

## تعیین پلی مورفیسم C677T ژن MTHFR در بیماران مبتلا به اختلال دوقطبی نوع ۱

سیدمسعود ارزاقی<sup>۱\*</sup>، سید وحید شریعت<sup>۲</sup>، آرش حسین نژاد<sup>۳</sup>، محمد قدیری<sup>۱</sup>، جمال شمس<sup>۳</sup>

### چکیده

**مقدمه:** پلی مورفیسم C677T ژن متیلن تتراهیدروفولات ردوکتاز (MTHFR)، به عنوان عامل خطری برای اختلالات روانپزشکی مطرح شده است اما ارتباط آن با اختلال دوقطبی هنوز مورد تردید است. **روش‌ها:** به منظور بررسی این ارتباط، تعداد ۹۰ بیمار مبتلا به اختلال دوقطبی نوع ۱ بر اساس معیارهای تشخیصی DSM-IV و ۹۴ فرد سالم فاقد ارتباط خانوادگی با گروه بیمار و فاقد سابقه بیماری روانپزشکی وارد مطالعه شده، میزان شیوع ژنوتیپی و آللی پلی مورفیسم C677T ژن MTHFR مورد ارزیابی قرار گرفت. **یافته‌ها:** در این مطالعه اختلاف معنی داری میان توزیع شیوع ژنوتیپ و آلل پلی مورفیسم C677T ژن MTHFR میان دو گروه بیمار و شاهد بدست نیامد اما آلل T در مقایسه با آلل C با نسبت شانس (OR) مساوی  $۱/۰۵۸(۱/۷۲) - ۰/۶۵ =$  فاصله اطمینان ۹۵٪) با اختلال دوقطبی نوع ۱ مرتبط بود، گرچه این ارتباط به حد معنی دار آماری نرسید ( $P > ۰/۰۵$ ). **نتیجه‌گیری:** گرچه آنزیم MTHFR نقشی مهم در متابولیسم 1-Carbon و متیلاسیون DNA بازی می‌کند، به نظر نمی‌رسد عامل مستعد کننده‌ای برای اختلال دوقطبی نوع ۱ باشد؛ گرچه گرایش مشاهده شده در ارتباط بین آلل T و اختلال دوقطبی نوع ۱ نیازمند ارزیابی‌های بیشتر است.

**واژگان کلیدی:** فولات، هموسیستین، ژن MTHFR، اختلال دوقطبی نوع ۱، پلی مورفیسم

۱- انستیتو روانپزشکی تهران و مرکز تحقیقات بهداشت روان، دانشگاه علوم پزشکی ایران

۲- مرکز تحقیقات غدد درون ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۳- مرکز تحقیقات علوم اعصاب و علوم رفتاری، شبکه تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

\* **نشانی:** انستیتو روانپزشکی تهران و مرکز تحقیقات بهداشت روان؛ تهران، خیابان ستارخان، خیابان نیایش، کوچه شهید منصور، صندوق پستی: ۴۴۱-۱۴۵۶۶، تلفن: ۶۰-۶۶۵۵۱۶۵۵، نمابر: ۶۶۵۰۶۸۵۳، پست الکترونیک: dr.arzaghi@gmail.com

## مقدمه

اختلال دوقطبی نوع ۱ (BID) یکی از اختلالات روانپزشکی است که با تغییرات خلقی و دوره‌های مکرر افسردگی و مانیا مشخص می‌شود [۱]. مطالعات متعدد دوقلویی (Twin) و خانوادگی (Family) بر نقش عوامل محیطی و ژنتیکی در اتیولوژی این اختلال صحنه گذاشته‌اند [۲]. میزان خطر ابتلا (Morbid Risk) در دوقلوهای تک تخمکی بین ۶۱٪ تا ۷۵٪ و در اعضای درجه اول خانواده بین ۱/۵ تا ۵/۵٪ برآورده شده است، این یافته‌ها مبین وجود الگوی وراثتی در اختلال دوقطبی ۱ اما نه با الگوی مندلی است [۳]. نواحی کروموزومی متعددی در اتیولوژی ژنتیکی این اختلال مطرح شده‌اند [۴ و ۵] و ژن‌های مرتبط با سیستم نوروترانسمیتری مونوآمینی بیشتر مطرح هستند، گرچه ارتباط قاطع و دقیقی تاکنون به دست نیامده است [۴ و ۶]. اخیراً مطالعاتی در بیماران مبتلا به نقصان آنزیم متیلن تراهایدرو فولات ردوکتاز (MTHFR) تظاهرات روانپزشکی را مشاهده کرده‌اند و چنین مطرح شده است که شاید این آنزیم در پاتوژنز برخی اختلالات روانپزشکی نظیر اسکیزوفرنیا و اختلالات خلقی مطرح باشد [۷]. ژن آنزیم MTHFR در انتهای بازوی کوتاه کروموزوم شماره ۱ واقع شده است. این ژن حاوی ۱۹/۳ کیلوبایت DNA، ۶۵۶ آمینو اسید و ۷۴/۶ کیلودالتون پروتئین است. حداکثر میزان بیان این ژن در بیضه‌ها و در درجات متوسط در مغز و کلیه‌ها دیده می‌شود. در سایر بافت‌های بدن به مقدار کمتر بیان می‌شود. آنزیم MTHFR، آنزیمی سیتوزولیک است (Ip36.3). این آنزیم نقشی محوری در متابولیسم فولات داراست و موجب تبدیل برگشت ناپذیر ۵ و ۱۰ متیلن تراهایدروفولات به ۵ متیل تراهایدروفولات می‌گردد که شکل غالب فولات موجود در گردش خون است. هموسیستین با اخذ یک گروه متیل از ۵ متیل تراهایدروفولات به متیونین بدل می‌شود که در بیوسنتز S-آدنوزیل متیونین (SAM) نقش دارد [۸-۱۰]. SAM منبع اصلی تامین گروه متیل در مغز محسوب می‌شود و یکی از تامین کننده‌های عمده گروه متیل برای آنزیم کاتکول متیل

