TUMJ monthly Tehran University Medical Journal
مجله دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، آبان ۱۳۹۳، دوره ۷۲، شماره ۸، صفحه‌های ۵۱۵ تا ۵۲۵
مقاله اصیل

# بررسی ارتباط بین آدنومای کولورکتال با غلظت فولات گلبول قرمز و پلی‌مورفیسم ژن آنزیم متیلن تتراهیدروفولات ردوکتاز

زهره مظلوم[1*]، سید محمد باقر تابعی[2]
سلمه بهمن‌پور[1]، سید حمید رضا طباطبائی[3]، مهوش علیزاده نائینی[4]

۱- گروه تغذیه بالینی، دانشکده تغذیه و علوم غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.
۲- گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.
۳- گروه اپیدمیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.
۴- گروه گوارش و بیماری‌های کبد، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.

* نویسنده مسئول: شیراز، بلوار رازی، دانشکده تغذیه و علوم غذایی، صندوق پستی ۱۱۱-۷۱۶۴۵
کدپستی: ۷۱۵۳۶-۷۵۵۴۱
تلفن: ۰۷۱-۳۶۳۱۴۹۲۳
E-mail: zmazloom@susms.ac.ir

## چکیده

دریافت: ۱۳۹۳/۰۳/۰۹ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۶/۳۰ آنلاین: ۱۳۹۳/۰۸/۲۰

***زمینه و هدف:*** تغییرات غلظت فولات با خطر آدنومای کولورکتال ارتباط دارد. متیلن تتراهیدروفولات ردوکتاز (MTHFR) آنزیم مهم تنظیمی در متابولیسم فولات می‌باشد. پلی‌مورفیسمِ ژن C677T این آنزیم با تغییرات سطوح فولات در ارتباط است. هدف این مطالعه بررسی ارتباط غلظت فولات گلبول قرمز با آدنومای کولورکتال و چگونگی اثر این پلی‌مورفیسم بر این ارتباط بود.

***روش بررسی:*** در مطالعه مورد- شاهدی که از دی ۱۳۸۶تا آذر ۱۳۸۷ در بخش کولونوسکوپی- اندوسکوپی بیمارستان شهید فقیهی شیراز انجام گردید، ۱۷۷ بیمار مبتلا به آدنومای کولورکتال (گروه مورد) و ۳۶۶ فرد سالم که در معاینه کامل کولونوسکوپی، عاری از پولیپ بودند (گروه شاهد) شرکت نمودند. نمونه خون سیاهرگی از افراد به منظور تعیین غلظت فولات و شناسایی پلی‌مورفیسم با تکنیک (PCR-RFLP) جمع‌آوری گردید.

***یافته‌ها:*** توزیع فراوانی جنسی (مرد و زن) به ترتیب در گروه بیماران ۵۷/۶٪ و ۴۲/۳٪ و در گروه شاهد ۵۵/۱٪ و ۴۳/۹٪ بود. ۵۰/۲٪ از افراد مورد و ۴۹/۲٪ از افراد شاهد در گروه سنی ۴۵ سال و بالاتر قرار داشتند (P=۰/۱۲۳). فراوانی نسبی آلل T در افراد کنترل و بیمار ۵۶/۶٪ و ۳۴/۴٪ بود. ارتباط معناداری بین آلل T ژن آنزیم MTHFR و ابتلا به آدنومای کولورکتال وجود داشت (P=۰/۰۰۱، ۴/۲۴-۰/۷۶=CI٪۹۵، OR=۱/۸۵) تفاوت میانگین غلظت فولات در ژنوتیپ‌های هموزیگوت جهش یافته (TT)، هتروزیگوت (CT)، هموزیگوت سالم (CC) معنادار نبود (P=۰/۹۲۲) با این حال افراد با ژنوتیپ TT نسبت به دو گروه دیگر میانگین غلظت فولات کمتری داشتند. افراد با ژنوتیپ TT و سطوح غلظت پایین‌تر فولات (کمتر از ۱۴۰ ng/ml)، خطر بیشتری در زمینه ابتلا به آدنومای کولورکتال در مقایسه با افراد با ژنوتیپ CC داشتند (P=۰/۴۴۲، ۲/۱۹-۰/۱۰=CI٪۹۵، OR=۲/۰۸).

***نتیجه‌گیری:*** افراد با ژنوتیپ TT و غلظت فولات پایین، افزایش خطر آدنومای کولورکتال را نشان دادند.

***کلمات کلیدی:*** متیلن تتراهیدروفولات ردوکتاز، پلی‌مورفیسم ژنتیکی، پولیپ آدنوماس کولورکتال، فولیک اسید.

## مقدمه

در کشورهای در حال توسعه، بیماری‌های غیرواگیر به سرعت جانشین بیماری‌های عفونی و سوء تغذیه شده‌اند و در صدر عامل‌های ایجاد کننده ناتوانی و مرگ زودرس قرار گرفته‌اند. ایران به عنوان یکی از کشورهای در حال توسعه، از این قاعده مستثنی نبوده است. سرطان یکی از بیماری‌های غیرواگیر و مزمن، دومین علت مرگ و میر را پس از بیماری‌های قلبی- عروقی به خود اختصاص می‌دهد و معضل بهداشتی اغلب کشورهای دنیاست. کارسینوژنزیس کولورکتال یک فرایند چند مرحله‌ای است که در طی آن تغییرات کلی در متیلاسیون DNA، هایپرپرولیفراسیون و تشکیل آدنوما، رشد آدنوما و تغییرات ژنتیکی خاص اتفاق می‌افتد.[1] ۶۰ تا ۹۰ درصد از



[ Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-06 ]

کارسینومای کولورکتال از رشد پولیپ‌های آدنوماتوز حاصل می‌شوند.[۲] پولیپ آدنوماتوز به‌عنوان پیش زمینه سرطان کولورکتال است.[۳]

شیوع سرطان کولون، چهارمین عامل متداول در مرگ‌های ناشی از سرطان، به طور فزاینده‌ای در جهان رو به افزایش می‌باشد.[۴و۵] بر اساس آمار سازمان بهداشت جهانی، سالانه در یک میلیون نفر از افراد جهان سرطان کولون تشخیص داده می‌شود.[۶] در ایران شیوع سرطان کولورکتال رو به افزایش است و بر پایه گزارش سالیانه موسسه ثبت ملی سرطان ایران، در حال حاضر چهارمین سرطان شایع در ایران است.[۷] شیوع سرطان کولورکتال در ایران هفت نفر به ازای هر ۱۰۰۰۰۰ نفر می‌باشد.[۸] تخمین زده می‌شود که هر سال در کشور ۳۶۴۱ مورد جدید سرطان اتفاق می‌افتد و سالانه ۲۲۶۲ نفر در اثر سرطان کولورکتال جان خود را از دست می‌دهند.[۹] میزان بروز این سرطان در جمعیت ایرانی ۲۲٪ می‌باشد.[۹] شیوع آدنومای کولورکتال، در کشورهای غربی، ۲۵٪ است، بنابراین پیشگیری از آدنومای کولورکتال، بروز سرطان کولورکتال را کاهش می‌دهد.[۱] در شیراز بروز سرطان کولورکتال در دهه ۱۳۴۹ تا ۱۳۵۹ (۳ و ۹) نفر در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر گزارش شده است، در حالی که در بین سال‌های ۱۳۶۹ تا ۱۳۷۹ به (۶ و ۹۲) نفر رسیده است.[۱۰] عوامل ژنتیکی و محیطی از جمله تغذیه در اتیولوژی سرطان کولورکتال نقش دارند. مواد غذایی به عنوان یکی از عوامل محیطی، مسئول ۷۰ تا ۹۰ درصد از موارد ابتلا به سرطان کولون می‌باشد[۱۱] مواد غذایی به‌عنوان عوامل تعیین کننده ریز محیط (Microenvironment) سلول‌های سرطان کولون هستند و بر هم کنش توام سلول‌های سرطانی با ریز محیط اطراف سلول نیز بر رشد تومور موثر است،[۱۲] نتایج حاصل از "تحقیقات جهانی سرطان"[۱۳] نشان داده است که مصرف میوه‌ها، سبزیجات و گیاهان اثرات محافظتی در برابر سرطان‌های دستگاه گوارش دارند. در بدنه اصلی غذاهایی با خاصیت محافظتی می‌توان به ترکیبات مغذی از جمله ویتامین‌ها اشاره نمود که خواص ضد کارسینوژنیک و آنتی موتاژنیک دارند.[۱۳]

