

● مقاله تحقیقی کد مقاله: ۰۳۳



بررسی ارتباط دو پلی مورفیسم C677T و A1298C در ژن MTHFR با سندرم سقط مکرر

چکیده

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

روش کار: ۳۰ زن با سابقه سقط مکرر خودبه‌خودی با علت نامشخص به عنوان گروه بیماران و ۱۰ زن بدون سابقه سقط مکرر و دارای حداقل دو باروری موفق، به عنوان گروه شاهد از میان مراجعه‌کنندگان به بیمارستان فوق تخصصی بقیه‌الله (عج) و مرکز ناباروری ابن سینا انتخاب شدند. برای بررسی دو پلی مورفیسم ژن MTHFR، از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و هضم آنزیمی محصولات PCR با آنزیم‌های اندونوکلاز محدودالایر (PCR-RFLP) استفاده شد. نتایج به دست آمده از تعیین ژنوتیپ هر پلی مورفیسم با نرم‌افزار SPSS، دو آزمون ۲٪ و همبستگی اسپیرمن تجزیه و تحلیل شد.

یافته‌ها: بین دو پلی مورفیسم C677T و A1298C ارتباط متقابل وجود دارد (17). $r=0/508$, $p\text{-value}<0/005$ نفر از زنان دچار سقط مکرر (۵۶/۶٪) و ۵ نفر از زنان گروه شاهد (۵۰٪) برای پلی مورفیسم C677T هتروزیگوت بودند. فراوانی الل موتانت T در زنان دچار سقط، بیشتر از زنان گروه شاهد بود (۲۸/۴٪ در میان زنان دچار سقط مکرر و ۲۵٪ در زنان گروه شاهد، $p\text{-value}<0/05$). فراوانی پلی مورفیسم A1298C در میان زنان دچار سقط مکرر و زنان گروه شاهد به ترتیب ۶۳/۳٪ و ۵۰٪ بود. ۴۳/۳٪ زنان دچار سقط مکرر و ۲۰٪ زنان گروه کنترل، برای پلی مورفیسم A1298C هتروزیگوت و ۲۰٪ زنان دچار سقط مکرر و ۳۰٪ زنان گروه شاهد، برای این پلی مورفیسم هموزیگوت بودند.

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

واژگان کلیدی: سندرم سقط مکرر خودبه‌خودی، ترومبوفیلی، پلی مورفیسم، 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 زیست‌شناسی ژنتیک

۳- استادیار گروه ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات

* نشانی نویسنده مسئول:

تهران، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات

تلفن: ۰۹۱۹۳۹۴۰۱۸۴

نشانی الکترونیکی:

keyvan_1878@yahoo.com

تاریخ پذیرش مقاله: ۸۹/۷/۷

تاریخ اصلاح نهایی: ۸۹/۷/۱۸

تاریخ دریافت مقاله: ۸۹/۴/۱۱

مقدمه

شایع‌ترین عارضه در سه ماهه اول و دوم حاملگی، سقط جنین است. مفهوم سقط جنین به ختم بارداری پیش از هفته بیستم اطلاق می‌شود. در این میان، زانی که بیش از دو بار سقط جنین پی‌درپی را تجربه می‌کند 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 (لخته 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 این ارتباط شود برای جنین زیان‌آور است [۲]. به نظر می‌رسد که ایجاد لخته نابجا 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 نوکلئوتیدی منفرد در ژن‌های کدکننده آنزیم‌های تنظیم‌کننده مسیرهای مهم متابولیکی همانند متیلن تتراهیدروفولات ردوکتاز (MTHFR) به عنوان یکی از فاکتورهای مطرح در ایجاد ترومبوفیلی در نظر گرفته می‌شوند. آنزیم MTHFR نقش محوری در متابولیسم فولات، متیونین و هموسیستئین دارد [۴]. هموسیستئین پلاسما یک آمینواسید بالقوه سمی است [۵]. افزایش هموسیستئین به علت اثرات پاتولوژیک منفی که بر روی آندوتلیوم عروق، آتروژنسیس و فعالیت فاکتورهای انعقادی V و VIII می‌گذارد، منجر به افزایش سطح ترومبین، تجمع پلاکت‌ها و در نتیجه ترومبوز وریدی می‌شود [۴]. بنابراین، با تبدیل این اسید آمینه به متیونین در بدن، اثرات سمی آن خنثی می‌شود. آنزیم MTHFR موجب تبدیل برگشت‌ناپذیر ۵ و ۱۰ متیلن تتراهیدروفولات به ۵ متیل تتراهیدروفولات می‌گردد که شکل غالب فولات موجود در گردش خون است. سپس هموسیستئین با اخذ یک گروه متیل از ۵- متیل تتراهیدروفولات، به متیونین تبدیل می‌شود. این واکنش توسط متیونین سنتاز کاتالیز می‌شود [۵، ۶، ۷]. کاهش در فعالیت آنزیم MTHFR منجر به کاهش در سوپسترا برای متیونین سنتاز می‌شود که به دنبال آن باعث توقف تشکیل هموسیستئین و در نتیجه افزایش سطح هموسیستئین می‌شود [۷]. ژن کدکننده آنزیم کاتالیک MTHFR در انتهای بازوی کوتاه کروموزوم یک (۳۶.۳۱ p) قرار داشته و دارای ۱۱ اگزون است [۸]. دو پلی‌مورفیسم C677T و A1298C 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

