

Investigating the clinical relevance of variants in the 5'-UTR region of the *TYMS* gene in response to chemotherapy in Iranian gastric cancer patients

Khadijeh Arjmandi¹, Iman Salahshourifar^{*1}, Fereshteh Ameli², Shiva Irani¹, Mohsen Esfandbod³

1. Department of Biology, SR.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran

2. Department of Pathology, Cancer Institute, Imam Khomeini Hospital Complex, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3. Department of Hematology and Oncology, Imam Khomeini Hospital Complex, Tehran University of Medical Sciences TUMS, Tehran Iran

Abstract

Aim and Background: Genetic variants are valuable markers for predicting chemotherapy resistance. Thymidylate synthetase is an important enzyme target in gastric cancer patients treated with neoadjuvant 5-fluorouracil-based chemotherapy. Genetic variants in the thymidylate synthetase gene are effective in gene expression and resistance to chemotherapy in gastric cancer patients. Therefore, the aim of this study is to investigate the variants of the *TYMS* gene and the possible effect of their alleles on drug resistance, survival, and gene expression in gastric cancer patients.

Materials and Methods: Genetic analysis was performed on normal sections of paraffin blocks of 100 patients. All patients received neoadjuvant chemotherapy based on 5-fluorouracil. The genotypes of rs34743033 (*TYMS* 28-bp VNTR) and rs2853542 (*TYMS* SNP C>G) variants were determined, and gene expression was investigated in tumor tissue and tumor margins of patients

Results: A significant association between *TYMS* 28 bp VNTR genotypes and treatment was observed ($P=0.003$). Patients with the 2R3R genotype showed a better response to treatment. The highest and lowest survival times were observed for the 3R3R and 2R2R genotypes, respectively ($P=0.003$). There was a significant relationship between gene expression and the *TYMS* 28 bp VNTR variant and the *TYMS* SNP C>G variant ($P<0.001$). The CC genotype of the *TYMS* SNP C>G variant was associated with lower gene expression and the CG genotype was associated with higher gene expression.

Conclusion: This study showed that determining the genotypes and expression of the *TYMS* gene can be effective for predicting the survival of gastric cancer patients and their response to 5-fluorouracil-based chemotherapy.

Keywords: Chemoresistance, Gastric cancer, Personalized medicine, *TYMS*.

Corresponding author:

Department of Biology, SR.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran

Email: isalahshouri@gmail.com

بررسی ارتباط بالینی واریانتهای ناحیه 5'-UTR ژن *TYMS* در پاسخ به شیمی‌درمانی بیماران سرطان معده در ایران

خدیجه ارجمندی^۱، ایمان سلحشوری فر^{۱*}، فرشته عاملی^۲، شیوا ایرانی^۱، محسن اسفند بد^۳

۱. گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲. گروه پاتولوژی، انستیتو کانسر مجتمع بیمارستان امام خمینی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

۳. بخش هماتولوژی و آنکولوژی، مجتمع بیمارستان امام خمینی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: واریانتهای ژنتیکی مارکرهای ارزشمندی برای پیش‌بینی مقاومت به شیمی‌درمانی هستند. تیمیدیلات سنتتاز (*TYMS*) هدف آنزیمی مهمی در بیماران سرطان معده درمان‌شده با شیمی‌درمانی نئوادجوانت بر پایه ۵-فلوروراسیل است. واریانتهای ژنتیکی ژن تیمیدیلات سنتتاز بر بیان ژن و مقاومت به شیمی‌درمانی در بیماران سرطان معده مؤثر است. هدف این مطالعه بررسی واریانتهای ژن *TYMS* و امکان تأثیر آل‌های آن‌ها بر مقاومت دارویی، بقا و بیان ژن در بیماران سرطان معده است.

مواد و روش‌ها: آنالیز ژنتیکی روی بخش‌های نرمال بلوک‌های پارافینه ۱۰۰ بیمار سرطان معده انجام شد. تمام بیماران شیمی‌درمانی نئوادجوانت بر پایه ۵-فلوروراسیل را دریافت کرده بودند. ژنوتیپ واریانتهای *TYMS* 28 bp (VNTR) و *TYMS* SNP C>G rs2853542 و به روش PCR و RFLP-PCR تعیین و بیان ژن در بافت تومور و حاشیه تومور بیماران بررسی شد.

یافته‌ها: ارتباط معناداری بین ژنوتیپ‌های *TYMS* 28 bp VNTR و درمان مشاهده شد ($P=0/003$). بیماران با ژنوتیپ 2R3R پاسخ بهتری به درمان نشان دادند. بیشترین و کمترین زمان بقا به ترتیب ژنوتیپ‌های 3R3R3 و 2R2R بود ($P=0/003$). بین بیان ژن و واریانتهای *TYMS* 28 bp VNTR و *TYMS* SNP C>G ارتباط معناداری وجود داشت ($P<0/001$). ژنوتیپ CC واریانتهای *TYMS* SNP C>G با بیان کمتر و ژنوتیپ CG با بیان بیشتر ژن مرتبط بود.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که تعیین ژنوتیپ‌ها و بیان ژن *TYMS* می‌تواند برای پیش‌بینی بقای بیماران مبتلا به سرطان معده و پاسخ به شیمی‌درمانی بر پایه ۵-فلوروراسیل مؤثر باشد.

واژگان کلیدی: مقاومت به شیمی‌درمانی، سرطان معده، پزشکی شخصی، *TYMS*.

۱- مقدمه

سرطان معده، یکی از سرطان‌های مهم در جهان شناخته می‌شود (۱). این سرطان از نظر فراوانی پنجمین و از نظر علت مرگومیر چهارمین نوع است (۱). علائم این بیماری در مراحل پیشرفته آن بروز می‌کند (۲) و بیش از

نویسنده مسئول:

گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد

اسلامی، تهران، ایران

پست الکترونیکی:

isalahshouri@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۷/۲۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۸/۱۴

۵۰ درصد موارد جدید سرطان معده در کشورهای درحال توسعه اتفاق می‌افتد. مناطق با ریسک بالا شامل کشورهای آسیای شرقی (چین و ژاپن)، اروپای شرقی، آمریکای مرکزی و جنوبی هستند (۲). هرچند برداشتن تومور در مراحل اولیه بیماری تنها راهبردی درمانی شفا بخش قابل دسترس برای سرطان معده است، بیشتر بیماران عود مجدد بیماری را تجربه خواهند کرد. برای بیماران با بیماری پیشرفته موضعی یا متاستاتیک، شیمی‌درمانی براساس ترکیبات پلاتینیوم و فلوروپیریمیدین توصیه می‌شود (۳). هرچند شیمی‌درمانی نقش مهمی در درمان سرطان معده بر عهده دارد، باین‌حال کارایی آن به دلیل مقاومت به شیمی‌درمانی محدود می‌شود. مقاومت به شیمی‌درمانی می‌تواند به‌طور ذاتی قبل از به‌کارگیری شیمی‌درمانی وجود

داشته باشد یا در طول انجام آن توسعه یابد. مکانیسم‌های مقاومت به شیمی‌درمانی در سرطان معده پیچیده و چندعاملی است. فاکتورهای مختلف مقاومت به شیمی‌درمانی عبارت‌اند از: کاهش غلظت درون‌سلولی داروها، تغییرهایی در اهداف دارویی، نقص تنظیمی در مسیرهای سیگنالینگ بقا، مرگ سلولی و برهم‌کنش بین سلول‌های سرطانی و محیط تومور (۴-۸).

