مجله دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران (پیاورد سلامت) دوره ۸ شماره ۵ آذر و دی ۱۳۹۳، ۴۶۳-۴۵۱

مقاله پژوهشی

مطالعه‌ی اثر پلی مورفیسم‌های 401CT- و 452CT+ ژن گاما گلوتامیل هیدرولاز(GGH) بر سطح سرمی وتوکسیسیتی مرتبط با مصرف متوترکسات در کودکان ایرانی مبتلا به لوسمی لنفوئید حاد تحت درمان در بیمارستان حضرت علی اصغر(ع)

ابوالفضل کلانتری[۱]، دکتر فرهاد ذاکر[۲]، دکتر شهلا انصاری دماوندی[۳]
حیدر شرفی[۴]، دکتر سید امیر یزدانپرست[۵]

چکیده

زمینه و هدف: بیماران مبتلا به لوسمی لنفوئید حاد پس از درمان با متوترکسات، تفاوت‌هایی در سطح سرمی و توکسیسیتی مرتبط با مصرف متوترکسات از خود نشان می‌دهند. یکی از عوامل مهم تعیین کننده‌ی این تفاوت‌ها، فارماکوژنتیک فرد است. در این مطالعه، تاثیر پلی مورفیسم‌های 401CT- و 452CT+ از ژن GGH بر سطح سرمی و توکسیسیتی مرتبط با مصرف متوترکسات بررسی شد. هدف از این مطالعه، ارزیابی و تعیین اثر پلی مورفیسم‌های 401CT– و 452CT+ ژن GGH بر سطح سرمی و توکسیسیتی مرتبط با مصرف متوترکسات در بیماران مبتلا به لوسمی لنفوئید حاد بود. همچنین برای اولین بار فراوانی پلی مورفیسم‌های فوق در ایران مورد مطالعه قرار گرفت.

روش بررسی: در این مطالعه‌ی پژوهشی، با استفاده از تکنیک‌های PCR و RFLP شیوع پلی مورفیسم‌های مذکور در ۸۳ بیمار ایرانی مبتلا به ALL بررسی شد. ارتباط میان پلی مورفیسم‌ها با سطح سرمی متوترکسات و توکسیسیتی مرتبط با مصرف آن با محاسبه Odds Ratio برآورد شد.

یافته‌ها: در این مطالعه بین پلی مورفیسم 452CT+ با سطح سرمی متوترکسات و توکسیسیتی‌های مرتبط با مصرف متوترکسات ارتباط معنی داری یافت نشد. رابطه‌ای بین پلی مورفیسم 401CT– با توکسیسیتی‌های مربوط که منجر به ترومبوسیتوپنی(odds ratio=۰/۲۶۵، CI=۰/۰۰۹–۰/۰۱۹ ۹۵٪) و همچنین لکوپنی(odds ratio=۲/۱۸۲، CI=۰/۰۲۱–۰/۰۴۲ ۹۵٪) می‌شود، در فاز تحکیمی درمان مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: بررسی بیماران از لحاظ پلی مورفیسم 401CT– ژن GGH ممکن است در انتخاب دوز مناسب متوترکسات و کاهش عوارض توکسیک مرتبط با مصرف آن مفید باشد.

واژه‌های کلیدی: متوترکسات، توکسیسیتی، لوسمی لنفوئید حاد کودکان، پلی مورفیسم

* نویسنده مسئول :
دکتر فرهاد ذاکر ؛
مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی ایران
Email :
Zaker.f@iums.ac.ir

– دریافت مقاله : مهر ۱۳۹۳ پذیرش مقاله : آذر ۱۳۹۳

[۱] کارشناس ارشد هماتولوژی و بانک خون، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
[۲] استاد گروه هماتولوژی و بانک خون، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
[۳] دانشیار گروه خون و انکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
[۴] دانشجوی دکترای هپاتولوژی، مرکز تحقیقات بیماری های کبد و گوارش، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)، تهران، ایران
[۵] دانشیار گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

مقدمه

لوسمی لنفوبلاستیک حاد(ALL)، یک اختلال بدخیم با منشا پیش سازهای لنفوسیتی T یا B است. تکثیر و توسعه‌ی سلول‌های بلاست در مغز استخوان، منتج به سرکوب خون سازی و در ادامه کم خونی،