ترانسفراز (COMT) است که در واگردش سروتونین و کاتکولامین‌ها نقش دارد [۶]. به این ترتیب متابولیسم فولات با سنتز نوروترانسمیترها [۱۱] و تولید SAM در دستگاه عصبی مرکزی مرتبط است [۱۲]. هموسیستین یا متابولیت‌های آن نظیر هموسیستتیک اسید، می‌تواند اثر excitotoxic روی گیرنده‌های N متیل D آسپارت (NMDA) گلوتامات داشته یا در فرآیند متیلاسیون در دستگاه عصبی مرکزی ایجاد اختلال نماید [۱۲]. فرآیند بیوشیمیایی مذکور به عنوان چرخه متابولیسم I-Carbon خوانده می‌شود (شکل ۱)، با اختلالات روانپزشکی متعددی مرتبط دانسته شده است که از جمله آن می‌توان به اختلال دوقطبی، اسکیزوفرنیا و افسردگی و اضطراب اشاره نمود. مطالعات متعددی به بررسی نقش متابولیسم هموسیستین در اختلالات نوروسایکیاتری پرداخته‌اند که با اندازه‌گیری سطح هموسیستین، فولات، ویتامین B<sub>12</sub> و ژنوتایپینگ MTHFR صورت پذیرفته‌اند. بیماری آلزایمر و دمانس عروقی جزء اولین اختلالاتی بودند که مورد توجه قرار گرفتند. مطالعات متعددی بر نقش هیپرهوموسیستینمی در دو اختلال فوق و حتی اختلال شناختی خفیف تاکید ورزیده‌اند [۱۷-۱۳].

دو پلی مورفیسم شایع تک نوکلئوتیدی (SNPs) در ژن MTHFR عبارتند از: تبدیل C به T در نوکلئوتید 677 (C677T) و جایگزینی A با C در نوکلئوتید 1298 (A1298C). متاسیون C677T موجب جایگزینی آلانین با والین (A222V) در آنزیم تولیدی می‌گردد که گونه هموزیگوت آن (TT)، ۳۰ درصد عملکرد و گونه هتروزیگوت آن (CT) ۶۵ درصد عملکرد در مقایسه با گونه هموزیگوت نرمال (CC) دارد. عواقب پلی مورفیسم C677T به شکل مقادیر کمتر محتوای فولات گلبول‌های قرمز خون، فولات پلاسما و ویتامین B<sub>12</sub> در افراد سالم T677T در مقایسه با ژنوتیپ‌های دیگر تظاهر می‌یابد. مطالعات چندانی روی پلی مورفیسم 1298 انجام پذیرفته است اما مشخص شده است که ژنوتیپ C1298C عملکرد معادل ۶۰ درصد عملکرد ژنوتیپ معمول یعنی A1298A دارد. شیوع آلل C677T، تفاوت‌های فراوانی در نقاط مختلف دنیا و در گونه‌های مختلف نژادی دارد. هم‌چنین

تنوع قابل توجهی در شیوع واریانت‌های هموزیگوت C677T در جوامع مختلف دنیا وجود دارد [۱۸]. این پلی مورفیسم با کاهش فعالیت MTHFR، درجات خفیف تا متوسط هیپرهوموسیستینمی، مرگ زودرس قلبی - عروقی، سندرم متابولیک، مقاومت به انسولین، دیابت نوع ۲، پرفشاری خون، نوروپاتی دیابتی و نقایص لوله عصبی همراه بوده است. به نظر می‌رسد سطح فولات و برخی ریزمغذی‌ها حاضر در مسیر متابولیک MTHFR با بعضی سرطان‌ها مرتبط باشند. بنابراین یافته‌های مطالعات مختلف، ژنوتیپ‌های T677T و C1298C ژن MTHFR به ویژه در افرادی که سطوح بالاتری از فولات را دارا هستند، با کاهش متوسط میزان سرطان کولورکتال همراه هستند. در افرادی که دریافت غذایی کمتر فولات و مصرف الکل بیشتری دارند، میزان خطر سرطان افزایش می‌یابد. سازوکار انکوژنز مرتبط با این آنزیم را می‌توان به این ترتیب توجیه کرد: کاهش فعالیت آنزیم MTHFR موجب تجمع ۵ و ۱۰ متیلن تتراهیدروفولات و کاهش ذخیره ۵ متیلن

تتراهیدروفولات می‌شود. افزایش تجمع ۵ و ۱۰ متیلن تتراهیدروفولات در چرخه تولید DNA (که موجب متیلاسیون dUMP به dTMP در سنتز DNA می‌شود) موجب افزایش خطر نابسامانی‌های کروموزومی می‌شود. هم‌چنین پلی مورفیسم‌های MTHFR با تداخل در وضعیت فولات، متیلاسیون DNA را متأثر می‌سازند [۱۹ و ۲۰]. نقصان عملکرد MTHFR ناشی از این پلی مورفیسم، در مطالعات متعددی با برخی اختلالات روانپزشکی نظیر عقب ماندگی ذهنی (MR)، اسکیزوفرنیا و اختلالات خلقی همراه بوده است (۲۶-۲۱). نقش احتمالی پلی مورفیسم C677T ژن MTHFR در اختلال دو قطبی طی چندین مطالعه مورد بررسی قرار گرفته است که نتایج متناقض گزارش شده است [۲۷-۳۳]. این مطالعات در جوامع مختلف و نژادهای متفاوت انجام گردیده‌اند. از آنجا که نتایج متناقضی تاکنون در این زمینه منتشر شده‌اند و نقش نژاد در وراثت ژن‌های مختلف انکارناپذیر است، در این مطالعه به بررسی پلی مورفیسم C677T در ژن MTHFR در بیماران مبتلا به اختلال دو قطبی و افراد سالم ایرانی پرداخته ایم.

Methylation of Biogenic Amines and Phospholipids in CNS

Excitotoxic Effects?

Neurotransmitter Synthesis (Biotin Dependent)

5,10mTHF

شکل ۱- اجزای چرخه متابولیسم 1-Carbon و ارتباط آن با دستگاه عصبی مرکزی [۱۲]

SAM indicates S-adenosylmethionine; Hcy, homocysteine; Met, methionine; B12, vitamin B<sub>12</sub>; MS, methionine synthetase; 5mTHF, 5-methyl-tetrahydrofolate; 5,10mTHF, 5,10-methylene-tetrahydrofolate; THF, tetrahydrofolate; and MTHFR, methylenetetrahydrofolate reductase.