داروی ۵- فلوروئوراسیل (5-FU) یکی از متداول‌ترین داروهای مورد استفاده در درمان انواع سرطان‌ها است (۹). هدف اصلی ۵- فلوروئوراسیل، آنزیم تیمیدیلات سنتتاز (TS) است که نقش حیاتی در سنتز DNA دارد (۹ و ۱۰). آنزیم تیمیدیلات سنتتاز به‌وسیله ژن *TYMS*^۱ کد می‌شود (۱۱). میزان بیان ژن تیمیدیلات سنتتاز حساسیت سلول‌های توموری به فلوروپیریمیدین‌ها را تعیین می‌کند. پاسخ به درمان 5-FU نسبت عکس با میزان بیان پروتئین و mRNA درون تومور ژن *TYMS* دارد (۱۱). درمان با 5-FU بیان TS را القا می‌کند و باعث افزایش مقاومت به شیمی‌درمانی می‌شود (۱۱). همچنین میزان پایه‌ی بیان TS در بافت متاستاتیک، نسبت به تومورهای اولیه بیشتر است. واریانت‌های ژن *TYMS* نیز روی بیان *TYMS* تأثیر می‌گذارند (۱۱).

واریانت‌های *TYMS* گزینه‌های مناسبی برای مطالعه‌های فارماکوژنتیک هستند. ناحیه کدکننده ژن *TYMS* بسیار پایدار است، بنابراین به واریانت‌های موجود در نواحی غیرکدکننده در ژن بیشتر توجه می‌شود (۱۲ و ۱۳). بیان آنزیم تیمیدیلات سنتتاز تحت تأثیر واریانت‌ها در ناحیه‌ی افزاینده پروموتور ژن *TYMS* قرار می‌گیرد. این واریانت‌ها مرتبط با پاسخ به درمان و بقا در بیماران سرطان معده و سرطان کولورکتال درمان شده بر پایه‌ی شیمی‌درمانی با فلوروپیریمیدین است (۱۴).

واریانت rs34743033 روی ناحیه‌ی افزاینده پروموتور ژن *TYMS* (ناحیه‌ی افزاینده ژن تیمیدیلات سنتتاز [*TSER*]^۲) قرار دارد و از یک توالی تکراری متغیر پشت سرهم ۲۸ جفت بازی (*VNTR*)^۳ تشکیل شده است (۱۵ و ۱۶). مطالعه‌های اپیدمیولوژیک نشان داده‌اند که بیشتر جمعیت تکرار دوتایی (2R) و سه‌تایی (3R) به ترتیب با فراوانی ۰/۴۷ و ۰/۵۳ دارند (۱۴). در نهایت حضور یک واحد تکراری برای نسخه‌برداری مورد نیاز است، به‌علاوه اولین توالی آلل 2R و دو توالی اول آلل 3R دارای توالی جعبه‌ی افزاینده (*E-BOX*)^۴

هستند. این توالی کوتاه (CANNTG) به‌وسیله چندین فاکتور نسخه‌برداری، به‌طور عمده فاکتورهای القاکننده بالادست (USF) که نسخه‌برداری ژن را القا می‌کنند، شناسایی می‌شود. بنابراین، تعداد بیشتر تکرارها میزان جایگاه‌های تشخیصی USF را افزایش می‌دهد و به نسخه‌برداری افزایش‌یافته ژن *TYMS* می‌انجامد (۱۵). بیشتر مطالعه‌ها نشان داده‌اند که ژنوتیپ هموزیگوس 3R مرتبط با بیان بیشتر ژن *TYMS* در مقایسه با دیگر ژنوتیپ‌ها (2R3R و 2R2R) است (۱۴-۱۶).

دومین توالی آلل 3R حاوی واریانت تک‌نوکلئوتیدی G/C (rs2853542) است. آلل 3R (G) با کارایی بیشتر فعالیت نسخه‌برداری مرتبط است، درحالی‌که کارایی نسخه‌برداری آلل 3R (C) همانند آلل 2R است (۱۰). جابه‌جایی C>G توزیع گسترده‌ای بین همه‌ی گروه‌های نژادی دارد و در نوکلئوتید مهم توالی E-box اتفاق می‌افتد. در حضور سیتوزین 3RC توالی E-box تخریب می‌شود و فاکتورهای نسخه‌برداری USF قادر به تشخیص توالی نیستند و انجام نسخه‌برداری نسبت به حضور گوانین 3RG کمتر القا می‌شود. در حقیقت 3RG فعالیت ترجمه بیشتری نسبت به ژنوتیپ‌های دیگر در نمونه‌های بافت کولورکتال و در خطوط سلولی سرطان کولون نشان می‌دهد (۱۵). با توجه به نقش واریانت‌های ژن *TYMS* در مقاومت به شیمی‌درمانی بر پایه‌ی 5-FU، مطالعه حاضر با هدف بررسی واریانت‌های rs2853542 و rs34743033 در پاسخ به درمان و بقای بیماران سرطان معده و تأثیر آن‌ها در بیان ژن *TYMS* طراحی و اجرا شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- بیماران و نمونه‌های مورد مطالعه

جامعه آماری پژوهش مشتمل بر ۱۰۰ بیمار سرطان معده است که بین سال‌های ۱۳۹۱ تا ۱۳۹۸ به بیمارستان امام خمینی (ره) تهران مراجعه کرده بودند. تمام بیماران شرکت‌کننده در این مطالعه تحت عمل جراحی گاسترکتومی قرار گرفته و همچنین شیمی‌درمانی نئوادجوانت بر پایه‌ی فلوروپیریمیدین‌ها را دریافت کرده بودند. اطلاعات بالینی بیماران از پرونده‌های موجود در قسمت پاتولوژی و شیمی‌درمانی بخش انستیتو کانسر بیمارستان امام خمینی (ره) دریافت شد و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. در مطالعه حاضر از بلوک‌های پارافینه بیماران

³ Variable Number of Tandem Repeats

⁴ Enhancer Box

¹ Thymidylate Synthase

² Thymidylate Synthase Promotor Enhancer Region

روی ژل آگارز ۳ درصد الکتروفورز شد. طول قطعه ۲۱۰ bp مربوط به آلل 2R و قطعه ۲۳۸ bp مربوط به آلل 3R است و ژنوتیپ‌های به دست آمده به صورت 2R3R، 2R2R و 3R3R بودند. حجم کلی واکنش ۲۲ میکرولیتر شامل ۵۰ نانوگرم DNA، ۲ میکرولیتر DMSO^۱، ۱۰ پیکومول از هر پرایمر و مسترمیکس 2X Hot Start بود. برنامه واکنش PCR به صورت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس برای واسرشت شدن اولیه و سپس یک دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به منظور واسرشت شدن، یک دقیقه در دمای ۶۴ درجه سلسیوس برای اتصال پرایمرها، ۴۵ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس برای پلیمر شدن در ۳۷ سیکل تکثیر شد و مرحله پلیمر شدن نهایی ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس بود.

شناسایی واریانت rs2853542 (*TYMS* SNP C>G) با استفاده از روش RFLP^۲ انجام شد. برای انجام این واکنش از محصول‌های PCR واریانت *TYMS* 28 bp VNTR استفاده شد. به این صورت که محصول‌های به دست آمده از PCR توسط آنزیم Hae III برش داده شد و سپس نتایج این هضم آنزیمی روی ژل آکريل آمید ۱۲ درصد جداسازی و ژنوتیپ‌ها تعیین شد (۱۳، ۲۰ و ۲۲-۲۴). پس از هضم و به دست آمدن قطعات DNA نتایج به صورت جدول ۱ تفسیر شدند.

