

● مقاله تحقیقی کد مقاله: ۰۳۳



بررسی ارتباط دو پلیمورفیسم A1298C و C677T در ژن MTHFR با سندروم سقط مکرر

چکیده

زمینه: یکی از فاکتورهای مطرح در ایجاد ترومبوفیلی در زنان مبتلا به سقط مکرر، پلیمورفیسم‌های A1298C و C677T در ژن MTHFR است. هدف از این تحقیق بررسی ارتباط این دو پلیمورفیسم با سندروم سقط مکرر به عنوان یکی از ریسک فاکتورهای ژنتیکی برای این سندروم بود.

روشن کار: ۳۰ زن با سابقه سقط مکرر خودبه‌خودی با علت نامشخص به عنوان گروه بیماران و ۱۰ زن بدون سابقه سقط مکرر و دارای حادث دو باروری موفق، به عنوان گروه شاهد از میان مراجعه‌کنندگان به بیمارستان فوق‌تخصصی بقیه‌الله(عج) و مرکز ناباروری ابن سینا انتخاب شدند. برای بررسی دو پلیمورفیسم ژن MTHFR، از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و هضم آنزیمی محصولات PCR با آنزیم‌های اندونوکلئاز محدود‌الاثر (PCR-RFLP) استفاده شد. نتایج به دست آمده از تعیین ژنوتیپ هر پلیمورفیسم با نرم‌افزار SPSS، دو آزمون χ^2 و همبستگی اسپیرمن تجزیه و تحلیل شد.

یافته‌ها: بین دو پلیمورفیسم A1298C و C677T ارتباط متقابل وجود دارد ($r=0.508$, $p\text{-value}<0.005$). ۱۷ نفر از زنان دچار سقط مکرر (۵۶٪) و ۵ نفر از زنان گروه شاهد (۵۰٪) برای پلیمورفیسم C677T هتروزیگوت بودند. فراوانی الـ موتانت T در زنان دچار سقط، بیشتر از زنان گروه شاهد بود ($4/28$ ٪ در میان زنان دچار سقط مکرر و $2/25$ ٪ در زنان گروه شاهد، $p\text{-value}<0.05$). فراوانی پلیمورفیسم A1298C در میان زنان دچار سقط مکرر و زنان گروه شاهد به ترتیب $62/3$ ٪ و 50 ٪ بود. $43/2$ ٪ زنان دچار سقط مکرر و 20 ٪ زنان گروه کنترل، برای پلیمورفیسم A1298C هتروزیگوت و 20 ٪ زنان دچار سقط مکرر و 30 ٪ زنان گروه شاهد، برای این پلیمورفیسم هموزیگوت بودند.

نتیجه‌گیری: نتایج به دست آمده در این پژوهش نشان داد که هیچ‌کدام از دو پلیمورفیسم MTHFR نمی‌توانند توجیه‌کننده علت سقط مکرر در زنان مورد بررسی محسوب گردند.

واژگان کلیدی: سندروم سقط مکرر خودبه‌خودی، ترومبوفیلی، پلیمورفیسم، MTHFR

دکتر سعید مروتی ۱

*امین خالق‌پرست ۲

دکتر زهرا نورمحمدی ۳

۱- استادیار گروه ژنتیک انسانی،

دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله(عج)

۲- کارشناسی ارشد زیست

شناسی ژنتیک

۳- استادیار گروه ژنتیک، دانشگاه

آزاد اسلامی، واحد علوم و

تحقیقات

* نشانی نویسنده مسؤول:

تهران، دانشکده علوم پایه، دانشگاه

آزاد اسلامی، واحد علوم و

تحقیقات

تلفن: ۰۹۱۹۳۹۴۰۱۸۴

نشانی الکترونیکی:

keyvan_1878@yahoo.com

جهش نقطه‌ای در نوکلئوتید ۶۷۷ در اگزون شماره ۴ ژن MTHFR منجر به جایگزینی والین به جای آلانین در اسید آمینه شماره ۲۲۲ توالی پروتئین آنزیم MTHFR می‌شود. این جهش نقطه‌ای، منجر به ایجاد یک آنزیم MTHFR ناپایدار و حساس به حرارت با فعالیت کم می‌شود. به علت فعالیت آنزیمی کمتر MTHFR موتانت، میزان هموسیستین سرمی افزایش می‌یابد. آنزیم MTHFR در افراد هموزیگوت ۳۰ درصد عملکرد و در افراد هتروزیگوت ۶۵ درصد عملکرد را در مقایسه با افراد نرمال دارد. هموزیگوت‌ها به شرط دریافت فولات کافی، دارای سطوح طبیعی هموسیستین در خون هستند؛ ولی اگر فولات کافی دریافت نکنند، میزان هموسیستین در آن‌ها افزایش می‌یابد [۱۱، ۱۰، ۹]. تبدیل آدنین به سیتوزین در نوکلئوتید ۱۲۹۸ در اگزون شماره ۷ در ژن A1298C (MTHFR) نیز منجر به جایگزینی آلانین به جای گلوتامین در اسید آمینه شماره ۴۲۹ توالی پروتئینی آنزیم MTHFR می‌شود. مطالعات چندانی روی پلی‌مورفیسم A1298C انجام نگرفته، اما مشخص شده است که ژنتیپ AA عملکردی معادل ۶۰ درصد عملکرد ژنتیپ Aa را داراست. افراد هموزیگوت برای ال A1298C سطوح بالای هموسیستین سرمی را نشان نمی‌دهند. اما افراد دارای هتروزیگوتی ترکیبی پلی‌مورفیسم A1298C و C677T دارای مشخصات بیوشیمیایی مشابه هموزیگوت‌های C677T، مانند سطوح افزایش یافته هموسیستین و سطوح کاهش یافته فولات هستند [۱۱، ۱۲]. با توجه به اهمیت و نقش MTHFR در هموستاز و اثرات پلی‌مورفیسم‌های آن در افزایش سطح هموسیستین و ابتلاء به ترومبوز وریدی و نیز ارتباط ترومبوز با افزایش احتمال سقط مکرر، در مطالعه حاضر ارتباط دو پلی‌مورفیسم A1298C و C677T در ژن MTHFR با سقط مکرر بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

انتخاب گروه بیماران و گروه شاهد

طی یک مطالعه مورد-شاهدی، ۳۰ زن با سابقه سقط مکرر خودبه‌خودی با علت نامشخص، به عنوان گروه بیماران و ۱۰ زن بدون سابقه سقط و دارای حداقل دو باروری موفق، به عنوان گروه شاهد از میان مراجعه کنندگان به بیمارستان فوق تخصصی بقیه الله (عج) و مرکز ناباروری این سینا در ماههای اردیبهشت تا اسفند سال ۱۳۸۸ با توجه به پرونده پزشکی بیماران و نظر متخصص زنان،