فولات (ویتامین B9) به‌عنوان یک ویتامین محلول در آب اثرات محافظتی در بروز سرطان کولورکتال دارد. متابولیسم فولات و اثرات متقابل آن در سنتز و متیلاسیون DNA به همراه تأثیر عوامل محیطی و ژنتیکی در مسیر این متابولیسم در اتیولوژی سرطان کولورکتال مورد توجه قرار گرفته است. سنتز و متیلاسیون DNA، همگی مکانیزم‌های اصلی برای حفظ عملکرد و تنظیم ژنوم می‌باشند.[۱۴]

فولات در بیوسنتز نوکلئوتیدهای پورینی و پیریمیدینی نقش اساسی دارد.[۱۵] فراهمی نوکلئوتیدها تکثیر و تقسیم سلول را تحت تاثیر قرار می‌دهد. با توجه به اینکه سلول‌های کولون در معرض باز گردش سریع هستند و از سویی مکانیزم‌های ترمیم DNA به وسیله دسترسی نوکلئوتیدی تحت تاثیر قرار می‌گیرد بنابراین کمبود فولات، سبب آسیب DNA و در نتیجه افزایش خطر سرطان کولورکتال می‌گردد.[۱۶] همچنین کمبود فولات، سبب جایگزینی یوراسیل (باز نیتروژنی RNA)، در توالی DNA می‌شود که در نتیجه منجر به شکست و عدم استحکام DNA می‌گردد.[۱۷] همچنین کمبود فولات، سبب کاهش دسترسی به S- آدنوزیل متیونین (SAM) می‌گردد که با کاهش فراهمی SAM، کاهش متیلاسیون (هایپومتیلاسیون) DNA اتفاق می‌افتد و ترمیم DNA را مختل می‌شود.[۱۸] هایپومتیلاسیون و شکست DNA دو نشانه در سرطان کولورکتال می‌باشند. همچنین کمبود فولات، سبب افزایش مقدار هموسیستئین و افزایش تکثیر سلولی می‌گردد.[۱۹] متیلن تتراهیدروفولات ردوکتاز (Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR آنزیم کلیدی در متابولیسم تک کربنی است که سبب تبدیل متیلن تتراهیدرو فولات به فرم فعال ۵- متیل تتراهیدروفولات و تبدیل Deoxyuridine Monophosphate (dUMP) به Thymidine Monophosphate (TMP) می‌گردد.[۲۰]

در طی یک جهش نقطه‌ای در موقعیت ۶۷۷ ژن این آنزیم، نوکلئوتید تیمیدین (T) جایگزین سیتیدین (C) می‌شود و فعالیت آنزیم به دلیل این جهش کاهش می‌یابد.[۲۱] امروزه پاسخ چراهای زیستی را باید در سلول جستجو کرد از این روی برای این کار باید به اجزای سازنده سلول یعنی مولکول‌ها توجه نمود. پژوهش‌های بیولوژی مولکولی به نقش تغییرات ژنتیکی و اثر آنها بر رفتار سلول در سبب‌شناسی بیماری‌های مزمن متمرکز شده‌اند. طی دهه‌های اخیر اهمیت درمان بیماری‌های مزمن با استفاده از بررسی حوادث مولکولی و تغییرات ژنتیکی روشن شده است. تعیین پلی‌مورفیسم ژن‌های کد کننده آنزیمِ اصلی در متابولیسم تک کربنی با فرایندهای تقسیم سلول در سبب‌شناسی کارسینوژنزیس کولورکتال نقش مهمی ایفا می‌کنند و چون پلی‌مورفیسم مدنظر با تغییر فعالیت آنزیم و تغییر در تعادل



[ Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-06 ]

تبدیل سوبسترا (۵، ۱۰- متیلن تتراهیدروفولات) به محصول (۵- متیل تتراهیدروفولات) همراه می‌باشد بنابراین به عنوان عامل خطر آدنومای کولورکتال مدنظر قرار داده می‌شود. با توجه به این که روند کارسینومای کولورکتال در شیراز، روندی صعودی داشته و اکثریت کارسینومای کولورکتال از رشد پولیپ‌های آدنوماتوز نشات می‌گیرد و همچنین در پژوهش‌های گذشته ارتباط معناداری بین فولات گلبول‌های قرمز خون و خطر آدنومای کولورکتال یافت نشده است و از طرفی با توجه به ضرورت انجام پژوهش‌های مولکولی در رشته علوم تغذیه، مطالعه حاضر برای اولین بار، مطالعه مورد- شاهدی با هدف تعیین ارتباط غلظت فولات گلبول قرمز خون و پلی‌مورفیسم ژن آنزیم متیلن تتراهیدروفولات ردوکتاز با خطر آدنومای کولورکتال انجام گردید.

## روش بررسی

در این مطالعه موردی- شاهدی، ۵۴۰ نفر که جهت انجام کولونوسکوپی به بخش اندوسکوپی- کولونوسکوپی بیمارستان شهید فقیهی شیراز (که از دی ۱۳۸۶ لغایت آذر ۱۳۸۷ به طول انجامید) مراجعه نمودند، انتخاب شدند. افراد گروه مورد این پژوهش ۱۷۷ نفر بودند که پزشک فوق تخصص بیماری‌های گوارش و کبد، وجود پولیپ در کولون یا رکتوم آنها را با معاینه کولونوسکوپی کامل تایید نمود. پس از معاینه، نمونه‌برداری صورت گرفت و به آزمایشگاه پاتولوژی ارجاع داده شد و پس از تأیید جواب پاتولوژی مبنی بر آدنوماتوز بودن پولیپ این افراد به‌عنوان گروه مورد مطالعه در نظر گرفته شدند. ۳۶۳ فرد سالم به‌عنوان گروه کنترل در این مطالعه شرکت داشتند که در معاینه کولونوسکوپی، هیچ آثاری از وجود پولیپ در آنها یافت نشد.

پس از معاینه کولونوسکوپی از کلیه افراد اطلاعاتی در زمینه‌های پزشکی، دموگرافیک، تغذیه‌ای (در زمینه عادات غذایی یک سال پیش) و سایر عوامل خطر مرتبط با خطر آدنومای کولورکتال در قالب پرسشنامه پرسیده شد. پس از تکمیل رضایت‌نامه‌ی مراجعه‌کننده، ۱۰ ml خون وریدی در حالت ناشتا (تمام افراد شرکت‌کننده در مطالعه از سه روز پیش از معاینه کولونوسکوپی از محلول‌های ملین کولون که سرپرستار بخش تجویز می‌کرد استفاده کرده بودند) از افراد به منظور انجام آزمایشات ژنتیک، تعیین هماتوکریت، تعیین غلظت فولات گلبول‌های قرمز خون گرفته شد. هر نمونه خون، در سه لوله آزمایش دربدار که حاوی Ethylenediaminetetraacetic acid (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) بود، ریخته شد و نمونه‌ها جهت انجام سایر آزمایشات به آزمایشگاه ژنتیک بخش ژنتیک پزشکی دانشکده پزشکی و پژوهشگاه غدد و متابولیسم بیمارستان نمازی شیراز منتقل گردید.