ترومبوسیتوپنی و نوتروپنی می‌گردد. این بیماری در کودکان شیوع بیشتری دارد، اما می‌تواند در هر سنی بروز یابد. ALL دارای زیرگروه‌های مختلفی است و می‌تواند براساس روش‌های ایمونولوژیک، سیتوژنتیک و ژنتیک مولکولی طبقه بندی گردد. سالیانه حدود ۴۰۰۰ مورد ALL در آمریکا تشخیص داده می‌شود. این تعداد، تقریباً ۱۲ درصد از کل لوسمی‌های تشخیص داده شده در آمریکا را شامل می‌شود(۱). ALL شایع ترین نوع سرطان در کودکان زیر ۱۵ سال است؛ به گونه‌ای که ۲۳ درصد از کل سرطان‌ها و ۷۶ درصد از کل لوسمی‌های موجود در این گروه سنی را شامل می‌شود. تنها ۲۰ درصد از لوسمی‌های حاد بالغان، ALL است. میزان وقوع ALL در پسران بیشتر از دختران بوده و همچنین میزان وقوع آن در مناطق جغرافیایی مختلف، متفاوت است. از جمله یافته‌های آزمایشگاهی در رابطه با این بیماری می توان به کم خونی، ترومبوسیتوپنی و شمارش افتراقی و نیز تعداد غیر طبیعی لکوسیت‌ها اشاره کرد که معمولاً در زمان تشخیص دیده می‌شود. مطالعات نشان می‌دهد که پلی مورفیسم‌های ژنتیکی متعدد و مشخص از آنزیم‌های متابولیزه کننده زنوبیوتیک‌ها می‌تواند توسط میان کنش با عوامل محیطی، تغذیه و سایر عوامل خارجی منجر به ایجاد ALL گردد. مطالعات اخیر نشان می‌دهد که مسیر فولات ممکن است در مستعد بودن به ALL نقش داشته باشد و مکمل‌های غذایی فولات نیز امکان دارد باعث کاهش خطر ابتلا شود(۲). عوامل مربوط به میزبان(فارماکودینامیک و فارماکوژنتیک بیمار) می‌توانند بر کارایی درمان تاثیر بگذارند(۴و۳). از مهمترین داروهایی که در درمان ALL به کار می‌رود متوترکسات(MTX) است که با دوز بالا یا متوسط در فاز درمان تحکیمی و دوز پایین در فاز نگهدارنده استفاده می‌شود. متوترکسات از آنالوگ‌های فولات است که در درمان بدخیمی‌های لنفوئید کاربرد دارد. متوترکسات با مهار آنزیم‌های دی هیدروتترا فولات ردوکتاز(DHFR) و تیمیدیلات سنتتاز(TS) موجب اختلال در سنتز DNA و مهار تکثیر سلول‌های بدخیم و سلول‌های طبیعی در بافت‌هایی مانند مغز استخوان، کبد، سیستم عصبی و دستگاه گوارش شده و عوارض توکسیک بیماری بصورت توکسیسیتی مغز استخوان، توکسیسیتی کبدی، اختلالات عصبی، اختلالات دستگاه گوارش، نارسایی کلیوی و Mucositis تظاهر می‌یابند. با دوزهای مشابهی از متوترکسات، تجمع کاهش یافته متابولیت‌های فعال این داروها در سلول‌های لوسمیک در اثر افزایش پاکسازی، غیر فعال سازی یا سایر عوامل، با بهبود کمتر همراه است(۷-۳). گاماگلوتامیل هیدرولاز(GGH) پپتیدازی است که پلی گلوتامات را از سلول برداشت می‌کند، متوترکسات با زنجیره بلند را به زنجیره کوتاه تبدیل کرده و در نهایت منجر به کاهش و حذف متوتروکسات در طی فرآیند درمان می‌شود(۹و۸). چندین گزارش نشان داد که پلی مورفیسم‌های تک نکلئوتیدی(SNPs) نقش مهمی در پاسخ به درمان MTX در بیماران مبتلا به ALL بازی می‌کند(۱۰و۸). فعالیت کاتالیتیک و هیدرولیتیک GGH بر روی متوترکسات پلی گلوتامات در سلولهای رده B یا T در افراد با پلی مورفیسم 452C/T+ در کدون ۱۲۷ متعادل می‌شود. در حالی که افراد با پلی مورفیسم 401C/T- سبب مقاومت به MTX در بیماران ALL می‌شود(۵و۳).

هدف از این مطالعه، ارزیابی و تعیین ارتباط پلی مورفیسم 401C/T- و 452C/T+ که مهمترین پلی مورفیسم‌های ژن GGH می‌باشند با سطح سرمی و توکسیسیتی ناشی از مصرف متوترکسات در بیماران مبتلا به لوسمی لنفوئیدی حاد است. در صورتی که

عوامل ژنتیکی موثر در روند توکسیسیتی به خوبی شناسایی و تشریح شود، می‌توان در جهت جلوگیری از عوارض متوترکسات به دنبال مصرف آن قدمی موثر برداشت.

روش بررسی

در این مطالعه، بیماران مبتلا به لوسمی لنفوبلاستیک حاد که در بیمارستان حضرت علی اصغر(ع) تحت درمان بوده و یا درمان آنها به پایان رسیده بود، مورد بررسی قرار گرفتند. این بیماران فاز درمان تحکیمی(Consolidation) با تجویز متوترکسات با دوز متوسط و فاز نگهدارنده (Maintenance) با تجویز متوترکسات با دوز پایین را پشت سر گذاشته بودند. تمام بیماران از پروتکل درمانی BFM 2002 استفاده کرده بودند. بر اساس این پروتکل، بیماران در فاز درمان تحکیمی، متوترکسات به مقدار ۲ g/m^2 هر دو هفته یک بار و برای چهار دوره و در فاز درمانی نگهدارنده متوترکسات به مقدار ۲۰ mg/m^2 هر هفته در یک نوبت خوراکی دریافت می‌کردند. اطلاعات مربوط به شاخص‌های آزمایشگاهی و بالینی بیماران از پرونده‌ی بیماران جمع آوری و ثبت شد. همچنین ژنوتیپ(پلی مورفیسم - 401C/T و 452C/T+ ژن GGH) هر کدام از بیماران انجام و به ثبت رسید.

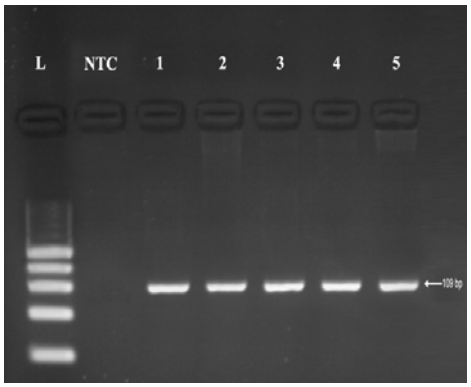
قبل از انجام نمونه گیری و پس از شناسایی بیماران و توضیح اهمیت طرح مطالعاتی برای والدین بیماران، رضایت آنها برای انجام خونگیری از فرزندشان کسب شد. ۵ میلی لیتر خون کامل با ضد انعقاد EDTA با روش لوله‌های دارای خلأ از هر بیمار گرفته شد. سپس پلی مورفیسم 401C/T- با استفاده از روش PCR و RFLP مورد بررسی قرار گرفت. بدین ترتیب که DNA استخراج شده که ۱۰۰ngبود در بافر 1X PCR که حاوی ۲۰۰µ..M از هر dNTP, ۰/۴ m.M از هر پرایمر، ۰/۵ واحد TaqDNA پلی مراز و ۱/۵m.M از $Mgcl_2$ در حجم نهایی ۲۵ ml قرارگرفت.