## روش‌ها

### ۱- جامعه پژوهش

بر اساس یک مطالعه مورد-شاهدی، تعداد ۹۰ نفر بیمار مبتلا به اختلال دوقطبی نوع ۱ (۵۱ نفر مرد، ۳۹ نفر زن، متوسط سن  $8 \pm 35$  سال) وارد مطالعه شدند. گروه مورد، بیماران مراجعه کننده به درمانگاه سرپایی و بستری در بخش های بیمارستان روانپزشکی ایران بودند و نمونه‌ها از بانک نمونه ایجاد شده در مرکز آموزشی درمانی روانپزشکی ایران برای مطالعات ژنتیک تهیه گردید. در بیماران تشخیص بر اساس معیارهای DSM-IV و بر اساس نظر توافقی یک نفر رزیدنت روانپزشکی و یک استاد روانپزشکی بیمارستان مربوطه گذاشته شد. برای این منظور از ابزار استاندارد مصاحبه بالینی ساختار یافته بر اساس DSM-IV در محور I<sup>1</sup> (SCID) استفاده شد [۳۴].

پس از ورود به مطالعه، پرسش نامه ای حاوی مشخصات دموگرافیک، سابقه بیماری روانپزشکی در بستگان درجه اول و درجه دوم، سابقه بیماری ارثی یا ژنتیکی در فرد یا خانواده وی و سابقه حوادث دوران کودکی از قبیل ابتلا به مننژیت یا ضربه به سر، توسط پژوهشگر تکمیل گردید. هیچیک از بیماران سابقه فعلی یا گذشته ابتلا به بیماری های نورولوژیک، اپی لپسی، عقب ماندگی ذهنی، ضربه به سر، بیماری های قلبی-عروقی، اندوکرینولوژیک یا متابولیک را نداشتند. از آنجا که ساختار ژنتیکی انسان ماهیتی پایدار در سراسر زندگی دارد، محدودیت سنی برای ورود به مطالعه وجود نداشت. اطلاعات بیماران بر اساس کدبندی ذخیره و اصول حفظ اسرار بیماران به دقت رعایت شد. پژوهش تاثیری بر روند درمان معمول و یا سیر بیماری نداشت.

گروه کنترل مشتمل بر ۹۴ نفر (۵۳ نفر مرد، ۴۱ نفر زن، متوسط سن  $6 \pm 31$  سال) بود که از میان پرسنل بیمارستان و دانشجویان داوطلب همان مرکز انتخاب شدند. اختلاف آماری معنی داری به لحاظ توزیع جنسی و سنی میان گروه بیمار و کنترل وجود نداشت. هیچ یک از افراد گروه کنترل سابقه فردی یا خانوادگی اختلالات عمده

روانپزشکی، بیماری های نورولوژیک، عقب ماندگی ذهنی و بیماری های متابولیک مداخله کننده با متابولیسم فولات را نداشتند از تمامی شرکت کنندگان پس از توضیح کافی در مورد اهداف پژوهش، رضایت نامه مکتوب اخذ گردید.

### ۲- جمع آوری نمونه ها

پس از توصیه به شستشوی دهان، از تمامی شرکت کنندگان حداقل ۲ میلی لیتر بزاق اخذ و در ظرف مخصوص نگهداری نمونه مد نظر برای استخراج DNA جمع آوری گردید. پس از کدگذاری، کلیه نمونه ها بر اساس توصیه شرکت سازنده تا زمان انتقال به آزمایشگاه در دمای اتاق نگهداری گردیدند. پس از تکمیل ظرفیت افراد پژوهش، کلیه نمونه ها به آزمایشگاه ژنتیک و بیوتکنولوژی مرکز تحقیقات غدد درون ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران منتقل شدند.

DNA با شیوه های استاندارد استخراج گردید. پلی مورفیسم C677T ژن MTHFR توسط (Polymerase Chain Reaction) PCR تعیین شد و مواد Amplified و digested با رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید در ژل آگاروز ۱/۵ درصد آنالیز شد.

### یافته‌ها

در این مطالعه ۱۸۴ نفر شرکت داده شدند. از این تعداد ۹۰ نفر بیمار مبتلا به اختلال دوقطبی نوع ۱ و ۹۴ نفر به عنوان گروه کنترل مورد بررسی قرار گرفتند. در گروه بیمار، ۵۶/۶ درصد بیماران مرد و متوسط گروه سنی در این گروه  $8 \pm 35$  سال بود (Mean  $\pm$  SD).

از ۹۴ نفر شرکت کننده به عنوان گروه کنترل، ۵۶/۳٪ مرد و متوسط سنی  $6 \pm 31$  سال بود (Mean  $\pm$  SD). اختلاف آماری معنی داری در مقایسه توزیع سنی و جنسی میان دو گروه وجود نداشت.

شیوع ژنوتیپ T677T (ژنوتیپ پلی مورفیسم) در گروه بیماران مبتلا به اختلال دوقطبی ۴/۴ درصد (۴ نفر)، ژنوتیپ C677C (ژنوتیپ سالم)، ۵۷/۸٪ (۵۲ نفر) و ژنوتیپ C677T، ۳۷/۸٪ (۳۴ نفر) بدست آمد. در بررسی گروه شاهد شیوع ژنوتیپ T677T (پلی مورفیسم) ۲/۱٪

1 - Structured Clinical Interview for DSM-IV

(۲ نفر)، ژنوتیپ C677T ۵۷/۴٪ (۵۴ نفر) و ژنوتیپ C677T ۴۰/۴٪ (۳۸ نفر) بود. اختلاف معنی دار آماری (جدول ۱).  
 میان دو گروه بیمار و شاهد در شیوع هیچ یک از ژنوتیپ های مذکور بدست نیامد ( $P > 0.05$ ) (جدول ۱).

جدول ۱- توزیع ژنوتیپهای مختلف ژن MTHFR در افراد دو قطبی نوع ۱ و گروه شاهد

تعداد	توزیع ژنوتیپ					آلل
	CC	CT	TT	T	C	
۹۴	۵۴ (۵۷/۴)	۳۸ (۴۰/۴)	۲ (۲/۱)	۴۲ (۲۲/۳)	۱۴۶ (۷۷/۷)	گروه شاهد
۹۰	۵۲ (۵۷/۸)	۳۴ (۳۷/۸)	۴ (۴/۴)	۴۲ (۲۳/۳)	۱۳۸ (۷۳/۷)	گروه بیماران دو قطبی نوع ۱

\* اعداد داخل پرانتز نشانگر درصد هستند.