جدول ۱- تفسیر نتایج هضم آنزیم HaeIII

آل‌ها	قطعات DNA
2R	۷ bp و ۴۴، ۴۶، ۶۶، ۱۱۳
3RC	۷ bp و ۴۴، ۴۶، ۴۷، ۶۶، ۹۴
3RG	۷ bp و ۲۸، ۴۴، ۴۶، ۴۷، ۶۶

واریانته‌ها	ژنوتیپ‌ها	فراوانی (%)
rs34743033 (<i>TYMS</i> 28 bp VNTR)	2R2R	۲۵ (%/۲۵)
	2R3R	۵۴ (%/۵۴)
	3R3R	۲۱ (%/۲۱)
re2853542 (<i>TYMS</i> SNP C>G)	3RC3RC, 2R3RC	۵۰ (%/۶۶/۶۶)
	3RG3RG, 2R3RG	۲۳ (%/۳۰/۶)
	3RC3RG	۲ (%/۲/۶)

سرطان معده استفاده شد. برای تهیه نمونه آزمایشی، ابتدا اسلایدهای رنگ‌آمیزی شده نمونه گاسترکتومی بیماران توسط پاتولوژیست زیر میکروسکوپ مشاهده و بخش‌های تومور و حاشیه آن مشخص شد. سپس بلوک‌های پارافینه مطابق با اسلایدها برای برش انتخاب شدند. برش بلوک‌ها با روش پانچ کردن با دقت بالا انجام شد و بدین ترتیب بافت‌ها و حاشیه تومور بیماران برای انجام آزمایش آماده شد.

برای تعیین درجه پاسخ به شیمی‌درمانی در بیماران از برگه پاتولوژی و مشاهده‌های پاتولوژیست طبق دستورالعمل کالج پاتولوژیست‌های آمریکا استفاده شد (۱۷). طبق این دستورالعمل، تأثیر درمان در بیماران دریافت‌کننده شیمی‌درمانی نئوادجوانت به صورت زیر گزارش می‌شود:

۱- بیماری که پس از درمان، سلول‌های سرطانی در آن‌ها قابل مشاهده نبوده است (پاسخ کامل، صفر score).

۲- بیماری که سلول‌های منفرد یا گروه‌های سلولی کمی از سلول‌های سرطانی را بعد از دریافت شیمی‌درمانی دارند (پاسخ نزدیک به کامل، یک score).

۳- بیماری که پس از دریافت شیمی‌درمانی نئوادجوانت بقایای سرطان با مشاهده پسرقت تومور را نشان می‌دهند و سلول‌های تکی و گروه‌های سلول‌های سرطانی بیشتر است (پاسخ نسبی، دو score).

۴- بیماری که پس از درمان همچنان بقایای سرطان گسترده با عدم مشاهده پسرقت تومور را نشان داده‌اند (پاسخ ضعیف یا بدون پاسخ، سه score).

در این مطالعه بیماران در دو گروه طبقه‌بندی شدند:

۱- بیماری که به درمان پاسخ داده‌اند (صفر score، یک score و دو score).

۲- بیماران با پاسخ ضعیف و عدم پاسخ به درمان (سه score).

۲-۲- استخراج DNA و تعیین ژنوتیپ‌ها

برای استخراج DNA از کیت GeneRead DNA FFPE Kit کیژن با شماره کاتالوگ ۱۸۰۱۳۴ طبق دستورالعمل استفاده شد. استخراج DNA از بافت حاشیه تومور صورت گرفت.

به منظور شناسایی آلل‌های 2R و 3R واریانت rs34743033 (*TYMS* 28 bp VNTR) واکنش PCR انجام شد. پرایمر واکنش PCR از دیگر مطالعه‌های صورت گرفته انتخاب شد (۱۲، ۲۱-۱۸). محصول به دست آمده از PCR

² Restriction Fragment Length Polymorphism

¹ dimethyl sulfoxide

۳-۱- نتایج فراوانی ژنوتیپ‌ها در واریانت‌های مورد مطالعه

میانگین سنی بیماران $11/43 \pm 58/10$ سال بود. از میان بیماران ۳۰ نفر (۳۰ درصد) زن و ۷۰ نفر (۷۰ درصد) مرد بودند. واریانت‌های مورد مطالعه در ۱۰۰ نمونه بافت حاشیه تومور بیماران بررسی شد و توزیع فراوانی ژنوتیپ‌ها در جدول ۲ نمایش داده شده است. در ارتباط با واریانت rs34743033 (*TYMS* 28 bp VNTR) بیشترین فراوانی مربوط به ژنوتیپ هتروزیگوت 2R3R (۵۴ درصد) بود و افراد دارای ژنوتیپ هموزیگوت با فراوانی 2R2R (۲۵ درصد) و 3R3R (۲۱ درصد) بودند. فراوانی ژنوتیپ‌ها در واریانت rs2853542 (*TYMS* SNP C>G) به صورت 2R3RC و 2R3RG (۶۶/۶۶ درصد)، 3R3RG و 3RC3RG (۲/۶ درصد) است. جدول ۲- توزیع فراوانی ژنوتیپ‌ها در واریانت‌های مورد مطالعه.

۳-۲- نتایج بررسی تأثیر درمان با ژنوتیپ‌ها در واریانت‌های مورد مطالعه

بیماران مورد مطالعه از نظر پاسخ به شیمی‌درمانی به دو گروه طبقه‌بندی شدند: گروهی که به درمان پاسخ داده بودند (پاسخ‌دهندگان) و گروهی که به درمان پاسخ نداده بودند (مقاوم). بیمارانی که به درمان پاسخ داده‌اند (صفر score، یک score و دو score) و بیمارانی که به درمان پاسخ نداده‌اند یا پاسخ آن‌ها ضعیف بوده است (سه score). از بین ۱۰۰ بیمار مورد مطالعه، ۴۳ بیمار مقاوم به درمان بوده و به شیمی‌درمانی پاسخ نداده بودند. از بین ۵۷ بیمار که به شیمی‌درمانی پاسخ داده بودند، پاسخ ۱۳ بیمار کامل بود (صفر score)، پاسخ ۱۵ بیمار نزدیک به کامل (یک score) و ۲۹ بیمار پاسخ نسبی (دو score) به درمان داده بودند. بررسی اختلاف توزیع فراوانی زیرگروه‌های تأثیر درمان با استفاده از آزمون مجذور کای نشان داد که بین توزیع فراوانی زیرگروه‌ها اختلاف معناداری وجود نداشت ($P=0/121$).

براساس آزمون مجذور کای ارتباط معناداری بین واریانت rs34733033 (*TYMS* 28 bp VNTR) و پاسخ به درمان وجود داشت ($P=0/032$). به این صورت که فراوانی

استخراج RNA و بررسی بیان ژن *TYMS*

استخراج RNA از بافت تومور و حاشیه تومور بیماران انجام شد. برای استخراج RNA از کیت Hybrid-RTM شرکت GeneAll با شماره کاتالوگ Cat.No. 305-101 طبق دستورالعمل استفاده شد. سنتز cDNA با استفاده از کیت cDNA Synthesis Kit با شماره کاتالوگ YT45400 شرکت یکتا تجهیز صورت گرفت. پرایمرهای مورد استفاده برای ژن *TYMS* طراحی و توالی ژن مرجع *GAPDH*^۱ از مقالاتی با بیشترین ارجاع انتخاب و BLAST آن‌ها انجام شد، در نهایت سنتز پرایمرها توسط شرکت متابیون آلمان صورت گرفت. برای انجام واکنش ریل تایم از مخلوط واکنش شرکت Amplicon، Hot Start No Rox (A323402-25) استفاده شد. برای انجام واکنش Real-Time PCR نمونه‌ها به صورت سه‌تایی با پرایمرهای *TYMS* و ژن کنترل داخلی *GAPDH* برای نمونه‌ها و حاشیه تومور گذاشته شد.