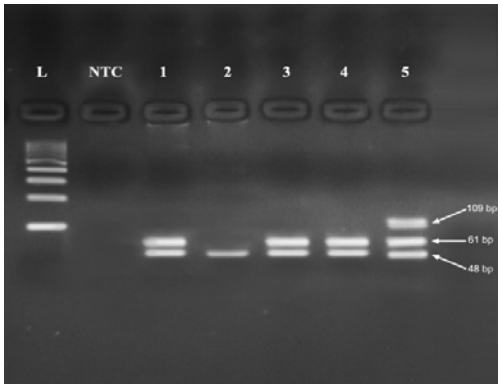
جدول ۱: درجات دمایی واکنش PCR جهت پلی مورفیسم 401C/T- و 452C/T+

ردیف	دما	زمان	مرحله
۱	۹۵ درجه سانتیگراد	۵ دقیقه	شروع دناتوراسیون(Initialdenaturation)
۲	۹۴ درجه سانتیگراد	۱۵ ثانیه(۴۰x)	دناتوراسیون(Denaturation)
۳	۶۰ درجه سانتیگراد	۴۵ ثانیه	چسبیدن(Annealing)
۴	۷۲ درجه سانتیگراد	۴۵ ثانیه	طویل شدن(Extension)
۵	۷۲ درجه سانتیگراد	۱۰دقیقه	طویل شدن نهایی(Final extension)
۶	۱۰ درجه سانتیگراد	۱۰دقیقه	سرد شدن(Cooling)

براساس جدول ۱ شرایط PCR شامل یک مرحله دناتوراسیون در آغاز به مدت ۵ دقیقه در ۹۵ درجه

سانتیگراد، ۴۰ سیکل از ۱۵ ثانیه در ۹۴، ۴۵ ثانیه در ۶۰ و ۴۵ ثانیه در ۷۲ و یک Extension نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد قرار داشت.





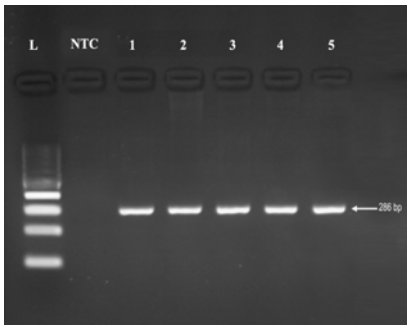
تصویر ۱: نتایج حاصل از PCR و RFLP پلی مورفیسم 401C/T-

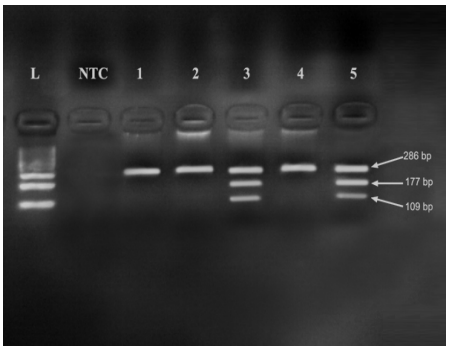
بر اساس تصویر ۱ محصول PCR که باند bp ۱۰۹ ایجاد می‌کند، تحت اثر هضم آنزیمی در ۵۵ درجه سانتیگراد با استفاده از ۲/۵ واحد آنزیم Bsl I قرار گرفت. محصولات حاصل از هضم آنزیمی، بر روی ژل آگاروز ۳ درصد آنالیز شدند. افراد با ژنوتیپ 401C/C - دو باند bp ۴۸ وbp ۶۱، افراد بـا ژنوتیـپ 401C/T - سه باند bp ۴۸، bp ۶۱ و bp ۱۰۹ و آنهایی که دارای ژنوتیپ 401T/T – بودند یک باند bp ۱۰۹ را نشان دادند.

(5'-CGCTGCCTGGTTACCAAACT-3')Forward

(5'-TGTTTACGTCGATGTGGACTTCAG-3') Reverse

پلی مورفیسم 452C/T+ با استفاده از روش PCR و RFLP بررسی شد. DNA استخراج شده که ۱۰۰ng بود، در بافر 1X PCR که حاوی M..µ۲۰۰ از هر dNTP, m.M ۰/۴ از هر پرایمر، ۰/۵ واحد TaqDNA پلی مراز و ۱/۵m.M از $Mgcl_2$ در حجم نهایی ml ۲۵ قرارگرفت.





تصویر ۲: نتایج حاصل از PCR و RFLP پلی مورفیسم 452C/T+

براساس تصویر ۲ محصول PCR که باند bp ۲۶۸ ایجاد می‌کند، تحت اثر هضم آنزیمی، در ۳۷ درجه سانتیگراد با استفاده از ۲/۵ واحد آنزیم Ase I قرار گرفت. محصولات حاصل از هضم آنزیمی بر روی ژل آگاروز ۳ درصد آنالیز شدند. در این ژنوتیپ سایز آلل وحشی bp ۲۶۸ و آلل جهش یافته شامل bp ۱۰۹ و bp ۱۷۷ بود.

(5'- GTGCCTATTTGGTTATGACA-3') Forward

(5 ' -CTACTTACTAATCCTGCCCA-3') Reverse

نمونه‌های بافی کوت از فریزر خارج و در دمای اتاق ذوب شدند و با استفاده از کیت کمپانی کیاژن(QIAamp DNA Kits)، استخراج DNA انجام گرفت. کلیه مراحل استخراج بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده‌ی کیت انجام شد.