معیارهای ورود به مطالعه مراجعه‌کنندگان در این پژوهش، عبارت بود از: پارسی زبان بودن، دارای محدوده سنی بین ۲۰ تا ۶۵ سال، عدم ابتلا به سرطان کولورکتال، عدم جراحی برش کولورکتال، عدم وجود بیماری التهابی روده (Inflammatory Bowel Disease) و عدم پیروی از رژیم غذایی خاص و انجام کولونوسکوپی کامل (نه سیگموییدوسکوپی). بیماران بستری در بیمارستان شهید فقیهی که جهت انجام کولونوسکوپی به صورت سرپایی به اتاق اندوسکوپی- کولونوسکوپی ارجاع داده می‌شدند در صورت آدنوماتوز بودن پولیپ‌ها وارد مطالعه نشدند.

روش‌های آزمایشگاهی: روش بیوشیمیایی- تعیین غلظت فولات گلبول قرمز خون. در مطالعه حاضر، غلظت فولات پلاسما و گلبول‌های قرمز خون در پژوهشگاه غدد و متابولیسم بیمارستان نمازی به روش Radioimmunoassay با استفاده از SimulTRAC, Radioassay Kit Vitamin B12 [57Co]/Folate (ICN Biomedicals, Eschwege, Germany) [125I] و دستگاه شمارشگر گاما (Beckman Instruments, Inc., Fullerton, California, USA) با حساسیت برای فولات سرم، فولات گلبول های قرمز خون به ترتیب ۱/۵ nM/L، ۱۲۰ PM/L، تعیین گردید. برای تعیین غلظت فولات گلبول‌های قرمز خون بنا به دستور کار شرکت سازنده کیت، تعیین عدد هماتوکریت لازم بود که تعیین عدد هماتوکریت با دستگاه میکروسانتریفیوژ و لوله مویین در آزمایشگاه بیمارستان نمازی انجام گرفت. به ۱۰۰ µl خون آغشته به EDTA که در لوله‌ای که با آلومینوم پوشیده شده بود، ۲ ml محلول اسید آسکوربیک ۰/۲٪ افزوده شد. عدد اولیه به دست آمده از کیت که غلظت فولات سرم بود در عدد ثابت ۲۱ (غلظت فولات بر حسب ng/ml خون کامل) ضرب گردید و سپس غلظت فولات خون کامل بر عدد هماتوکریت (به‌صورت اعشاری) تقسیم شد. عدد حاصل، غلظت فولات گلبول قرمز بر



[ Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-06 ]

حسب ng/ml بود. لازم به یادآوری است که در این پـژوهش غلظـت فولات گلبول قرمز خون به جای غلظت فولات پلاسـما انـدازه‌گیـری گردید زیرا غلظت فـولات گلبـول قرمـز خـون تحـت تـاثیر عوامـل مختلف دچار نوسان نمی‌گردد و تغییر نمی‌کند و بیانگر غلظت فولات سه ماهه خون است.

آزمایشات ژنتیکی: کلیه آزمایشات در آزمایشگاه ژنتیـک پزشـکی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز انجام شد.

از ml ۷ خون سیاهرگی، DNA بـه روش Salting out، اسـتخراج گردید. غلظت DNA در nm ۲۸۰–۲۶۰ OD توسط اسـپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد. تمام نمونه‌ها با نـسبت جـذب ۱/۸< ۲۶۰/۲۸۰ و در دمـای زیـر $^{\circ}C$ ۷۰ بـرای مراحـل آینـده نگهـداری شـدند. تعیـین پلی‌مورفیسم ژن آنزیم MTHFR در اگزون شماره ۴ با روش PCR در دستگاه Eppendorf Mastercycler PCR thermal cycler (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) انجام شد. آزمایشگر در ارتباط با نمونـه خون افراد مورد و شاهد هیچ آگاهی نداشت (کورسازی). روش کـار PCR بر اساس روش مطرح شـده توسـط Frosst و همکـاران انجـام گردید.[۲۱] واکنش PCR در حجم نهایی µL ۲۵ که شـامل µL ۱/۲۵ از هر کـدام از پرایمرهـایMTHFR F, MTHFR R، µl ۱ dNTP، Taq DNA Polymerase µl ۰/۲، µl ۱ MgCl ۲، µl ۲/۵ 10X PCR buffer و µl ۲ از DNA الگو و µl ۱۵/۸ آب مقطر در نظر گرفته شد.

تـوالی دو پرایمـر MTHFR R (Reverse) و MTHFR F (Forward) مورد اسـتفاده بـه منظـور تکثیـر ژن آنـزیم MTHFR، بـر اساس رفـرانس ۲۱ بـه ترتیـب 5'–TGA-AGG-AGA-AGG-TGT-3' 5' – AGG-ACG-GTG-CGG-TGA- و CTG-CGG G-<A> 3' GAG-T-<G>3' در نظـر گرفتـه شـد. برنامـه دسـتگاه بـرای (PCR) Polymerase Chain Reaction ژن MTHFR به صورت دناتوراسـیون اولیه در $^{\circ}C$ ۹۴ در پنج دقیقه و سپس ۳۰ چرخه، کـه دناتوراسـیون در $^{\circ}C$ ۹۵ در ۶۰ ثانیه، مرحله Annealing در $^{\circ}C$ ۶۰ در ۶۰ ثانیه، مرحلـه Extention در $^{\circ}C$ ۷۲ در یـک دقیقـه و مرحلـه Final Extention در $^{\circ}C$ ۷۲ در ۵ دقیقه بود. جهت بررسی تشکیل باندها، مقداری از حجم محصول PCR بر روی ژل آگارز انتقـال داده شـد و پـس از مـشاهده باندهای حاصـل از PCR، بقیـه محلـول PCR بـرای انجـام آزمـایش Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) نگهـداری شد. در هر سری آزمایش، تیوپی به‌عنوان کنترل منفی (جهـت کنتـرل آلودگی) نیز قرار داده شد که محتوای تمام مـواد PCR بـه جـز DNA در آن موجود بود. پس از اضـافه کـردن (۴ µl) unit ۴ آنـزیم Hinf I، (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) به همـراه µl ۲ بافر آنزیم محدود کننده و µl ۴ آب مقطر دو بـار تقطیـر بـه µl ۱۰ محصول PCR، انکوباسیون محصول PCR و آنزیم در دمای $^{\circ}C$ ۳۷ به مدت زمان یک ساعت، صورت گرفـت. پـس از اتمـام انکوباسـیون، محصول PCR که در مجاورت آنزیم قرار گرفته بود با ژل ۳٪ آگاروز بـه همـراه بـافر 1X Tris-Acetate-EDTA (TAE) (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) رنـگ‌آمیـزی شـده بـا µl ۴ اتیدیوم برماید به مدت ۳۵ دقیقه در ۹۰ ولت الکتروفورز شد. پـس از پایـان الکتروفـورز بـا 300-nm ultraviolet transilluminator (Cybertech, Berlin, Germany)) و نرم‌افـزار Gene Snap ver. 6.08f (SelectScience Ltd., Bath, Corston, UK) مورد بررسـی قـرار داده شد. در صورتی که تنها قطعه bp ۱۹۸ در روی ژل مشاهده می‌گردید، نشان‌دهنده ژنوتیپ هموزیگوت سـالم (CC) بـود. قطعـات bp ۱۹۸+ bp ۱۷۵+ bp ۲۳ نشان‌دهنده ژنوتیپ هتروزیگوت (CT) بود و قطعات bp ۱۷۵+ bp ۲۳ نشان‌دهنده ژنوتیپ هموزیگوت جهـش یافتـه (TT) بود. این قطعات حاصل شده به علت تأثیر آنـزیم Hinf I بـر روی ژن آنزیم MTHFR بود. در صورتی که این ژن دارای پلی‌مورفیسم نبـود، تحت تأثیر آنزیم شکسته نمی‌شد و فقط یـک قطعـه bp ۱۹۸ در روی ژل مشاهده می‌شد (شکل ۱).