† در مقایسه بین دو گروه توسط آزمون خی دو، در هیچ یک از موارد اختلاف معنی دار نبود ( $P > 0.05$ ).

هیچ یک از موارد یافته معنی دار آماری برای OR بدست نیامد ( $P > 0.05$ ). گرچه بر اساس OR بدست آمده برای آلل T و در مقایسه با آلل C (۱/۰۲۸) با فاصله اطمینان ۹۵ درصد (۱/۳۱-۰/۸)، به نظر می رسد گرایش (Trend) برای افزایش استعداد ابتلا به اختلال دو قطبی نوع I در افراد دارای ژنوتیپ حاوی آلل T وجود داشته باشد، اگرچه به حد معنی دار نرسیده است.

در جدول ۲ و نسبت شانس (OR) و فاصله اطمینان ۹۵٪ برای مقایسه میان شیوع آلل T در مقابل آلل C، ژنوتیپ TT در مقابل مجموع ژنوتیپهای CC و CT، ژنوتیپ CC در مقابل CC، ژنوتیپ CT در مقابل CT و TT در مقابل ژنوتیپ CC در افراد مورد بررسی (۱۸۴ نفر شامل ۹۴ نفر گروه کنترل و ۹۰ نفر گروه بیمار اختلال دو قطبی نوع ۱) ارائه شده اند. در

جدول ۲- مقادیر نسبت شانس (OR) و فاصله اطمینان ۹۵ درصد در مقایسه ژنوتیپها و آللهای پلی مورفیسم C677T ژن

MTHFR در افراد دو قطبی نوع ۱ و سالم

مقایسه	نسبت شانس (OR)	فاصله اطمینان ۹۵ درصد
آلل T در مقایسه با آلل C	۱/۰۵۸	(۰/۶۵-۱/۷۲)
TT در مقابل (CT + CC)	۲/۱۴	(۰/۳۸-۱۱/۹۸)
TT در مقابل CC	۲/۰۷	(۰/۳۶-۱۱/۸۳)
CT در مقابل CC	۰/۹۲	(۰/۵۱-۱/۶۹)
(TT + CT) در مقابل CC	۰/۹۹	(۰/۵۴-۱/۷۷)

\* تعداد کل افراد مورد بررسی ۱۸۴ نفر (۹۴ نفر گروه کنترل و ۹۰ نفر گروه بیمار اختلال دو قطبی نوع ۱).

†  $P < 0.05$  از لحاظ آماری معنی دار تلقی گردید.

## بحث

پرداخته اند [۲۷-۳۳ و ۲۱] که تنها در یک مطالعه ارتباط معنی دار میان پلی مورفیسم C677T و اختلال دو قطبی بدست آمده است (جدول ۳).

تاکنون چندین مطالعه در نقاط مختلف دنیا و با گونه های نژادی مختلف به بررسی پلی مورفیسم شایع در ژن MTHFR یعنی C677T و A1298C در بیماران دو قطبی

جدول ۳- مطالعات انجام شده روی پلی مورفیسم C677T ژن MTHFR در بیماران دوقطبی

تعداد		ژنوتیپ CC		ژنوتیپ CT		ژنوتیپ TT		آلل T	
CTL	BP	CTL	BP	CTL	BP	CTL	BP	CTL	BP
۲۵۸	۱۴۳	(۲۸/۷)۴۱	(۳۶/۸)۹۵	(۵۱/۷)۷۴	(۵۰)۱۲۹	(۱۹/۶)۲۸	(۱۳/۲)۳۴	(۴۵/۵)۱۳۰	(۳۸/۲)۱۹۷
۴۱۹	۴۰	(۳۷/۵)۱۵	(۳۶/۸)۱۵۴	(۵۰)۲۰	(۵۱/۱)۲۱۴	(۱۲/۵)۵	(۱۲/۲)۵۱	(۳۷/۵)۳۰	(۳۱/۷)۳۱۶
۱۲۰	۱۶۷	(۵۹/۳)۹۹	(۶۶/۱)۸۰	(۳۵/۹)۶۰	(۲۸/۱)۳۴	(۴/۸)۸	(۵/۸)۷	(۲۲/۷)۷۶	(۱۹/۸)۴۸
۳۰۰	۲۰۰	(۵۴)۱۰۸	(۷۰)۲۱۰	(۳۶/۵)۷۳	(۲۶/۳)۷۹	(۹/۵)۱۹	(۳/۷)۱۱	(۲۷/۵)۱۱۱	(۱۶/۸)۱۰۱
۲۳۸	۱۹۷	(۵۲/۸)۱۰۴	(۴۸/۷)۱۱۶	(۳۸/۶)۷۶	(۴۰/۸)۹۷	(۸/۶)۱۷	(۱۰/۵)۲۵	(۲۸)۱۱۰	(۲۹)۱۶۳
۱۷۶	۹۲	(۵۲/۲)۴۸	(۴۲/۶)۷۵	(۳۷)۳۴	(۴۵/۵)۸۰	(۱۰/۹)۱۰	(۱۱/۹)۲۱	-	-
۴۶۱	۴۱۹	(۳۵/۵)۱۴۸	(۳۳/۲)۱۵۳	(۴۶/۳)۱۹۴	(۵۱)۲۳۵	(۱۸/۴)۷۷	(۱۵/۸)۷۳	(۴۱/۵)۳۴۸	(۵۸/۵)۴۹۰
۱۷۷	۱۱۵	(۴۸/۶)۵۶	(۴۵/۱)۸۰	(۴۲/۷)۴۹	(۴۲/۳)۷۵	(۸/۷)۱۰	(۱۲/۵)۲۲	-	-
۹۴	۹۰	(۵۷/۸)۵۲	(۵۷/۲)۵۴	(۳۷/۸)۳۴	(۴۰/۴)۳۸	(۴/۴)۴	(۲/۱)۲	(۲۳/۳۳)۴۲	(۲۲/۳۴)۴۲

\* BP: گروه اختلال دوقطبی

† CTL: گروه کنترل

حاضر، گرایش برای شیوع بالاتر آلل T در بیماران بدست آمد [۲۸].