ابتدا ۲۰ میکرولیتر(µl) از محلول پروتئاز کیاژن (فراهم شده توسط کیت) داخل یک میکروتیوب ml ۱/۵ ریخته شد. سپس ۲۰۰µl از نمونه خون(بافی کوت) به میکروتیوب اضافه گردید. در مرحله‌ی بعد، ۲۰۰µl از بافر AL به نمونه اضافه و به مدت ۱۵ ثانیه به وسیله شیکر کاملاً مخلوط و سپس نمونه به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری ۵۶ درجه سانتی گراد انکوبه شد. پس از اتمام زمان انکوباسیون، میکروتیوب و در مدت زمان کوتاه سانتریفوژ شد تا قطرات داخل در میکروتیوب سرازیر شوند. سپس ۲۰۰µl اتانول (۱۰۰-۹۶٪) به نمونه اضافه شده و دوباره به مدت ۱۵ ثانیه به وسیله شیکر کاملاً مخلوط شد. در ادامه میکروتیوب باز هم سانتریفوژ گردید تا قطرات داخل کلاهک میکروتیوب سرازیر شوند. در مرحله‌ی بعد، کل مخلوط مرحله‌ی ۶ بدون تماس با لبه، بر روی ستون فیلتر دار کیاژن که در یک میکروتیوب ml ۲ قرار داشت(فراهم شده توسط کیت)، اضافه شد. در ستون بسته شد و به مدت ۱ دقیقه در بالاترین دور(۱۴۰۰۰rpm) سانتریفوژ گردید. سپس ستون فیلتر دار در یک میکروتیوب ml ۲ جدید(فراهم شده توسط کیت) قرار گرفت و میکروتیوب حاوی محلول فیلتر شده دور انداخته شد. در ستون باز و µl ۵۰۰ از بافر AW1(فراهم شده توسط کیت) بدون تماس با لبه‌ی ستون بر روی فیلتر اضافه گردید. سپس در ستون بسته شد و برای ۱ دقیقه در دور rpm ۱۴۰۰۰ سانتریفوژ گردید. پس از اتمام سانتریفوژ، ستون فیلتر دار در یک میکروتیوب ml ۲ جدید(فراهم شده توسط کیت) قرار گرفت و میکروتیوب حاوی محلول فیلتر شده دور انداخته شد. در ستون باز و µl ۵۰۰ از بافر AW2(فراهم شده توسط کیت) بدون تماس با لبه‌ی ستون بر روی فیلتر اضافه گردید و سپس درب ستون بسته شده و به مدت ۳ دقیقه در بالاترین دور(۱۴۰۰۰rpm) سانتریفوژ گردید. ستون فیلتر دار در یک میکروتیوب ml ۱/۵ استریل قرار گرفت و میکروتیوب حاوی محلول فیلتر شده دور انداخته شد. در ستون باز و ۲۰۰µl از بافر AE(فراهم شده توسط کیت) بر روی فیلتر اضافه گردید و پس از ۱ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، در دور rpm ۸۰۰۰ مجدداً به مدت ۱ دقیقه سانتریفوژ شد. پس از اتمام انکوباسیون، ستون فیلتردار دور انداخته شد و میکروتیوب محتوی ۲۰۰ میکرولیتر DNA به فریزر منتقل گردید. برای بررسی کمیت DNA تخلیص شده از دستگاه اسپکتروفوتومتر(Gene quant) استفاده شد. این دستگاه جذب نوری(OD) نمونه‌های DNA را در طول موج‌های ۲۶۰ نانومتر و ۲۸۰ نانومتر اندازه گیری و با استفاده از جذب نوری ۲۶۰ نانومتر، غلظت DNA را محاسبه می‌کند.

همچنین با محاسبه‌ی نسبت، خلوص DNA بررسی شد. میزان خلوص DNA باید در محدوده‌ی ۱/۶۵<۲۶۰ نانومتر /۲۸۰ نانومتر <۲ باشد. چنانچه

این نسبت بیشتر از ۲ باشد دال بر آلودگی RNA در نمونه‌ی DNA بوده اما اگر کمتر از ۱/۶۵ باشد بیانگر این است که آلودگی با پروتئین وجود دارد. محصولات حاصل از استخراج DNA که با استفاده از روش ذکر شده به دست آمد، دارای غلظت‌های بالایی از DNA(g/mμl ۳۰۰-۱۰۰) با خلوص مناسب (نسبت OD بین ۱/۸-۱/۷) بودند.

برای تجزیه و تحلیل آماری از آزمون‌های Chi-square و ANOVA استفاده شد. آنالیزها به وسیله‌ی برنامه‌های آماری SPSS نسخه ۱۷ و OpenEpi نسخه ۲ انجام گردید. به منظور بررسی وجود ارتباط میان پلی مورفیسم 401C/T- و 452C/T+ ژن GGH و انواع سمیت‌ها از آزمون Chi square و بررسی وجود ارتباط میان پلی مورفیسم 401C/T- و 452C/T+ و سطح متوترکسات سرم از آزمون ANOVA استفاده شد. در این مطالعه، در صورتی که P value کمتر از ۰/۰۵ شود از نظر آماری ارزشمند درنظر گرفته شد. همچنین، تاثیر ژنوتیپ 401C/T- و 452C/T+ بر توکسیسیتی متوترکسات، OR با ٪۹۵ =CI محاسبه گردید.

یافته‌ها

در این مطالعه ۸۳ بیمار مبتلا به لوسمی لنفوبلاستیک حاد رده‌ی B مورد بررسی قرار گرفتند. این بیماران فاز درمان تحکیمی و نگهدارنده را گذرانده بودند و از لحاظ پلی مورفیسم 401C/T- و452C/T+ ژن گاما گلوتامیل هیدرولاز بررسی شدند(جدول ۲).

جدول ۲: جنسیت، تعداد و فراوانی بیماران ALL و گروه پرخطر

جنس	محدوده سنی	تعداد(٪)	گروه پرخطر
پسر	۲ تا ۱۳ سال	۴۹(٪۵۰/۰۴)	دوز بالای متوترکسات و شمارش بسیار پایین گلبول‌های سفید و پلاکت
دختر	۲ تا ۱۳ سال	۳۴(٪۴۰/۹۶)	دوز بالای متوترکسات و شمارش بسیار پایین گلبول‌های سفید و پلاکت