روش‌های آماری: در این مطالعه مورد– شاهدی اطلاعاتی دربـاره عوامل مؤثر بـر خطـر آدنومـای کولورکتـال جمع‌آوری گردیـد و بـا استفاده از روش‌های آماری و با استفاده از مـدل لجـستیک رگرسـیون غیرشرطی مورد ارزیابی قرار گرفت. در آنالیز آماری اطلاعات حاصله از بررسی ژنومی و خونگیری و اطلاعات به‌دست آمـده از پرسـشنامه بیماران از برنامه‌های آماری SSPS ویراست ۱۶ استفاده شـد. مقایـسه غلظت فـولات RBC در سـه گـروه بـر اسـاس ژنوتیـپ MTHFR و تخمین معنادار بودن آماری بین ارقام میانگین در ژنوتیپ‌های مختلف، توسط روش آنالیز واریانس یک طرفـه One-way ANOVA صـورت گرفت. به دلیل وجود عوامل مخدوش‌کننده و همچنین جهت تخمـین ارتباط بین فولات با آدنومای کولورکتال و ارزیابی ارتبـاط فـولات بـا آدنومای کولورکتال بر اسـاس ژنوتیـپ MTHFR، از مـدل Logestic Regression استفاده گردید. جهت تخمین خطر نـسبی ژنوتیـپ‌هـای



[ Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-06 ]

مختلف با آدنومای کولورکتال، نسبت شانس (ODDs Ratio) و حدود اطمینان ۹۵٪ (CI٪۹۵) محاسبه گردید. داده‌های کیفی با آزمون $\chi^2$ مورد ارزیابی قرار داده شد و برای مشخص نمودن اینکه گروه‌های مورد مطالعه از نظر ژنوتیپ‌های مورد بررسی در تعادل با معادله Hardy-Weinberg (H-W) هستند یا خیر، بار دیگر از آزمون آماری $\chi^2$، استفاده گردید.

## یافته‌ها

مقایسه فراوانی سنی و جنسی، وضعیت استعمال دخانیات، انجام تمرینات ورزشی، استفاده از داروهای غیرالتهاب استرووییدی، استفاده از مکمل فولات، سابقه فامیلی ابتلا به سرطان کولورکتال در دو گروه مورد و شاهد اختلاف معنادار آماری را نشان نداد (جدول ۱).

**جدول ۱: مقایسه فراوانی و فراوانی نسبی بیماران مبتلا به پولیپ‌های آدنوماتوز و شاهدهای بیمارستانی از نظر خصوصیات زمینه‌ای**

| | | مورد (n=۱۷۷) | شاهد (n=۳۶۶) | P |
|---|---|---|---|---|
| **سن** (سال)* | ۳۰-۱۵ | ۳۸(٪۲۱/۴۶) | ۷۰(٪۱۹/۱۲) | |
| | ۴۴-۳۱ | ۵۰(٪۲۸/۲۴) | ۱۱۲(٪۳۰/۶۰) | ۰/۱۲۳ |
| | ۴۵ سال و بالاتر | ۸۹(٪۵۰/۲۸) | ۱۸۱(٪۴۹/۴۵) | |
| **جنس**** | مرد | ۱۰۲(٪۵۷/۶۲) | ۱۶۱(٪۴۳/۹۸) | ۰/۰۰۴ |
| | زن | ۷۵(٪۴۲/۳۷) | ۲۰۲(٪۵۵/۱۹) | |
| **وضعیت استعمال دخانیات**** | خیر | ۱۳۳(٪۷۵/۱۴) | ۲۹۴(٪۸۰/۳۲) | ۰/۱۴۳ |
| | بلی | ۴۴(٪۲۴/۸۵) | ۶۹(٪۱۸/۸۵) | |
| **انجام تمرینات ورزشی**** | خیر | ۱۵۸(٪۸۹/۲۶) | ۳۲۷(٪۸۹/۳۴) | ۰/۷۶۴ |
| | بلی | ۱۹(٪۱۰/۷۳) | ۳۶(٪۹/۸۳) | |
| **دریافت الکل**** | خیر | ۱۶۵(٪۹۳/۲۲) | ۳۵۴(٪۹۶/۷۲) | ۰/۰۳ |
| | بلی | ۱۲(٪۹/۷۷) | ۹(٪۲/۴۵) | |
| **مصرف داروی NSAIDs**** | خیر | ۱۵۰(٪۸۴/۷۴) | ۳۰۳(٪۸۲/۷۸) | ۰/۸۰۳ |
| | بلی | ۲۷(٪۱۵/۲۵) | ۵۹(٪۱۶/۱۲) | |
| **استفاده از مکمل فولات**** | خیر | ۱۵۷(٪۸۸/۷۰) | ۳۳۲(٪۹۰/۷۱) | ۰/۳۴۷ |
| | بلی | ۲۰(٪۱۱/۲۹) | ۳۱(٪۸/۴۶) | |
| **سابقه خانوادگی ابتلا به سرطان کولورکتال**** | خیر | ۱۵۹(٪۸۹/۸۳) | ۳۲۶(٪۸۹/۰۷) | ۱/۰۰ |
| | بلی | ۱۸(٪۱۰/۱۶) | ۳۷(٪۱۰/۱۰) | |
| **علل انجام کولونوسکوپی**** | یبوست | ۷۶(٪۴۲/۹۳) | ۱۹۹(٪۵۴/۳۷) | |
| | اسهال | ۵۴(٪۳۰/۵۰) | ۸۰(٪۲۱/۸۷) | |
| | خونریزی از مقعد | ۱۲۸(٪۷۲/۳۱) | ۲۴۴(٪۶۶/۶۶) | |
| | درد شکم | ۷۹(٪۴۴/۶۳) | ۱۸۷(٪۵۰/۰۹) | |
| **غلظت فولات گلبول‌های قرمز خون** (ng/ml)* | | ۱۷۷/۰۶±۷۷/۸۶ | ۱۷۲/۵۶±۷۶/۵۲ | ۰/۹۴۴ |

* آزمون آماری: Independent sample t- test، ** آزمون آماری: $\chi^2$، مقادیر P<۰/۰۵ معنادار می‌باشد.



[ Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-06 ]

**جدول ۲: ارتباط پلی‌مورفیسم C677T ژن آنزیم MTHFR با استعداد ابتلا به آدنومای کولورکتال**

| | مورد (n=۱۷۷) | | شاهد (n=۳۶۳) | | نسبت شانس | ۹۵٪ حدود اطمینان | | P* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | تعداد | درصد | تعداد | درصد | | حد پایین | حد بالا | |
| **CC** | ۶۸ | ۲۲/۱ | ۲۴۰ | ۷۷/۹ | ۱ | – | – | – |
| **CT** | ۹۸ | ۴۹ | ۱۰۲ | ۵۱ | ۳/۳۹ | ۲/۲۶ | ۵/۰۸ | ۰/۰۰۱ |
| **TT** | ۱۱ | ۳۴/۴ | ۲۱ | ۵۶/۶ | ۱/۸۵ | ۰/۷۶ | ۴/۲۴ | ۰/۱۲ |

* آزمون آماری: Logestic Regression MTHFR=Methylenetetrahydrofolate Reductase

**جدول ۳: مقایسه میانگین غلظت فولات گلبول قرمز خون بر حسب پلی‌مورفیسم ژن آنزیم C677T (MTHFR)**

| | TT (n=۳۲) | CT (n=۲۰۰) | CC (n=۳۰۸) | مجموع (n=۵۴۰) | P* |
|---|---|---|---|---|---|
| فولات RBC (ng/ml) | ۱۶۸/۴۴±۵۶/۵۹ | ۱۷۴/۰۳±۷۶/۰۹ | ۱۷۲/۳۳±۷۹/۸۳ | ۱۷۲/۷۳±۷۷/۱۶ | ۰/۹۲۲ |

