

## بررسی ژنتیپ G1793A در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال اسپورادیک

دکتر مهدی منتظرحقیقی<sup>۱\*</sup>، دکتر سید رضا ممبی<sup>۲</sup>، محسن وامدی<sup>۳</sup>، دکتر محمد رضا زالی<sup>۴</sup>

۱. دکتری تخصصی ژنتیک، محقق، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۲. دانشجوی دکتری بیوشیمی، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۳. دکتری ویروس‌شناسی، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۴. دانشجوی دکتری آمار، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۵. استاد، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

### چکیده

**سابقه و هدف:** سرطان کولورکتال از شایع‌ترین سرطان‌های کشنده در کشورهای صنعتی میان زنان و مردان است که دومین عامل مرگ‌های حاصل از سرطان در آمریکا می‌باشد. آنژیم ۱۰ و ۵ متیلن تراهیدروفولات ردوکتاز (MTHFR) که توسط ژن MTHFR ساخته می‌شود، در متیلاسیون، سنتز و ترمیم DNA نقش دارد. علاوه بر آن این آنژیم نقش مهمی در متابولیزم فولات بر عهده دارد. در این تحقیق پلی‌مورفیسم ژن MTHFR (1793G>A) در افراد مبتلا به سرطان کولورکتال مورد بررسی قرار گرفته است.

**مواد و روش‌ها:** این مطالعه یک مطالعه توصیفی است که در آن، ژنتیپ ۲۲۷ بیمار مبتلا به سرطان کولورکتال با استفاده از روش Pyrosequencing PCR مورد ارزیابی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** فراوانی ژنتیپ‌های GG و AA در بین افراد مبتلا، به ترتیب ۳/۹۸٪ و ۱/۷٪ و صفر درصد بود. متوسط سن مبتلایان ۶۸/۳ سال بود؛ به طوری که در افراد دارای ژنتیپ GG، ۶۹/۱ سال و در مبتلایان با ژنتیپ GA، ۶۶/۸ سال تعیین گردید. هیچ فرد مبتلایی با ژنتیپ AA دیده نشد و ۱/۷٪ افراد مبتلا ژنتیپ GA داشتند، در حالی که افراد مبتلا به سرطان کولورکتال (۳/۹۸٪) در ایاری ژنتیپ GG بودند.

**نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد که ژنتیپ A>G در بروز سرطان کولورکتال نقش داشته باشد. تحقیقات بیشتر در این زمینه توصیه می‌شود.

**واژگان کلیدی:** سرطان غیرفامیلی کولورکتال، آنژیم متیلن تراهیدروفولات ردوکتاز، پلی‌مورفیسم، Pyrosequencing، rs2274976

### مقدمه<sup>۱</sup>

غیراراثی (Sporadic) می‌باشد. ۸۰٪ موارد به صورت اسپورادیک هستند در حالی که ۲۰٪ بقیه الگوی توارثی دارند.<sup>(۴)</sup>

همانند سایر سرطان‌ها، فاكتورهای محیطی و ژنتیکی زیادی در ایجاد این بیماری دخیل هستند. احتمالاً سرطان کولورکتال غیرفامیلی با پلی‌مورفیسم‌های موجود در لوکوس‌های ژن‌ها در ارتباط است. یکی از شایع‌ترین انواع پلی‌مورفیسم‌هایی که امروزه در بیشتر مراکز تحقیقاتی جهان برای تعیین ارتباط آنها با سرطان‌ها و بیماری‌های گوناگون مورد مطالعه قرار می‌گیرند، چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی SNPs یا (Single Nucleotide Polymorphisms)

