Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 16:23 +0330 on Saturday January 20th 2018

مقاله پژوهشی

افزایش فراوانی همزمان الل‌های جهش یافته ژن متیلن تترا هیدروفولات ردوکتاز در بیماران انسداد عروق مغزی در یک جمعیت از استان آذربایجان شرقی

دکتر سید محمود طباطبائی*[۱]، دکتر مسعود نیکانفر[۲]، نسرین بارگاهی[۳]، امیر منفردان[۴]

تاریخ دریافت: 1391/02/17 تاریخ پذیرش: 1391/04/14

چکیده

پیش زمینه و هدف: سکته‌های مغزی به همراه انسداد عروق مغزی، جزو شایع‌ترین و مهم‌ترین عوامل مرگ و میر در جوامع انسانی به شمار می‌رود. بررسی فاکتورهای ژنتیکی که به عنوان فاکتورهای پیش آگهی کننده در این گروه از بیماری‌ها مطرح هستند، نقش حیاتی در کنترل و کاهش خسارات جبران ناپذیر این مشکلات مغزی دارند. جهش ژن متیلن‌تتراهیدروفولات‌ردوکتاز (MTHFR) با میزان فراوانی بیشتر از مورد انتظار و تأثیرگذاری آن بر افزایش ریسک استرس‌های اکسیداتیو، یکی از فاکتورهای ژنتیکی است که هدف این بررسی در یک جمعیت از استان آذربایجان شرقی قرار می‌گیرد.

مواد و روش کار: ۵۰ فرد سالم بدون سابقه بیماری انسداد عروق مغزی و ۵۰ فرد با تشخیص قطعی این بیماری، بر اساس شاخص‌های بالینی مشخص، به شکل تصادفی انتخاب و وارد مطالعه گردیدند. پس از استخراج DNA از خون محیطی، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، برای بررسی دو نوع جهش شایع این ژن بکار گرفته شد.

یافته‌ها: با مقایسه انواع ژنوتیپ‌های درگیر در افراد گروه‌های کنترل و بیمار، حضور هموزیگوت الل T در تغییر C677T در گروه بیمار، بیشتر از گروه کنترل بود، ولی تفاوت معنی‌داری بین این دو گروه مشاهده نشد ($P>0.05$). همچنین هتروزیگوت سیس و ترانس دو جهش C677T و A1298C در افراد با انسداد عروق مغزی به طور معنی‌داری بیشتر از افراد گروه کنترل بود ($P<0.05$).

بحث و نتیجه‌گیری: از آنجایی‌که شیوع این چند شکلی ژنتیکی در جمعیت‌های گوناگون دنیا متفاوت است و ریسک فاکتور بودن این تغییرات برای بیماری انسداد عروق مغزی به اثبات رسیده است، لازم است تا شیوع این چند شکلی در یک جمعیت از استان آذربایجان شرقی بررسی گردد.

کلید واژه‌ها: چند شکلی ژنتیکی، ژن متیلن تترا هیدروفولات ردوکتاز، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، بیماری انسداد عروقی مغز

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و سوم، شماره سوم، ص ۲۶۷-۲۵۹، مرداد و شهریور ۱۳۹۱

آدرس مکاتبه: تبریز، منظریه، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تلفن: ۰۹۱۴۱۱۶۵۳۱۹

Email: smt1351@yahoo.com

مقدمه

انسداد عروق مغزی وسیع یا خاموش، سالیانه چندین نفر را به کام مرگ می‌کشاند و یا با آسیب‌های شدید جسمی نظیر فلج روبرو می‌کند (۵-۱). بررسی فاکتورهای ژنتیکی که به عنوان فاکتورهای پیش آگهی کننده مطرح هستند، نقشی حیاتی در کنترل و کاهش خسارات جبران ناپذیر انسداد عروق ایسکمیک مغزی خواهند داشت. سطح بالای سرمی هموسیستئین یکی از فاکتورهایی است که در چند سال اخیر به عنوان ریسک فاکتور مستقل در بروز انسداد عروق ایسکیمک مغزی مطرح است. متیلن تترا هیدروفولات ردوکتاز (MTHFR) یکی از اصلی‌ترین آنزیم‌هایی است که در متابولیسم هموسیستئین نقش دارد و چند شکلی این ژن، که می‌تواند عامل بالا بودن سطح سرمی هموسیستئین باشد، شاید مهم‌ترین فاکتوری باشد که قابل بررسی است. جهش‌های ژن متیلن تترا هیدرو فولات ردوکتاز تأثیر مستقیم در سطح هموسیستئین پلاسما دارد (۶-۹).

