خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۶ شماره ۴ زمستان ۸۸ (۲۷۵-۲۶۶)
مقاله پژوهشی

# پلی‌مورفیسم‌های آنزیم متیلن تتراهیدروفولات ردوکتاز و لوسمی حاد لنفوبلاستیک کودکان

فرزانه آتش رزم[۱]، فرهاد ذاکر[۲]، مهناز آقایی‌پور[۳]، وحید پاژخ[۱]

## چکیده

### سابقه و هدف

تغییرات ژنتیکی و موتاسیون‌هایی که در سطح ژن روی می‌دهند؛ از جمله عوامل اتیولوژیک به وجود آورنده لوسمی‌ها می‌باشند. از این تغییرات می‌توان به پلی‌مورفیسم‌هایی اشاره کرد که در سطح ژن بعضی مولکول‌های حیاتی حضور دارند. هدف از این مطالعه، ارزیابی میزان شیوع دو پلی‌مورفیسم مهم در این ناحیه ژنی یعنی C667T و A1298C و بررسی نقش انفرادی و یا مشترک این دو در ایجاد حفاظت در برابر لوسمی حاد لنفوبلاستیک بیماران زیر ۱۶ سال بود.

### مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع مورد ـ شاهدی بود. با استفاده از روش PCR-RFLP ، به صورت تصادفی تعداد ۱۰۳ نفر از بیماران مبتلا به ALL زیر ۱۶ سال و ۱۶۰ نفر از گروه کنترل هماهنگ از نظر سن و جنس، مورد بررسی قرار گرفتند. جهت تحلیل آماری از آزمون‌های Hardy-weinberg equilibrium ، کای‌دو و نرم‌افزار SPSS ۱۶ استفاده گردید.

### یافته‌ها

ارتباط معناداری بین دو پلی‌مورفیسم آنزیم متیلن‌تتراهیدروفولات ردوکتاز(MTHFR) و ابتلا به لوسمی یافت نشد. در مورد C677T ، برای 677CT در مقابل 677CC (۱/۹۵-۰/۵۸ = ٪۹۵ CI) OR=۱/۰۸، برای 677TT در مقابل 677CC (۱/۲۴-۰/۰۵= ٪۹۵ CI) OR=۰/۲۵ و برای مجموع 677TT/677CT در مقابل 677CC (۱/۶۶-۰/۵۳= ٪۹۵ CI) OR=۰/۹۴ بود. نتیجه مهم دیگر، شیوع بالای پلی‌مورفیسم A1298C (۴۰/۶۷٪ در مقابل ۱۷٪ تا ۱۹٪ در سایر جمعیت‌های آسیایی) در جمعیت مورد مطالعه ایرانی بود.

### نتیجه گیری

نتایج مطالعه نشان می‌دهد که واریانت‌های C677T و A1298C از آنزیم MTHFR، تاثیر چندانی بر کاهش خطر ابتلا به ALL ندارند. اما شیوع این پلی‌مورفیسم‌ها در افراد نرمال بیشتر از مبتلایان به ALL بود که می‌تواند حمایت کننده بعضی نتایج قبلی باشد.

**کلمات کلیدی:** پلی‌مورفیسم، آنزیم متیلن تتراهیدروفولات ردوکتاز، لوسمی حاد لنفوبلاستیک کودکان

تاریخ دریافت : ۸۷/۱۲/۲۴
تاریخ پذیرش : ۸۸/ ۶/۱۱

۱ـ کارشناس ارشد هماتولوژی و بانک خون ـ دانشگاه علوم پزشکی ایران، مرکز تحقیقات انکوپاتولوژی و مرکز تحقیقات سلولی مولکولی
۲ـ مؤلف مسؤول: PhD هماتولوژی ـ دانشیار دانشگاه علوم پزشکی ایران، مرکز تحقیقات انکوپاتولوژی و مرکز تحقیقات سلولی مولکولی ـ صندوق پستی: ۱۴۱۵۵-۶۱۸۳
۳ـ متخصص آسیب‌شناسی ـ استادیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-10-14 ]

**مقدمه**

از جمله عوامل اتیولوژیک به وجود آورنده لوسمی‌ها، تغییرات ژنتیکی و موتاسیون‌هایی است که در سطح ژن روی می‌دهد. به عنوان مثال می‌توان به حضور پلی‌مورفیسم‌هایی اشاره کرد که در ژن بعضی مولکول‌های حیاتی حضور دارند و ارتباط بین این پلی‌مورفیسم‌ها با مستعد کردن و یا بالعکس حفاظت شخص در مقابل بیماری‌ها از جمله لوسمی‌ها، در حال مطالعه و بررسی است. یکی از این مولکول‌ها، آنزیم متیلن‌تتراهیدروفولات ردوکتاز می‌باشد که تاثیر دو پلی‌مورفیسم مهم فانکشنال آن در ایجاد حفاظت در مقابل لوسمی‌های حاد، در حال بررسی است. مطالعه‌ها نشان می‌دهد که حضور این دو پلی‌مورفیسم، خاصیت محافظتی در کودکان برای ابتلا به لوسمی حاد لنفوبلاستیک دارد.

لوسمی لنفوبلاستیک حاد، شایع‌ترین لوسمی و نیز شایع‌ترین کانسر شناخته شده در بین کودکان است. این بیماری شامل گروهی از بدخیمی‌ها است که با استناد بر شواهد موجود، به جز موارد نادر، در ناپایداری‌های ژنتیکی و نقص ایمنی که باعث ایجاد حدود ۵٪ موارد بیماری می‌شوند، در سایر موارد حساسیت‌های موجود در سلول‌های زایا عامل ایجاد بیماری می‌باشد. تنوع انواع زیرگروه‌های لوسمی کودکان نشان‌دهنده حضور عوامل اتیولوژیک مختلف است(۱).