آزمون آماری: آنالیز واریانس یک طرفه (One-way ANOVA)

**جدول ٤: ارتباط آدنومای کولورکتال و غلظت فولات گلبول قرمز خون بر حسب ژنوتیپ آنزیم متیلن تتراهیدروفولات ردوکتاز**

| متغیر | مورد (تعداد) | شاهد (تعداد) | نسبت شانس | ۹۵٪ حدود اطمینان | | P* |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | حد پایین | حد بالا | |
| **CC کم‌خطر** | ۴۲ | ۱۴۹ | ۱ | ۰/۵۶۷ | ۱/۷۱ | ۱/۰۰ |
| **CC پرخطر** | ۲۶ | ۹۱ | ۰/۰۱ | | | |
| **CT کم‌خطر** | ۶۳ | ۶۱ | ۱ | ۰/۶۸۳ | ۲/۱۴ | ۰/۵۶۱ |
| **CT پرخطر** | ۳۵ | ۴۱ | ۰/۸۲ | | | |
| **TT کم‌خطر** | ۶ | ۱۵ | ۱ | ۰/۱۰۵ | ۲/۱۹۱ | ۰/۴۴۲ |
| **TT پرخطر** | ۵ | ۶ | ۲/۰۸ | | | |

* آزمون آماری: Logestic Regression، CC: ژنوتیپ هموزیگوت سالم، CT کم خطر: فولات گلبول قرمز بیش از ۱۴۰ ng/ml، CT پرخطر: فولات گلبول قرمز کمتر از ۱۴۰ ng/ml، CT: ژنوتیپ هتروزیگوت، TT: ژنوتیپ هموزیگوت جهش یافت

میانگین غلظت فولات گلبول قرمز در گروه مورد از شاهد بیشتر بود اما این اختلاف از لحاظ آماری معنادار نبود (P=۰/۹۴۴). مقایسه تک متغیره نسبت شانس با حدود اطمینان ۹۵٪ بیماران مبتلا به پولیپ‌های آدنوماتوز و افراد سالم از نظر پلی‌مورفیسم ژن آنزیم متیلن تتراهیدروفولات ردوکتاز در موقعیت ۶۷۷ در جدول ۲ نشان داده شده است. ۳۰۸ نفر از شرکت‌کنندگان در مطالعه دارای ژنوتیپ CC بودند، ۲۰۰ نفر ژنوتیپ CT و ۳۲ نفر دارای ژنوتیپ TT بودند. درصد فراوانی ژنوتیپ TT در موردها و شاهدها به ترتیب ۳۴/۴٪ و ۵۶/۶٪ بود، درصد فراوانی ژنوتیپ CT در موردها و شاهدها به ترتیب ۴۹٪ و ۵۱٪ و درصد فراوانی ژنوتیپ CC در موردها و شاهدها به ترتیب ۲۲/۱٪ و۷۷/۹٪ بود، همچنین توزیع فراوانی ژنوتیپ TT آنزیم متیلن تتراهیدروفولات ردوکتاز در جمعیت مورد مطالعه ما نسبت به دو ژنوتیپ دیگر یعنی ژنوتیپ CT و ژنوتیپ CC، کمتر است و توزیع فراوانی این ژنوتیپ در افراد مورد در مقایسه با



[ Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-06 ]

شاهد کمتر بود. بر اساس جدول ۲، رابطه آدنومای کولورکتال و پلی مورفیسم CT، ژن آنزیم C677T MTHFR در گروه مورد و شاهد در سطح آماری ۵٪ ارتباط معناداری بین ژنوتیپ‌ها و آدنومای کولورکتال دیده شد (P=۰/۰۰۱).

به گونه‌ای که شانس افراد با ژنوتیپ CT، ۳/۳۹ برابر شانس افراد با ژنوتیپ CC بود. همچنین با توجه به جدول فوق، شانس افراد با ژنوتیپ TT، ۱/۸۵ برابر شانس افراد با ژنوتیپ CC بود. میانگین غلظت فولات گلبول قرمز خون بر حسب ژنوتیپ‌های آنزیم C677T MTHFR بررسی شد (جدول ۳). تفاوت میانگین غلظت فولات RBC در ژنوتیپ‌های TT، CT، CC از لحاظ آماری در سطح ۵٪ معنادار نبودند، با این حال افراد با ژنوتیپ TT نسبت به دو گروه دیگر میانگین غلظت فولات آنها، کمتر بود.

نسبت شانس آدنومای کولورکتال و غلظت فولات گلبول قرمز خون بر حسب ژنوتیپ آنزیم C677T MTHFR را بر اساس گروه پر خطر (فولات کمتر از ۱۴۰ ng/ml) و کم خطر (فولات بیشتر از ۱۴۰ ng/dl)، در سطح آماری ۵٪ در جدول ۴ نشان داده شده است. در افراد با ژنوتیپ TT، شانس ابتلا به آدنومای کولورکتال در افرادی که سطوح فولات کمتر از ۱۴۰ ng/ml (پرخطر) داشتند، ۲/۰۸ برابر، افرادی بود که سطوح فولات آنها بیشتر از ۱۴۰ ng/ml (کم خطر) بود.

## بحث

فرایند متیلاسیون DNA یک پدیده اولیه در فرایند کارسینوژنزیس کولورکتال است و فولات به دلیل شرکت در فرایند متیلاسیون، با حوادث اولیه کارسینوما کولورکتال ارتباط دارد.[۲۲] مطالعاتی که بر هم کنش ژن- محیط را بررسی می‌نمایند، بسیار حایز اهمیت می‌باشند، زیرا می‌توانند اتیولوژی سرطان و فاکتورهایی قابل کنترل در پیشگیری از سرطان، را مشخص نمایند.[۲۳] تعیین ژنوتیپ آنزیم کلیدی MTHFR دقیقترین روش ارزیابی ارتباط فولات و آدنومای کولورکتال است زیرا بیانگر ارتباط بین فاکتورهای ژنتیکی و محیطی در مراحل اولیه فرایند کارسینوزنزیس می‌باشد.[۲۴] همچنین مطالعه آدنومای کولورکتال در مقایسه با کارسینوما کولورکتال مقدم‌تر است، زیرا افراد مبتلا به آدنومای کولورکتال علایم بیماری ندارند و در نتیجه تغییر رژیم غذایی و در پی آن تغییر در پروفایل‌های خونی مواد مغذی در آنها اتفاق نمی‌افتد. همچنین فرایند ایجاد آدنوما، بر سطوح مواد مغذی خون اثر اندکی دارد[۲۵] و در نهایت، زمان لازم برای القا آدنوما کمتر و کوتاه‌تر از زمان لازم برای ایجاد کارسینوما می‌باشد.

بر اساس نتایج به‌دست آمده در مطالعه حاضر، اختلاف میانگین غلظت فولات گلبول قرمز خون در دو گروه مبتلا به آدنومای کولورکتال و افراد سالم اختلاف آماری معناداری در سطح ۵٪ وجود نداشت. غلظت فولات گلبول قرمز در موردها بیشتر از شاهدها بود که یافته اخیر با نتایج برخی مطالعات[۲۹-۲۶] هماهنگی داشت در حالی که نتایج مطالعه Molloy و همکاران مشابه یافته‌های مطالعه حاضرنبود.[۳۰]

در مطالعه حاضر ارتباط خطر بین آدنومای کولورکتال و پلی‌مورفیسم ژن آنزیم متیلن تتراهیدروفولات ردوکتاز C677T بررسی گردید. که بر اساس یافته‌های این پژوهش، ژنوتیپ TT به‌عنوان یک عامل خطر برای آدنومای کولورکتال محسوب می‌شود و در توزیع فراوانی ژنوتیپ‌های مختلف ژن آنزیم متیلن تتراهیدروفولات C677T در گروه‌های تحت مطالعه، اختلاف معناداری در سطح آماری ۵٪ مشاهده گردید (P<۰/۰۰۱).