[۱] استادیار نوروساینس و عضو هیئت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز (نویسنده مسئول)

[۲] دانشیار مغز و اعصاب و عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

[۳] مربی ژنتیک مولکولی دانشکده پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز

[۴] مربی هماتولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 16:23 +0330 on Saturday January 20th 2018

بررسی پلی‌مورفیسم ژن متیلن تترا هیدروفولات ردوکتاز، کاملاً مستقل از فاکتورهای مداخله‌گر محیطی (نظیر میزان پروتئین پلاسما که در سطح هموسیستئین پلاسما به صورت معنی‌داری تأثیر گذار است) می‌تواند به عنوان فاکتور پیش آگهی کننده سطح بالای سرمی هموسیستئین و متعاقب آن، انسداد عروق ایسکمیک مغزی باشد.

ژن MTHFR روی کروموزوم ۱ و در جایگاه p36.6 قرار دارد (۹). rs1801131A1298C و (C677T)rs1801133 دو چند شکلی معمول این ژن می‌باشند (۱۱،۱۰). جایگزینی C با T در نوکلئوتید ۶۷۷ منجر به جایگزینی بی‌معنی (Non sense) آلانین با والین در پروتئین MTHFR می‌شود. این جهش منجر به تولید آنزیمی حساس به حرارت و ناپایدار می‌گردد. حساسیت به حرارت باعث کاهش فعالیت آنزیم می‌شود و این در حالی است که حساسیت این آنزیم به دما در میان افراد هموزیگوت بیشتر است (۱۸-۲۲%) در حالی که در افراد هتروزیگوت (۵۶%) و در افراد سالم (۶۶-۶۷%) می‌باشد (۱۱).

Frosst و همکاران نشان داده‌اند که آنزیم MTHFR در افراد هتروزیگوت (TC) ۶۵ درصد فعالیت سالم را دارد در حالی که در افراد هموزیگوت (TT) ۳۰ درصد فعالیت سالم را نشان می‌دهد (۱۳،۱۲). مطالعاتی که روی MTHFR نوترکیب انجام شده است نشان می‌دهد پروتئینی که توسط T677 کد می‌شود کوفاکتور FAD خود را ۳ برابر زودتر از پروتئین نوع طبیعی از دست می‌دهد (۱۴).

مواد و روش کار

برای تعیین تعداد مناسب نمونه جهت این بررسی که از نوع مورد- شاهدی بود، از نرم افزار محاسبه حجم نمونه PS و با به کار بردن ضرایب e، r و z در فرمول محاسباتی $N=Z^2 R / E^2$، با فاصله اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد. فراوانی مشاهده شده در کشور همسایه ترکیه، مبنا و اساس تعیین حجم نمونه قرار گرفت و سطح معنی‌داری ۰/۰۵ برای رد شدن فرضیه صفر مدنظر قرار بود. از افراد مراجعه کننده به مرکز آزمایشگاهی در تبریز، رضایت نامه کتبی مورد تایید کمیته‌ی اخلاق دانشگاه علوم پزشکی تبریز اخذ شد و با توضیح مبسوط برای لزوم انجام کار، پرسشنامه اختصاصی، تکمیل گردید. علاوه بر ۵۰ فرد سالم که هیچ سابقه‌ی اختلال مغزی را نداشتند، تعداد ۵۰ نفر از بیماران با تشخیص قطعی استروک ایسکمیک، انتخاب و با ارائه توضیحات، با سیستم وکیوم شرکت تریمو ژاپن خون‌گیری وریدی به عمل آمد (گروه کنترل و بیمار). DNAژنومیک از گلبول‌های سفید به صورت مستقیم با استفاده از کیت QIAamp DNA Blood Mini Kit (کیاژن) و با استفاده از روش پیشنهادی این کیت استخراج شد.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از ۱۱۰ نانوگرم DNA ژنومیک در محیط حاوی ۱۰ میلی مول مخلوط dNTP شرکت تاکارای ژاپن، ۰/۳ میکرومول از پرایمرهای تکثیر دهنده قطعه DNA مدنظر شامل پرایمر F و R (جدول ۱) (۱۵)، ۰/۵ واحد از آنزیم Taq Polymeraseتاکارای ژاپن با شماره کاتالوگ A6101A، ۵/۲ میکرولیتر از بافر X۱۰ محتوی ۲۵ Mm TAPS (pH 9.3),50] mMKCl, 2mM $MgCl_2$, 1mM 2-mercaptoethanol, 200µM each dATP,dGTP,dTTP, dCTP 100µM و ۰/۲۵ mg/ml activated salmon sperm DNA] و ۱ میکرولیتر از $MgCl_2$50mM در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام گرفت. این ترکیب PCR برای بررسی هر دو جهش C677T و A1298C استفاده شد. روش مورد استفاده برای بررسی جهش C677T روش ARMS-PCR و برای مطالعه جهش A1298C ژن MTHFR روش PCR-RFLP بو.