سرطان کولورکتال سومین سرطان شایع در دنیا می‌باشد و دومین سرطانی است که منجر به بیشترین میزان مرگ و میر ناشی از سرطان، در سراسر دنیا می‌شود. سالانه ۶۵۵۰۰۰ نفر در دنیا در اثر ابتلابه این بیماری از بین می‌رونند و شیوع آن در یک قرن گذشته روند رو به رشدی را نشان داده است (۱ و ۲). بروز این سرطان در ایران نیز در سه دهه گذشته افزایش داشته است و مشکلی جدی برای سلامت جامعه ما به شمار می‌آید (۳). این سرطان دارای دو نوع ارثی (Familial) و

\*نویسنده مسئول مکاتبات: دکتر مهدی منتظرحقیقی؛ تهران، اوین، بیمارستان طالقانی، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد؛ پست الکترونیک: mah\_montazer@yahoo.com

تحقیقات گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تصویب شد و مورد استفاده قرار گرفت. از تمامی بیماران ۱۰ میلی لیتر خون محیطی جهت انجام آزمایش‌های ژنتیکی گرفته شد.

**انتخاب SNP:** با بررسی SNP‌ها در زن MTHFR با استفاده از بانک اطلاعاتی محتوی اطلاعات مربوط به فرکانس SNP500Cancer SNP‌ها مانند (<http://snp500cancer.nci.nih.gov/>) و سایت اختصاصی پروژه بین‌المللی (<http://www.hapmap.org>) Hap Map SNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>) dbSNP این SNP انتخاب شد (۱۱) که یک SNP مهم با شماره دسترسی rs2274976 در اگزون ۱۱ این زن می‌باشد که در سال ۲۰۰۲ برای اولین بار در دنیا تعیین شد (۱۲ و ۱۳) و هتروزیگوستی آن ۰/۱۲۶ می‌باشد.

**واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR):** با استفاده از DNA استخراج شده از خون محیطی (با استفاده از روش استاندارد فل - کلروفرم) (۱۴)، ناحیه مورد نظر از زن MTHFR (شماره دستیابی زن ۰۰۰۰۰۱ NC-000001) توسط یک جفت پرایمر که یکی از آنها (پرایمر فوروارد) بیوتینه شده بود، تکثیر یافت. مشخصات مربوط به پرایمراهای ۱ آمده است. شرایط PCR برای یک واکنش با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر به این شرح بود: یک میکرولیتر از DNA ژنومی (۱۰۰ نانوگرم)، pM ۲۰ از هر پرایمر، ۰/۲ mM dNTP، ۲ mM MgCl<sub>2</sub> و ۰/۲ U/μl Ampli taq Gold پلیمراز.

PCR با برنامه زیر انجام گرفت:

زمان	دما
۹۴ دقیقه	۹۴ درجه سانتی گراد
۳۰ ثانیه	۹۴ درجه سانتی گراد
۴۵ دقیقه	۵۹ درجه سانتی گراد
۴۵ دقیقه	۷۲ درجه سانتی گراد
۱۰ دقیقه	۷۲ درجه سانتی گراد

آنژیم ۵ و ۱۰ متیلن تراهیدروفولات ردوکتاز که توسط زن (5,10-methylenetetrahydrofolate reductase) MTHFR کد می‌شود، نقش مهمی در ایجاد ارتباط بین چرخه ساخت و متیلاسیون DNA دارد (۵-۹).

فعالیت MTHFR سبب تبدیل ۵ و ۱۰ متیلن تراهیدروفولات به ۵ متیلن تراهیدروفولات می‌شود که ماده اول به عنوان سوبسترا برای سنتز DNA لازم است؛ در حالی که دومین ماده در متیلاسیون DNA نقش دارد.