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 هموسیستئین 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 هموسیستئین در خون هستند؛ ولی اگر فولات کافی دریافت نکنند، میزان هموسیستئین در آن‌ها افزایش می‌یابد [۹، ۱۰، ۱۱]. تبدیل آدنین به سیتوزین در نوکلئوتید ۱۲۹۸ در اگزون شماره ۷ در ژن (MTHFR A1298C) 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 ژنوتیپ CC، عملکردی معادل ۶۰ درصد عملکرد ژنوتیپ AA را داراست. افراد هموزیگوت برای ال A1298C سطوح بالای هموسیستئین سرمی را نشان نمی‌دهند. اما افراد دارای هتروزیگوتی ترکیبی پلی‌مورفیسم A1298C و C677T دارای مشخصات بیوشیمیایی مشابه هموزیگوت‌های C677T، مانند سطوح افزایش یافته هموسیستئین و سطوح کاهش یافته فولات هستند [۱۱، ۱۲]. با توجه به اهمیت و نقش MTHFR در هموستاز و اثرات پلی‌مورفیسم‌های آن در افزایش سطح هموسیستئین و ابتلا 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 مراجعه‌کنندگان به بیمارستان فوق تخصصی بقیه الله (عج) و مرکز ناباروری ابن سینا در ماه‌های اردیبهشت تا اسفند سال ۱۳۸۸ با توجه به پرونده پزشکی بیماران و نظر متخصص زنان،



مدت ۱ دقیقه، oC72 به مدت ۲ دقیقه) تکثیر یافتند و به دنبال آن، مرحله طویل سازی نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد 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 محصولات PCR برای دو پلی مورفیسم C677T و A1298C به ترتیب توسط آنزیم های محدودالانثر 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 C677T، 198 bp طول دارد. ال نرمل برای آنزیم Hinf I هیچ توالی قابل شناسایی ندارد، اما در ال جهش یافته، به علت جهش رخ داده، یک جایگاه شناسایی برای آنزیم ایجاد می شود. حاصل این تغییر، ایجاد دو قطعه 175 bp و 23 bp پس از هضم آنزیمی است. باند 23 bp به علت کوچکی اندازه در ژل آگاروز ۳ درصد مشاهده نمی شود، بنابراین، ملاک بررسی برای تعیین ژنوتیپ C677T، باند 175 bp است (شکل ۱). محصول PCR برای پلی مورفیسم A1298C نیز 256 bp طول دارد که پس از هضم با آنزیم Mbo II در ال نرمل چهار قطعه و در ال جهش یافته ۳ قطعه حاصل می شود. قطعات 30، 28 و 22 bp، به علت کوچکی اندازه، در ژل مشاهده نمی شوند. بنابراین، ملاک بررسی برای تشخیص ال C، مشاهده قطعه 204 bp و برای ال A، مشاهده قطعه 176 bp در ژل آگاروز ۳ درصد است (شکل ۲).

انتخاب شدند. معیارهای خروج از مطالعه شامل سایر علل مطرح در سقط از جمله وجود ناهنجاری های کروموزومی در جنین، مشکلات آناتومیک در رحم، اختلالات هورمونی و عفونت های مرتبط با سقط بود. جهت ورود به مطالعه و انجام خون گیری، از تمامی افراد مورد مطالعه رضایت نامه آگاهانه اخذ گردید.