۲-۴- آنالیز آماری

از نرم‌افزار SPSS24 و REST2000 به منظور آنالیز داده‌ها استفاده شد. توصیف حالت‌های مختلف واریانت‌های مورد بررسی با فراوانی (درصد فراوانی) انجام شده است. به منظور بررسی ارتباط پاسخ به درمان در بیماران با grade و stage بیماری و ژنوتیپ‌های واریانت‌ها از آزمون مجذور کای و مونت کارلو استفاده شد. برای محاسبه میانگین زمان بقای افراد مبتلا به سرطان معده پس از درمان 5-FU، از روش آنالیز بقای کاپلان مایر^۲ و برای مقایسه آن‌ها از تست لوگ رنک^۳ استفاده شد. به منظور محاسبه نسبت خطر مرگ در حالت‌های مختلف واریانت از مدل نیمه پارامتری کاکس^۴ بهره گرفته شد. از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ برای محاسبه تغییرهای بیانی استفاده شد. برای محاسبه کارایی Real-time PCR و کارایی پرایمر، پس از تهیه رقت از cDNA، منحنی استاندارد ترسیم و شیب خط در فرمول $E=10^{(1/\text{slope})}$ قرار داده شد. سطح معناداری آماری ۰/۰۵ لحاظ شده است.

۳- نتایج

³ Log-Rank Test

⁴ Cox-Regression

¹ Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase

² Kaplan-Meier

پاسخ‌دهندگان به میزان معناداری در ژنوتیپ 2R3R بیشتر از سایر ژنوتیپ‌های واریانت rs34733033 بود. در حالی که فراوانی افراد مقاوم به درمان در ژنوتیپ 3R3R بیشتر از سایر ژنوتیپ‌های واریانت rs34733033 بود. ارتباط بین ژنوتیپ‌های واریانت (TYMS SNP C>G) معناداری بین ژنوتیپ‌های واریانت (TYMS SNP C>G) و پاسخ به درمان مشاهده نشد (جدول ۳).

جدول ۳- ارتباط بین واریانت‌ها و پاسخ به درمان بیماران سرطان معده.

مقدار احتمال (P-value)	پاسخ به درمان		تعداد بیماران	ژنوتیپ‌ها	واریانت
	مقاوم	پاسخ‌دهندگان			
*./۰.۳۲	۱۱ (/۰.۴۴)	۱۴ (/۰.۵۶)	۲۵ (/۰.۲۵)	2R2R 2R3R 3R3R	rs34733033 (TYMS 28 bp VNTR)
	۱۸ (/۰.۳۳/۳)	۳۶ (/۰.۷/۶۶)	۵۴ (/۰.۵۴)		
	۱۴ (/۰.۶۶/۷)	۷ (/۰.۳۳/۳)	۲۱ (/۰.۲۱)		
۰./۲۹۰	۲۱ (/۰.۴۲)	۲۹ (/۰.۵۸)	۵۰ (/۰.۶۶/۶)	3RC3R 2R3RC 3RG3RG, 2R3RG 3RC3RG	rs2853542 (TYMS SNP C>G)
	۱۴ (/۰.۶۰/۹)	۹ (/۰.۳۹/۱)	۲۳ (/۰.۳۰/۶۶)		
	۲ (/۰.۱۰۰)	۰ (/۰.۰)	۲ (/۰.۲/۶۶)		

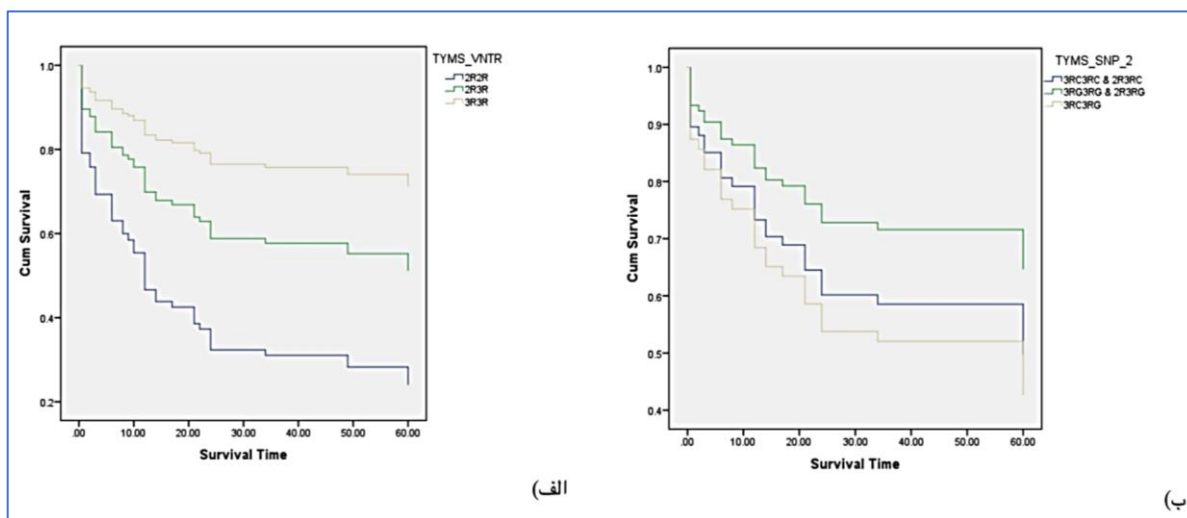
۳-۳- ارتباط بین واریانت‌ها و بقای بیماران

میانگین زمان بقای بیماران برحسب واریانت‌های بیان‌شده و نسبت خطر (HR) آن‌ها در جدول ۴ و نمودار ۱ آمده است. بیشترین و کمترین میانگین زمان بقای افراد پس از درمان 5-FU در افراد دارای ژنوتیپ 2R2R و 3R3R بود و اختلاف مشاهده‌شده نیز از نظر آماری معنادار است (P=۰/۰۰۳). در مدل کاکس نیز مشاهده شد، خطر مرگ در افراد دارای ژنوتیپ‌های 2R2R و 3R3R، نسبت به افراد دارای ژنوتیپ 2R2R (گروه مرجع)، کمتر و به ترتیب ۰/۲۴ و ۰/۴۷ است.

در ارتباط با واریانت (TYMS SNP C>G) rs2853542 همان‌طور که در جدول ۴ و نمودار ۱ مشاهده می‌شود، بیشترین و کمترین میانگین زمان بقای افراد پس از درمان با 5-FU در افراد دارای ژنوتیپ‌های 3RG3RG و 3R3RG بود، ولی اختلاف مشاهده‌شده از نظر آماری معنادار نیست (P=۰/۵۱). در مدل کاکس نیز مشاهده شد، نسبت خطر مرگ در افراد دارای ژنوتیپ‌های 3RG3RG، 2R3RG و 3RC3RC نسبت به افراد دارای ژنوتیپ 3RG3RG (گروه مرجع)، از نظر آماری معنادار نیست (P>۰/۰۵).