از جمله نواحی ژنتیکی که به نظر می‌رسد می‌تواند با تکثیر لجام گسیخته سلول‌های هماتوپویتیک ارتباط داشته باشد، جایگاه ژنتیکی آنزیم متیلن تتراهیدروفولات ردوکتاز (MTHFR) است. ارتباط بین تغییرات اپی‌ژنتیک و تاثیر آن‌ها بر سلول‌های هماتوپویتیک، باعث ایجاد علاقه به مطالعه بر روی واریانت‌های مختلف MTHFR و لوکموژنزیس شده است. علت تاثیر این ناحیه ژنتیکی، به نقش مهم فولات در فرایند تکثیر سلول بر می‌گردد(۲).

با توجه به مطالعه‌های انجام شده در مورد ارتباط میان وضعیت فولات با ایجاد کانسر، این فرضیه وجود دارد که آنزیم MTHFR با توجه به نقشی که در کاهش و افزایش حوضچه فولات و مشتقات موثر آن در واکنش‌های مربوط به سنتز DNA دارد، می‌تواند در بروز سرطان نقش داشته باشد(۳).

بیش از ۲۵ پلی‌مورفیسم در ناحیه ژنتیکی کدکننده آنزیم MTHFR شناسایی شده است که مهم‌ترین آن، جایگزینی تیمین به جای سیتوزین در ناحیه ۶۷۷ نوکلئوتیدی در اگزون ۴ است که منجر به تبدیل اسیدآمینه آلانین به والین در ناحیه ۲۲۲ ازساختار پروتئین می‌شود(A222V). جهش در این موقعیت چه به صورت هموزیگوت و چه به صورت هتروزیگوت، منجر به کاهش فعالیت آنزیم و افزایش ناپایداری در برابر حرارت(thermoability) آن می‌گردد. نشان داده شده است که فعالیت اگر در حالت نوع وحشی، ۱۰۰٪ در نظر گرفته شود، میزان آن به ۶۵٪ در هتروزیگوت CT و به ۳۰ ٪ در هموزیگوت T کاهش می‌یابد(۴). افراد هموزیگوت برای جهش به صورت معناداری دارای افزایش مقادیر پلاسمایی هموسیستئین می‌باشند. نقش فاکتور خطری این پلی‌مورفیسم در بیمارهای قلبی وعروقی مشخص شده است.

با مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۳ برای توزیع پلی‌مورفیسم 677C-T در ژن MTHFR انجام شد، ژنوتیپ TT دارای شیوع به صورت ۲۰٪ در چین جنوبی، ۲۶٪ در غرب ایتالیا و ۳۲٪ در مکزیک بود. میزان شیوع ژنوتیپ TT در نوزادان آفریقایی کم، در نواحی اروپایی متوسط و در آمریکا بالا بود(۵).

در سال ۱۹۹۸ پلی‌مورفیسم دیگری (1298A-C) نیز شناسایی شده که در کاهش فعالیت آنزیم نقش دارد. در این پلی‌مورفیسم، جایگزینی سیتوزین به جای آدنین در ناحیه ۱۲۹۸ نوکلئوتیدی منجر به تغییر گلوتامین به آلانین در جایگاه ۴۲۹ از ساختار پروتئین می‌گردد(۷، ۶). ژنوتیپ CC دارای ۶۰٪ از فعالیت نسبت به نوع AA می‌باشد(۷). شیوع آلل C از ۱۹٪–۱۷٪ در بین جمعیت آسیایی تا ۳۶٪–۲۷٪ در اروپای غربی متفاوت است(۸).

کاهش فعالیت آنزیم MTHFR که به دلیل حضور پلی‌مورفیسم‌های مذکور ایجاد شده است، باعث افزایش متیلن تتراهیدروفولات و متعاقباً افزایش تبدیل dUMP به dTMP در ساختمان DNA می‌شود. در واقع میزان اشتباه قرارگیری U به جای T در ساختمان DNA کاهش می‌یابد



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-10-14 ]

و DNA در مقابل شکست و سایر تغییرات کروموزومی محافظت می‌شود. این تئوری می‌تواند حمایت کننده نقش حفاظتی این پلی‌مورفیسم‌ها در بروز سرطان باشد؛ در مطالعه‌های گذشته نشان داده شده که افراد هموزیگوت برای این واریانت‌ها، به میزان کمتری مبتلا به سرطان‌هایی مثل سرطان کولورکتال و سرطان پستان می‌شوند(۱۰، ۹). در پی این یافته‌ها، مطالعه‌هایی برای ارتباط واریانت‌های آللیک MTHFR با بدخیمی‌های خونی صورت گرفت، زیرا لوسمی‌ها نیز مانند کارسینوماهای کولورکتال، از سرطانی شدن بافت‌هایی با تکثیر بالا که نیاز بسیار بالایی به سنتز DNA دارند ایجاد می‌گردد. از طرف دیگر فعالیت کاهش‌یافته این آنزیم باعث کاهش روند متیلاسیون هموسیستئین به متیونین و در پی آن کاهش مقادیر S-آدنوزیل متیونین (SAM) می‌گردد که این مسیر در نهایت موجبات هایپومتیلاسیون در DNA را فراهم می‌آورد و از این نظر، می‌تواند اختلالاتی در زمینه بیان ژن در سطح ژنوم ایجاد کرده، موجبات پیشرفت به سوی بیماری‌ها از جمله سرطان را فراهم آورد(۱۱).

هدف از انجام این مطالعه، ارزیابی میزان شیوع دو پلی مورفیسم مهم در این ناحیه ژنی یعنی C667T و A1298C که تا به حال در ایران، گزارشی از آن صورت نگرفته و بررسی نقش انفرادی و یا مشترک این دو پلی‌مورفیسم برای ایجاد حفاظت در برابر لوسمی حاد لنفوبلاستیک در بیماران زیر ۱۶ سال بود.