برای واکنش‌های سالم و جهش یافته تمام اجزای واکنش کاملاً یکسان در نظر گرفته شد به غیر از پرایمرهای سالم (NP) و جهش یافته (MP)که هر کدام به همراه پرایمر معمول (CP) به کار رفت. جدول ۱ لیست پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه را نشان می‌دهد (جدول ۱).

جدول شماره (۱): لیست پرایمرهای مورد استفاده (۱۵)

نام آغازگر	توالی
C677T.Nor	GCGTGATGATGAAATCGG
C677T.Mut	GCGTGATGATGAAATCGA
C677T.Com	TGCTGTTGGAAGGTGCAAGAT
A1298C.F	CTTTGGGGAGCTGAAGGACTACTAC
A1298C.R	CACTTTGTGACCATTCCGGTTTG

برنامه دمایی مورد استفاده برای بررسی دو جهش C677T و A1298C در جداول ۲ و ۳ به ترتیب نشان داده شده است.

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 16:23 +0330 on Saturday January 20th 2018

جدول شماره (۲): برنامه دمایی مورد استفاده برای بررسی جهش C677T

مدت زمان (دقیقه و ثانیه)	درجه حرارت	مرحله	تعداد سیکل
MTHFR (C677T)			
۵ دقیقه	۹۵ درجه سانتی‌گراد	First Denaturation	۱ سیکل
۳۰ ثانیه	۹۵ درجه سانتی‌گراد	First Cycilc Denaturation	۱۰ سیکل
۵۰ ثانیه	۶۴ درجه سانتی‌گراد	First Annealing and Extension	
۳۰ ثانیه	۹۵ درجه سانتی‌گراد	Final Cycilc Denaturation	۲۵ سیکل
۳۰ ثانیه	۶۲ درجه سانتی‌گراد	Final Annealing	
۳۰ ثانیه	۷۲ درجه سانتی‌گراد	Final Extension	

جدول شماره (۳): برنامه دمایی مورد استفاده برای بررسی جهش A1298C

مدت زمان (دقیقه و ثانیه)	درجه حرارت	مرحله	تعداد سیکل
MTHFR (A1298C)			
۵ دقیقه	۹۵ درجه سانتی‌گراد	Denaturation	۱ سیکل
۳۰ ثانیه	۹۵ درجه سانتی‌گراد	Cycilc Denaturation	۳۵ سیکل
۳۰ ثانیه	۶۳ درجه سانتی‌گراد	Annealing	
۳۰ ثانیه	۷۲ درجه سانتی‌گراد	Extension	

جهت بررسی جهش A1298C در ژن MTHFR پس از انجام واکنش PCR، محصولات حاصل بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد الکتروفورز، سپس رنگ‌آمیزی و عکس‌برداری گردید. پس از اطمینان از کارکرد محصولات PCR، این محصولات با استفاده از آنزیم MboII(فرمنتاز) برش داده شد. ترکیب مورد استفاده برای اعمال برش، ۲ میکرولیتر از بافر R، ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR کنترل شده و ۱ میکرولیتر از آنزیم در نظر گرفته شد. سپس فراوانی جهش با استفاده از قطعات مورد انتظار مورد آنالیز قرار گرفت.