مقدمه

شایع‌ترین عارضه در سه ماهه اول و دوم حاملگی، سقط جنین است. مفهوم سقط جنین به ختم بارداری پیش از هفت‌هفته بیستم اطلاق می‌شود. در این میان، زنانی که بیش از دو بار سقط جنین پی‌درپی را تجربه می‌کنند دچار سقط مکرر هستند [۱]. در سقط مکرر به عنوان یک بیماری چند عاملی، مسائل متعددی دخیل است و مسائل ژنتیکی به خصوص فاکتورهای ترومبوفیلی (اخته دوستی) به عنوان یکی از دلایل سقط مکرر می‌توانند مطرح باشند. سلامت جنین، ارتباط مستقیم با گردش خون مادر دارد. هر عاملی که باعث اختلال در ارتباط شود برای جنین زیان آور است [۲]. به نظر می‌رسد که ایجاد اخته نابه‌جا یا ترومبوز می‌تواند در مویرگ‌های جفت، باعث اختلال در روند تبادلات مواد بین مادر و جنین شده و نهایتاً منجر به سقط گردد [۳]. پلی‌مورفیسم‌های نوکلئوتیدهای متفاوت در ژن‌های کدکننده آنزیم‌های تنظیم‌کننده مسیرهای مهم متابولیکی همانند متیلن تتراهیدروفولات دوکتاز (MTHFR) به عنوان یکی از فاکتورهای مطرح در ایجاد ترومبوفیلی در نظر گرفته می‌شوند. آنزیم MTHFR نقش محوری در متابولیسم فولات، متیونین و هموسیستین دارد [۴]. هموسیستین پلاسمایی که آمینواسید بالقوه سمی است [۵]. افزایش هموسیستین به علت اثرات پاتولوژیک منفی که بر روی آنوتولیوم عروق، آتروزنسیس و فعالیت فاکتورهای انقادی V و VIII می‌گذارد، منجر به افزایش سطح ترومبوین، تجمع پلاکت‌ها و در نتیجه ترومبوز وریدی می‌شود [۴]. بنابراین، با تبدیل این اسید آمینه به متیونین در بدنه، اثرات سمی آن خشی می‌شود. آنزیم MTHFR موجب تبدیل برگشت‌ناپذیر ۵ و ۱۰ متیلن تتراهیدروفولات به ۵ متیلن تتراهیدروفولات می‌گردد که شکل غالب فولات موجود در گردش خون است. سپس هموسیستین با اخذ یک گروه متیل از ۵-متیلن تتراهیدروفولات، به متیونین تبدیل می‌شود. این واکنش توسط متیونین سنتاز کاتالیز می‌شود [۷، ۶، ۵]. کاهش در فعالیت آنزیم MTHFR منجر به کاهش در سوبسترا برای متیونین سنتاز می‌شود که به دنبال آن باعث توقف تشکیل هموسیستین و در نتیجه افزایش سطح هموسیستین می‌شود [۷]. ژن کدکننده آنزیم کاتالیک MTHFR در انتهای بازوی کوتاه کروموزوم یک (p ۳۶.۳۱) قرار داشته و دارای ۱۱ اگزون است [۸]. دو پلی‌مورفیسم A1298C و C677T که به طور بارزی در فعالیت آنزیمی MTHFR تغییر ایجاد می‌کنند، در این ژن تشخیص داده شده است. تبدیل سیتوزین به تیمین در نتیجه یک



مدت ۱ دقیقه، ۰C72 به مدت ۲ دقیقه) تکثیر یافتند و به دنبال آن، مرحله طویل‌سازی نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه انجام شد. صحت انجام PCR با انجام الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگاروز ۲ درصد تأیید شد. RFLP بر روی A1298C و C677T مخصوصات PCR برای دو پلی مورفیسم C677T و A1298C به ترتیب توسط آنزیم‌های محدود‌الاثر Hinf I و Mbo II و مطابق دستورالعمل شرکت تولیدکننده آنزیم انجام شد. سپس قطعات حاصل از RFLP بر روی ژل آگاروز ۳ درصد الکتروفورز شد و طول قطعات حاصل از هضم آنزیمی مشاهده گردید. محصول PCR برای پلی مورفیسم Hinf I هیچ توالی قابل شناسایی ندارde اما در الل جهش یافته، به علت جهش رخ داده، یک جایگاه شناسایی برای آنزیم ایجاد می‌شود. حاصل این تغییر، ایجاد دو قطعه ۱۷۵ bp و ۲۳ bp از هضم آنزیمی است. باند ۲۳ bp به علت کوچکی اندازه در ژل آگاروز ۳ درصد مشاهده نمی‌شود، بنابراین، ملاک بررسی برای تعیین ژنتیپ C677T، باند ۱۷۵ bp است (شکل ۱). محصول PCR برای پلی مورفیسم A1298C نیز ۲۵۶ bp طول دارد که پس از هضم با آنزیم Mbo II در الل نرمال چهار قطعه و در الل جهش یافته ۳ قطعه حاصل می‌شود. قطعات ۳۰، ۲۸ و ۲۲ و ۲۰۴ bp مشاهده قطعه ۲۰۴ bp برای الل و برای ملاک A، مشاهده قطعه ۱۷۶ bp در ژل آگاروز ۳ درصد است (شکل ۲).

انتخاب شدند. معیارهای خروج از مطالعه شامل سایر علل مطرح در سقط از جمله وجود ناهنجاری‌های کروموزومی در جنین، مشکلات آناتومیک در رحم، اختلالات هورمونی و عفونت‌های مرتبط با سقط بود. جهت ورود به مطالعه و انجام خون‌گیری، از تمامی افراد مورد مطالعه رضایت‌نامه آگاهانه آخذ گردید.