## مواد و روش ها

مطالعه انجام شده از نوع مورد ـ شاهدی بود. جهت بررسی پلی‌مورفیسم‌های A1298C و C677T در ژن MTHFR ، ۱۰۳ نمونه خونی افراد مبتلا به لوسمی لنفوئیدی حاد(ALL) به صورت تصادفی با پراکندگی طبیعی و زیر گروه‌های مختلف: Pro-B ALL ، Early Pre-B ALL ، Pre-B ALL ، B-cell ALL و T-ALL از بخش فلوسیتومتری آزمایشگاه پاتوبیولوژی تخت طاووس و نیز مرکز فلوسیتومتری سازمان انتقال خون تهیه شد تا جهت استخراج DNA و بررسی‌های بعدی مورد استفاده قرار گیرد. بیماران در رنج سنی ۱۶-۰ سال قرار داشتند. نمونه‌های تهیه شده، مغز استخوان(BM) و در تعداد محدودی از موارد خون محیطی(PB) بیماران مبتلا بود. هم چنین ۱۶۰ نمونه خون محیطی کودکان نرمال که از نظر سن و جنس با گروه بیماران هماهنگ بودند، از بیمارستان کودکان علی‌اصغر جمع‌آوری گردید. پرونده گروه کنترل بررسی شد. این افراد اکثراً از افراد مراجعه‌کننده سرپایی یا اورژانسی بودند و تا زمان نمونه‌گیری، گزارشی از بدخیمی و لوسمی نداشتند.

آنالیز استاندارد PCR-RFLP برای تعیین ژنوتیپ به کار گرفته شد. در ابتدا استخراج DNA از گلبول‌های سفید نمونه‌های دو گروه صورت گرفت. بدین منظور از روش دستی استخراج با فنل ـ کلروفرم و رسوب‌گیری با اتانول استفاده گردید که محلول لیز اولیه WBC و RBC ، از شرکت ژن فن‌آوران و با عنوان کیت استخراج DNA Fast تهیه شد. ناحیه ژنتیکی مورد نظر برای هر دو پلی‌مورفیسم به طور جداگانه تکثیر گردید؛

C677T : آغازگر مورد استفاده شامل 5'- TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA-3' جهت forward (جلو برنده) و 5'- AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG-3' جهت reverse (معکوس)(با ایجاد محصولی به طول bp ۱۹۸) بود. هر واکنش PCR محتوی (pH ۸/۳) ۱۰mM TrisHCl، ۵۰ mM KCl، ۰/۲ mM dNTP، ۵ unit *Taq* polymerase ، ۲۰۰-۵۰۰ ng/µL DNA و غلظت نهایی ۷ picomol/µL از هر آغازگر بود. جهت PCR ، تعداد ۳۵ سیکل با برنامه ۴۵ ثانیه ºC ۹۴ ، ۴۵ ثانیه ºC ۶۴ و ۱ دقیقه ºC ۷۲ مورد استفاده قرار گرفت. بعد از انجام PCR ، جهت اطمینان از تکثیر قطعه مورد نظر، تمامی نمونه‌ها روی ژل آگاروز ۲٪ الکتروفورز گردیدند. سپس باقیمانده محصول جهت هضم آنزیمی به مدت ۱۶ ساعت در مجاورت آنزیم Hinf1 قرار گرفت. پس از اتمام مدت انکوباسیون، محصولات مجدداً روی آگاروز ۲٪ الکتروفورز شده و مورد بررسی قرار گرفتند. قطعه هضم نشده bp ۱۹۸ نشان دهنده تایپ وحشی هموزیگوت، وجود ۳ قطعه به طول‌های bp ۲۳، bp ۱۹۸ و bp ۱۷۵ نشان‌دهنده هتروزیگوت و وجود ۲ قطعه به طول‌های bp ۱۷۵ و bp ۲۳ نشانگر هموزیگوت واریانت در این ناحیه بود.



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-10-14 ]

A1298C : آغازگر مورد استفاده شامل 5´ – GCA AGT CCC CCA AGG AGG -3´ جهت جلوبرنده و 5´ – GGT CCC CAC TTC CAG CAT C-3´ جهت معکوس(با ایجاد محصولی به طول ۱۴۵bp) بود. هر واکنش PCR محتوی ۵۰ mM KCl، ۱۰ mM TrisHCl (pH ۸/۳) ، ۰/۲ mM dNTP، ۵ unit *Taq* polymerase ، ۵۰۰–۲۰۰ ng/µl DNA و غلظت نهایی ۷ picomol/µl از هر آغازگر بود. جهت PCR، تعداد ۴۰ سیکل با برنامه ۱ دقیقه ۹۴ ºC ، ۱دقیقه ۶۷ ºC و ۱ دقیقه ۷۲ ºC مورد استفاده قرار گرفت. بعد از انجام PCR ، جهت اطمینان از تکثیر قطعه مورد نظر، تمامی نمونه‌ها روی ژل آگاروز ۲٪ الکتروفورز گردیدند. سپس باقیمانده محصول جهت هضم آنزیمی به مدت ۱۶ ساعت در مجاورت آنزیم Mbo II قرار گرفت. پس از اتمام مدت انکوباسیون، محصولات جهت الکتروفورز عمودی، روی ژل پلی‌اکریلامید برده شدند. سه باند تکی به طول‌های ۷۹ bp ، ۳۷ bp ، ۲۹ bp نشان‌دهنده نوع وحشی هموزیگوت، چهار باند به طول‌های ۱۰۸ bp ، ۷۹ bp ، ۳۷ bp ، ۲۹ bp نشان‌دهنده هتروزیگوت و وجود دو باند به طول‌های ۱۰۸ bp و ۳۷ bp نشانگر هموزیگوت واریانت در این ناحیه بود.

ارتباط بین پلی‌مورفیسم‌ها و بیماری با استفاده از آنالیز رگرسیون آماری، Odds ratio (OR) و فاصله اطمینان ۹۵٪ (CI) محاسبه گردید. شیوع واریانت‌های MTHFR توسط آزمایش Hardy-Weinberg equilibrium آنالیز گردید. محاسبه‌های آماری توسط پکیج آماری SPSS ۱۶ و ارتباط این متغیرها با هم توسط STATA تجزیه و تحلیل شد.

