongchamp R, Sinha R. Blood determinations of S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine, and homocysteine: correlations with diet. *Cancer Epidemiol Biomark. Prev* 2002;10:649-55.