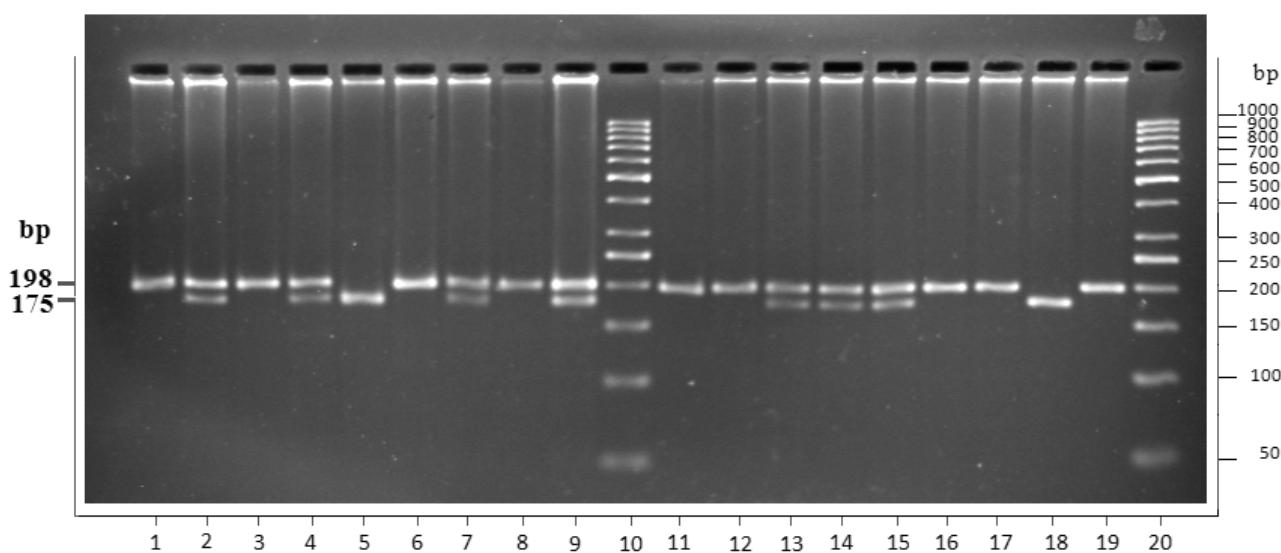
بررسی ژنتیپ‌ها

DNA ژنومی از نمونه خون‌هایی که در لوله‌های حاوی ماده ضدانعقاد EDTA آخذ شده بود به روش استاندارد رسوب نمکی PCR-RFLP استخراج گردید. تعیین ژنتیپ با استفاده از تکنیک PCR و سپس واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) برای هر جفت پرایمر، بهینه‌سازی شد (جدول ۱). مواد لازم برای واکنش PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر، شامل ۴۰ نانوگرم DNA ژنومی، ۲ میلی‌مول ۰C72 ۲۵/۰ میلی‌مول dNTPs ۰C61 ۴/۰ میلی‌مول از هر جفت پرایمر و ۱ واحد آنزیم Taq پلیمراز بود. مراحل انجام روش PCR به ترتیب ذیل بر روی نمونه‌های DNA از دو گروه بیمار و شاهد انجام شد. پس از دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، قطعات DNA برای پلی مورفیسم C677T در ۳۵ سیکل (۰C95 به مدت ۱ دقیقه، ۰C61 به مدت ۱ دقیقه، ۰C72 به مدت ۱ دقیقه) و برای پلی مورفیسم A1298C در ۳۰ سیکل (۰C95 به مدت ۱ دقیقه، ۰C63 به مدت ۱ دقیقه، ۰C63 به مدت ۱ دقیقه، ۰C95 به مدت ۱ دقیقه، ۰C61 به مدت ۱ دقیقه، ۰C72 به مدت ۱ دقیقه) انجام شد.