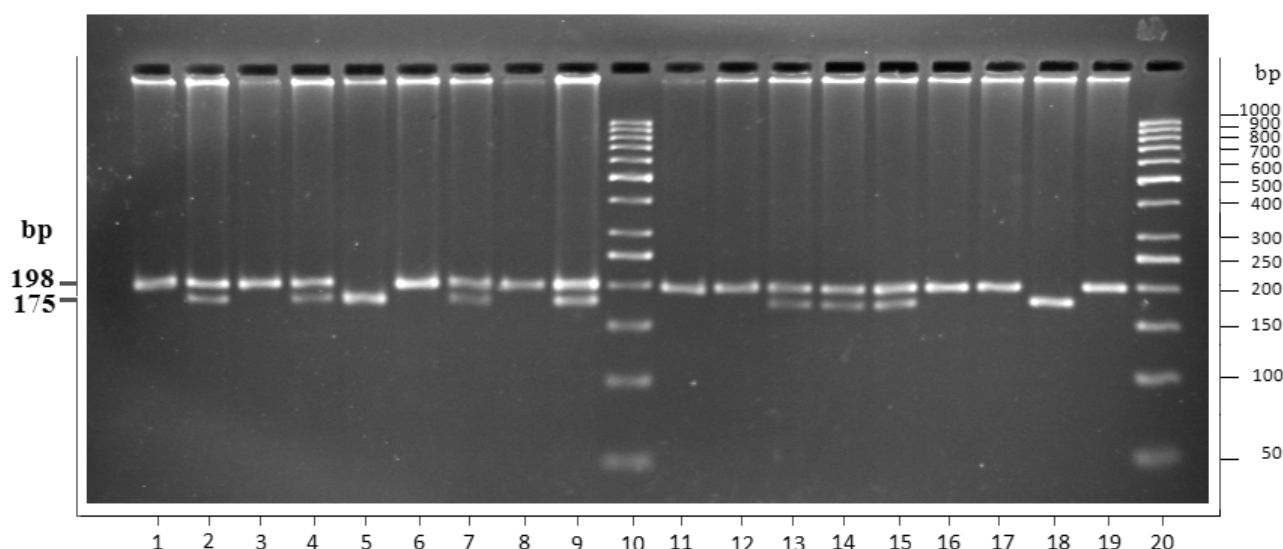
بررسی ژنوتیپ ها

DNA ژنومی از نمونه خون هایی که در لوله های حاوی ماده ضدانعقاد EDTA اخذ شده بود به روش استاندارد رسوب نمکی استخراج گردید. تعیین ژنوتیپ با استفاده از تکنیک PCR-RFLP صورت گرفت. پرایمرهای مناسب برای هر پلی مورفیسم طراحی شد و سپس واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) برای هر جفت پرایمر، بهینه سازی شد (جدول ۱). مواد لازم برای واکنش PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر، شامل ۴۰ نانوگرم DNA ژنومی، ۲ میلی مول MgCl₂، 25/0 میلی مول dNTPs، 4/0 میلی مول از هر جفت پرایمر و ۱ واحد آنزیم Taq پلیمرز بود. مراحل انجام روش PCR به ترتیب ذیل بر روی نمونه های DNA از دو گروه بیمار و شاهد انجام شد. پس از دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، قطعات DNA برای پلی مورفیسم C677T در ۳۵ سیکل (oC95 به مدت ۱ دقیقه، oC61 به مدت ۱ دقیقه، oC72 به مدت ۱ دقیقه) و برای پلی مورفیسم MTHFR A1298C در ۳۰ سیکل (oC95 به مدت ۱ دقیقه، oC63 به