## یافته‌ها

۱۶۰ فرد گروه کنترل و ۱۰۳ بیمار، همگی برای ناحیه ژنی C677T تکثیر شدند(شکل ۱). نتایج برای افراد نرمال بدین صورت به دست آمد: ۶۳/۱٪ (۱۰۱ نفر) هموزیگوت CC ، ۲۹/۴٪ (۴۷ نفر) هتروزیگوت CT و ۷/۵٪ (۱۲ نفر) هموزیگوت TT . هم چنین برای افراد بیمار : ۶۵/۰۵٪ (۶۷ نفر) هموزیگوت CC ، ۳۳٪ (۳۴ نفر) هتروزیگوت CT و ۱/۹۵٪ (۲ نفر) هموزیگوت TT.

برای پلی‌مورفیسم A1298C نیز همگی تکثیر شدند (شکل ۲). نتایج برای افراد نرمال شامل ۳۱/۲٪(۵۰ نفر) هموزیگوت AA ، ۵۶/۳٪(۹۰ نفر) هتروزیگوت AC ، ۱۲/۵٪(۲۰نفر) هموزیگوت CC ، و برای افراد بیمار ۳۰/۱٪ (۳۱نفر) هموزیگوت AA ، ۵۸/۳٪ (۶۰ نفر) هتروزیگوت AC و ۱۱/۶٪ (۱۲ نفر) هموزیگوت CC (جدول ۱).

در مورد C677T نتایج زیر حاصل شد: میزان شیوع آلل T در گروه کنترل۲۲/۲٪ ، در افراد بیمار ۱۸/۴۵٪ و در مجموع دو گروه ۲۰/۳٪ بود. با توجه به ۱/۲۴–۰/۰۵= ۹۵٪ CI و OR=۰/۲۵، ارتباط معناداری بین حضور نوع واریانت C677T و کاهش ابتلا به ALL دیده نمی‌شود. با توجه به ۱/۹۵–۰/۵۸ = ۹۵٪ CI و ۱/۰۸ =OR ارتباط معناداری بین وجود نوع هتروزیگوت و کاهش ابتلا به ALL وجود ندارد. زمانی که دو نوع واریانت و هتروزیگوت با هم به عنوان آلل T مورد بررسی قرار گرفتند، از آن جا که ۱/۶۶–۰/۵۳= ۹۵٪ CI و ۰/۹۴=OR ، بدیهی است که ارتباط معناداری بین دو گروه وجود ندارد. نتیجه نهایی این که در مورد آلل C677T ، با توجه به OR و CI به دست آمده، ارتباط معناداری میان آلل T و بروز لوسمی دیده نشد اما علی‌رغم عدم اختلاف معنادار، شیوع آلل T در بین افراد نرمال بسیار بالاتر از افراد بیمار بود که این موضوع می‌تواند حمایت‌کننده تئوری‌هایی باشد که حفاظت علیه ALL را مطرح می‌کنند.

در مورد A1298C نیز این نتایج به دست آمد: در مورد پلی‌مورفیسم 1298، شیوع آلل از ۱۹٪–۱۷٪ در جمعیت‌های آسیایی تا میانگین ۳۰٪ در جمعیت‌های اروپایی و آمریکایی متغیر است. اما در مطالعه‌ای که انجام شد، میزان افرادی که دارای آلل هتروزیگوت در این ناحیه ژنی بودند، بسیار بالا بود. میزان شیوع آلل C در گروه کنترل ۴۰/۶۵٪ ، در افراد بیمار ۴۰/۷٪ و در مجموع دو گروه ۴۰/۶۷٪ می‌باشد. این میزان نهایی با مطالعه‌های قبلی که در مناطق آسیایی انجام گرفته اختلاف فاحشی نشان می‌دهد. با توجه به ۲/۴۵–۰/۳۷= ۹۵٪ CI و ۰/۹۶=OR ، ارتباط معناداری بین حضور نوع واریانت A1298C و کاهش ابتلا به ALL دیده نمی‌شود. به عبارتی میزان حضور نوع واریانت این محل ژنی در این آنزیم، در گروه کنترل و افراد مبتلا اختلافی ندارد.

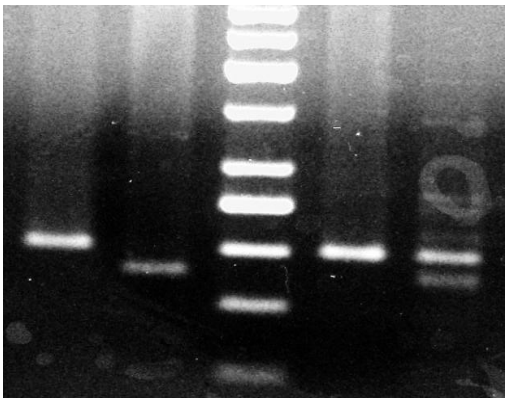


[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-10-14 ]

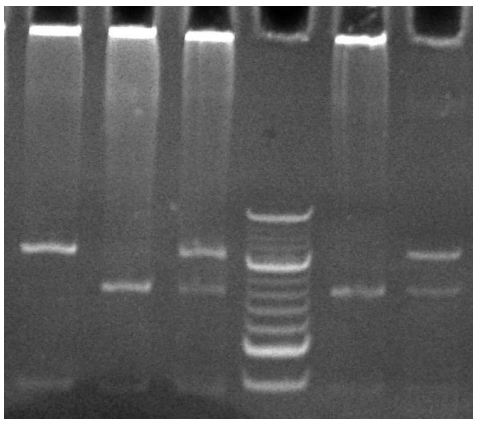
**جدول ۱: نتایج نهایی حاصل از بررسی پلی‌مورفیسم C677T و A1298C در دو گروه بیمار و کنترل**