جدول ۴- میانگین زمان بقای بیماران برحسب واریانت‌های ژن TYMS

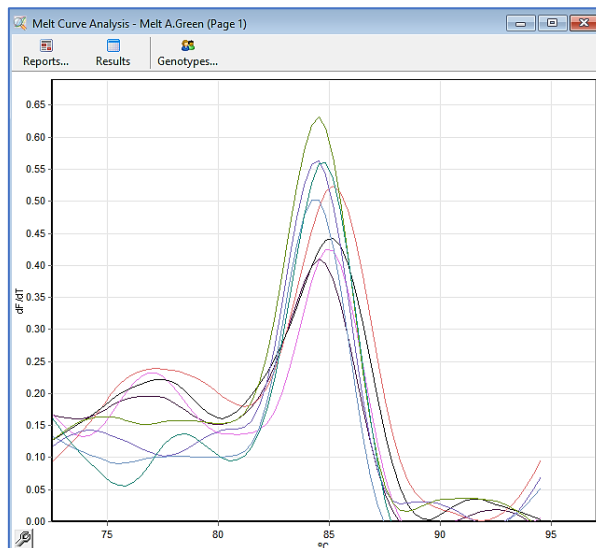
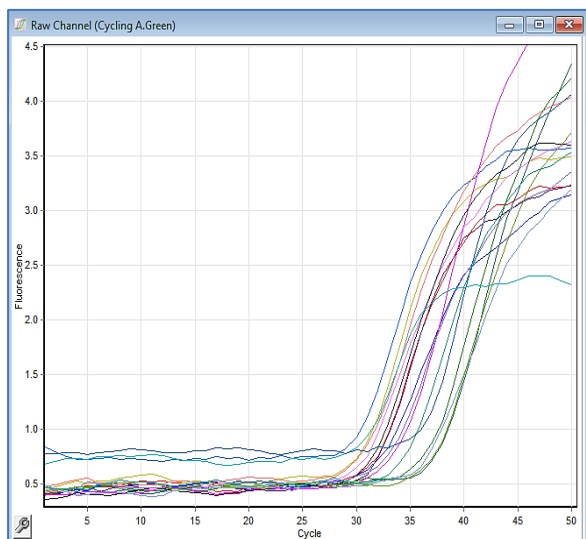
ضریب خطر (HR)		زمان بقا (ماه)		ژنوتیپ‌ها	واریانت‌ها
P-value	HR (%95 CI)	P-value	Mean (%95CI)		
-	(گروه مرجع) ۱	۰/۰۰۳	۲۳/۴۴ (۳۳/۱۳-۰۴/۸۴)	2R2R	rs34733033 (TYMS 28-bp VNTR)
۰/۰۲	۰/۴۷ - ۰/۲۵) (۰/۸۷)		۳۹/۳۶ (۴۶/۱ - ۳۲/۶۲)	2R3R	
۰/۰۰۵	۰/۲۴ - ۰/۰۹) (۰/۶۴)		۴۷/۱۷ (۵۷/۰۴ - ۳۷/۳)	3R3R	
-	(گروه مرجع) ۱	۰/۵۱	۳۲ (۵۹/۷۲ - ۴/۲۸)	3RG3RG	rs2853542 (TYMS SNP C>G)
۰/۵۳	۰/۵۱ - ۰/۰۷) (۴/۱۸)		۴۷/۸۴ - ۳۸/۵۲) (۵۷/۱۵)	3R3RG,3RG3RG	
۰/۸۵	۰/۸۲ (۶/۱ - ۰/۱۱)		۳۸/۸۸ - ۳۱/۸۲) (۴۵/۹۴)	2R3RC, 2RC3RC	



نمودار ۱- نمودار احتمال بقای افراد مبتلا به سرطان معده پس از درمان 5-FU. الف) برحسب ژنوتیپ‌های مختلف *TYMS* 28 bp VNTR. با توجه به نمودار بقا، بیشترین و کمترین میانگین زمان بقا به ترتیب مربوط به بیماران با ژنوتیپ‌های 3R3R و 2R2R است. ب) برحسب ژنوتیپ‌های مختلف واریانت rs2853542 (*TYMS* SNP C>G). بیشترین و کمترین زمان بقا مربوط به ژنوتیپ‌های 3R3RG, 2R3RG و 3RC3RG است.

۳-۴- نتایج حاصل از بررسی بیان ژن *TYMS* در بافت و حاشیه تومور
 در آنالیز بیان ژن *TYMS* در بافت توموری و حاشیه تومور ۱۰۰ بیمار مبتلا به سرطان معده، پس از انجام آزمون t-test و با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ ، در ۶۱ مورد (۶۱ درصد) افزایش بیان در بافت توموری، نسبت به بافت حاشیه تومور، نشان دادند و ۳۹ مورد (۳۹ درصد) افزایش بیان را نشان ندادند. منحنی ذوب ژن *TYMS* و نمودار تکثیر ژن *TYMS* به ترتیب در نمودار ۲ و ۳ نشان داده شده است.

نمودار ۲- منحنی ذوب ژن *TYMS*.
 نمودار ۳- نمودار تکثیر



نمودار ۳- نمودار تکثیر

نمودار ۲- منحنی ذوب ژن *TYMS*.

ژن *TYMS*

ارتباط بین بیان ژن *TYMS* و ژنوتیپهای مورد بررسی در جدول ۵ نشان داده شده است. بر اساس این جدول ارتباط معناداری بین بیان ژن *TYMS* و واریانت ژن *TYMS* ارتباط داشتند و بروز ژنوتیپهای 3R3R از *TYMS* مرتبط بودند.

به این معنا که ژنوتیپهای 2R2R از واریانت *TYMS* VNTR و CC از واریانت *TYMS* SNP با بیان کم ژن *TYMS* ارتباط داشتند و بروز ژنوتیپهای 3R3R از *TYMS* VNTR و CG از *TYMS* SNP با بیان زیاد ژن *TYMS* مرتبط بودند.

جدول ۵- ارتباط بین بیان ژن *TYMS* و ژنوتیپهای مورد مطالعه.

P-value	بیان ژن <i>TYMS</i>		هاژنوتیپ	هاواریانت
	فراوانی با بیان زیاد (%)	فراوانی با بیان کم (%)		
<0/001	۰ (/۰)	۲۵ (/۱۰۰)	2R2R	rs34733033 (<i>TYMS</i> 28 bp VNTR)
	۱۸ (/۳۳/۳۳)	۳۶ (/۶۶/۷)	2R3R	
	۲۱ (/۱۰۰)	۰ (/۰)	3R3R	
<0/001	۰ (/۰)	۲۵ (/۱۰۰)	None	rs2853542 (<i>TYMS</i> SNP C>G)
	۲۱ (/۴۲)	۲۹ (/۵۸)	2R3RC, 3RC3RC	
	۱۶ (/۶۹/۶)	۷ (/۳۰/۴)	3RG3RG, 2R3RG	
	۲ (/۱۰۰)	۰ (/۰)	3RC3RG	-



۴- بحث

واریانت‌های ژنتیکی و میزان بیان ژن‌ها می‌توانند در پیش‌بینی پاسخ به شیمی‌درمانی و پیش‌آگهی درمان مؤثر باشند. در مطالعه حاضر واریانت‌های ژنتیکی rs34733033 (*TYMS* 28-bp VNTR) و rs2853542 (*TYMS* SNP C>G) ژن *TYMS* در بیماران سرطان معده بررسی شده است. همچنین بیان ژن *TYMS* و در نهایت ارتباط بین واریانت‌ها و بیان ژن با پاسخ به درمان بیماران و بقای آن‌ها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته است.