اخیراً Chen و همکاران در کشور چین به بررسی ۴۱۹ بیمار مبتلا به اختلال دوقطبی نوع ۱ و ۴۶۱ فرد سالم پرداخته‌اند. این مطالعه تنها مطالعه‌ای بوده است که ۸۲ بیمار مبتلا به اختلال دوقطبی نوع ۲ را نیز به صورت جداگانه مورد بررسی قرار داده است. در این مطالعه نیز ارتباطی میان پلی مورفیسم C677T و اختلال دوقطبی نوع ۱ و نوع ۲ بدست نیامده که مشابه نتایج مطالعه حاضر است [۳۰]. در میان همه مطالعات انجام شده، تنها در مطالعه Chen و مطالعه ما بیماران مبتلا به اختلال دوقطبی نوع ۱ به تفکیک از نوع ۲ مورد بررسی قرار گرفته‌اند که از نقاط قوت هر دو مطالعه محسوب می‌شود. چهار مطالعه فوق‌الذکر، مطالعاتی بوده‌اند که در میان افراد نژاد آسیایی شرق دور صورت پذیرفته‌اند و به جز مطالعه Tan، سه مطالعه دیگر شیوع تقریباً مشابهی از ژنوتیپ‌های CC، CT، TT، را ارائه داده‌اند (جدول ۴) و شیوع ژنوتیپ پلی مورفیک TT، در بیماران و البته در گروه کنترل بیش از سایر مطالعات صورت پذیرفته در نژادهای دیگر بوده است که بر نقش نژاد و عوامل دیگر موثر در تغییرات ژنتیکی (از جمله عوامل تغذیه‌ای) دلالت دارد. Ozbek و همکاران در مطالعه‌ای، ۱۹۷ بیمار مبتلا به اختلال دوقطبی و ۲۷۸ نفر از

ضمناً تاکنون چهار مطالعه متوالی به بررسی ارتباط پلی مورفیسم C677T و اختلال دوقطبی پرداخته‌اند که به یافته‌های آنها اشاره خواهد شد. همه مطالعات صورت گرفته تاکنون به شیوه مورد-شاهدی انجام پذیرفته‌اند. در مطالعه‌ای که در کشور ژاپن توسط Kunugi صورت پذیرفته است، تعداد ۱۴۳ بیمار مبتلا به اختلال دوقطبی بر اساس معیارهای DSM-IV با ۲۵۸ فرد سالم مورد مقایسه قرار گرفته‌اند. همانند مطالعه حاضر، افراد گروه کنترل از میان افراد پرسنل و دانشجویان انتخاب شده و فاقد علائم بیماری روانپزشکی بوده‌اند. در این مطالعه ارتباط معناداری میان پلی مورفیسم C677T و اختلال دوقطبی یافت نشده است که مشابه یافته‌های مطالعه حاضر است. گرچه ارتباط ضعیفی میان آلل هموزیگوت T677 و اختلال دوقطبی بدست آمده که معنی‌دار نبوده است [۲۷]. مطالعه دیگری در کشور ژاپن توسط Arinami، به مقایسه ۴۰ بیمار مبتلا به اختلال دوقطبی و ۴۱۹ فرد سالم پرداخته است که مطالعه مذکور نیز ارتباط معنی‌داری را میان پلی مورفیسم C677T و اختلال دوقطبی بدست نیآورده است [۲۸].

Tan و همکاران نیز در سنگاپور به بررسی ۲۰۰ بیمار مبتلا به اختلال دوقطبی و ۳۰۰ فرد سالم پرداخته‌اند که مشابه مطالعه حاضر ارتباطی میان پلی مورفیسم مذکور و اختلال دوقطبی نیافته‌اند، گرچه در آن مطالعه نیز همچون مطالعه

دوقطبی نیافته‌اند که منطبق بر یافته‌های مطالعه حاضر است [۳۳]. تنها مطالعه‌ای که ارتباط مثبت میان پلی‌مورفیسم C677T و اختلال دوقطبی را گزارش کرده، مطالعه Kempisty و همکاران در مجارستان بوده است. در مطالعه مذکور OR بدست آمده برای اختلال دوقطبی معادل  $1/988(1/883-2/37) = 95\% CI$  بوده است. این مطالعه ۲۰۰ بیمار مبتلا به اختلال دوقطبی را با ۳۰۰ فرد سالم مورد مقایسه قرار داده است و در این بررسی شیوع آلل T در گروه بیماران ۱/۷ برابر گروه کنترل بوده است. نکته دیگر در مقایسه مطالعه حاضر با سایر بررسی‌ها، شیوع کمتر ژنوتیپ هموزیگوت TT در گروه کنترل و گروه بیمار بود که شاید با توجه به تفاوت‌های نژادی قابل توجه باشد.

تاکنون چهار مطالعه متاآنالیز به بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم C677T و اختلال دوقطبی پرداخته‌اند که یافته‌های مطالعات مذکور در جدول ۴ قابل مشاهده است.

افراد خانواده آنان را با ۲۳۸ فرد سالم از لحاظ پلی‌مورفیسم ژن MTHFR و سطوح هموسیستین، فولات و ویتامین B<sub>12</sub> مورد مقایسه قرار داده‌اند. در مطالعه مذکور نیز همانند مطالعه حاضر ارتباطی میان پلی‌مورفیسم C677T و اختلال دوقطبی بدست نیامده است [۳۲]. یافته‌های مطالعه مذکور در شیوع ژنوتیپ‌های مختلف شباهت زیادی به یافته‌های بررسی ما دارد که با توجه به قرابت نژادی قابل توجه است. Reif و همکاران در کشور آلمان، ۹۲ بیمار مبتلا به اختلال دوقطبی و ۱۷۶ فرد سالم را لحاظ سطح هموسیستین و پلی‌مورفیسم ژن MTHFR بررسی کرده‌اند که ارتباطی میان پلی‌مورفیسم C677T و اختلال دوقطبی نیافته‌اند اما این ارتباط را با پلی‌مورفیسم A1298C مثبت گزارش کرده‌اند [۳۱]. اخیراً Jonsson و همکاران ۱۱۵ بیمار نروژی مبتلا به اختلال دوقطبی را با ۱۷۷ فرد سالم مورد مقایسه قرار داده و ارتباطی میان پلی‌مورفیسم C677T و اختلال