زن MTHFR یک زن پلی‌مورفیک می‌باشد و پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی متنوعی در آن وجود دارد. یک پلی‌مورفیسم شایع G1793A می‌باشد که تغییر نوکلئوتید گوانین به آدنین منجر به جایگزینی اسید آمینه آرژنین با گلوتامین در کدون ۵۹۴ می‌شود. این تغییر، با کاهش فعالیت آنزیم همراه است (۱۰). هدف از انجام این تحقیق، بررسی ژنتیک G1793A، در افراد مبتلا به سرطان کولورکتال غیراراضی می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

این تحقیق یک مطالعه توصیفی است که بیماران به طور مستمر (sequentially) از افرادی که در یک دوره زمانی یک‌ساله از ۸۶/۶/۱ تا ۸۵/۱/۱ لغایت ۲۴۴ بیمار باشند که در بخش کولونوسکوپی بیمارستان طالقانی تهران مراجعه کردند و نتیجه کولونوسکوپی آنها از نظر وجود بافت توموری با استفاده از آزمایش‌های پاتولوژی تایید شده بود، انتخاب شدند. در نهایت تعداد ۲۴۴ بیمار با این شرایط به مطالعه وارد شدند. بیمارانی که سابقه فامیلی ابتلا به سرطان کولورکتال در بستگان درجه اول (پدر، مادر، برادر، خواهر و فرزند) و درجه دوم (پدربرزگ، مادربرزگ، عمه، خاله، عمو، دایی و نوه) داشتند، از مطالعه خارج شدند. از کلیه بیماران رضایت‌نامه کتبی اخذ و در مورد نحوه استفاده از نتایج و داوطلبانه بودن حق شرکت یا عدم شرکت در این مطالعه، توضیح داده شد. فرم رضایت‌نامه اخلاقی شرکت افراد در مطالعه توسط کمیته اخلاق مرکز

جدول ۱- توالی و مشخصات مربوط به پرایمراهای PCR ، Pyrosequencing

PCR , Pyrosequencing			Score: 98	Quality: High	
پرایمر	Id	توالی پرایمر	bp	Tm°C	GC (%)
PCR	Forward	GTGGGCCTTGTCTATTCCG	۲۰	۷۰/۶	۵۵
PCR	Reverse	ACGGGGACTCCTCCTCAT	۱۸	۶۸/۴	۶۱/۱
Sequencing	Sequencing	TTGCCCTGTGGATTG	۱۵	۵۴/۶	۵۳/۳

بین جنسیت و نوع ژنوتیپ اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ( $p=0.629$ ). میانگین سنی در افراد دارای ژنوتیپ GG و GA با یکدیگر تفاوت معنی‌داری نداشت ( $p=0.476$ ).

جدول ۲- مشخصات بیماران مورد مطالعه

ریسک فاکتور	GG	GA	AA	جنس	مرد	زن	سن
•	(۷۵٪) ۳	(۵۴٪) ۱۲۲	(۲۵٪) ۱	جنس	مرد	زن	
•	(۴۵٪) ۱۰۱	(۴۵٪) ۶۹	(۲۵٪) ۶۶	سن	۶۶/۸±۶/۱	۶۹/۱±۶/۴	

### بحث

آنزیم ۵ و ۱۰ متیلن تتراهیدروفولات ردوکتاز نقش اصلی را در متابولیسم فولات دارد. این آنزیم از یک طرف در تولید پورین برای سنتز DNA و از طرف دیگر در سنتز متیونین و متیلاسیون DNA نقش دارد. احتمال می‌رود پلی‌مورفیسم‌های این زن در ایجاد سرطان دخیل باشند. یکی از پلی‌مورفیسم‌های این زن که جدیداً تعیین شده است، ژنوتایپ G1793A می‌باشد و تاکنون هنوز عملکرد مشخصی برای آن تعیین نشده است.

با توجه به این که این پلی‌مورفیسم جدید شناخته شده است و هنوز مطالعات زیادی بر روی آن انجام نشده است، این تحقیق برای اولین بار به بررسی ژنوتایپ زن MTHFR و سرطان کولورکتال غیرفamilی در جمعیت بیمار می‌پردازد. بنابراین یافته‌های این تحقیق با نتایج حاصل از تنها مطالعه‌ای که تاکنون بر روی این پلی‌مورفیسم و سرطان اندومتر در جمعیت چین انجام شد، مقایسه گردید که بیانگر تفاوت یافته‌های مطالعه حاضر با نتایج به دست آمده از آن تحقیق است (۱۸)، زیرا نتایج مطالعه در جمعیت چین نشان داد که فراوانی این آلل نادر (G1793A) در جمعیت چین نسبتاً بالاتر (۱۰٪) از سفیدپوستان (۵٪) بوده در حالی که فراوانی این آلل در جمعیت مورد مطالعه این پژوهش (متلاطه به سرطان روده بزرگ) ۱/۷٪ می‌باشد.