براساس CTCAE (2006) یا Common Terminology Criteria for Adverse Events, درجات لکوپنی شامل درجه ۱ با شمارش گلبول‌های سفید کمتر از ۳۰۰۰، درجه ۲ بین ۲۰۰۰ تا ۳۰۰۰، درجه ۳ بین ۱۰۰۰ تا ۲۰۰۰ و درجه ۴ کمتر از ۱۰۰۰ در میلی متر مکعب می‌باشد. همچنین درجات ترومبوسیتوپنی شامل درجه ۱ با شمارش پلاکت‌ها کمتر از ۷۵۰۰۰، درجه ۲ بین ۵۰۰۰۰ تا ۷۵۰۰۰، درجه ۳ بین ۲۵۰۰۰ تا ۵۰۰۰۰ و درجه ۴ کمتر از ۲۵۰۰۰ در میلی متر مکعب می‌باشد. ارتباط میان بروز انواع توکسیسیتی (Grade 1-4) در دو فاز درمانی تحکیمی و نگهدارنده و ژنوتیپ‌های مختلف پلی مورفیسم‌های 401C/T و 452C/T+ آنالیز شدند. در این مطالعه تمام بیماران توکسیک، صرف نظر از درجه‌ی توکسیسیتی در قالب یک گروه، در

برابر بیماران غیر توکسیک آنالیز شدند. همچنین ارتباط میان بروز انواع توکسیسیتی (Grade 1-4) در دو فاز درمانی تحکیمی و نگهدارنده و فرکانس آلل C و T پلی مورفیسم 401 C/T- آنالیز شد که نتایج این آنالیز در جداول بعدی آورده شده است.

با بررسی جداگانه آلل‌های C و T، اثر آنها در توکسیسیتی‌های مذکور محاسبه شد؛ بدین صورت که ابتدا هموزیگوت C را جدا کرده و سپس مجموع هموزیگوت T و هتروزیگوت CT را جداگانه در دو فاز تحکیمی و نگهدارنده درمان محاسبه نموده که به شکل **A** 401C/T- برای نرم افزار تعریف شد، اما ارتباط معنی داری بین این ترکیب آلل‌ها و توکسیسیتی کبد و مغز استخوان(لکوپنی، کم خونی و ترومبوسیتوپنی) مشاهده نشد. همچنین در مورد ارتباط آلل پلی مورفیسم **B** 401C/T- و توکسیسیتی کبد و مغز استخوان در فاز تحکیمی و نگهدارنده درمان هموزیگوت T را جداگانه کرده و سپس مجموع هموزیگوت C و هتروزیگوت CT را جداگانه در دو فاز تحکیمی و نگهدارنده محاسبه شد که ارتباط معنی داری بین این ترکیب آلل‌ها و توکسیسیتی کبد و مغز استخوان نیز مشاهده نشد.

در **A** 401C/T افراد با آلل CC را در مقابل افراد با آلل CT+TT آنالیز شدند تا حضور و عدم حضور آلل‌های C و T در توکسیسیتی‌های ذکر شده بررسی شود. همچنین در **B** 401C/T، افراد با آلل TT در مقابل افراد با آلل CC+CT آنالیز شدند.

جدول ۳: ارتباط آلل‌های پلی مورفیسم 401C/T- و توکسیسیتی کبد و مغز استخوان(لکوپنی، کم خونی، ترومبوسیتوپنی) در فاز تحکیمی و نگهدارنده درمان بیماران ALL

توکسیسیتی	C	T	P value
توکسیسیتی کبدی(تحکیمی)	۳۰(٪۳۶/۱۴)	۹(٪۱۰/۸۴)	۰/۱۱
توکسیسیتی کبدی(نگهدارنده)	۳۳(٪۳۹/۷۵)	۱۳(٪۱۵/۶۶)	۰/۵۲
کم خونی(تحکیمی)	۳۷(٪۴۴/۵۷)	۱۲(٪۱۴/۴۵)	۰/۰۶
کم خونی(نگهدارنده)	۳۱(٪۳۷/۴۳)	۷(٪۸/۴۳)	۰/۷۳
لکوپنی(تحکیمی)	۳۹(٪۴۶/۹۸)	۱۱(٪۱۳/۲۵)	۰/۰۴
لکوپنی(نگهدارنده)	۴۱(٪۴۹/۳۹)	۵۱(٪۱۸/۰۷)	۰/۲۳
ترومبوسیتوپنی(تحکیمی)	۲۸(٪۳۳/۷۳)	۱۰(٪۱۲/۰۴)	۰/۰۱
ترومبوسیتوپنی(نگهدارنده)	۲۳(٪۲۷/۷۱)	۳(٪۳/۶۱)	۰/۸۰

همانطور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود، گلبول‌های سفید و پلاکت‌ها در پلی مورفیسم 401C/T- عددی کمتر از ۰/۰۵ را براساس نتایج آماری نشان داده‌اند؛ بنابراین از نظر آماری ارزشمند بوده و بیماران ALL در فاز تحکیمی درمان دچار لکوپنی و ترومبوسیتوف پنی شدید شده‌اند و همچنین در خطر ابتلا به آنمی نیز قرار می‌گیرند. با وجودی که این بیماران در فاز درمانی نگهدارنده، هیچ یک از علائم لکوپنی، ترومبوسیتوپنی و آنمی را بروز ندادند.

جدول ۴: ارتباط آلل های پلی مورفیسم 452C/T+ و توکسیسیتی کبد و مغز استخوان(لکوپنی، کم خونی، ترومبوسیتوپنی) در فاز تحکیمی و نگهدارنده درمان بیماران ALL

توکسیسیتی	C	T	P value
توکسیسیتی کبدی(تحکیمی)	۴۰(٪۴۸/۱۹)	۰	۰/۸۳
توکسیسیتی کبدی(نگهدارنده)	۵۰(٪۶۰/۲۴)	۰	۰/۶۷
کم خونی(تحکیمی)	۵۰(٪۶۰/۲۴)	۰	۰/۹۸
کم خونی(نگهدارنده)	۳۷(٪۴۴/۵۷)	۰	۰/۶۱
لکوپنی(تحکیمی)	۵۲(٪۶۲/۶۵)	۰	۰/۸۹
لکوپنی(نگهدارنده)	۵۹(٪۷۱/۰۸)	۰	۰/۹۳
ترومبوسیتوپنی(تحکیمی)	۳۹(٪۴۶/۹۸)	۰	۰/۶۶
ترومبوسیتوپنی(نگهدارنده)	۲۷(٪۳۲/۵۳)	۰	۰/۹۶

همانطور که در جدول ۴ مشاهده می شود ارتباط معنی داری بین پلی مورفیسم 452C/T+ و توکسیسیتی کبد و مغز استخوان(لکوپنی، کم خونی، ترومبوسیتوپنی) در هر دو فاز تحکیمی و نگهدارنده درمان در بیماران ALL مشاهده نشد.