جدول ۴ - OR و فاصله اطمینان ۹۵٪ در متاآنالیزهای انجام شده برای ارتباط پلی‌مورفیسم C677T و اختلال دوقطبی

مرجع	تعداد نمونه‌ها (بیمار+کنترل)	آلل T در مقابل C	TT در مقابل (CT+CC)	TT در مقابل CC	CT در مقابل CC	TT+CT در مقابل CC
Zintzaras (2006)	۱۴۱۵(۴۴۲+۹۷۳)	۱/۱۱(۰/۹۲-۱/۳۳)	۱/۱۹(۰/۸۲-۱/۷۵)	۱/۲۲(۰/۸۱-۱/۸۳)	گزارش نشد	۱/۱۲(۰/۸۷-۱/۴۴)
Gilbody (2007)	۱۶۴۸(۵۵۰+۱۰۹۸)	۱/۴۱(۱/۱۹-۱/۶۸)	گزارش نشد	۱/۸۲(۱/۲۲-۲/۷۰)	۱/۴۵(۱/۱۴-۱/۸۶)	گزارش نشد
Jonsson (2008)	۲۲۱۱(۷۶۱+۱۴۵۰)	۱/۲(۱/۰۴-۱/۳۹)	۱/۲۹(۰/۹۴-۱/۷۶)	۱/۳۵(۰/۹۷-۱/۸۸)	۱/۲۱(۰/۹۹-۱/۴۸)	۱/۲۵(۱/۰۳-۱/۵۱)
مطالعه حاضر	۱۸۴(۹۰+۹۴)	۱/۰۵۸(۰/۶۵-۱/۷۲)	۲/۱۴(۰/۳۸-۱۱/۹۸)	۲/۰۷(۰/۳۶-۱۱/۸۳)	۰/۹۲(۰/۵۱-۱/۶۹)	۰/۹۹(۰/۵۴-۱/۷۷)

در مطالعات آینده نگر طولانی مدت برای بررسی این ارتباط ضروری است. متاآنالیز Jonsson، مقایسه آلل T با آلل C و TT+CT در برابر CC، ارتباط ضعیفی را نشان داده است که از لحاظ آماری معنی دار نبوده است و در آن بر انجام مطالعات بیشتر و با حجم نمونه بزرگتر تاکید شده است [۳۳]. به طور خلاصه بر اساس نتایج مطالعه ما، به نظر نمی‌رسد پلی‌مورفیسم C677T ژن MTHFR عامل خطر عمده‌ای برای اختلال دوقطبی در بیماران ایرانی محسوب شود که منطبق بر مطالعات مختلف انجام شده در سایر نقاط

در متاآنالیز Gilbody بنابر OR بدست آمده، مقایسه آلل T در مقابل آلل C و همچنین ژنوتیپ TT در مقابل CC، ارتباطی را میان این پلی‌مورفیسم و بیماری آورده است هرچند در این مطالعه سطح معنی داری ذکر نشده است [۳۵] (جدول ۴). در مطالعه Zintzaras ارتباطی میان این پلی‌مورفیسم و حتی آلل T با اختلال دوقطبی بدست نیامده است، گرچه در این مطالعه ارتباط ضعیفی میان آلل T و این اختلال در مردمان آسیای شرقی گزارش شده است [۳۶]. در این مطالعه تصریح شده است که انجام

مطالعه association کاهش می‌یابد. لذا پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده این نکات مورد توجه قرار گیرند. چهارم آنکه تاکنون حداقل ۱۴ موتاسیون مختلف در ژن MTHFR گزارش شده است [۴۶-۴۴] که گرچه شیوع بسیار کمتری دارند، با اختلال عملکرد بسیار شدیدتری در فعالیت آنزیم همراه هستند و ممکن است موجب اختلال در متابولیسم 1-Carbon گردند. از محدودیت‌های دیگر مطالعه حاضر عدم کنترل سایر موتاسیون‌هاست که پیشنهاد می‌شود در بررسی‌های بعدی مورد توجه قرار گیرند.

پنجم آنکه اختلال دوقطبی، اختلالی پیچیده بوده و عوامل ژنتیکی و محیطی متعددی در ایجاد آن موثرند. سازوکارهای اپی ژنتیک نظیر متیلاسیون DNA نیز در اختلال دوقطبی نقش دارند [۴۸ و ۴۷] و مطالعات نشان داده‌اند که پلی مورفیسم C677T ژن MTHFR در متیلاسیون DNA موثر است [۴۰ و ۴۹]. در هیچ یک از مطالعات گذشته و مطالعه حاضر به این نکته توجه نشده است که بررسی نقش عامل فوق در مطالعات بعدی پیشنهاد می‌شود.

در کل ارتباط معنی‌داری میان پلی مورفیسم C677T و اختلال دوقطبی بدست نیامد اما گرایش به افزایش شیوع آلل T که یافته مطالعه حاضر است را نمی‌توان از نظر دور داشت و شاید انجام مطالعاتی چند مرکزی با حجم نمونه بالاتر و با کنترل سایر عوامل دخیل در عملکرد آنزیم MTHFR بتواند به روشن شدن نقش احتمالی پلی مورفیسم C677T در اختلال دوقطبی کمک نماید.

### سپاسگزاری

مطالعه حاضر بخشی از طرح پژوهشی مصوب در "مرکز تحقیقات علوم اعصاب" دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و همچنین "شبکه تحقیقات علوم اعصاب کشور" است که از مسئولین محترم این مرکز به سبب تامین هزینه مالی این پژوهش سپاسگزاری می‌گردد.

دنیاست گرچه بر اساس OR بدست آمده، ژنوتیپ‌های حاوی آلل T می‌توانند با ارتباطی مرزی موجب افزایش گرایش در استعداد ابتلا به اختلال دوقطبی گردند. شاید بتوان برخی عوامل را در عدم امکان یافتن ارتباط میان این پلی مورفیسم و اختلال دوقطبی ذکر کرد:

نخست آن که بر اساس مطالعات انجام شده، فولات پایین و هموسیستین بالای خون با اختلالات نوروسایکياتری همراهی دارند [۳۷ و ۳۸]. مطالعات نشان داده‌اند که افراد دارای ژنوتیپ هموزیگوت T677T، در شرایط کمبود فولات به میزان بیشتری از سطوح بالای هموسیستین، که خود نشانی از متابولیسم مختل 1-Carbon است، آسیب می‌بینند [۳۹ و ۴۰] ضمن آنکه در شرایط مطلوب سطوح فولات، اختلافی میان ژنوتیپ‌های مختلف C677T و میزان هموسیستین وجود ندارد [۴۱].