پیشنهاد می‌شود به منظور مطالعه دقیق‌تر، یک گروه کنترل به عنوان شاهد انتخاب شود و ژنوتیپ‌های آن تعیین گردد تا ارتباط بین این ژنوتیپ‌ها و سرطان روده بزرگ بررسی شود. اگرچه مطالعات مشابهی در مورد بررسی این ژنوتیپ و بیماری‌های دیگر انجام گرفته است ولی مزیت‌های این طرح این است که ژنوتیپ‌ها با استفاده از روش جدید پایروسکوتوسینگ (Pyrosequencing) مورد مطالعه قرار گرفته‌اند و مزیت دیگر آن، جدید بودن مطالعه می‌باشد که تاکنون

آبشاری آنزیمی و تولید نور مرئی در حین سنتز DNA عمل می‌کند.

آبشار آنزیمی با پلی‌مریزاسیون یک نوکلئوتید و آزاد شدن پایروفسفات (ppi) به عنوان نتیجه استفاده آنزیم پلی‌مراز از آن نوکلئوتید، انجام می‌شود. با به کارگیری نوکلئوتید به وسیله پلی‌مراز، پایروفسفات، رها شده و متعاقباً ATP را به سولفوریلاز تبدیل می‌کند که انرژی لازم برای تبدیل لوسیفراز به اکسید لوسیفرین و تولید نور را فراهم می‌کند و از آنجایی که نوع نوکلئوتید اضافه شده مشخص است، سکانس DNA تعیین می‌گردد (۱۶).

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 (SNP Software) صورت گرفت. به این صورت که پیک‌های حاصله بر اساس الگوی پاچش (dispensation) ارزیابی شدند، تعیین ژنوتایپ به وسیله نرم‌افزار PSQ96MA V2.1.1 صورت گرفت و نتایج به صورت گراف بر روی مانیتور متصل به نرم‌افزار آشکار شدند.

### آنالیز آماری

متغیرهای کمی به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار و متغیرهای کیفی به صورت درصد بیان شدند. تجزیه و تحلیل متغیرهای گروه‌بندی شده با آزمون مجذور کای و متغیرهای کمی با آزمون  $\chi^2$  صورت پذیرفت.

### یافته‌ها

از ۲۴۴ نمونه مورد بررسی، ۱۷ بیمار به دلیل عدم تکمیل بروونده اطلاعات آنها، از مطالعه حذف شدند. از ۲۲۷ بیمار باقیمانده، ۱۲۵ نفر (۵۵٪) مرد و ۱۰۲ نفر (۴۴٪) زن بودند. میانگین سنی بیماران  $68/3$  سال ثبت شد (جدول ۲). میانگین سنی افراد بیمار دارای ژنوتیپ GG  $69/1\pm 6/4$  سال و میانگین سنی برای مبتلایان دارای ژنوتیپ GA  $66/8\pm 6/1$  سال مشخص گردید.

فراوانی آللی در بیماران به ترتیب  $G=99\%$  و  $A=1\%$  مشاهده شد. فراوانی ژنوتیپ‌ها در بیماران برای ژنوتیپ‌های AA، GA و GG به ترتیب  $17.1\%$ ،  $48.3\%$  و  $34.6\%$  تعیین شد و هیچ فردی با دو آلل جهش‌یافته یعنی با ژنوتیپ AA در میان بیماران مشخص نشد.