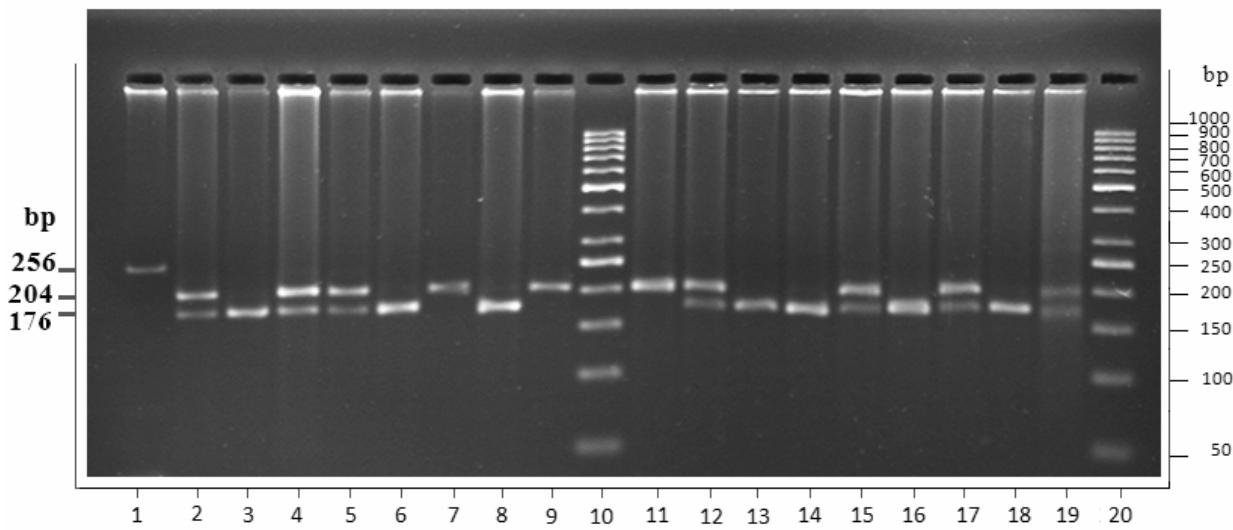
جدول ۱- توالی پرایمرها، آنزیم‌های محدود‌الاثر و محصولات PCR و RFLP دو پلی مورفیسم زن MTHFR

RFLP محصول (bp)	آنژیم محدود‌الاثر	PCR محصول (bp)	توالی پرایمرها	پلی مورفیسم
(176, 30, 28, 22)* (204, 30, 22)**	Mbo II	256	F: ۵'-CTTCTACCTGAAGAGCAAGTC -3' R: ۵'-CATGTCCACAGCATGGAG -3'	MTHFR A1298C
(198)* (175, 23)**	Hinf I	198	F: ۵'-TGAAGGAGAACGGTCTGCCGGGA -3' R: ۵'-AGGACGGTGCGGTGAGAGTG -3'	MTHFR C677T

* الل نرمال ** الل موتانت



شکل ۱- نتایج الکتروفورز محصولات PCR پس از RFLP برای پلی مورفیسم C677T. ۱: نمونه محصولات قبل از PCR (رنگار). ۲، ۴، ۷، ۹، ۱۱، ۱۲، ۱۶، ۱۷، ۱۹: هموژیگوت (کنترل مشتبث). ۳: فرمال. ۵، ۸، ۱۰، ۱۳، ۱۴، ۱۵، ۲۰: هتروژیگوت. (.50bp) DNA Ladder: ۱۰، ۲۰.



شکل ۲- نتایج الکتروفورز محصولات PCR پس از RFLP برای پلی مورفیسم A1298C. ۱: نمونه محصولات قبل از PCR (رنگار). ۲، ۴، ۵، ۶، ۸، ۱۲، ۱۴، ۱۵، ۱۷، ۱۹: هموژیگوت. ۳، ۷، ۹، ۱۱، ۲۰: هتروژیگوت. (.50bp) DNA Ladder

از نرم افزار SPSS Ver:16 و آزمون χ^2 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. آزمون همبستگی اسپیرمن نیز برای بررسی امکان وجود ارتباط متقابل بین این دو پلی مورفیسم انجام شد. نتایج برای این دو آزمون با $p\text{-value} < 0.05$ معنی دار تلقی گردیدند.