این یافته‌ها نشانگر آن است که مقادیر بالاتر فولات خون، اثر جبرانی روی کم‌کاری آنزیم MTHFR دارد. از محدودیت‌های مطالعه حاضر می‌توان به عدم اندازه‌گیری سطوح فولات و هموسیستین سرم در شرکت‌کنندگان اشاره کرد که انجام آن در مطالعات بعدی پیشنهاد می‌گردد. دوم آنکه مطالعات نشان داده‌اند میزان افت عملکرد آنزیم MTHFR در اثر پلی مورفیسم C677T، تحت تاثیر عوامل خطر محیطی نظیر فقر تغذیه‌ای به ویژه مصرف کم میوه‌جات و سبزیجات که منبع غنی فولات، ویتامین‌های گروه B و آنتی‌اکسیدان‌ها هستند می‌باشد [۲۴ و ۴۲]. لذا از دیگر محدودیت‌های مطالعه حاضر می‌توان به عدم ثبت محتوای تغذیه‌ای شرکت‌کنندگان و برآورد میزان متوسط دریافت مواد مغذی فوق بر اساس یادآمد غذایی اشاره نمود که پیشنهاد می‌شود در بررسی‌های آینده به این نکته توجه گردد.

سوم آنکه تعامل بالقوه میان MTHFR و سایر ژن‌های موثر در متابولیسم 1-Carbon نظیر متیلن تتراهیدروفولات دهیدروژناز و متیونین سنتتاز که با اختلال دوقطبی مرتبط دانسته شده‌اند [۴۳]، احتمال یافتن اثر خاص هر یک طی



## ماخذ

- 1- AC. Swann, B. Geller, R.M. Post, L. Altshuler, K.D. Chang, M.P. Delbello, C. Reist and I.A. Juster. Practical clues to early recognition of bipolar disorder: a primary care approach. *Prim. Care Companion J Clin Psychiatry* 2005;7:15-21.
- 2- F. Mamdani, I. Jaitovich Groisman, M. Alda and G. Turecki. Long-term responsiveness to lithium as a pharmacogenetic outcome variable: treatment and etiologic implications. *Curr Psychiatry Rep* 2003; 5: 484-492.
- 3- A.G. Cardno, E.J. Marshall, B. Coid, A.M. Macdonald, T.R. Ribchester, N.J. Davies, P. Venturi, L.A. Jones, S.W. Lewis, P.C. Sham, I.I. Gottesman, A.E. Farmer, P. McGuffin, A.M. Reveley and R.M. Murray. Heritability estimates for psychotic disorders: the Maudsley twin psychosis series. *Arch Gen Psychiatry* 1999; 56: 162-168.
- 4- N. Craddock, S. Dave and J. Greening. Association studies of bipolar disorder. *Bipolar Disord* 2001; 6:284-298.
- 5- N. Craddock and M. Owen. Chromosomal aberrations and bipolar affective disorder. *Br J Psychiatry* 1994; 164: 507-512.
- 6- M. Anguelova, C. Benkelfat and G. Turecki. A systematic review of association studies investigating genes coding for serotonin receptors and the serotonin transporter: II. Suicidal behavior. *Mol Psychiatry* 2003;7:646-653.
- 7- J.D. Picker and J.T. Coyle. Do maternal folate and homocysteine levels play a role in neurodevelopmental processes that increase risk for schizophrenia? *Harv Rev Psychiatry* 2005; 4:197-205.
- 8- V.M. Andreoli and F. Maffei. Blood-levels of S-adenosylmethionine in schizophrenia. *Lancet* 1975; 2: 922.
- 9- A.C.M. Alessio, J.M. Annichino-Bizzacchi, S.P. Bydlowski, M.N. Eberlin, A.P. Vellasca and N.F. Hoehr. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase reductase genes and homocysteine levels in Brazilian children. *Am J Med Genet* 2004; 128A : 256-260.
- 10- Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, et al.. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995; 10:111-113.
- 11- Van Praag HM. Depression. *Lancet* 1982; 2: 1259-1283.
- 12- Bottiglieri T, Hyland K, Reynolds EH. The clinical potential of ademetionine (S-adenosylmethionine) in neurological disorders. *Drugs* 1994;48:137-152.
- 13- Hasanah CI, Khan UA, Musalmah M, et al. Reduced red-cell folate in mania. *J Affect Disord* 1997; 46:95-9.
- 14- Muntjewerff JW and Blom HJ. Aberrant folate status in schizophrenic patients: what is the evidence? *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2005; 29:1133-9.
- 15- Kessler RC, Nelson CB, McGonagle KA, Liu J, Swartz M, Blazer DG. Comorbidity of DSM-III-R major depressive disorder in the general population: results from the US National Comorbidity Survey. *Br J Psychiatry* 1996; 30: 17-30.
- 16- Mezzich JE, Ahn CW, Fabrega HJ, Pilkonis PA. Patterns of psychiatric comorbidity in a large population presenting for care. In: Maser JD, Cloninger CR, eds. *Comorbidity of Mood and Anxiety Disorders*. Washington, DC: American Psychiatric Press; 1990:189-204.
- 17- Sartorius N, Ustun TB, Lecrubier Y, Wittchen HU. Depression comorbid with anxiety: results from the WHO study on psychological disorders in primary health care. *Br J Psychiatry* 1996;30:38-43.
- 18- Rozen R. Molecular genetics of methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *J Inherit Metab Dis* 1996; 19:589-94.
- 19- R.C. Bakker and D.P. Brandjes. Hyperhomocysteinaemia and associated disease. *Pharm World Sci* 1997; 3:126-132.
- 20- S. Matsushita, T. Muramatsu, H. Arai, T. Matsui and S. Higuchi. The frequency of the methylenetetrahydrofolate reductase-gene mutation varies with age in the normal population. *Am J Hum Genet*. 1997; 61: pp. 1459-1460.
- 21- T. Arinami, N. Yamada, K. Yamakawa-Kobayashi, H. Hamaguchi and M. Toru. Methylenetetrahydrofolate reductase variant and schizophrenia/depression. *Am J Med Genet* 1997; 74 : 526-528.
- 22- T. Bottiglieri, P. Godfrey, T. Flynn, M.W. Carney, B.K. Toone and E.H. Reynolds. Cerebrospinal fluid S-adenosylmethionine in depression and dementia: effects of treatment with parenteral and oral S-adenosylmethionine. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1990; 53:1096-1098.
- 23- J.M. Freeman, J.D. Finkelstein and S.H. Mudd. Folate-responsive homocystinuria and "schizophrenia". A defect in methylation due to deficient 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase activity. *N Engl J Med* 1975;292: 491-496.
- 24- P.S. Godfrey, B.K. Toone, M.W. Carney, T.G. Flynn, T. Bottiglieri, M. Laundry. I. Chanarin and E.H. Reynolds, Enhancement of recovery from psychiatric illness by methylfolate. *Lancet* 1990; 336: 392-395.
- 25- F. Pasquier, F. Lebert, H. Petit, J. Zittoun and J. Marquet. Methylenetetrahydrofolate reductase deficiency revealed by a neuropathy in a psychotic adult. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994; 57: 765-766.