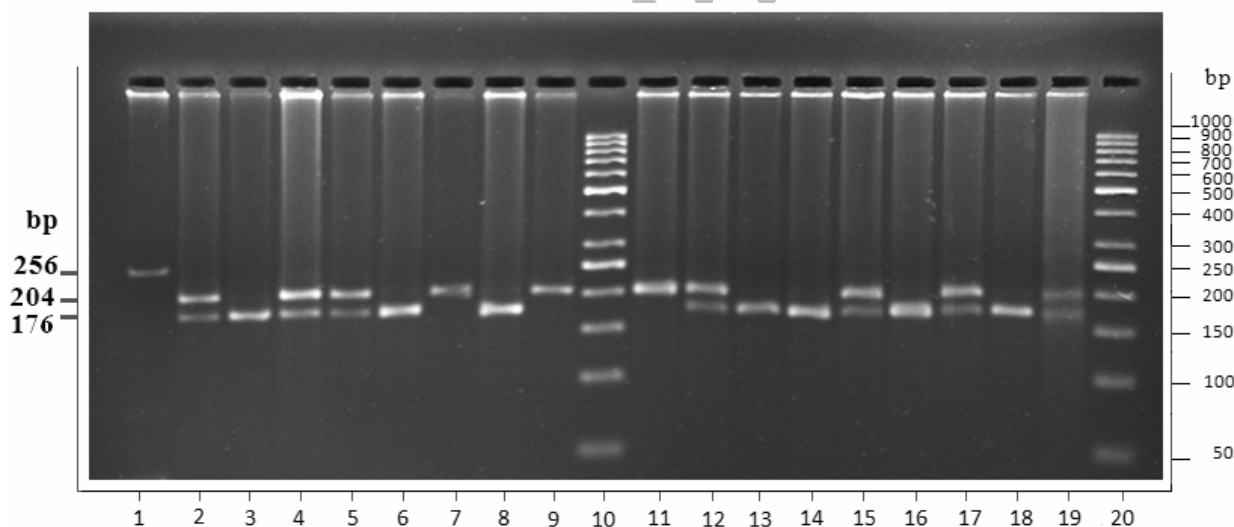
جدول ۱- توالی پرایمرها، آنزیم های محدودالانثر و محصولات PCR و RFLP دو پلی مورفیسم ژن MTHFR

پلی مورفیسم	توالی پرایمرها	محصول PCR (bp)	آنزیم محدودالانثر	محصول RFLP (bp)
MTHFR A1298C	F: 5'-CTTCTACCTGAAGAGCAAGTC-3' R: 5'-CATGTCCACAGCATGGAG-3'	256	Mbo II	(176, 30, 28, 22)* (204, 30, 22)**
MTHFR C677T	F: 5'-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3' R: 5'-AGGACGGTGCGGTGAGAGTG-3'	198	Hinf I	(198)* (175, 23)**

* ال نرمل ** ال موتانت



شکل ۱- نتایج الکتروفورز محصولات PCR پس از RFLP برای پلی مورفیسم C677T. ۱: نمونه محصولات PCR قبل از RFLP. ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲، ۱۴، ۱۶، ۱۸، ۲۰: هموزیگوت (کنترل مثبت). ۳، ۵، ۷، ۹، ۱۱، ۱۳، ۱۵، ۱۷، ۱۹: هتروزیگوت. ۱۰، ۲۰: DNA Ladder (50bp).



شکل ۲- نتایج الکتروفورز محصولات PCR پس از RFLP برای پلی مورفیسم A1298C. ۱: نمونه محصولات PCR قبل از RFLP. ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲، ۱۴، ۱۶، ۱۸، ۲۰: هموزیگوت. ۳، ۵، ۷، ۹، ۱۱، ۱۳، ۱۵، ۱۷، ۱۹: هتروزیگوت. ۱۰، ۲۰: DNA Ladder (50bp).

آنالیز آماری

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

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.

یافته‌ها

A1298C در میان زنان دچار سقط مکرر و زنان گروه شاهد، به ترتیب ۶۳/۳ و ۵۰ درصد بود. ۴۳/۳ درصد زنان دچار سقط مکرر و ۲۰ درصد زنان گروه کنترل، برای پلی مورفیسم A1298C هتروزیگوت و ۲۰ درصد زنان دچار سقط مکرر و ۳۰ درصد زنان گروه شاهد، برای این پلی مورفیسم هموزیگوت بودند. فراوانی الل موتانت C در زنان دچار سقط مکرر ۴۱/۷ درصد و در زنان گروه شاهد ۴۰ درصد بود، اما این اختلاف به لحاظ آماری معنادار نبود (جدول ۳). ۳ نفر از ۳۰ زن دچار سقط مکرر (۱۰٪) و ۱ نفر از ۱۰ زن گروه شاهد (۱۰٪) فاقد پلی مورفیسم در ژن MTHFR بودند. تعداد افرادی که دو پلی مورفیسم MTHFR را به طور همزمان داشتند در گروه بیماران، ۹ نفر (۳۰٪) و در گروه شاهد، ۱ نفر (۱۰٪) بود.