پس از انجام واکنش زنجیره‌ای پلی مراز و تکثیر قطعه مورد نظر، محصولات به دست آمده به اندازه ۱۶۳ جفت باز، تحت تأثیر این آنزیم، برش داده شدند. محصولات حاصل از برش بر روی ژل آگاروز ۳ درصد، در کنار سایز مارکر ۵۰ جفت بازی الکتروفورز گردید و الگوی به دست آمده مورد بررسی قرار گرفت. الگوی مورد انتظار پس از انجام برش به شرح زیر بود:

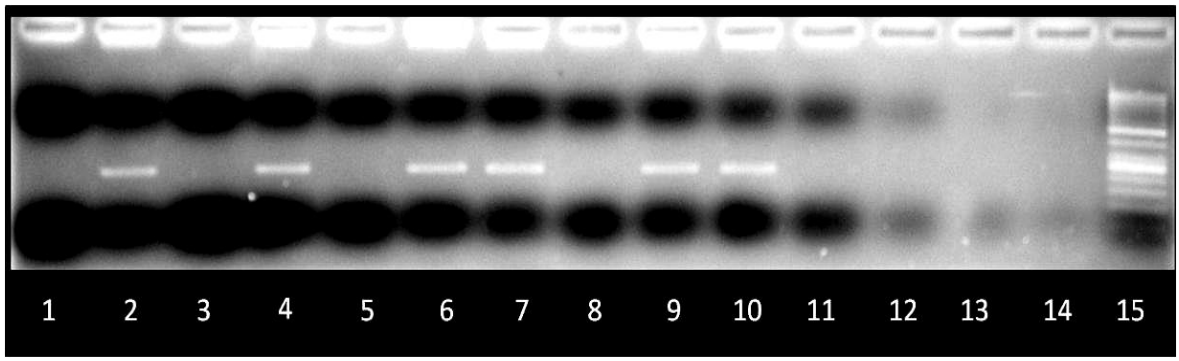
- حالت سالم (حضور نوکلوتید A در ردیف ۱۲۹۸): پنج محصول به اندازه‌های ۵۶، ۳۱، ۳۰، ۲۸ و ۱۸ جفت بازی
- حالت جهش یافته (حضور نوکلوتید C در ردیف ۱۲۹۸): چهار محصول به اندازه‌های ۸۴، ۳۱، ۳۰ و ۱۸ جفت بازی. قطعه‌ای به اندازه‌ی ۸۴ جفت باز به دلیل عدم برش محصول PCR توسط آنزیم MboII ایجاد می‌شود.
- حالت جهش یافته هتروزیگوت (حضور نوکلوتید A و C در دو الل در ردیف ۱۲۹۸): شش محصول به اندازه‌های ۸۴،۵۶،۳۱،۳۰،۲۸ و ۱۸ جفت بازی

برای حصول اطمینان از نتایج بررسی ARMS جهش C677T ژن متیلن‌تتراهیدروفولات ردوکتاز، ۲۰ نمونه به صورت اتفاقی انتخاب و نتایج به دست آمده با روش‌های تأییدی RFLP مورد ارزیابی مجدد قرار گرفت. نتایج به دست آمده حاکی از صحت ۹۹ درصد روش مورد استفاده ARMS بود.

یافته‌ها

به منظور تکثیر قطعه‌ای به طول ۲۲۶ جفت باز حاوی این جهش، PCR مربوطه بهینه‌سازی گردید. جهت انجام این واکنش، از دو پرایمر سالم و جهش یافته و یک پرایمر مشترک (Common) که در جدول ۱ به توالی آن‌ها اشاره گردید، استفاده شد که بر اساس اندازه بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد در شکل (۱) ارائه شده است.