در این مطالعه ارتباط معناداری بین واریانت *TYMS* 28 bp VNTR و پاسخ به درمان مشاهده شد ($P=0/032$). بیماران دارای ژنوتیپ 2R3R، نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها، پاسخ بهتری به درمان داده بودند، در حالی که پاسخ بیماران با ژنوتیپ 3R3R به درمان ضعیف بود. در مطالعه‌های گذشته نشان داده شد که حضور تکرارهای سه‌تایی 3R3R با کارایی ضعیف پاسخ به 5-FU مرتبط (۲۵) و در توافق با مطالعه حاضر است. مطالعه‌ای برای نشان دادن ارتباط بین واریانت‌های *TYMS* و پاسخ به شیمی‌درمانی در بیماران سرطان رکتال انجام و مشخص شد که ژنوتیپ 2R3R پاسخ بهتری به درمان داده بودند (۲۶). در سرطان رکتال مطالعه‌ای برای نشان دادن ارتباط بین واریانت‌های *TYMS* و پاسخ به شیمی‌درمانی انجام و مشخص شد که ژنوتیپ 2R3R پاسخ بهتری به درمان داده بودند (۲۵) که در توافق با مطالعه حاضر بود. رومیته^۱ و همکارانش نشان دادند که ژنوتیپ 2R2R با پیشرفت سمیت هماتولوژیک و معده‌ای- روده‌ای در بیماران درمان‌شده با کاپتیسابین مرتبط است. این مشاهده‌ها پیشنهاد دادند که حضور ژنوتیپ 2R2R سمیت شیمی‌درمانی استاندارد با فلوروپیریمیدین را پیش‌بینی می‌کند (۲۶). در گزارش دیگری که بیماران سرطان کولورکتال مورد بررسی قرار گرفته بودند ارتباط قابل‌توجهی بین تعداد آلل‌های 2R و سمیت فلوروپیریمیدین وجود داشت. ژنوتیپ 2R2R ژن *TYMS* نشانگر پیش‌بینی‌کننده به پاسخ کلینیکی و سمیت شدید به فلوروپیریمیدین‌ها در بیماران سرطان کولورکتال بود (۱۳). در این مطالعه ارتباط دوگانه‌ای بین سمیت بیشتر و پاسخ بهتر با ژنوتیپ 2R2R نشان داده شد که قبلاً نیز گزارش شده بود (۱۲، ۱۳ و ۲۶-۲۹).

در سال‌های اخیر مطالعاتی در زمینه ارتباط بین واریانت‌های *TYMS* و مدت‌زمان بقا انجام شده است.

بیشترین و کمترین میانگین زمان بقای بیماران پس از درمان به ترتیب در بیماران دارای ژنوتیپ‌های 3R3R و ۲R۲R مشاهده شد که اختلاف معناداری نیز بین آن‌ها وجود داشت ($p=0/003$). در مطالعه چن^۲ و همکارانش مشخص شد که بقای بیماران با ژنوتیپ 2R3R به‌طور قابل‌توجهی، نسبت به بیماران با ژنوتیپ 3R3R و 2R2R، طولانی‌تر است (۳۰). در بیماران سرطان ریه بعد از ۲۱ ماه فالو کردن مشخص شد که PFS برای افراد دارای ژنوتیپ 3R3R بهتر بود (۲۰). گزارشی دیگر نشان داد که بیماران دارای ژنوتیپ 2R2R، که با شیمی‌درمانی بر پایه فلوروپیریمیدین قبل از عمل درمان شده بودند، بقا کلی بسیار بهتری نسبت به ژنوتیپ‌های 3R3R، 2R3R داشتند (۲۹). مطالعه‌های دیگری در ارتباط با پیش‌بینی بقا و ارتباط آن با واریانت‌ها در ناحیه 5'-UTR ژن *TYMS* انجام شده که در هیچ‌کدام ارتباط معناداری گزارش نشده است (۲۰، ۲۷ و ۳۱-۳۵). علاوه بر این، ارتباط معناداری بین بیان ژن *TYMS* و واریانت 28 bp VNTR مشاهده شد ($P=0/001$). ژنوتیپ‌های 2R2R با بیان کمتر *TYMS* ارتباط داشتند و بروز ژنوتیپ‌های 3R3R با بیان زیاد *TYMS* مرتبط بودند. افزایش میزان *TYMS* در بافت توموری بیماران سرطان معده مشاهده شده است که مرتبط با نتیجه ضعیف پاسخ به درمان با 5-FU است (۲۶). پولارکیت^۳ و همکارانش برای اولین بار اهمیت ارتباط بین مقدار *TYMS* mRNA در بافت توموری و نرمال و نیز واریانت توالی تکراری 28 bp در ناحیه 5'-UTR ژن *TYMS* را گزارش کردند. در این مطالعه بیان بیشتر داخل توموری *TYMS* mRNA با افزایش تعداد تکرارهای توالی 28 bp مشاهده شد. همچنین نشان داده شد که آلل 3R نه تنها بیان درون توموری *TYMS* mRNA را پیش‌بینی می‌کند، بلکه قادر به پیش‌بینی پاسخ به شیمی‌درمانی بر پایه 5-FU نیز است. بیماران با ژنوتیپ 2R2R پاسخ به 5-FU قابل‌قبول‌تری داشتند؛ زیرا بیان داخل توموری *TYMS* mRNA آن‌ها به‌طور قابل‌توجهی در این گروه کمتر بود (۳۶). گزارش دیگری نیز نشان داد که تکرارهای سه‌تایی 28 bp در انتهای 5'-UTR ژن *TYMS* مرتبط با بیان بیشتر ژن *TYMS* نسبت به تکرار دوتایی آن است، همچنین این مطالعه نشان داد که بیان *TYMS* mRNA کمتر در بافت نرمال مرتبط با ریسک بیشتر اثرهای سمیت 5-FU است. کاهش یافتن بیان *TYMS* mRNA در بافت نرمال بیماران

³ Pullarkat

¹ Romiti

² Chen

در یک گزارش ارتباط بین واریانت rs2853542 و پیش‌بینی سمیت نسبت به فلوروپیریمیدین‌ها در بیماران سرطان کولورکتال بررسی شد (۲۷). در دو مطالعه دیگر روی بیماران سرطان کولورکتال، واریانت *TYMS* SNP نتوانست نتیجه پاسخ کلینیکی را پیش‌بینی کند (۳۳) و (۴۲). در مطالعه لیما^۳ و همکارانش روی بیماران سرطان ریه، بیماران هموزیگوت 3RG بقای بهتری نشان دادند (۱۵) که در توافق با گزارش (۴۳) الدر^۴ و همکارانش است. در این مطالعه نیز ارتباط معناداری بین واریانت rs2853542 و پاسخ به درمان و بقای کلی بیماران مشاهده نشد.

۵- نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که واریانت rs34733033 (*TYMS* 28 bp VNTR) ژن *TYMS* می‌تواند در پیش‌بینی پاسخ به شیمی‌درمانی بر پایه 5-FU مؤثر باشد. بیماران با ژنوتیپ 3R3R پاسخ ضعیفی به درمان داشتند، درحالی‌که بیماران با ژنوتیپ 2R3R پاسخ به درمان بهتری را نشان دادند.

۶- ملاحظات اخلاقی

پروتکل انجام مطالعه در تاریخ ۱۳۹۷/۱۰/۲۳ به تصویب کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات تهران با شناسه IR.IAU.SRB.REC.1397.110 رسید.

۷- تشکر و قدردانی

بدین وسیله از زحمات توموربانک انستیتو کانسر بیمارستان امام خمینی (ره) تهران برای تهیه نمونه و آزمایشگاه ژینوزن پژوهان برای انجام آزمایش‌های مولکولی تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

۸- تعارض منافع

ندارد.