با توجه به نتایج مشاهده شده در الکتروفورز محصول RFLP ژنوتیپ هر فرد برای هر پلی مورفیسم مشخص شد. بین دو پلی مورفیسم C677T و A1298C ارتباط متقابل وجود داشت ($r=0/508$, $p\text{-value}<0.005$) فراوانی الل موتانت T در زنان دچار سقط، بیشتر از زنان گروه شاهد بود (۲۸/۴ درصد در میان زنان دچار سقط مکرر و ۲۵ درصد در زنان گروه شاهد، $p\text{-value}<0.05$). ۱۷ نفر از زنان دچار سقط مکرر (۵۶/۶٪) و ۵ نفر از زنان گروه شاهد (۵۰٪) برای پلی مورفیسم C677T هتروزیگوت بودند، اما هیچ هموزیگوتی در بین زنان دچار سقط مکرر و زنان گروه شاهد مشاهده نشد (جدول ۲). فراوانی پلی مورفیسم

جدول ۲- مقایسه ژنوتیپ‌ها و آلل‌های پلی مورفیسم 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 پلی مورفیسم 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 ($p>0.05$)

بحث

سقط مکرر نشان داده است. برخی مطالعات نشان داده که کمبود فولات، هایپرهوموسیستئینمیا و هموزیگوتی برای پلی مورفیسم‌های ژن MTHFR عامل خطر برای سقط خودبه‌خودی و تخریب جفت هستند. درحالی که مطالعات دیگر ارتباط میان این پلی مورفیسم‌ها و سقط مکرر را نفی کرده‌اند [۱۴، ۱۳، ۵]. Wang و همکاران در چین،

بررسی‌هایی که در جمعیت‌های مختلف صورت گرفته، نتایج متفاوتی را برای ارتباط میان پلی مورفیسم‌های ژن MTHFR با سندرم

سقط مکرر وجود ندارد [۱۹]. در مطالعه حاضر نیز با وجود این که شیوع پلی مورفیسم های 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 می تواند 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 هموسیستئین می تواند متأثر از پلی مورفیسم C677T در ژن MTHFR و نیز کوفاکتورهای مسیر هموسیستئین - متیونین همانند فولیک اسید، ویتامین B12 و ویتامین B6 باشد [۷]. کمبود این عوامل نیز می تواند باعث هایپرهموسیستئینمیا شود، اما افراد دارای پلی مورفیسم C677T که مکمل فولیک اسید یا سایر ویتامین های B را دریافت می کنند، می توانند از این خطر دور بمانند [۲۰، ۱۰].

نتیجه گیری

در این مطالعه با وجود این که شیوع پلی مورفیسم های 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 پلی مورفیسم ژن MTHFR نمی توانند علت سقط مکرر در زنان مورد بررسی محسوب گردند.

شیوع پلی مورفیسم های MTHFR را در میان زنان بررسی کردند و در سال ۲۰۰۴ گزارش کردند که اختلاف معناداری برای پلی مورفیسم C677T بین زنان دچار سقط مکرر خودبه خودی با علت نامشخص و زنان گروه شاهد وجود دارد و نیز با وجود این که اختلاف معناداری برای پلی مورفیسم A1298C بین دو گروه وجود ندارد، اما فراوانی ژنوتیپ AA/677CC ۱۲۹۸ در میان زنان دچار سقط مکرر، به طور معناداری پایین تر از گروه کنترل است [۱۵]. Mtiraoui و همکاران نیز بر مبنای آنالیز ژنتیکی دو گروه از زنان تونس برای پلی مورفیسم های MTHFR در سال ۲۰۰۶ گزارش دادند که فراوانی ژنوتیپ های AA ۱۲۹۸ و CC ۶۷۷ در زنان دچار سقط مکرر، به طور معناداری بیشتر از گروه کنترل است [۱۶]. مشاهدات در سایر نقاط جهان، کاملاً متفاوت از این یافته ها 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 پلی مورفیسم 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 پلی مورفیسم C677T با سقط مکرر، در سال ۲۰۰۹ گزارش می کنند که اختلاف معناداری را در فراوانی اللی میان زنان دچار سقط مکرر و گروه کنترل مشاهده نکردند [۱۸]. Unfried و همکاران در استرالیا در یک مطالعه گسترده 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 پلی مورفیسم های 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. *Ginekolog 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.

Archive of SID