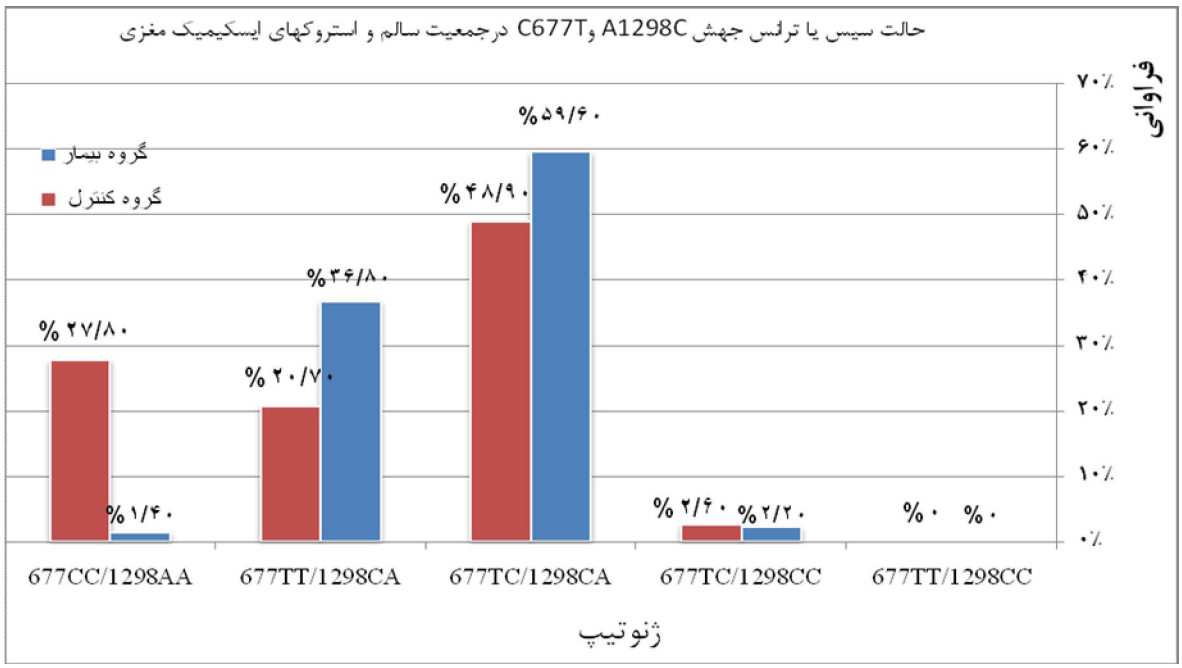
Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 16:23 +0330 on Saturday January 20th 2018



شکل شماره (۱):نتایج حاصل از ARMS-PCR مربوط به جهش C677T ژن متیلن تتراهیدروفولات ردوکتاز (MTHFR) به طول ۲۲۶ جفت باز، که با پرایمرهای اختصاصی سالم، جهش یافته و مشترک تکثیر شده‌اند. از چپ به راست:

خط‌های ۱، ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶: افراد هموزیگوت سالم (Homo. N) نسبت به جهش C677T که PCR مربوطه فقط با پرایمر سالم کار کرده است. خط‌های ۷ و ۸: فرد هموزیگوت جهش یافته (Homo. M) نسبت به جهش C677T که PCR مربوطه فقط با پرایمر جهش یافته کار کرده است. خط‌های ۹ و ۱۰: فرد هتروزیگوت (Hetero) نسبت به جهش C677T که PCR مربوطه با هر دو پرایمر سالم و جهش یافته کار کرده خط‌های ۱۱، ۱۲، ۱۳ و ۱۴: کنترل منفی که فاقد DNA می‌باشد و با هیچ پرایمری کار نمی‌کند. خط ۱۵: نشانگر اندازه (مارکر) را نشان می‌دهد.

با مقایسه انواع ژنوتیپ درگیر در افراد گروه‌های کنترل و بیمار نتایج جالبی در همزمانی بروز ژنوتیپ‌های متفاوت به دست می‌آید. به‌طوری‌که حضور هموزیگوت الل T در تغییر C677T در گروه بیمار بیشتر از گروه کنترل است ولی تفاوت معنی‌داری ما بین این دو گروه مشاهده نشد (P>0.05). همچنین هتروزیگوت سیس و ترانس دو جهش C677T و A1298C در افراد با انسداد عروق ایسکمیک مغزی به طور معنی‌داری بیشتر از افراد گروه کنترل است (P<0.05) (۹۵% CI، ۱/۵۳ (۱/۰۶-۲/۹) OR، p=0.039. جداول ۴ و ۵ مشخصات ژنوتیپی دو گروه مورد مطالعه را نشان می‌دهد. نمودار ۱ توزیع فراوانی انواع ژنوتیپ‌های درگیر را در این مطالعه نشان می‌دهند.