با ژنوتیپ 2R2R سلول‌های نرمال، به دلیل کارایی زیاد مهار *TYMS*، در برابر آسیب‌های شیمی‌درمانی بر پایه 5-FU محافظت نمی‌شود (۲۷). شینتانی^۱ و همکارانش ثابت کردند که میزان mRNA در بافت‌های سرطان ریه با ژنوتیپ 3R3R، در مقایسه با ژنوتیپ 2R2R، به شکل قابل توجهی بیشتر است (۳۷). مطالعه‌های بیان ژن *TYMS* در نمونه‌های سرطان کولورکتال نشان داد که بیان ژن در نمونه‌های بافت توموری با ژنوتیپ 2R2R کاهش می‌یابد (۱۳). همچنین مطالعه‌های انجام شده در تومورهای gastrointestinal نشان دادند که ژنوتیپ 3R3R مرتبط با افزایش بیان *TYMS* در مقایسه با ژنوتیپ‌های 2R2R و 2R3R (۳۸) و در توافق با مطالعه حاضر است. مطالعه‌های دیگر نیز در زمینه ارتباط بین واریانت *TYMS* VNTR در ناحیه 5'-UTR و بیان ژن *TYMS* انجام شد و ارتباط معناداری مشاهده نشده است (۱۵، ۱۸، ۲۶ و ۳۹).

در مطالعه‌هایی نیز نشان داده شد که SNP در توالی 28 bp ناحیه 5'-UTR ژن *TYMS* می‌تواند بیان افزایش یافته مرتبط با توالی‌های تکراری ژن *TYMS* را تغییر دهد (۲۷، ۲۸، ۳۳ و ۴۰). یک جانشینی در باز G→C نوکلئوتید دوازدهم توالی دوم در آلل 3R، لوکوس سه آلی (2R، 3RG و 3RC) ایجاد می‌کند (۴۱) که قابلیت ایجاد تغییر اساسی در ناحیه USF-E box را دارد (۲۸، ۳۳، ۴۰ و ۴۱). این تغییر باز جایگاه باندشونده به USF1 (USF1 binding site) را تخریب و جایگاه E box را حذف می‌کند، در نتیجه در این حالت فعالیت نسخه برداری آلل 3RC مشابه آلل 2R خواهد بود (۲۷، ۳۳ و ۴۰). بنابراین نتایج پیشنهاد می‌کنند که توالی اضافه 28 bp به تنهایی برای فعالیت نسخه برداری افزایش یافته ژن *TYMS* کافی نیست، اما جایگاه USF E-box در توالی اضافه تکراری برای افزایش نسخه برداری نیاز است (۴۰). براساس مطالعه‌های مندولا^۲ و همکارانش به نظر می‌رسد این SNP توانایی تکرارهای به عنوان افزایش یافته نسخه برداری را تغییر می‌دهد و در توضیح اختلافات در پیش‌بینی پاسخ به درمان 5-FU به عنوان یک مارکر مفید ارزیابی می‌شود (۴۰). در مطالعه حاضر بین بیان ژن *TYMS* و واریانت rs2853542 (*TYMS* SNP C>G) ارتباط معناداری مشاهده شد ($p < 0.001$) و ژنوتیپ CC از واریانت *TYMS* SNP با بیان کمتر *TYMS* مرتبط بود و بروز ژنوتیپ CG از *TYMS* SNP با بیان زیاد *TYMS* مرتبط بود.

³ Lima

⁴ Edler

¹ Shintani

² Mandola

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2021;71(3):209-49.
2. Sitarz R, Skierucha M, Mielko J, Offerhaus GJA, Maciejewski R, Polkowski WP. Gastric cancer: epidemiology, prevention, classification, and treatment. *Cancer management and research*. 2018:239-48.
3. Duarte HO, Gomes J, Machado JC, Reis CA. Gastric cancer: Basic aspects. *Helicobacter*. 2018;23:e12523.
4. Shi W-J, Gao J-B. Molecular mechanisms of chemoresistance in gastric cancer. *World journal of gastrointestinal oncology*. 2016;8(9):673.
5. Marin J, Al-Abdulla R, Lozano E, Briz O, Bujanda L, M Banales J ,et al. Mechanisms of resistance to chemotherapy in gastric cancer. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*. 2016;16(3):318-34.
6. Yang W, Ma J, Zhou W, Cao B, Zhou X, Yang Z, et al. Molecular mechanisms and theranostic potential of miRNAs in drug resistance of gastric cancer. *Expert opinion on therapeutic targets*. 2017;21(11):1063-75.
7. Russi S, Verma HK, Laurino S, Mazzone P, Storto G, Nardelli A, et al. Adapting and surviving: intra and extra-cellular remodeling in drug-resistant gastric cancer cells. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(15):3736.
8. Marin JJ, Perez-Silva L, Macias RI, Asensio M, Peleteiro-Vigil A, Sanchez-Martin A, et al. Molecular bases of mechanisms accounting for drug resistance in gastric adenocarcinoma. *Cancers*. 2020;12(8):2116.
9. Biagioni A, Staderini F, Peri S, Versienti G, Schiavone N, Cianchi F, et al. 5-Fluorouracil conversion pathway mutations in gastric cancer. *Biology*. 2020;9(9):265.
10. De Mattia E, Roncato R, Palazzari E, Toffoli G, Cecchin E. Germline and somatic pharmacogenomics to refine rectal cancer patients selection for neo-adjuvant chemoradiotherapy. *Frontiers in Pharmacology*. 2020;11:897.
11. Hernando-Cubero J, Matos-García I, Alonso-Orduña V, Capdevila J. The role of fluoropyrimidines in gastrointestinal tumours: From the bench to the bed. *Journal of gastrointestinal cancer*. 2017;48:135-47.
12. Gallegos-Arreola M, Zúñiga-González G, Sánchez-López J, Cruz A, Peralta-Leal V, Figuera L ,et al. TYMS 2R3R polymorphism and DPYD [IVS] 14+ 1G> A gene mutation in Mexican colorectal cancer patients. *Acta Biochimica Polonica*. 2018;65(2):227-34.
13. Castro-Rojas CA, Esparza-Mota AR, Hernandez-Cabrera F, Romero-Diaz VJ, Gonzalez-Guerrero JF, Maldonado-Garza H, et al. Thymidylate synthase gene variants as predictors of clinical response and toxicity to fluoropyrimidine-based chemotherapy for colorectal cancer. *Drug Metabolism and Personalized Therapy*. 2017;32(4):209-18.
14. Meulendijks D, Rozeman E ,Cats A, Sikorska K, Joerger M, Deenen M, et al. Pharmacogenetic variants associated with outcome in patients with advanced gastric cancer treated with fluoropyrimidine and platinum-based triplet combinations: a pooled analysis of three prospective studies. *The pharmacogenomics journal*. 2017;17(5):441-51.
15. Lima A, Azevedo R, Sousa H, Seabra V, Medeiros R. Current approaches for TYMS polymorphisms and their importance in molecular epidemiology and pharmacogenetics. *Pharmacogenomics*. 2013;14(11):1337-51.
16. Palmirotta R, Carella C, Silvestris E, Cives M, Stucci SL, Tucci M, et al. SNPs in predicting clinical efficacy and toxicity of chemotherapy: walking through the quicksand. *Oncotarget*. 2018;9(38):25355.
17. Burgart LJ, Shi C, Driman D, Fitzgibbons P ,Frankel W, Hill K. Protocol for the Examination of Specimens from Patients with Carcinoma of the Appendix. *College of American Pathologists*. 2020.