### Pyrosequencing

Pyrosequencing یک تکنیک توالی‌بایی DNA می‌باشد که بر اساس تشخیص پایروفسفات (ppi) آزادشده در یک واکنش آبشاری آنزیمی و تولید نور مرئی در حین سنتز DNA عمل

لذا پیشنهاد می‌شود که برای انجام مطالعات مشابه بعدی این متغیرها در نظر گرفته شود.

از دیگر محدودیت‌های این مطالعه عدم اطلاع دقیق از میزان مصرف الكل در افراد شرکت‌کننده در این مطالعه بود، چرا که الكل می‌تواند به عنوان یک آنتاگونیست برای فولات عمل کند و نقش بازدارنده در جذب فولات داشته باشد (۲۷-۲۸). بنابراین پیشنهاد می‌شود برای انجام مطالعات مشابه این موضوع نیز مورد توجه قرار بگیرد.

### نتیجه‌گیری

به نظر می‌رسد که ژنتیک A>G 1793MTHFR ژن در بروز سرطان کولورکتال نقش داشته باشد. به این صورت که افرادی که واجد این ژنتیک می‌باشند، دارای اثر محافظتی در مقابل سرطان روده بزرگ غیرارثی هستند.

بررسی این ژنتیک در سرطان کولورکتال مورد ارزیابی قرار نگرفته است.

لازم به یادآوری است که در انجام این تحقیق محدودیت‌های زیادی وجود داشت؛ از جمله عدم اندازه‌گیری میزان جذب فولات رژیم غذایی، زیرا کمبود فولات ممکن است منجر به کاهش دسترسی به ۵ متیلن تتراهیدروفولات لازم برای متیلاسیون مجدد هموسیستین به متیونین شود که این امر می‌تواند به نوبه خود منجر به کاهش سطح متیونین، S-آدنوزیل ال متیونین و هایپرمتیلاسیون کلی ژنوم گردد و نهایتاً منجر به افزایش میزان موتاسیون از طریق ناپایدار کردن ژنوم شود. کمبود فولات همچنین ممکن است باعث افزایش خطای Hمانندسازی DNA از طریق اتصال نابجای بوراسیل به DNA گردد که در نتیجه سبب افزایش میزان شکست کروموزومی خواهد شد. علاوه بر این به نظر می‌رسد که کاهش میزان فولات با هایپرمتیلاسیون توالی‌های CpG در نواحی پرموتوری DNA از ژن‌های مهارکننده و ژن‌های ترمیم‌کننده مرتبط باشد که باعث کاهش بیان این ژن‌ها می‌شود (۲۳-۲۶)؛

## REFERENCES

1. John D. Potter. Colorectal cancer: molecules and Populations; J Natl Cancer Inst 1999;91:916-32.
2. Naccarati A, Pardini B, Hemminki K, Vodicka P. Sporadic colorectal cancer and individual susceptibility: A review of the association studies investigating the role of DNA repair genetic polymorphisms; Mutation Research 2007;635:118-145.
3. Moghimi-Dehkordi B, Safaei A, Zali MR. Prognostic factors in 1,138 Iranian colorectal cancer patients. Int J Colorectal Dis 2008 ;7:683-688.
4. Fearon ER, Vogelstein BA. A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell 199;61:759-67.
5. Oyama K, Kawakami K, Maeda K, Ishiguro K, Watanabe G. The association between methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and promoter methylation in proximal colon cancer. Anticancer Res 2004;24:649-54.
6. Issa JP, Ottaviano YL, Celano P, Hamilton SR, Davidson NE, Baylin SB, et al. Methylation of the oestrogen receptor CpG island links aging and neoplasia in human colon. Nat Genet 1994;7:536-40.
7. Duthie SJ, Narayanan S, Brand GM, Pirie L, Grant G. Impact of folate deficiency on DNA stability. J Nutr 2002;132:2444S-49S.
8. Ulrich CM, Curtin K, Samowitz W, Bigler J, Potter JD, Caan B, et al. MTHFR variants reduce the risk of G:C>A:T transition mutations within the p53 tumor suppressor gene in colon tumors. J Nutr 2005;135:2462-7.
9. Narayanan S, McConnell J, Little J, Sharp L, Piyathilake CJ, Powers H, et al. Associations between two common variants C677T and A1298C in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and measures of folate metabolism and DNA stability (Strand Breaks, Misincorporated Uracil, and DNA Methylation Status) in Human Lymphocytes In vivo. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2004;13:1436-43.
10. Kawakami K, Ruszkiewicz A, Bennett G, Moore J, Watanabe G, Iacobetta B, et al .The folate pool in colorectal cancers is associated with DNA hypermethylation and with a polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase; Clin Cancer Res 2003;1:5860-5.
11. Curtin K, Slattery ML, Ulrich CM, Bigler J, Levin TR, Wolff RK, et al. Genetic polymorphisms in one-carbon metabolism: associations with CpG island methylator phenotype (CIMP) in colon cancer and the modifying effects of diet; Carcinogenesis 2007;28:1672-9.
12. Levi F, Pasche C, Lucchini F, La Vecchia C. Selected micronutrients and colorectal cancer. a case-control study from the canton of Vaud, Switzerland; Eur J Cancer 2000;36:2115-19.