بر این اساس می‌توان عنوان کرد که آلل C پلی مورفیسم 401C/T-، آلل خطر ترومبوسیتوپنی و لکوپنی در بیماران تحت درمان با متوترکسات باشد. ازاین رو آلل C را در حالات مختلف به شکل هموزیگوت و هتروزیگوت با آلل T همراه کرده و پلی مورفیسم 401C/T- را به دو شکل **A** 401C/T و **B** 401C/T برای نرم افزار آماری تعریف شد تا نقش آلل C در این حالات مورد آنالیز قرار گیرد. بر اساس آمار بدست آمده احتمال داده می‌شود که آلل T نقش حمایتی در جلوگیری از ترومبوسیتوپنی داشته باشد. همانطور که در جداول بالا مشاهده می‌شود در فاز درمانی نگهدارنده که بیماران متوترکسات را به صورت خوراکی با دوز پایین دریافت می‌کنند، هیچ ارتباطی معنا داری بین ژنوتیپ‌ها و فرکانس آللی پلی مورفیسم 401C/T- و توکسیستی مغز استخوان شامل: کم خونی، لکوپنی و ترومبوسیتوپنی مشاهده نمی‌شود.

در فاز تحکیمی درمان که بیماران متوترکسات را با دوز متوسط($۲g/m^2$) دریافت می‌کنند، ارتباط معناداری بین ژنوتیپ‌ها و فرکانس آلل‌های پلی مورفیسم 401C/T- و توکسیسیتی مغزاستخوان که شامل لکوپنی و ترمبوسیتوپنی می‌باشد مشاهده شد. البته طبق آنالیز آماری به دست آمده(P value=۰/۰۶) بیماران در مرز کم خونی در فاز تحکیمی درمان قرار می‌گیرند.

ارتباط میان پلی مورفیسم 401C/T- و 452C/T+ ژن GGH و سطح متوترکسات سرم به کمک روش ANOVA آنالیز شد که ارتباط معنی داری بین پلی مورفیسم 401C/T- و 452C/T+ و سطح سرمی متوترکسات مشاهده نشد(P value۰/۵۳).

بحث

یکی از داروهای اصلی رژیم‌های شیمی درمانی ALL از جمله BFM 2002، متوترکسات می‌باشد که مانند سایر داروهای شیمی درمانی دارای یکسری عوارض توکسیک است که از جمله می‌توان به سرکوب مغز استخوان، توکسیسیتی کلیوی، توکسیسیتی کبدی، توکسیسیتی عصبی و توکسیسیتی

دستگاه گوارش اشاره کرد(۱۱). بروز این عوارض توکسیک از فردی به فرد دیگر حتی در دوزهای مشابه متوترکسات، تفاوت های آشکاری دارد. به نظر می‌رسد که عوارض توکسیک این دارو تحت تاثیر فاکتورهای مختلف بیمار از جمله ژنتیک او باشد.

به نظر می‌رسد که مطالعه‌ی حاضر اولین بررسی فرکانس ژنوتیپ‌های پلی مورفیسم 401C/T- و452C/T+ ژن GGH در یک جمعیت ایرانی باشد. بر این اساس فرکانس C/C، C/T و T/T به ترتیب ۵۴/۲، ۲۷/۷ و ۱۸/۱درصد در پلی مورفیسم 401C/T- می‌باشد. همچنین فرکانس C/C، C/T و T/T در پلی مورفیسم 452C/T+ به ترتیب ۷۴/۶۹، ۲۵/۳۰ و ۰/۰ درصد است.

در مطالعه‌ی حاضر، ژنوتیپ و فرکانس آللی پلی مورفیسم‌های 401C/T- و 452C/T+ ژن GGH و ارتباط آنها با توکسیستی کبدی، دستگاه گوارش و مغزاستخوان(شامل کم خونی، لکوپنی و ترومبوسیتوپنی) به طور جداگانه بررسی شدند. براساس نتایج به دست آمده هیچ ارتباطی بین توکسیستی کبدی و دستگاه گوارش با پلی مورفیسم‌های 401C/T- و 452C/T+ ژن GGH مشاهده نشد. البته در پرونده‌ی بعضی از بیماران افزایش آنزیم‌های ALT و AST کبدی مشهود بود، اما افزایش مقدار آنزیم‌ها در حدی نبود که گویای توکسیستی کبدی باشد. از طرفی تعداد این بیماران در ۸۳ بیمار ALL مورد مطالعه‌ی ما بسیار کم بود. با بررسی جداگانه و آنالیز آماری پلی مورفیسم 401C/T- و ارتباط آن با توکسیستی مغز استخوان مشخص شد که آلل C به عنوان فاکتور خطر برای لکوپنی و ترومبوسیتوپنی در فاز تحکیمی درمان می‌باشد. در بررسی پرونده‌ی این بیماران، در فاز تحکیمی درمان لکوپنی و ترومبوسیتوپنی در درجه(Grade) ۴-۳ قرار داشتند. در فاز درمانی نگهدارنده، توکسیستی مغز استخوان مشاهده نشد و در پروند ی بیماران، افزایش نسبی گلبول‌های سفید و پلاکت در فاز درمانی نگهدارنده نسبت به فاز تحکیمی درمان بدست نیامد. در واقع شمارش سلولی تقریباً به حالت طبیعی رسیده بود. براساس نتایج حاصل از آنالیز آماری، مشاهده گردید که بیماران در فاز تحکیمی درمان، در مرز کم خونی نیز قرار دارند که احتمال دارد اگر مطالعه بر روی تعداد بیشتری از این بیماران انجام شود، عدد آماری به مقداری که معرف کم خونی باشد، خواهد رسید و توکسیستی مغز استخوان را علاوه بر لکوپنی و ترومبوسیتوپنی، کم خونی را نیز شامل خواهد شد. با بررسی جداگانه و آنالیز آماری پلی مورفیسم 452C/T+ و ارتباط آن با توکسیستی مغز استخوان مشخص شد که این پلی مورفیسم هیچ نقشی در توکسیستی‌های ذکر شده ندارد. طبق بررسی انجام شده در این مطالعه، پلی مورفیسم‌های ذکر شده تاثیری بر سطح سرمی متوترکسات نیز نداشتند. براساس مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۰ بر روی ۱۰۵ بیمار مبتلا به ALL با سن زیر ۱۵ سال انجام شد، از بین واریانت‌های ژنتیکی که در مسیر متابولیسم MTX قرار دارند دو کاندیدای ژنتیکی که کد کننده آنزیم‌های مهم مسیر متابولیسم MTX بودند، مورد بررسی قرار گرفتند. این دو ژن GGH و DHFR بودند که اسید آمینه‌هایی که از این دو ژن ترجمه می‌شوند، عملکردهای متفاوتی دارند(۱۳و۱۲). بنابراین تفاوت‌های عملکردی محصولات این دو ژن ممکن است علت توکسیسیتی و اثرات متفاوت MTX را نشان دهند. در مطالعه‌ی مذکور مشاهده شد که کودکان مبتلا به ALL که پلی مورفیسم‌های 401C/T - یا T/T در ژن GGH را دارند، خطر بالایی از لکوپنی و ترومبوسیتوپنی را با