18. Shitara K, Muro K, Ito S, Sawaki A, Tajika M, Kawai H, et al. Folate intake along with genetic polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase and thymidylate synthase in patients with advanced gastric cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*. 2010;19(5):1311-9.
19. Suzuki T. Alcohol Drinking and One-Carbon Metabolism-Related Gene Polymorphisms on Pancreatic Cancer Risk. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 17: 2742–2747. (No Title). 2008;10.1158/055.
20. Arévalo E, Castañón E, López I, Salgado J, Collado V, Santisteban M, et al. Thymidylate synthase polymorphisms in genomic DNA as clinical outcome predictors in a European population of advanced non-small cell lung cancer patients receiving pemetrexed. *Journal of Translational Medicine*. 2014;12:1-9.
21. Lu J-W, Gao C-M, Wu J-Z, Cao H-X, Tajima K, Feng J-F. Polymorphism in the 3'-untranslated region of the thymidylate synthase gene and sensitivity of stomach cancer to fluoropyrimidine-based chemotherapy. *Journal of human genetics*. 2006;51(3):155-60.
22. Fariña-Sarasqueta A, van Lijnschoten G, Rutten HJ, Van den Brule AJ. Value of gene polymorphisms as markers of 5-FU therapy response in stage III colon carcinoma: a pilot study. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2010;66:1167-71.
23. Lincz LF, Scorgie FE, Garg MB, Ackland SP. Identification of a novel single nucleotide polymorphism in the first tandem repeat sequence of the thymidylate synthase 2R allele. *International journal of cancer*. 2007;120(9):1930-4.
24. Pastorakova A, Chandogova D, Chandoga J, Luha J, Bohmer D, Malova J, et al. Distribution of the most common polymorphisms in TYMS gene in Slavic population of central Europe. *Neoplasma*. 2017;64(6):962-70.
25. Yang Y, Wu G, Jin L, Wang K, Bai Z, Wang J, et al. Association of thymidylate synthase polymorphisms with the tumor response to preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *The pharmacogenomics journal*. 2017;17(3):265-73.
26. Romiti A, Roberto M, D'Antonio C, Onesti CE, Barucca V, Milano A, et al. The TYMS-TSER polymorphism is associated with toxicity of low-dose capecitabine in patients with advanced gastrointestinal cancer. *Anti-cancer drugs*. 2016;27(10):1044-9.
27. Lecomte T, Ferraz J-M, Zinzindohoué F, Loriot M-A, Tregouet D-A, Landi B, et al. Thymidylate synthase gene polymorphism predicts toxicity in colorectal cancer patients receiving 5-fluorouracil-based chemotherapy. *Clinical Cancer Research*. 2004;10(17):5880-8.
28. Kristensen M, Pedersen P, Melsen G, Ellehauge J, Mejer J. Variants in the dihydropyrimidine dehydrogenase, methylenetetrahydrofolate reductase and thymidylate synthase genes predict early toxicity of 5-fluorouracil in colorectal cancer patients. *Journal of International Medical Research*. 2010;38(3):870-83.
29. Smyth E, Zhang S, Cunningham D, Wotherspoon A, Soong R, Peckitt C, et al. Pharmacogenetic analysis of the UK MRC (medical Research Council) magic trial: association of polymorphisms with toxicity and survival in patients treated with perioperative epirubicin, cisplatin, and 5-fluorouracil (ECF) chemotherapy. *Clinical Cancer Research*. 2017;23(24):75.۹-۴۳
30. Chen J, Ying X, Zhang L, Xiang X, Xiong J. Influence of TS and ABCB1 gene polymorphisms on survival outcomes of 5-FU-based chemotherapy in a Chinese population of advanced gastric cancer patients. *Wiener klinische Wochenschrift*. 2017;129:420-6.
31. Gao J, He Q, Hua D, Mao Y, Li Y, Shen L. Polymorphism of TS 3'-UTR predicts survival of Chinese advanced gastric cancer patients receiving first-line capecitabine plus paclitaxel. *Clinical and Translational Oncology*. 2013;15:619-25.
32. Kim H, Seo B, Kim J, Oh S, Lee S, Kim S, et al. Comprehensive analysis of Excision repair complementation group 1, Glutathione S-transferase, Thymidylate synthase, and Uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1A1

polymorphisms predictive for treatment outcome in patients with advanced gastric cancer treated with FOLFOX or FOLFIRI. *Journal of Clinical Oncology*. 2009;27(15_suppl):e15580-e.

33.Gusella M, Frigo A, Bolzonella C, Marinelli R, Barile C, Bononi A, et al. Predictors of survival and toxicity in patients on adjuvant therapy with 5-fluorouracil for colorectal cancer. *British journal of cancer*. 2009;100(10):1549-57.

34.Cui YH, Liu TS, Zhuang RY, Gao HJ, Li H. Polymorphism of thymidylate synthase gene and chemosensitivity of 5-fluorouracil regimen in metastatic gastrointestinal cancer. *Journal of Digestive Diseases*. 2009;10(2):118-23.

35.Martinez-Balibrea E, Abad A, Martínez-Cardús A, Ginés A, Valladares M, Navarro M, et al. UGT1A and TYMS genetic variants predict toxicity and response of colorectal cancer patients treated with first-line irinotecan and fluorouracil combination therapy. *British journal of cancer*. 2010;103(4):581-9.

36.Pullarkat S, Stoehlmacher J, Ghaderi V, Xiong Y, Ingles S, Sherrod A, et al. Thymidylate synthase gene polymorphism determines response and toxicity of 5-FU chemotherapy. *The pharmacogenomics journal*. 2001;1(1):65-70.

37.Shintani Y, Ohta M, Hirabayashi H, Tanaka H, Iuchi K, Nakagawa K, et al. New prognostic indicator for non-small-cell lung cancer, quantitation of thymidylate synthase by real-time reverse transcription polymerase chain reaction. *International journal of cancer*. 2003;104(6):790-5.

38.Iacopetta B, Grieu F, Joseph D, Elsaleh H. A polymorphism in the enhancer region of the thymidylate synthase promoter influences the survival of colorectal cancer patients treated with 5-fluorouracil. *British journal of cancer*. 2001;85(6):827-30.

39.Gosens MJ, Moerland E, Lemmens VP, Rutten HT, Tan-Go I, van den Brule AJ. Thymidylate synthase genotyping is more predictive for therapy response than immunohistochemistry in patients with colon cancer. *International journal of cancer*. 2008;123(8):1941-9.

40.Mandola MV, Stoehlmacher J, Muller-Weeks S, Cesarone G, Yu MC, Lenz H-J, et al. A novel single nucleotide polymorphism within the 5' tandem repeat polymorphism of the thymidylate synthase gene abolishes USF-1 binding and alters transcriptional activity. *Cancer research*. 2003;63(11):2898-904.

41.Cho H-J, Park YS, Kang WK, Kim J-W, Lee S-Y. Thymidylate synthase (TYMS) and dihydropyrimidine dehydrogenase (DPYD) polymorphisms in the Korean population for prediction of 5-fluorouracil-associated toxicity. *Therapeutic drug monitoring*. 2007;29(2):190-6.

42.Dotor E, Cuatrecasas M, Martínez-Iniesta M, Navarro M, Vilardell F, Guinó E, et al. Tumor thymidylate synthase 1494del6 genotype as a prognostic factor in colorectal cancer patients receiving fluorouracil-based adjuvant treatment. *J Clin Oncol*. 2006;24(10):1603-11.

43.Edler D, Glimelius B, Hallström M, Jakobsen A, Johnston PG, Magnusson I, et al. Thymidylate synthase expression in colorectal cancer: a prognostic and predictive marker of benefit from adjuvant fluorouracil-based chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology*. 2002;20(7):1721-8.