| متغیرها | بیماران | کنترل | OR (odds ratio) | CI (95%) (confidence interval) |
|---|---|---|---|---|
| **MTHFR 677** | | | | |
| CC | (۶۵/۰۵)۶۷ | (۶۳/۱)۱۰۱ | ۱/۰۰* | – |
| CT | (۳۳)۳۴ | (۲۹/۴)۴۷ | ۱/۰۸ | ۰/۵۸–۱/۹۵ |
| TT | (۱/۹۵)۲ | (۷/۵)۱۲ | ۰/۲۵ | ۰/۰۵–۱/۲۴ |
| CT/TT | (۳۵/۹)۳۷ | (۳۶/۹)۵۹ | ۰/۹۴ | ۰/۵۳–۱/۶۶ |
| **MTHFR 1298** | | | | |
| AA | (۳۰/۱)۳۱ | (۳۱/۲)۵۰ | ۱/۰۰* | – |
| AC | (۵۸/۲)۶۰ | (۵۶/۳)۹۰ | ۱/۰۷ | ۰/۵۷–۱/۹۵ |
| CC | (۱۱/۶)۱۲ | (۱۲/۵)۲۰ | ۰/۹۶ | ۰/۳۷–۲/۴۵ |
| AC/CC | (۶۹/۸)۷۲ | (۶۹/۴)۱۱۱ | ۱/۰۴ | ۰/۵۷–۱/۸۵ |
| **Combination** | | | | |
| 677CC/1298AA | (۱۴/۵۶)۱۵ | (۱۶/۲۵)۲۶ | ۱/۰۰* | – |
| 677CC/1298AC | (۴۰/۷)۴۲ | (۳۸/۱۲)۶۱ | ۱/۱۸ | ۰/۵۱–۲/۶۶ |
| 677CC/1298CC | (۹/۷۳)۱۰ | (۸/۷۵)۱۴ | ۱/۲۴ | ۰/۳۹–۳/۸ |
| 677CT/1298AA | (۱۴/۵۶)۱۵ | (۸/۷۵)۱۴ | ۱/۸۴ | ۰/۶۲–۵/۳۶ |
| 677CT/1298AC | (۱۶/۵)۱۷ | (۱۶/۸۸)۲۷ | ۱/۰۸ | ۰/۴۱–۲/۸۲ |
| 677CT/1298CC | (۱/۹۴)۲ | (۳/۷۵)۶ | ۰/۵۷ | ۰/۰۸–۳/۶۳ |
| 677TT/1298AA | (۰/۹۷)۱ | (۶/۲۵)۱۰ | ۰/۱۷ | ۰/۰۱–۴/۱۴ |
| 677TT/1298AC | (۰/۹۷)۱ | (۱/۲۵)۲ | ۰/۸۶ | ۰/۰۵–۱۳ |
| 677TT/1298CC | (۰/۰)۰ | ۰/۰ | ۰/۰ | |

* به عنوان گروه رفرانس




**شکل ۱: قطعات DNA پس از روش PCR-RFLP برای تعیین ژنوتیپ C677T ؛ از راست به چپ : فرم هتروزیگوت 677CT ، فرم وحشی 677CC ، 50bp DNA ladder ، فرم هموزیگوت واریانت 677TT، فرم وحشی 677CC (قطعه 23 bp به دلیل سبک بودن از ژل خارج می‌شد).**




**شکل ۲ : قطعات DNA پس از روش PCR-RFLP برای تعیین ژنوتیپ A1298C ؛ از راست به چپ: فرم هتروزیگوت 1298AC ، فرم وحشی 1298AA ، 10bp DNA ladder، فرم هتروزیگوت 1298AC ، هموزیگوت واریانت 1298CC ، فرم وحشی 677CC (قطعه 27p به دلیل سبک بودن از ژل خارج می‌شد).**



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-10-14 ]

با توجه به ۱/۹۵-۰/۵۷= ٪۹۵ CI و OR=۱/۰۷، ارتباط معناداری بین وجود نوع هتروزیگوت و کاهش ابتلا به ALL وجود ندارد. زمانی که دو نوع واریانت و هتروزیگوت با هم به عنوان آلل C مورد بررسی قرار گرفتند، از آن جا که ۱/۸۵-۰/۵۷ = ٪۹۵ CI و OR=۱/۰۴ می‌باشد، بدیهی است که ارتباط معناداری بین دو گروه مشاهده نمی‌شود.

هم چنین یک بررسی برای وجود ارتباط احتمالی ترکیب دو پلی‌مورفیسم (joint effect ) با ابتلا به ALL انجام شد که با توجه به نتایج به دست آمده از OR و CI، مشخص می‌شود که هیچ اختلاف معناداری در حالات ترکیبی فرم‌های هتروزیگوت و یا هموزیگوت واریانت پلی‌مورفیسم‌ها وجود ندارد.

## بحث

شیوع آلل موتانت 677T از ژن MTHFR ، تغییرات قومی جغرافیایی و بارزی را از خود نشان می‌دهد به گونه‌ای که از ۵۵٪ در اسپانیا تا ۶٪ در جمعیت‌های آفریقایی، واریاسیون دارد. در اروپا نیز شیوع این آلل از شمال به جنوب افزایش پیدا می‌کند که ممکن است بیانگر محتوای رژیمی غنی تر فولات در افراد مدیترانه‌ای باشد(۵). در مطالعه حاضر میزان شیوع آلل Tدر افراد نرمال ۲۲/۲٪ بود که این میزان نهایی با مطالعه‌های قبلی که در مناطق آسیایی صورت گرفته بود(شیوع حدود ۲۰٪) هم‌خوانی داشت.

در مورد شیوع افزایش یافته جهش A1298C که در مطالعه حاضر به دست آمد، ذکر این نکته ضروری است که چنین شیوع افزایش یافته‌ای در چند مطالعه دیگر نیز گزارش شده است از جمله مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۴ انجام شد و شیوع ۴۶/۷ درصدی را در افراد ایرلندی گزارش نمود(۱۲). به جز این مطالعه دو مطالعه دیگر نیز که در اسکاتلند شمالی به چاپ رسیده، شیوع بالایی از این ناحیه ژنتیکی اعلام کرده است(۱۴، ۱۳). به علاوه در مطالعه‌ای که اخیراً به چاپ رسیده است بالاترین شیوع این آلل، از مطالعه‌ای که در لبنان صورت گرفته گزارش شده است(۱۵). ولی مطالعه‌هایی که در نواحی آسیای شرقی و هند صورت گرفته، شیوعی مشابه با گزارش‌های قبلی اعلام نموده‌اند. برای مشخص شدن دقیق این شیوع بالا در جمعیت ایرانی، مطالعه‌های وسیع‌تر با تعداد افراد بیشتری مورد نیاز می‌باشد.