بنابر مطالعات انجام گرفته در زمینه ارتباط پلی‌مورفیسم ژن آنزیم متیلن تتراهیدروفولات ردوکتاز C677T و آدنومای کولورکتال، یافته‌های مطالعه حاضر مشابه یافته‌های مطالعه Marugame و همکاران می‌باشد[۳۱] که نتایج به دست آمده از این مطالعه خطر آدنومای کولورکتال در افراد با ژنوتیپ TT ۱/۱۷ برابر بیشتر از افرادی با ژنوتیپ CC گزارش نموده بود (OR=۱/۱۷ ،CI٪۹۵=۰/۶۱-۲/۲۳). همچنین می‌توان به مطالعات Marugame, Slattery, Chen, Ulrich نیز اشاره نمود که با هدف ارزیابی ارتباط پلی‌مورفیسم ژن آنزیم متیلن تتراهیدروفولات رودوکتاز C677T و خطر آدنومای کولورکتال، به این نتیجه دست یافتند که ژنوتیپ TT یک عامل خطر برای آدنومای کولورکتال است.[۱۸و۲۴و۲۵و۳۲]

یافته‌های بعضی از پژوهش‌های نشان می‌دهد که ژنوتیپ TT یک اثر محافظتی در برابر آدنومای کولورکتال دارد که با نتایج مطالعه ما هماهنگی نداشت[۳۲و۳۳] و برخی مطالعات نیز در کشورهای حوزه کارائیب رابطه‌ای مشاهده نکرده‌اند.[۲۷] عدم دیدن رابطه محافظتی در مطالعه اخیر نسبت به مطالعاتی که رابطه محافظتی را بیان کرده‌اند،



[ Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-06 ]

این است که در این مطالعه فراوانی ژنوتیپ TT (۱۲٪) در مقایسه با مطالعه van der Put و همکاران[۲۷] (۱۸٪)، کمتر بود. همچنین اکثر این مطالعات رابطه محافظتی بین پلی‌مورفیسم جهش یافته آنزیم متیلن تتراهیدروفولات را با پولیپ‌های آدنوماتوزی مشاهده نمودند که پولیپ‌ها در ناحیه کولون پروگزیمال مستقر بودند، اما در مطالعه حاضر پولیپ‌ها آدنوماتوز در قسمت دیستال کولون بودند. پولیپ‌های آدنوماتوز موجود در قسمت پروگزیمال کولون سبب هایپرمتیلاسیون ژن‌هایی چرخه سلولی و ژن‌های ترمیم‌کننده می‌گردند و منجر به Microsatellite Instability (MSI) می‌شوند.[۳۴] درحالی که پولیپ‌های آدنوماتوز موجود در کولون دیستال با هایپومتیلاسیون و عدم استحکام کروموزومی ارتباط دارد.[۳۵]

در نگاهی به مکانیسم ارتباط معکوس ژنوتیپ TT و آدنومای کولورکتال باید عنوان گردد که اختلال در سنتز DNA و کاهش متیلاسیون DNA، دو مکانیسم مرتبط با فرایند کارسینوژنزیس می‌باشد. بنابراین کاهش متیلاسیون و تشکیل آدنوما هر دو از حوادث اولیه کارسینوزنزیس کولورکتال می‌باشند. متیلن تتراهیدروفولات ردوکتاز یک آنزیم کلیدی در متابولیسم تک کربنی است که سنتز و متیلاسیون DNA را کنترل می‌نماید. پلی‌مورفیسم C677T ژن آنزیم متیلن تتراهیدروفولات سبب کاهش فعالیت این آنزیم می‌گردد، به گونه‌ای که افرادی که تنها یک آلل آنها دچار جهش شود (افراد با ژنوتیپ CT)، فعالیت آنزیمشان ۶۵٪ افراد نرمال می‌باشد و افرادی که هر دو آلل آنها دچار جهش شود (افراد با ژنوتیپ TT) فعالیت آنزیمشان ۳۰٪ افراد نرمال با ژنوتیپ CC است.[۳۶]

در بررسی عملکرد بیوشیمیایی آنزیم متیلن تتراهیدروفولات دیده می‌شود که این آنزیم، سوبسترای ۵، ۱۰- متیلن تتراهیدروفولات را به ۵- متیل تتراهیدروفولات تبدیل می‌کند که به‌عنوان عامل دارنده متیل سبب تبدیل شدن هموسیستئین به متیونین می‌گردد و متیونین گروه متیل را برای متیلاسیون بسیاری از واکنش‌ها از طریق S-آدنوزیل متیونین (SAM) فراهم می‌کند، اما زمانی که در این آنزیم جهش نقطه‌ای اتفاق بیافتد، فعالیت آنزیم بسیار اندک می‌شود، بنابراین ۵، ۱۰- متیلن تتراهیدروفولات در مقادیر کمتری به ۵- متیل تتراهیدروفولات تبدیل می‌گردد که در پی آن، میزان متیلاسیون کاهش می‌یابد. همچنین در افراد با ژنوتیپ TT فولات بیشتر به شکل فرمیل (به جای متیل) تتراهیدروفولات می‌باشد[۳۶] که با افزایش خطر آدنومای کولورکتال نیز همراه است.

اثرات محافظتی ژنوتیپ TT آنزیم MTHFR در کارسینوژنزیس کولورکتال تنها در مراحل پایانی فرایند کارسینوژنزیس دیده می‌شود زیرا با کاهش فراهمی ۵- متیل تتراهیدروفولات برای سلول‌های کولون و ایجاد عدم تعادل نوکلئوتیدی سبب کاهش تقسیم سلولی می‌گردد، اما هر pbt کاهش در میزان متیلاسیون حال چه به دلیل کاهش غلظت پایین ۵- متیل تتراهیدروفولات یا به دلیل کاهش فعالیت آنزیم MTHFR در نتیجه جهش، در مراحل اولیه فرایند کارسینوژنزیس کولورکتال می‌تواند سبب آغاز روند بدخیمی باشد. همچنین با آغاز روند تبدیل شدن پولیپ‌های آدنوماتوز به سلول‌های کارسینوژن متاستاتیک، تکثیر و پرولیفراسیون سلول‌های کولون سرعت می‌یابد و عدم تعادل در ذخایر نوکلئوتیدی و افزایش جایگزینی نادرست dUMP (که نوکلئوتید محدود برای سنتز DNA است) به جای dTMP اتفاق می‌افتد.[۲۳] این در حالی است که ژنوتیپ CC آنزیم MTHFR، سوبسترای خود را (متیلن) به سمت تولید بیشتر تیمیدیلات و پورین‌ها هدایت می‌کند و مانع جایگزینی dUMP در توالی DNA می‌گردد.

زمانی که پولیت‌های آدنوماتوز توانایی تبدیل شدن به کارسینوم متاستاتیک را یافتند دو عامل (ژنوتیپ آنزیم MTHFR و میزان فراهمی فولات) می‌تواند در پیشگیری از ادامه روند موثر باشد. با توجه به نتایج به‌دست آمده میانگین غلظت ۵- متیل تتراهیدروفولات گلبول قرمز خون در افراد TT از دو گروه دیگر (ژنوتیپ CC و ژنوتیپ CT) کمتر بود. همان‌طور که در جدول ۵ دیده می‌شود، رابطه محافظتی بین فولات گلبول قرمز و آدنومای کولورکتال با ژنوتیپ TT، تنها در افرادی دیده می‌شود که سطوح فولات گلبول قرمز خون آنها بالاتر از ng/ml ۱۴۰ باشد. نتایج مطالعه حاضر، با نتایج مطالعات[۱۸و۲۴و۳۷و۳۸] همخوانی دارد ولی پژوهش‌هایی[۲۰و۳۹و۴۰] نیز ارتباط محافظتی را بیان نکردند.