درجه(Grade) ۴-۳ نسبت به C/C نشان می‌دهند(۱۴). حتی اگر آنزیم‌های دیگری در مسیر متابولیسم MTX قرار داشته باشند، واریانت‌های این آنزیم‌ها نیز می‌توانند در مطالعه‌ی مذکور تاثیرگذار باشند؛ در حالی که عوامل دیگر مثل دوزاژ MTX و نژادها نیز تاثیرگذار هستند(۱۵). در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۰ بر روی پلی مورفیسم‌های 401C/T- و 452C/T+ از ژن GGH در۷۰ کودک ALL در مکزیک انجام شد، رابطه‌ی بین پلی مورفیسم 401C/T– و خطر عود بیماری در این افراد بررسی شد و بیماران با پلی مورفیسم 401T/T- ۱۰/۸۳ درصد خطر عود بیماری را نشان دادند، در حالی که هیچ رابطه‌ای بین پلی مورفیسم 452C/T+ و خطر عود در این بیماران وجود ندارد(۱۶). شیماساکی و همکاران، تاثیر پلی مورفیسم‌های MTHFR و SLC19A1 را بر روی توکسیستی مرتبط با متوترکسات در ۱۵ کودک ALL که تحت درمان با رژیم های حاوی متوترکسات با دوز بالا بودند، مورد بررسی قرار گرفتند. در این مطالعه بین پلی مورفیسم A80G و سطح سرمی متوترکسات هیچ رابطه‌ای مشاهده نشد و مشخص گردید که فرکانس آلل G در بیماران دچار استفراغ به شکل معناداری بیشتر است، اما در مورد توکسیستی کبدی و موکوزیت هیچ رابطه‌ای با پلی مورفیسم A80G دیده نشد(۱۷).

نتیجه گیری

از نتایج به دست آمده از این پژوهش می‌توان برای پیش گویی موارد توکسیسیتی و تنظیم دوز متوترکسات استفاده کرد؛ به نحوی که قبل از تعیین دوز دارو پلی مورفیسم 401C/T- و هموزیگوت و هتروزیگوت بودن آلل‌های C و T آن پیگیری شود تا با تکیه بر آن، دوز مصرفی دارو تعیین شده و از عوارض توکسیک دارو جلوگیری گردد. البته نباید فراموش کرد که نوع توکسیسیتی مرتبط با این پلی مورفیسم‌ها در اکثر موارد متفاوت است. با وجود این، نتایج به دست آمده نیاز به بررسی بر روی گروههای بزرگتر و نژادهای دیگری دارد. در صورتی که بتوان عوامل ژنتیکی موثر در روند توکسیسیتی را به خوبی شناسایی و تشریح کرد، می‌توان در جهت جلوگیری از عوارض مصرفی متوترکسات قدمی موثر برداشت. لذا برای به دست آوردن نتایج بهتر پیشنهاد می‌شود حجم نمونه‌ی بزرگتری در مطالعات آینده درنظر گرفته شود. همچنین، با توجه به پیچیده بودن فارماکودینامیک و فارماکوکینتیک متوترکسات، بهتر است تعداد زیادی از پلی مورفیسم ژن‌های مختلف دخیل همزمان بررسی شوند.

یکی دیگر از راهکارهای پیشنهادی، بررسی Genome Wide Association Study(GWAS) می‌باشد که توان ژنوتایپینگ بیش از ۵۰۰۰۰۰ پلی مورفیسم برای هر بیمار در یک فرآیند کاری را داراست. نتایج این مطالعه، می‌تواند جهت تهیه الگوریتم برای تعیین دوز متوترکسات برای درمان بیماران مورد استفاده قرار گیرد. در این الگوریتم تمام فاکتورهای ژنتیکی و غیر ژنتیکی موثر وارد و براساس آن‌ها دوز اولیه‌ی متوترکسات تعیین می‌شود. استفاده از این الگوریتم منجر به کاهش عوارض متوترکسات خواهد شد.

تشکر و قدردانی

با تشکر از سرکار خانم سیما کلانتری و کلیه عزیزانی که در این مسیر ما را یاری داشته‌اند به ویژه استادان و کارشناسانی که همواره از راهنمایی‌ها و مساعدت ایشان بهره مند گشته‌ایم.

منابع

1. Jemal A, Tiwari RC, Murray T, Ghafoor A, Samuels A, Ward E, et al. Cancer statistics, 2004. CA: A Cancer Journal for Clinicians 2004; 54(1): 8-29.

2. Assaraf YG. Molecular basis of antifolate resistance. Cancer Metastasis Reviews 2007; 26(1): 153-81.

3. Hider SL, Bruce IN & Thomson W. The pharmacogenetics of methotrexate. Rheumatology 2007; 46(10): 1520-4.

4. Gokbuget N & Hoelzer D. Treatment of adult acute lymphoblastic leukemia. Hematology American Society & Hematology Education Program 2006; 2006(1):133-41.