آنالیز آماری

نتایج به دست آمده از تعیین ژنوتیپ هر پلی مورفیسم برای سه حالت نرمال، هتروژیگوت و هموژیگوت در دو گروه بیمار و شاهد با استفاده



یافته‌ها

A1298C در میان زنان دچار سقط مکرر و زنان گروه شاهد، به ترتیب $\frac{43}{3}$ و 50 درصد بود. درصد زنان دچار سقط مکرر و A1298C درصد زنان گروه کنترل، برای پلیمورفیسم هتروزیگوت و 20 درصد زنان دچار سقط مکرر و 30 درصد زنان گروه شاهد، برای این پلیمورفیسم هموزیگوت بودند. فراوانی الـ موتانت C در زنان دچار سقط مکرر $41/7$ درصد و در زنان گروه شاهد 40 درصد بود، اما این اختلاف به لحاظ آماری معنادار نبود(جدول ۳). 3 نفر از 30 زن دچار سقط مکرر (10%) و 1 نفر از 10 زن گروه شاهد (10%) فاقد پلیمورفیسم در زن MTHFR بودند. تعداد افرادی که دو پلیمورفیسم MTHFR را به طور همزمان داشتند در گروه بیماران، 9 نفر (30%) و در گروه شاهد، 1 نفر (10%) بود.

با توجه به نتایج مشاهده شده در الکتروفورز محصول RFLP ژنتیپ هر فرد برای هر پلیمورفیسم مشخص شد. بین دو پلیمورفیسم A1298C و C677T ارتباط متقابل وجود داشت ($r=0.508$, $p\text{-value}<0.005$). فراوانی الـ موتانت T در زنان دچار سقط، بیشتر از زنان گروه شاهد بود ($28/4$ درصد در میان زنان دچار سقط مکرر و 25 درصد در زنان گروه شاهد، $p\text{-value}<0.05$). 17 نفر از زنان گروه شاهد (50%) برای پلیمورفیسم C677T هetrozیگوت بودند، اما هیچ هموزیگوتی در بین زنان دچار سقط مکرر و زنان گروه شاهد مشاهده نشد (جدول ۲). فراوانی پلیمورفیسم

جدول ۲- مقایسه ژنوتیپ‌ها و آلل‌های پلیمورفیسم C677T ژن MTHFR در زنان دچار سقط مکرر و زنان گروه شاهد

ژنوتیپ	نمونه (n=۳۰)	شاهد (n=۱۰)
TT	۰ (٪ ۰)	۰ (٪ ۰)
CT	۱۷ (٪ ۵۶/۶)	۵ (٪ ۵۰)
CC	۱۳ (٪ ۴۳/۳)	۵ (٪ ۵۰)

در مقایسه بین دو گروه، در هیچ یک از ژنوتیپ‌ها تفاوت معنی داری مشاهده نشد ($p>0.05$).

جدول ۳- مقایسه ژنوتیپ‌ها و آلل‌های پلیمورفیسم A1298C ژن MTHFR در زنان دچار سقط مکرر و زنان گروه شاهد

ژنوتیپ	نمونه (n=۳۰)	شاهد (n=۱۰)
CC	۶ (٪ ۲۰)	۳ (٪ ۳۰)
AC	۱۳ (٪ ۴۳/۳)	۲ (٪ ۲۰)
AA	۱۱ (٪ ۳۶/۷)	۵ (٪ ۵۰)

در مقایسه بین دو گروه، در هیچ یک از ژنوتیپ‌ها تفاوت معنی داری مشاهده نشد ($p>0.05$).

سقط مکرر نشان داده است. برخی مطالعات نشان داده که کمبود فولات، هایپرهموسیستئمیا و هموزیگوتی برای پلیمورفیسم‌های ژن MTHFR عامل خطر برای سقط خودبه‌خودی و تخریب جفت هستند. در حالی که مطالعات دیگر ارتباط میان این پلیمورفیسم‌ها و سقط مکرر را نفی کرده‌اند [۱۳,۱۴,۱۵]. Wang و همکاران در چین،

بحث

بررسی‌هایی که در جمعیت‌های مختلف صورت گرفته، نتایج متفاوتی را برای ارتباط میان پلیمورفیسم‌های ژن MTHFR با سندروم