13. Harnack L, Jacobs DR Jr, Nicodemus K. Relationship of folate, vitamin B-6, vitamin B-12, and methionine intake to incidence of colorectal cancers. *Nutr Cancer* 2002;43:152– 58.
14. Choi SW, Mason JB. Folate status: effects on pathways of colorectal carcinogenesis. *J Nutr* 2002;132:2413S-18S.
15. Osian G, Procopciuc L, Vlad L. MTHFR polymorphisms as prognostic factors in sporadic colorectal cancer. *J Gastrointestin Liver Dis* 2007;16:251-6.
16. Battistelli S, Vittoria A, Stefanoni M, Bing C, Roviello F. Total plasma homocysteine and methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism in patients with colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2006;14:6128-32.
17. Ulvik A, Ueland PM, Fredriksen A, Meyer K, Vollset SE, Hoff G, et al. Functional inference of the methylenetetrahydrofolate reductase 677 C> T and 1298A> C polymorphisms from a large-scale epidemiological study. *Hum Genet* 2007;121:57-64.
18. 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.
19. Choi SW, Mason JB. Folate and carcinogenesis: an integrated scheme. *J Nutr* 2000;130:129–32.
20. Lievers KJ, Boers GH, Verhoef P. 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– 28.
21. van der Put NM, Gabreels F, Stevens EM, Smeitink JA, Trijbels FJ, Eskes TK, et al. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects. *Am J Hum Genet* 1998; 62:1044–51.
22. Song C, Xing D, Tan W, Wei Q, Lin D. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms increase risk of esophageal squamous cell carcinoma in a Chinese population. *Cancer Res* 2001;8:3272–75.
23. Hustad S, Midttun O, Schneede J. The methylenetetrahydrofolate reductase 677c→t polymorphism as a modulator of a b vitamin network with major effects on homocysteine metabolism. *Am J Hum Genet* 2007;80:846–55.
24. Marchand LL, Wilkens LR. The MTHFR C677T polymorphism and colorectal cancer the multiethnic cohort study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:1198-203.
25. Murata M, Ikeda Y, Opare-Sem O, Rosenberg N. The frequent 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism is associated with a common haplotype in whites, japanese, and Africans. *Am J Hum Genet* 2002;70:758–62.
26. Bailey LB. Folate, methyl-related nutrients, alcohol, and the MTHFR 677C-->T polymorphism affect cancer risk: intake recommendations. *J Nutr* 2003;133:3748S-53S.
27. Van den Donk M, van Engeland M, Pellis L. Dietary folate intake in combination with MTHFR C677T genotype and promoter methylation of tumor suppressor and DNA repair genes in sporadic colorectal adenomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16:327-33.