- 26- B. Regland, B.V. Johansson and C.G. Gottfries. Homocysteinemia and schizophrenia as a case of methylation deficiency. *J Neural Transm Gen Sect* 1994; 98: 143–152.
- 27- Kunugi H, Fukuda R, Hattori M, et al. C677T polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase gene and psychoses. *Mol Psychiatry* 1998; 3:435–7.
- 28- Tan EC, Chong SA, Lim LC, et al. Genetic analysis of the thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase variant in schizophrenia and mood disorders. *Psychiatr Genet* 2004; 14: 227–31.
- 29- Kempisty B, Mostowska A, Gorska I, et al. Association of 677C→T polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene with bipolar disorder and schizophrenia. *Neurosci Lett* 2006; 400: 267–71.
- 30- Chen Z, Liu Y, Zhang D, et al. C677T methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms in bipolar disorder: an association study in the Chinese population and a meta-analysis of genetic association studies. *Neurosci Lett* 2009; 449: 48–51.
- 31- Reif A, Pfuhlmann B, Lesch K. Homocysteinemia as well as methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms are associated with affective psychosis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2005; 29: 1162–1168.
- 32- Ozbek Z, Kucukali C, Ozbek E, et al. Effect of methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms on homocysteine, folate and vitamin B12 in patients with bipolar disorder and relatives. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2008; 32: 1331–1337.
- 33- Jonsson E, Larsson K, Vares M, et al. Two methylenetetrahydrofolate reductase gene (MTHFR) polymorphisms, schizophrenia and bipolar disorder: An association study. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2008; 147B: 976–982.
- 34- M.B. First, R.L. Spitzer, M. Gibbon and J. Williams, Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders, Clinician Version (SCID-CV), American Psychiatric Press Inc., Washington, DC (1996).
- 35- Gilbody S, Lewis S, Lightfoot T. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genetic polymorphisms and psychiatric disorders: A HuGE review. *Am J Epidemiol* 2007; 165: 1–13.
- 36- Zintzaras E. C677T and A1298C methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms in schizophrenia, bipolar disorder and depression: a meta-analysis of genetic association studies. *Psychiatr Genet* 2006; 16: 105–115.
- 37- T. Bottiglieri. Folate, vitamin B12, and neuropsychiatric disorders. *Nutr. Rev.* 1996; 54: 382–390.
- 38- S. Reutens and P. Sachdev. Homocysteine in neuropsychiatric disorders of the elderly. *Int J Geriatr Psychiatry* 2002; 17: 859–864.
- 39- S. Friso, S.W. Choi, D. Girelli, J.B. Mason, G.G. Dolnikowski, P.J. Bagley, et al. A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. *Proc Natl Acad Sci* 2002; 99: 5606–5611.
- 40- P.F. Jacques, A.G. Bostom, R.R. Williams, R.C. Ellison, J.H. Eckfeldt, I.H. Rosenberg, et al. Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation* 1996; 93 7–9.
- 41- L. Brattstrom, D.E. Wilcken, J. Ohrvik and L. Brudin. Common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation leads to hyperhomocysteinemia but not to vascular disease: the result of a meta-analysis. *Circulation* 1998; 98: 2520–2526.
- 42- B. Regland. Schizophrenia and single-carbon metabolism. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2005; 29: 1124–1132.
- 43- B. Kempisty, J. Sikora, M. Lianeri, A. Szczepankiewicz, P. Czerski, J. Hauser et al. MTHFD 1958G >A and MTR 2756A>G polymorphisms are associated with bipolar disorder and schizophrenia. *Psychiatr Genet* 2007; 17: 177–181.
- 44- Goyette P., Sumner J.S., Milos R., Duncan A.M.V., Rosenblatt D.S., Matthews, et al. Human methylenetetrahydrofolate reductase: Isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nature Genetics* 1994; 7: 195–200.
- 45- Goyette P., Christensen B., Rosenblatt D.S., Rozen R. Severe and mild mutations in cis for the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene, and description of five novel mutations in MTHFR. *American Journal of Human Genetics* 1996; 59: 1268–1275.
- 46- Goyette P., Frosst P., Rosenblatt D.S., Rozen R. Seven novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and genotype/phenotype correlations in severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *American Journal of Human Genetics* 1995; 56: 1052–1059.
- 47- H.M. Abdolmaleky, S. Thiagalingam and M. Wilcox. Genetics and epigenetics in major psychiatric disorders: dilemmas, achievements, applications, and future scope. *Am J Pharmacogenomics* 2005; 5: 149–160.
- 48- J. van Vliet, N.A. Oates, E. Whitelaw. Epigenetic mechanisms in the context of complex diseases. *Cell Mol. Life Sci.* 2007; 64: 1531–1538.
- 49- L.L. Stern, J.B. Mason, J. Selhub, S.W. Choi. Genomic DNA hypomethylation, a characteristic of most cancers, is present in peripheral leukocytes of individuals who are homozygous for the C677T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9: 849–853.