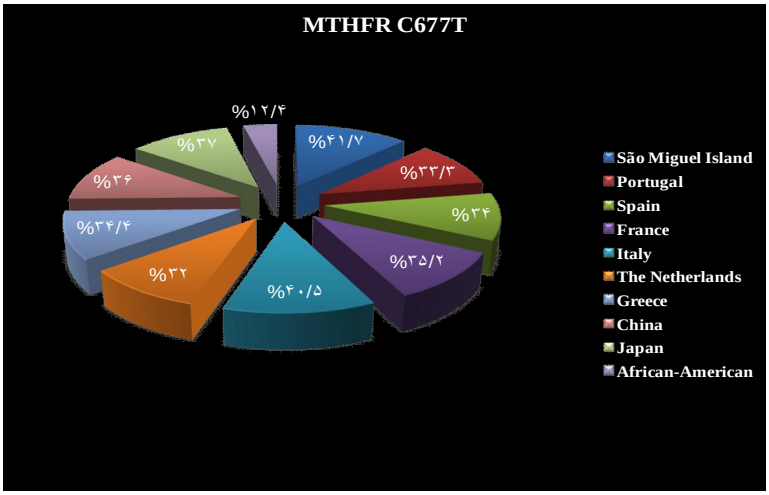
نمودار شماره (۱): مقایسه توزیع ژنوتیپ C677T و A1298C در دو گروه کنترل و بیمار

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 16:23 +0330 on Saturday January 20th 2018

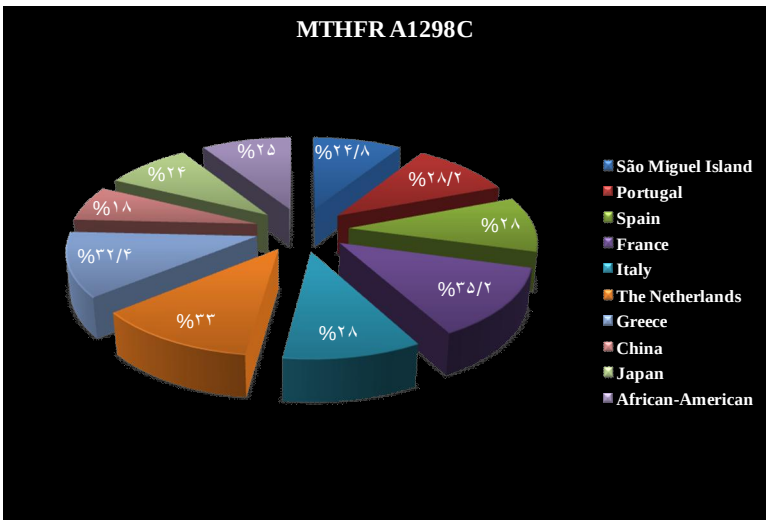
بحث و نتیجه‌گیری

چند شکلی‌های C677T و A1298C جزو مهم‌ترین چند شکلی‌های معنی‌دار در ژن MTHFR محسوب می‌شوند (۱۱،۱۰) و با تعدادی از سرطان‌ها در ارتباط می‌باشند که از آن جمله می‌توان به سرطان روده (۱۶- ۲۳)، سرطان پروستات (۲۵،۲۴)، سرطان رحم (۲۶)، سرطان سینه (۲۸،۲۷) و سرطان معده (۲۹) اشاره نمود. همچنین این چند شکلی‌ها با کاهش خطر ابتلا به لوسمی لنفوبلاستیک حاد (ALL) همراه می‌باشند (۳۰،۲۹). چند شکلی C677T یکی از شایع‌ترین چند شکلی‌ها به شمار می‌آید که ریسک فاکتور بیماری‌های عروق کرونری است و با افزایش خطر انفارکتوس قلبی (۳۱-۳۵)، افزایش فشار خون (۳۶) و بیماری‌های عروق مغزی (۳۷،۳۶) همراه است.

میزان فراوانی جهش این ژن در میان اقوام مختلف متفاوت است (۳۸). حدود ۱۰ درصد از جمعیت آمریکای شمالی برای این جهش هموزیگوت می‌باشند (۳۹). بیشترین میزان جهش در افراد مدیترانه‌ای و اسپانیایی دیده می‌شود. بعد از آن به ترتیب جمعیت‌های قفقازی و آفریقائی و سپس آمریکایی‌های آفریقائی تبار قرار دارند (۴۰). نمودار ۲ و ۳ نحوه توزیع فراوانی دو جهش C677T و A1298C را در جوامع مختلف نشان می‌دهد.