تاثیر ژنوتیپ‌های MTHFR بر روی سرطان، یک تاثیر دوجانبه است. به این معنی که کاهش فعالیت آنزیم که به دلیل حضور پلی‌مورفیسم‌های آن ایجاد می‌شود، از یک طرف باعث کاهش خطر سرطانی شدن سلول‌ها می‌شود مانند آن چه که برای سرطان‌های کولورکتال و پستان به اثبات رسیده است(۱۰، ۹). اما از سوی دیگر، این کاهش فعالیت آنزیم، منجر به هایپومتیلاسیون در سطح DNA گشته که موجب بروز اختلالاتی در بیان ژن می‌شود. همان گونه که مشخص است از این نظر، حضور واریانت‌های MTHFR موجب افزایش خطر سرطان می‌شود که این حالت در مورد سرطان معده و کارسینوم سلول‌های مخاطی مری نشان داده شده است(۱۷، ۱۶).

در مورد لوسمی‌ها، در ابتدا نتایج دال بر اثر محافظتی آنزیم بود(۲۰-۱۸)، اما پس از مدتی نتایج به سمت عدم تاثیر واریانت‌های MTHFR بر خطر لوسمی‌ها پیش رفت (۲۲، ۲۱، ۷). در نتایج مطالعه حاضر نیز هیچ تاثیر محافظتی برای این پلی‌مورفیسم‌ها و خطر لوسمی لنفوبلاستیک کودکان پیدا نشد.

لوسمی کودکان، بدخیمی نادری می‌باشد و مطالعه‌هایی که تا به حال روی پلی‌مورفیسم MTHFR انجام شده است، نسبتاً کوچک بوده و تنها یک مورد از مطالعه‌ها، با مقیاس بزرگ‌تر انجام شده است. در بزرگ‌ترین مطالعه‌ای که در آلمان توسط شانکنبرگ و همکاران بر روی لوسمی کودکان انجام شد، توزیع واریانت‌های C677T و A1298C روی ۴۶۰ کودک مبتلا و ۱۴۷۲ فرد کنترل بررسی شد(۲۲). افراد مورد مطالعه در بین سال‌های ۱۹۸۳ تا ۲۰۰۳ متولد شده بودند. نتایج نشان داد که شیوع دو واریانت، با مطالعه‌های انجام گرفته گذشته در اروپا هم‌خوانی داشت ولی بر خلاف مطالعه‌های قبلی، هیچ اختلاف آماری معناداری در شیوع ژنوتیپی A1298C بین دو گروه مورد مطالعه وجود نداشت. به صورت مشابه هیچ اختلاف معناداری بین ترکیب دو پلی‌مورفیسم هم وجود نداشت در حالی که ترکیب این دو ژنوتیپ در مطالعه‌های پیشین، اثر محافظتی



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-10-14 ]

روی لوسمی حاد را نشان داده بودند. از آن‌جایی که در آلمان در اواسط دهه ۱۹۹۰ ، استفاده از مکمل‌های غذایی فولات در طول دوره بارداری الزامی شده بود، بر آن شدند تا این مطالعه را به دو بخش قبل از ۱۹۹۶ و بعد از ۱۹۹۶ تقسیم کنند. ولی باز در دو گروه، اختلاف معناداری مشاهده نشد. تعداد نمونه‌ها نیز در دو گروه به اندازه کافی بالا بود تا بتواند OR کمتر از ۰/۵٪ یا پایین‌تر و با توان بالاتر از ۹۰٪ را نشان دهد.

اما گروه دیگری که مطالعه مشابهی را انجام داده بودند، کراجینوویک و همکاران بودند که مقاله خود را قبل از مقاله بحث شده چاپ کرده بودند(۱۹). آن‌ها نیز افراد مورد مطالعه خود را به دو گروه متولد شده قبل و بعد از ۱۹۹۶ تقسیم کردند. آن‌ها مشاهده نمودند که اثر حفاظتی این پلی‌مورفیسم‌ها تنها در کودکانی که قبل از ۱۹۹۶ متولد شده بودند وجود داشته است. این نتیجه نشان می‌داد که ارتباط خطر ابتلا به بیماری و وجود این پلی‌مورفیسم‌ها، وابسته به وضعیت تغذیه‌ای فولات می‌باشد. در واقع طبق این مطالعه، افزایش مقدار فولات می‌تواند کمبود متابولیت‌های فولات که ناشی از فعالیت کم MTHFR می‌باشد را جبران نماید.

همان گونه که دیده می‌شود، جواب‌های ضد و نقیضی در زمینه وجود یا عدم ارتباط میان MTHFR و ابتلا به لوسمی وجود دارد؛ کما این که در مطالعه حاضر، نتایج به صورت عدم ارتباط این دو به دست آمد. نتایج پیچیده میان مطالعه‌های بررسی کننده پلی‌مورفیسم‌های MTHFR و خطر ابتلا به اشکال مختلف سرطان می‌تواند به دلیل کمبود اطلاعات روی وضعیت برداشت فولات و یا سایر مقیاس‌های وضعیت فولات باشد. با در نظر گرفتن کارسینوژنزیس سرطان‌های کولورکتال، در مطالعه‌هایی که پلی‌مورفیسم‌ها و میزان برداشت فولات را بررسی و یا فولات پلاسما را اندازه‌گیری کرده‌اند، مشخص شده است که ارتباط معکوس میان ژنوتیپ 677TT با آدنوما در یک سرطان، تنها در افراد با کمبود برداشت فولات و یا فولات پایین سرم دیده می‌شود(۲۴، ۲۳، ۹).