5. Evans WE & Relling MV. Moving towards individualized medicine with pharmacogenomics. Nature 2004; 429(6990): 464-8.

6. Cheng Q, Cheng C, Crews KR, Ribeiro RC, Pui CH, Evans WE, et al. Epigenetic regulation of human gamma-glutamyl hydrolase activity in acute lymphoblastic leukemia cells. American Journal of Human Genetics 2006; 79(2): 264-74.

7. Schneider E & Ryan TJ. Gamma-glutamyl hydrolase and drug resistance. Clinica Chimica Acta 2006; 374(1-2): 25-32.

8. Mancini M, Scappaticci D, Cimino G, Nanni M, Derme V, Elia L, et al. A comprehensive genetic classification of adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): Analysis of the GIMEMA 0496 protocol. Blood 2005; 105(9): 3434-41.

9. Wessels JA, de Vries-Bouwstra JK, Heijmans BT, Slagboom PE, Allaart CF, Kerstens PJ, et al. Efficacy and toxicity of methotrexate in early rheumatoid arthritis are associated with single-nucleotide polymorphisms in genes codiSng for folate pathway enzymes. Arthritis & Rheumatology 2006; 54(4): 1087-95.

10. Hayashi H, Fujimaki C, Inoue K, Suzuki T & Itoh HK. Genetic polymorphism of C452T (T127I) in human gamma-glutamyl hydrolase in a Japanese population. Biological & Pharmaceutical Bulletin 2007; 30(4): 839-41.

11. Pui CH & Evans WE. Drug therapy: Treatment of acute lymphoblastic leukemia. New England Journal of Medicine 2006; 354(2): 166-78.

12. Dervieux T, Kremer J, Lein DO, Capps R, Barham R, Meyer G, et al. Contribution of common polymorphisms in reduced folate carrier and [gamma]-glutamylhydrolase to methotrexate polyglutamate levels in patients with rheumatoid arthritis. Pharmacogenetics 2004; 14(11): 733-9.

13. Chave KJ, Ryan TJ, Chmura SE & Galivan J. Identification of single nucleotide polymorphisms in the human gamma-glutamyl hydrolase gene and characterization of promoter polymorphisms. Gene 2003; 319(1): 167-75.

14. Dervieux T, Greenstein N & Kremer J. Pharmacogenomic and metabolic biomarkers in the folate pathway and their association with methotrexate effects during dosage escalation in rheumatoid arthritis. Arthritis & Rheumatology 2006; 54(10): 3095-103.

15. Koomdee N, Hongeng S, Apibal S & Pakakasama S. Association between polymorphisms of dihydrofolate reductase and gamma glutamyl hydrolase genes and toxicity of high dose methotrexate in children with acute lymphoblastic leukemia. Asian Pacific Journal of Cancer Preventatin 2012; 13(7): 3461-4.

16. Jorge ON, Yazmín GG, Mónica VSH, Ana BRR, Marco ATP, Luz del CAR, et al. Polymorphisms of the γ-glutamyl hydrolase gene and risk of relapse to acute lymphoblastic leukemia in Mexico. Leukemia Research 2010: 34(6): 728-32.

17. Shimasaki N, Mori T, Torii C, Sato R, Shimada H, Kosaki K, et al. Influence of MTHFR and RFC1 polymorphisms on toxicities during maintenance chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia or lymphoma. Journal of Pediatric Hematology Oncology 2008; 30(5): 347-52.

The Effect Of -401CT And -401CT Polymorphisms Of GGH Gene On Methotrexate Serum Level And Toxicity In Iranian Children With Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) Under Treatment In Ali Asghar Hospital In Tehran

Kalantari Abolfazl[1](MSc.) – Zaker Farhad[2](Ph.D) –Ansari Damavandi Shahla[3](M.D.) – Sharafi Heydar[4](MSc.) – Yazdanparast Seyed Amir[5](Ph.D)

1 Master of Sciences in Hematology and Blood Banking, School of Allied Medical Sciences, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2 Professor, Hematology and Blood Banking Department, Cellular and Molecular Research Center, School of Allied Medical Sciences, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3 Associated Professor, Oncology and Hematology Department, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4 Ph.D Student in Hepatology, Baqiyatallah Research Center for Gastroentrology and Liver Disease, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
5 Associated Professor, Medical Laboratory Sciences Department, School of Allied Medical Sciences, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Received : Sep 2014
Accepted : Dec 2014

Background and Aim: Acute lymphoblastic leukemia patients show differences in serum levels and toxicity associated with methotrexate after its treatment. Pharmacogenetics is an important determining factor for these differences. In this study, the effect of +452 C/T and -401C/T polymorphisms of GGH gene on serum levels and toxicity associated with methotrexate was studied. The aim of this study was to evaluate the effect of +452C/T and -401C/T polymorphisms of GGH gene on methotrexate level in serum and its associated toxicity in patients with acute lymphoblastic leukemia. Furthermore, the frequency of the above polymorphisms was investigated for the first time in Iran.

Materials and Methods: The prevalence of these polymorphisms was assessed in 83 Iranian patients with ALL using PCR and RFLP. The relationship between the polymorphism and serum methotrexate levels and its toxicity was estimated by calculating the Odds Ratio.

Results: No correlation was found between +452CT polymorphism and serum levels of methotrexate and methotrexate-related toxicity. -401CT polymorphism was found to be correlated with methotrexate-related toxicity leading to thrombocytopenia (95% CI= 0.009-0.019, odds ratio=0.265) and leukopenia (95% CI = 0.021-0.042, odds ratio = 2.182) in consolidation phase of the treatment.

Conclusion: Evaluation of patients for methotrexate-related polymorphism of GGH gene may be useful in selecting the appropriate dose of methotrexate and reducing the toxic side effects associated with its administration.

Key words: Methotrexate, Toxicity, Children ALL, Polymorphisms

*** Corresponding Author:**
Zaker F;
E -mail:
Zaker.f@iums.ac.ir