سقط مکرر وجود ندارد [۱۹]. در مطالعه حاضر نیز با وجود این که شیوع پلی‌مورفیسم‌های C677T و A1298C در زنان دچار سقط مکرر، بیشتر از گروه کنترل است، این اختلاف به لحاظ آماری معنادار نیست. نتایج متفاوتی که در این مطالعات به دست آمده می‌تواند به علت تعریف متفاوت از سقط مکرر، تفاوت در معیارهای انتخاب نمونه و توزیع جغرافیایی باشد. بایستی این موضوع را در نظر گرفت که سطح هموسیستین می‌تواند متاثر از پلی‌مورفیسم MTHFR در زن C677T و نیز کوفاکتورهای مسیر هموسیستین-متیونین همانند فولیک اسید، ویتامین B12 و ویتامین B6 باشد [۷]. کمبود این عوامل نیز می‌تواند باعث هایپرهموسیستینیمی شود، اما افراد دارای پلی‌مورفیسم C677T که مکمل فولیک اسید یا سایر ویتامین‌های B را دریافت می‌کنند، می‌توانند از این خطر دور بمانند [۲۰، ۱۰].

نتیجه‌گیری

در این مطالعه با وجود این که شیوع پلی‌مورفیسم‌های C677T و A1298C در زنان دچار سقط مکرر، بیشتر از گروه کنترل است، این اختلاف به لحاظ آماری معنادار نیست. نتایج به دست آمده در این پژوهش نشان داد که هیچ کدام از دو پلی‌مورفیسم زن MTHFR نمی‌توانند علت سقط مکرر در زنان مورد بررسی محسوب گردند.

شیوع پلی‌مورفیسم‌های MTHFR را در میان زنان بررسی کردند و در سال ۲۰۰۴ گزارش کردند که اختلاف معناداری برای پلی‌مورفیسم C677T بین زنان دچار سقط مکرر خودبه‌خودی با علت نامشخص و زنان گروه شاهد وجود دارد و نیز با وجود این که اختلاف معناداری برای پلی‌مورفیسم A1298C بین دو گروه وجود ندارد، اما فراوانی ژنوتیپ AA/677CC ۱۲۹۸ در میان زنان دچار سقط مکرر، به طور معناداری پایین‌تر از گروه کنترل است [۱۵]. Mtiraoui و همکاران نیز بر مبنای آنالیز ژنتیکی دو گروه از زنان تونسی برای پلی‌مورفیسم‌های MTHFR در سال ۲۰۰۶ گزارش دادند که فراوانی ژنوتیپ‌های CC ۱۲۹۸ و AA ۱۲۹۸ در زنان دچار سقط مکرر، به طور معناداری بیشتر از گروه کنترل است [۱۶]. مشاهدات در سایر نقاط جهان، کاملاً متفاوت از این یافته‌ها است. Carp و همکاران، ارتباط میان فاکتورهای ترومبوفیلی را با سقط مکرر مورد بررسی قرار دادند و در سال ۲۰۰۲ گزارش کردند با وجود این که شیوع پلی‌مورفیسم C677T در زنان دچار سقط مکرر، بیشتر از گروه کنترل است، اما این اختلاف به لحاظ آماری معنادار نیست [۱۷]. Morales-Machin و همکاران در ونزوئلا نیز پس از بررسی ارتباط میان پلی‌مورفیسم C677T با سقط مکرر، در سال ۲۰۰۹ گزارش می‌کنند که اختلاف معناداری را در فراوانی الی میان زنان دچار سقط مکرر و گروه کنترل مشاهده نکردند [۱۸]. Unfried و همکاران در استرالیا در یک مطالعه گستره‌های پس از بررسی ۱۴۵ زن با سابقه سقط مکرر و ۱۰۱ زن بدون سابقه سقط و دارای حداقل دو باروری موفق، در سال ۲۰۰۳ گزارش دادند که هیچ رابطه معناداری بین پلی‌مورفیسم‌های C677T و A1298C با