نکته مهم دیگری که وجود دارد این است که تعدیل تاثیر ژنتیک توسط فولات تغذیه‌ای، شامل هر دو ژنوتیپ MTHFR مادر ویا بچه می‌باشد. اخیراً نشان داده شده است که در موارد خاصی، ژنوتیپ والدین بیشتر از ژنوتیپ کودکان، روی مستعد بودن آن‌ها به بیماری تاثیر می‌گذارد (۲۵). اهمیت ژنوتیپ MTHFR مادری در چندین مطالعه آورده شده است. ریسک نقایص لوله عصبی در صورتی که هم مادر و هم بچه دارای ژنوتیپ واریانت باشند، افزایش می‌یابد(۲۶). هم چنین گفته شده است که وضعیت فولات مادری در عدم تفکیک میوزی نقش داشته و بنابراین ریسک آنیپلوئیدی در حضور آلل 677T افزایش می‌یابد(۷). اما در مورد لوسمی، کراجینوویک و همکاران نشان داده‌اند که برداشت فولات توسط مادر و نه ژنوتیپ لوکوس MTHFR، در حساسیت به ALL نقش دارد و اثر محافظتی MTHFR تنها وابسته به ژنوتیپ کودکان می‌باشد نه والدین(۱۹).

## نتیجه‌گیری

به طور کلی هیچ ارتباط معناداری بین دو پلی مورفیسم MTHFR و ابتلا به لوسمی یافت نشد. به علاوه نتیجه مهم دیگری که به دست آمد، شیوع بالای پلی‌مورفیسم A1298C (۴۰/۶۷٪) در جمعیت مورد مطالعه ایرانی در مقابل ۱۷٪–۱۹٪ در سایر جمعیت‌های آسیایی بود.

با توجه به مباحث بالا، بررسی میزان پلاسمایی فولات در مطالعه حاضر ضروری به نظر می‌رسد، اما به دلیل در دسترس نبودن افراد مبتلا و نیز به این دلیل که اکثریت نمونه‌ها، مقادیر بسیار کم آسپیراسیون مغز استخوان بود، بررسی و اندازه‌گیری فولات سرم امکان پذیر نبود.

درک نقش پلی‌مورفیسم‌های ژن MTHFR هنوز در پرده‌ای از ابهام می‌باشد و هر بار با نتایج ضد و نقیضی در مطالعه‌های مختلف همراه می‌شود. به منظور حل ناشناخته‌ها پیشنهاد می‌شود از نمونه‌های بیشتری استفاده شود. مطالعه‌هایی با تعداد بیشتر و طراحی صحیح مورد نیاز است واین به مفهوم نیاز به همکاری‌های چند مرکزی و یا حتی چند ملیتی است. در مورد مطالعه حاضر نیز از آن جایی که تا به حال مطالعه‌ای در ایران گزارش نشده، تعداد نمونه‌های مورد مطالعه برای قضاوت پایین بوده و مطالعه‌های بیشتر و در نواحی مختلف جمعیتی را می‌طلبد.



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-10-14 ]

هم چنین مطالعه میان کنش ژن ـ محیط باید در کنار هم انجام گیرد. مدارک زیادی وجود دارد که نشان می‌دهد مقادیر داخل سلولی فولات باعث تعدیل تاثیر پلی‌مورفیسم‌های MTHFR روی بیماری‌ها می‌گردد(۲۴، ۲۳، ۹).

در نتیجه پیشنهاد می‌شود مطالعه‌های آینده که برای ارتباط میان MTHFR و لوسمی‌ها انجام می‌گیرد، همراه با بررسی وضعیت فولات باشد. مهم‌تر از همه تدوین راه‌کارهای تشخیصی پلی‌مورفیسم‌ها در ایران است. همان گونه که پیش‌تر توضیح داده شد، به دلیل ارتباط این پلی‌مورفیسم‌ها با فارماکوژنتیک، ارزیابی وضعیت بیمار از نظر نوع واریانت MTHFR برای تعیین نوع داروی مورد نیاز برای شیمی درمانی ضروری به نظر می‌رسد.

## References :


1- Pui Ch. Acute lymphoblastic leukemia. In: Lichtman M, Beutler E, Kaushansky K, Kipps T, Seligsohn U, Prchal J. Williams Hematology. 7th ed. New York: McGraw-Hill; 2005. p.1321-39.

2- Burnett AK. Acute myeloid leukemia. In: Hoffbrand AV, Catovsky D, Tuddenham EGD. Postgraduate Hematology. 5th ed. Wiley-Blackwell; 2005. p. 509-24.

3- Paz MF, Avila S, Fraga MF, Pollan M, Capella G, Peinado MA, *et al*. Germ-line variants in methyl-group metabolism genes and susceptibility to DNA methylation in normal tissues and human primary tumors. Cancer Res 2002; 62(15): 4519-24.

4- Frosst P, Zhang Z, Pai A, Rozen R. The methylenetetrahydrofolate reductase (Mthfr) gene maps to distal mouse chromosome 4. Mammalian Genome 1996; 7(11): 864-5.

5- Wilcken B, Bamforth F, Li Z, Ritvanen A, Redlundet M, Stoll C, *et al*. Geographical and ethnic variation of the 677C>T allele of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): findings from over 7000 newborns from 16 areas world wide. J Med Genet 2003; 40(8): 619-25.

6- Sibani S, Christensen B, O'Ferrall E, Saadi I, Hiou-Tim F, Rosenblatt DS, *et al.* Characterization of six novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene in patients with homocystinuria. Human Mutat 2000; 15(3): 280-7.

7- Wiemels JL, Smith RN, Taylor GM, Eden OB, Alexander FE, Greaves MF. Methylene tetrahydrofolate reductase polymorphisms and risk of molecularly defined subtypes of childhood acute leukemia. Proc Natl Acad Sci USA 2001 27; 98(7): 4004-9.

8- Robien K, Ulrich CM. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and leukemia risk: a HuGE minireview. Am J Epidemiol 2003; 157(7): 571-82.