ارتباط بین سطوح فولات گلبول قرمز و آدنومای کولورکتال توسط پلی‌مورفیسم ژن آنزیم متیلن تتراهیدروفولات ردوکتاز مکانیسم پیچیده‌ای دارد. همان‌طور که عنوان گردید MTHFR می‌تواند در دو فرایند متیلاسیون و سنتز نوکلئوتیدی نقش داشته باشد.[۴۱] در متابولیسم فولات، فعالیت MTHFR یک مرحله محدودکننده در توزیع گروه متیل برای فعالیت ترانس متیلاسیون یا سنتز نوکلئوتید است.[۲۵] جهش



[ Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-06 ]

در ژن آنزیم متیلن تتراهیدروفولات C→T سبب کاهش فعالیت آنزیم و تغییر در توزیع فولات در درون سلول می‌گردد به گونه‌ای که سوبسترای آنزیم یعنی متیلن تتراهیدروفولات در درون سلول تجمع می‌یابد و در پی آن میزان رشد سلول شتاب می‌گیرد، زیرا فعالیت تیمیدیلات سنتاز (TS) افزایش می‌یابد.[۴۲]

کاهش میزان غلظت ۵- متیل تتراهیدروفولات گلبول‌های قرمز خون و کاهش میزان ۵، ۱۰- متیلن تتراهیدروفولات (که برای حفظ اندوخته نوکلئوتیدی لازم است)، با افزایش نسبت SAM به S-آدنوزیل هیدروسیستیین در بافت‌هایی نظیر کولون همراه است که این افزایش نسبت، سبب سریعتر شدن و افزایش تقسیم سلول‌های کولون می‌گردد و پیامدهای نامناسبی بر جا می‌گذارد.[۴۳و۴۴] در افراد با ژنوتیپ TT زمانی که میزان غلظت ۵- متیل تتراهیدروفولات گلبول‌های قرمز خون بالا باشد، علی‌رغم کاهش فعالیت آنزیمِ متیلن تتراهیدروفولات در تبدیل فرم متیلن فولات به فرم متیل، ۵، ۱۰- متیلن تتراهیدروفولات در درون سلول جمع می‌گردد و سبب افزایش سنتز نوکلئوتیدها می‌شود و همچنین متیلاسیون، کمتر تحت تاثیر افت فعالیت آنزیم قرار گیرد[۱۸] زیرا غلظت ۵- متیل تتراهیدروفولات گلبول‌های قرمز خون بالا است. اما زمانی که در افراد هموزیگوت جهش یافته میزان غلظت ۵- متیل تتراهیدروفولات گلبول‌های قرمز خون کاهش یابد، هایپومتیلاسیون DNA اتفاق می‌افتد زیرا سطوح ۵-متیل تتراهیدروفولات کم می‌باشد و در پی آن سنتز متیونین کاهش می‌یابد.[۱۸] بنابراین افزایش خطر آدنومای کولورکتال در این افراد زمانی بیشتر است که غلظت ۵- متیل تتراهیدروفولات گلبول‌های قرمز خون از حد نرمال کمتر باشد، زیرا هم سنتز DNA دچار اختلال می‌شود و هم وضعیت متیلاسیون DNA تغییر می‌کند.[۳۲]

در مجموع این مطالعه نشان داد پلی‌مورفیسم ژنتیکی آنزیم متیلن تتراهیدروفولات در متابولیسم فولات بر رشد آدنومای کولورکتال اثر می‌گذارد.

*سپاسگزاری:* این پژوهش برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد با شماره طرح پژوهشی ۸۷- ۴۹۴ مصوب شورای تحصیلات تکمیلی دانشگاه علوم پزشکی شیراز تامین اعتبار گردید. در اجرای این پژوهش، پژوهشگاه غدد و متابولیسم بیمارستان نمازی، آزمایشگاه بیمارستان نمازی، بخش آندوسکوپی- کولونوسکوپی بیمارستان شهید فقیهی و آزمایشگاه ژنتیک پزشکی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز همکاری داشته‌اند که نویسندگان این مقاله، به این وسیله مراتب تقدیر و تشکر را اعلام می‌دارند.

## References

1. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61(5):759-67.
2. Walther A, Johnstone E, Swanton C, Midgley R, Tomlinson I, Kerr D. Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 2009;9(7):489-99.
3. Sweetser S, Smyrk TC, Sinicrope FA. Serrated colon polyps as precursors to colorectal cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2013;11(7):760-7; quiz e54-5.
4. Foroutan M, Rahimi N, Tabatabaeifar M, Darvishi M, Hashemi M, Hossein-Panah F, et al. Clinical features of colorectal cancer in Iran: a 15-year review. *J Dig Dis* 2008;9(4):225-7.
5. Cunningham D, Atkin W, Lenz HJ, Lynch HT, Minsky B, Nordlinger B, et al. Colorectal cancer. *Lancet* 2010M;375(9719):1030-47.
6. Sharma M, Li L, Celver J, Killian C, Kovoor A, Seeram NP. Effects of fruit ellagitannin extracts, ellagic acid, and their colonic metabolite, urolithin A, on Wnt signaling. *J Agric Food Chem* 2010;58(7):3965-9.
7. Safaee A, Fatemi SR, Ashtari S, Vahedi M, Moghimi-Dehkordi B, Zali MR. Four years incidence rate of colorectal cancer in Iran: a survey of national cancer registry data - implications for screening. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012;13(6):2695-8.
8. Mahmodlou R, Mohammadi P, Sepehrvand N. Colorectal cancer in northwestern iran. *ISRN Gastroenterol* 2012;2012:968560.
9. Malekzadeh R, Bishehsari F, Mahdavinia M, Ansari R. Epidemiology and molecular genetics of colorectal cancer in iran: a review. *Arch Iran Med* 2009;12(2):161-9.
10. Hosseini SV, Izadpanah A, Yarmohammadi H. Epidemiological changes in colorectal cancer in Shiraz, Iran: 1980-2000. *ANZ J Surg* 2004;74(7):547-9.
11. Araújo JR, Gonçalves P, Martel F. Chemopreventive effect of dietary polyphenols in colorectal cancer cell lines. *Nutr Res* 2011;31(2):77-87.
12. Pin AL, Houle F, Huot J. Recent advances in colorectal cancer research: the microenvironment impact. *Cancer Microenviron* 2011;4(2):127-31.
13. World Cancer Research Fund. American Institute for Cancer Research. Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective. Washington DC: AICR, 1997.
14. Novakovic P, Stempak JM, Sohn KJ, Kim YI. Effects of folate deficiency on gene expression in the apoptosis and cancer pathways in colon cancer cells. *Carcinogenesis* 2006;27(5):916-24.
15. Ohrvik VE, Witthoft CM. Human folate bioavailability. *Nutrients* 2011;3(4):475-90.
16. Uthus EO, Ross SA, Davis CD. Differential effects of dietary selenium (se) and folate on methyl metabolism in liver and colon of rats. *Biol Trace Elem Res* 2006;109(3):201-14.



[ Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-06 ]

17. Hazra A, Selhub J, Chao WH, Ueland PM, Hunter DJ, Baron JA. Uracil misincorporation into DNA and folic acid supplementation. *Am J Clin Nutr* 2010;91(1):160-5.
18. Marugame T, Tsuji E, Kiyohara C, Eguchi H, Oda T, Shinchi K, et al. Relation of plasma folate and methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism to colorectal adenomas. *Int J Epidemiol* 2003;32(1):64-6.
19. Bollheimer LC, Buettner R, Kullmann A, Kullmann F. Folate and its preventive potential in colorectal carcinogenesis. How strong is the biological and epidemiological evidence? *Crit Rev Oncol Hematol* 2005;55(1):13-36.
20. van den Donk M, Buijsse B, van den Berg SW, Ocké MC, Harryvan JL, Nagengast FM, et al. Dietary intake of folate and riboflavin, MTHFR C677T genotype, and colorectal adenoma risk: a Dutch case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14(6):1562-6.
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. *Nat Genet* 1995;10(1):111-3.
22. Figueiredo JC, Mott LA, Giovannucci E, Wu K, Cole B, Grainge MJ, et al. Folic acid and prevention of colorectal adenomas: a combined analysis of randomized clinical trials. *Int J Cancer* 2011;129(1):192-203.
23. Osian G, Procopciuc L, Vlad L. MTHFR polymorphisms as prognostic factors in sporadic colorectal cancer. *J Gastrointestin Liver Dis* 2007;16(3):251-6.
24. Slattery ML, Potter JD, Samowitz W, Schaffer D, Leppert M. Methylenetetrahydrofolate reductase, diet, and risk of colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999;8(6):513-8.
25. Chen J, Giovannucci EL, Hunter DJ. MTHFR polymorphism, methyl-replete diets and the risk of colorectal carcinoma and adenoma among U.S. men and women: an example of gene-environment interactions in colorectal tumorigenesis. *J Nutr* 1999;129(2S Suppl):560S-564S.
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(7):657-63.
27. van der Put NM, Steegers-Theunissen RP, Frosst P, Trijbels FJ, Eskes TK, van den Heuvel LP, et al. Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. *Lancet* 1995;346(8982):1070-1.
28. Deloughery TG, Evans A, Sadeghi A, McWilliams J, Henner WD, Taylor LM Jr, et al. Common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. Correlation with homocysteine metabolism and late-onset vascular disease. *Circulation* 1996;94(12):3074-8.
29. Christensen B, Frosst P, Lussier-Cacan S, Selhub J, Goyette P, Rosenblatt DS, et al. Correlation of a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene with plasma homocysteine in patients with premature coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17(3):569-73.
30. Molloy AM, Daly S, Mills JL, Kirke PN, Whitehead AS, Ramsbottom D, et al. Thermolabile variant of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase associated with low red-cell folates: implications for folate intake recommendations. *Lancet* 1997;349(9065):1591-3.
31. 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(2):181-6.
32. Ulrich CM, Kampman E, Bigler J, Schwartz SM, Chen C, Bostick R, et al. Colorectal adenomas and the C677T MTHFR polymorphism: evidence for gene-environment interaction? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999;8(8):659-68.
33. Kelemen LE, Anand SS, Hegele RA, Stampfer MJ, Rosner B, Willett WC, et al. Associations of plasma homocysteine and the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism with carotid intima media thickness among South Asian, Chinese and European Canadians. *Atherosclerosis* 2004;176(2):361-70.
34. Powers HJ. Interaction among folate, riboflavin, genotype, and cancer, with reference to colorectal and cervical cancer. *J Nutr* 2005;135(12 Suppl):2960S-2966S.
35. Toffoli G, Gafà R, Russo A, Lanza G, Dolcetti R, Sartor F, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase 677 C-->T polymorphism and risk of proximal colon cancer in north Italy. *Clin Cancer Res* 2003;9(2):743-8.
36. Ulrich CM, Kampman E, Bigler J, Schwartz SM, Chen C, Bostick R, et al. Lack of association between the C677T MTHFR polymorphism and colorectal hyperplastic polyps. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9(4):427-33.
37. Brockton NT. Localized depletion: the key to colorectal cancer risk mediated by MTHFR genotype and folate? *Cancer Causes Control* 2006;17(8):1005-16.
38. Hubner RA, Muir KR, Liu JF, Sellick GS, Logan RF, Grainge M, et al. Folate metabolism polymorphisms influence risk of colorectal adenoma recurrence. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15(9):1607-13.
39. 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(6):1098-102.
40. 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(10):970-9.
41. Van Guelpen B, Hultdin J, Johansson I, Hallmans G, Stenling R, Riboli E, et al. Low folate levels may protect against colorectal cancer. *Gut* 2006;55(10):1461-6.
42. Giovannucci E. Epidemiologic studies of folate and colorectal neoplasia: a review. *J Nutr* 2002;132(8 Suppl):2350S-2355S.
43. Le Marchand L, Wilkens LR, Kolonel LN, Henderson BE. The MTHFR C677T polymorphism and colorectal cancer: the multiethnic cohort study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14(5):1198-203.
44. James SJ, Yin L, Swendseid ME. DNA strand break accumulation, thymidylate synthesis and NAD levels in lymphocytes from methyl donor-deficient rats. *J Nutr* 1989;119(4):661-4.



[ Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-06 ]

TUMJ monthly Tehran University Medical Journal
*Tehran University Medical Journal, November 2014; Vol. 72, No. 8: 515-525* *Original Article*

# Relation of red blood cell's folate and methylenetetrahedrofolate reductase C677T polymorphism to colorectal adenoma

Zohreh Mazloom Ph.D.[1*]
Seyed Mohammad Bagher Tabei Ph.D.[2]
Salmeh Bahmanpour Ph.D. Candidate[1]
Hamid Reza Tabatabaee M.Sc.[3]
Mahvash Alizadeh Naeni M.D.[4]

*1- Department of Clinical Nutrition, School of Nutrition and Food Sciences Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.*
*2- Department of Medical Genetics, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.*
*3- Department of Epidemiology, School of Health, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.*
*4- Department of Gastroenterology, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.*

[*] Corresponding author: Department of Clinical Nutrition, School of Nutrition and Food Sciences Shiraz University of Medical Sciences, Razi Blvd., Shiraz, Iran.
Tel: +98- 71-36314923
E-mail: zmazloom@susms.ac.ir

## Abstract

Received: 30 May. 2014 Accepted: 21 Sep. 2014 Available online: 11 Nov. 2014

***Background*:** Red Blood Cell's (RBC)'s folate may be related to decreased risk of colorectal adenoma. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) is a key regulatory enzyme in folate metabolism. The MTHFR C677T polymorphism is located in the Exon 4 region and is associated with the change of folate level. This study evaluated the associations between RBC's Folate levels and colorectal adenoma risk, taking into account whether this associations is modified by MTHFR Polymorphism.

***Methods*:** In a case-control study conducted from January to October 2007 in Endoscopy-Colonoscopy ward of Shahid Faghihi Hospital, Shiraz. Participants were 177 case of colorectal adenoma who had pathologic-confirmed adenomatous polyps in full colonoscopy examination and 366 controls without polyps in full colonoscopy. Fasting venous blood were drawn from patients in order to determine RBC's folate and to identify the MTHFR polymorphism by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) technique.

***Results*:** Gender Distribution in the patient group were 57.6% male and 42.3% female and control group consisted of 55.1% male and 43.9% female. 50.2% of cases and 49.2% of controls were in the age group "45 years and above". The T allele frequency was 56.6% in control group and 34.4% in colorectal adenoma patients. There was a significant association between T allele in -677 position of MTHFR gene and colorectal adenoma susceptibility (OR: 1.85, 95% CI: 0.76-4.24, P<0.001). Mean concentration of RBC's folate was not statistically significant among three groups with TT genotype (mutation homozygote), CT genotype (heterozygote), and CC genotype (wild-type homozygote) (P>0.05) but mean concentration of RBC's folate was the lowest in TT genotype compare with two other genotype. Odd's Ratio for low (<140ng/ml) versus high level of RBC's folate in participants with TT genotype was (OR: 2.08, 95% CI: 0.10-2.19, P<0.05) as compare with the CC ones.

***Conclusion:*** The result of this study suggested an inverse association between RBC's folate concentration and colorectal adenomas risk, which may be more relevant for those with the MTHFR TT genotype.

***Keywords:*** colorectal adenomatous polyposis, folic acid, genetic polymorphism, methylenetetrahydrofolate reductase (NADPH2).



[ Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-06 ]