مراجع

- 1- Aruna M and Reddy BM. Recurrent spontaneous abortions: An overview of the Genetic and Non-Genetic backgrounds. *Int. J. Hum. Genet.* 2006; 6: 109-117.
- 2- James AH. Venous thromboembolism in pregnancy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009; 29(3): 326-31.
- 3- Kupferminc MJ. Thrombophilia and pregnancy. *Reprod Biol Endocrinol.* 2003; 1: 1-23.
- 4- Kurzawińska G, Seremak-Mrozikiewicz A, Drews K, Barlik M, Mrozikiewicz PM. Genetic conditioned changes in activity of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and recurrent miscarriages. *Ginekol Pol.* 2009; 80 (10): 762-7.
- 5- Spiroski I, Kedev S, Antov S, Arsov T, Krstevska M, Dzhekova-Stojkova S, Bosilkova G, Kostovska S, Trajkov D, Petlichkovski A, Strezova A, Efinska-Mladenovska O, Spiroski M. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR-677 and MTHFR-1298) genotypes and haplotypes and plasma homocysteine levels in patients with occlusive artery disease and deep venous thrombosis. *Acta Biochim Pol.* 2008; 55(3): 587-94 .
- 6- Oliveira KC, Bianco B, Verreschi IT, Guedes AD, Galera BB, Galera MF, Barbosa CP, Lipay MV. Prevalence of the polymorphism MTHFR A1298C and not MTHFR C677T is related to chromosomal aneuploidy in Brazilian Turner Syndrome patients. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2008; 52(8): 1374-81.
- 8- van der Put NM, van der Molen EF, Kluijtmans LA, Heil SG, Trijbels JM, Eskes TK, Van Oppenraaij-Emmerzaal D, Banerjee R, Blom HJ. Sequence analysis of the coding region of human methionine synthase: relevance to hyperhomocysteinaemia in neural-tube defects and vascular disease. *QJM.* 1997; 90(8): 511-7.
- 8- Goyette P, Pai A, Milos R, Frosst P, Tran P, Chen Z, Chan M, Rozen R. Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Mamm Genome.* 1998; 9(8): 652-6.
- 9- Bailey LB, Gregory JF. Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and other enzymes: metabolic significance, risks and impact on folate requirement. *J Nutr.* 1999; 129(5): 919-22.
- 10- Nishio K, Goto Y, Kondo T, Ito S, Ishida Y, Kawai S, Naito M, Wakai K, Hamajima N. Serum folate and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism adjusted for folate intake. *J Epidemiol.* 2008; 18(3): 125-31.
- 11- Robien K, Ulrich CM. 5, 10-Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and leukemia risk: a HuGE minireview. *Am J Epidemiol.* 2003; 157(7): 571-82.
- 12- Etienne MC, Ilc K, Formento JL, Laurent-Puig P, Formento P, Cheradame S, Fischel JL, Milano G. Thymidylate synthase and methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms: relationships with 5-fluorouracil sensitivity. *Br J Cancer.* 2004; 90(2): 526-34.
- 13- Bakker RC, Brandjes DP. Hyperhomocysteinaemia and associated disease. *Pharm World Sci.* 1997; 19(3): 126-32.
- 14- Freitas AI, Mendonça I, Guerra G, Brión M, Reis RP, Carracedo A, Brehm A. Methylenetetrahydrofolate reductase gene, homocysteine and coronary artery disease: the A1298C polymorphism does matter. Inferences from a case study (Madeira, Portugal). *Thromb Res.* 2008; 122(5): 648-56.
- 15- Wang XP, Lin QD, Ma ZW, Zhao AM. C677T and A1298C mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in unexplained recurrent spontaneous

- abortion. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*. 2004; 39(4): 238-41.
- 16- Mtiraoui N, Zammiti W, Ghazouani L, Braham NJ, Saidi S, Finan RR, Almawi WY, Mahjoub T. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphism and changes in homocysteine concentrations in women with idiopathic recurrent pregnancy losses. *Reproduction*. 2006; 131(2): 395-401.
- 17- Carp H, Salomon O, Seidman D, Dardik R, Rosenberg N, Inbal A. Prevalence of genetic markers for thrombophilia in recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod*. 2002; 17(6): 1633-7.
- 18- Morales-Machin A, Borjas-Fajardo L, Quintero JM, Zabala W, Alvarez F, Delgado W, Hernández ML, Solis-Añez E, Sánchez Y, Butrón Z. C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene as risk factor in women with recurrent abortion. *Invest Clin*. 2009; 50(3): 327-33.
- 19- Unfried G, Hohlagschwandtner M, Heinze G, Huber JC, Nagele F, Tempfer C. Combined thrombophilic polymorphisms in women with idiopathic recurrent miscarriage. *Fertil Steril*. 2003; 79(5): 1141-8.
- 20- Esfahani ST, Cogger EA, Caudill MA. Heterogeneity in the prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms in women of different ethnic groups. *J Am Diet Assoc*. 2003; 103(2): 200-7.