9- Chen J, Giovannucci E, Kelsey K, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, *et al*. A methylene tetrahydrofolate reductase polymorphism and risk of colorectal. Cancer Res 1996; 56(21): 4862-4.

10- Chen J, Gammon MD, Chan W, Palomeque C, Wetmur JG, Kabat GC, *et al.* One-carbon metabolism, MTHFR polymorphisms, and risk of breast cancer. Cancer Res 2005; 65(4): 1606-14.

11- Cadieux1 B, Ching1 T, Scott R, Costello JF. Genome-wide Hypomethylation in Human Glioblastomas Associated with Specific Copy Number Alteration, Methylenetetrahydrofolate Reductase Allele Status, and Increased Proliferation. Cancer Res 2006; 66(17): 8469-76.

12- McCarthy C, Ryan F, Vaughan J. Increased Frequency of the MTHFR A1298C Mutation in an Irish Population. Clinl Chem 2004; 5(12): 2462-3.

13- Sharp L, Little J, Schofield AC, Pavlidou E, Cotton SC, Miedzybrodzka Z, *et al.* Folate and breast cancer:the role of polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). Cancer Lett 2002;181(1): 65–71.

14- Sharp L, Little J, Brockton N, Cotton SC, Haites NE, Cassidy J. Dietary intake of folate and related micronutrients, genetic polymorphisms in MTHFR and colorectal cancer: a population based case-control study in Scotland. J Nutr 2002; 132 (Suppl 11): 3542S.

15- Sabbagh AS, Mahfoud Z, Taher A, Zaatari G, Daher R, Mahfouz RA. High prevalence of MTHFR gene A1298C polymorphism in Lebanon. Genet Test 2008; 12(1): 75-80.

16- Shen H , Xu Y , Zheng Y , Yun Q , Rongbin Yu, Qin YU, *et al*. Polymorphisms of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase and risk of gastric cancer in a Chinese population: a case-control study. Int J Cancer 2001; 95(5): 332-6.

17- 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; 61(8): 3272-5.

18- Skibola CF, Smith MT, Kane E, Roman E, Rollinson S, Cartwright RA, *et al*. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96(22): 12216-8.

19- Krajinovic M, Lamothe S, Labuda D, Lemieux-Blanchard E, Theoret Y, Moghrabi A, *et al*. Role of MTHFR genetic polymorphisms in the susceptibility to childhood acutelymphoblastic leukemia. Blood 2004; 103(1): 252-7.

20- Franco RF, Simões BP, Tone LG, Gabellini SM, Zago MA, Falcão RP. The methylenetetrahydrofolate




[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-10-14 ]

reductase C677T gene polymorphism decreases the risk of childhood acute lymphocytic leukemia. Br J Haematol 2001; 115(3): 616-8.
21- Thirumaran RK, Gast A, Flohr T, Burwinkel B, Bartram C, Hemminki K, *et al*. MTHFR genetic polymorphisms and susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 2005; 106(7) :2590-1.
22- Schnakenberg E, Mehles A, Cario G, Rehe K, Seidemann K, Schlegelberger B, *et al*. Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and susceptibility to pediatric acute lymphoblastic leukemia in a German study population. BMC Med Genet 2005; 6: 23.
23- 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.
24- 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.
25- Labuda D, Krajinovic M, Sabbagh A, Infante-Rivard C, Sinnett D. Parental genotypes in the risk of a complex disease. Am J Hum Genet 2002; 71(1): 193-7.
26- Isotalo PA, Wells GA, Donnelly JG. Neonatal and fetal methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphisms: an examination of C677T and A1298C mutations. Am J Hum Genet 2000; 67(4): 986-90.

[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-10-14 ]

*Original Article*

# Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and susceptibility to childhood ALL

*Atashrazm F.[1,2]( MS), Zaker F.[1,2](PhD), Aghaeipour M.[3](MD), Pazhakh V.[1,2] (MS)*

[1]*Cellular and Mulecular Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
[2]*Oncopathology Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
[3]*Research Center of Iranian Blood Transfusion Organization, Tehran, Iran*

## Abstract

***Background and Objectives***

Genetic variations and mutations are of the etiological factors leading to leukemia. Among these genetic alterations, polymorphisms are present on gene surfaces of some critical molecules. The aim of this study was to assess individual and/or combined role of these two polymorphisms (C677T and A1298C) in resistance against pediatric acute lymphoblastic leukemia. Moreover, the frequency rate of these important polymorphisms has not been reported in Iran so far and the present study is the first attempt to this end.

***Materials and Methods***

Using PCR and RFLP analyses, we studied the prevalence rate of the C677T and A1298C Methylenetetrahydrofolate (MTHFR) genotypes in 103 pediatric ALL patients and 160 age-sex matched control patients. The data were analyzed with Hardy-weinberg and Chi-square by SPSS 16.

***Results***

No significant association between two common polymorphisms of MTHFR or combination of polymorphisms with the risk of ALL was observed. The study also showed the high prevalence of A1298C which was significantly higher than that reported for most Asian population (40.67% in our study versus 17-19% in Asian). It is proved that C677T prevalence pattern is similar with those in most Asian populations.

***Conclusion***

Our findings suggest that the MTHFR C677T and A1298C gene variants do not have a major influence on the susceptibility to pediatric ALL. But despite the absence of any significant association, the frequency of MTHFR 677TT was lower among patients than general population which may support previous evidence about its protective effect against ALL.

***Key words:*** Polymorphism(Genetic), Methylene Tetrahydrofolate Reductase, Lymphoblastic Leukemia, Acute

*Sci J Iran Blood Transfus Org 2010; 6(4): 266-275*

*Received: 14 Mar 2009*
*Accepted: 2 Sep 2009*

*Correspondence:* Zaker F., PhD of Hematology. Associate Professor of Cellular and Molecular Research Center and Oncopathology Center of Iran University of Medical Sciences.
P.O.Box: 14155-6183, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 88054357-8; Fax : (+9821) 88054355
E-mail: *Farhadz20@yahoo.co.uk*



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-10-14 ]