نمودار شماره (۲): توزیع فراوانی جهش C677T در جوامع مختلف (۳۹)



نمودار شماره (۳): توزیع فراوانی جهش A1298C در جوامع مختلف (۳۹)

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 16:23 +0330 on Saturday January 20th 2018

می‌توان به جرئت ادعا کرد که تشخیص جهش‌های سیس و ترانس ژن متیلن تترا هیدروفولات ردوکتاز، بهترین تشریح کننده ناهمگونی مطالعات جمعیت‌شناسی است. هیچ شکی بر آن نیست که تفاوت در توزیع جهش‌های C677T و A1298Cتحت تأثیر تفاوت‌های نژادی و منطقه‌ای قرار دارد (۷،۸،۴۱،۳۹،۴۲).

در مطالعات انجام شده قبلی در ایران، حضور جهش C677T با فرکانس اللی بالا مشاهده شده است (۴۳). این موضوع که این جهش بر اساس قانون هاردی وینبرگ میل به سمت پلی مورفیسم دارد یا نه، نیازمند مطالعات آتی با حجم نمونه بیشتر از مطالعه حاضر است ولی در این مطالعه نیز مشخص شد که این جهش با میزان فراوانی مشاهده شده، همانند سایر نقاط ایران از حالت جهش خارج و گرایش به سمت پلی مورفیسم در جامعه دارد.

در مطالعه‌ای که مرتضی باقری و همکاران بر روی ۵۳ بیمار با سابقه سقط و ۶۳ کنترل از جمعیت آذری ترکی ایران، انجام دادند، میزان فراوانی پلی مورفیسم C677T را در هر دو گروه به صورت میانگین ۴۶ درصد مشاهده کردند که اختلاف معنی‌داری در دو گروه وجود نداشت (۴۳).

تنوع در میزان فراوانی جهش‌ها در جوامع مختلف تأثیرپذیری این اختلاف از تفاوت‌های نژادی را می‌تواند توجیه کند، به طوری که این میزان تنوع شاید بتواند شانس ابتلا به بیماری‌های مختلف نظیر انسداد عروق ایسکمیک مغزی را توضیح دهد. با این وجود مطالعاتی نظیر این مطالعه، قسمت بسیار کوچکی از ارتباط مابین ژنوتیپ و فنوتیپ را تشریح می‌کند و نیازمند آن است که در حجم نمونه‌های بالاتر مورد آنالیز تأییدی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با استفاده از هزینه طرح پژوهشی با کد پژوهشی ۱۴۲۴۷۷-۵-۱۷-۲ دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز انجام یافته است. از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه و همه همکاران محترم حوزه پژوهشی کمال امتنان را دارد. همچنین از همکاری‌های بی‌دریغ مجموعه تشخیص طبی پلاسما نیز نهایت تشکر را اعلام می‌دارد.

References:

1. Bernick C, Kuller L, Dulberg C, Longstreth WT Jr, Manolio T, Beauchamp N, et al. Cardiovascular Health Study Collaborative Reseach Group. Neurology 2001; 57(7):1222-9.
2. Goracy I, Cyryłowski L, Kaczmarczyk M, Fabian A, Koziarska D, Goracy J, et al. C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolat reductase gene and the risk of ischemic stroke in Polish subjects. J Appl Genet 2009; 50(1): 63-7.
3. Kobayashi S, Okada K, Koide H. Subcortical silent brain infarction as a risk factor for clinical stroke. Stroke 2003; 28:1932-9.
4. Longstreth WT Jr, Bernick C, Manolio TA, Bryan N, Jungreis CA, Price TR. Lacunar infarcts defined by magnetic resonance imaging of 3660 elderly people: the Cardiovascular Health Study. Arch Neurol 1998; 55:1217-25.
5. Matsui T, Arai H, Yuzuriha T, Yao H, Miura M, Hashimoto S, et al. Elevated plasma homocysteine levels and risk of silent brain infarction in elderly people. Stroke 2001; 32:1116-19.
6. Morita H, Kurihara H, Tsubaki S, Sugiyama T, Hamada C, Kiruhara Y. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism and ischemic stroke in Japanese. Arterioscl Throm Vas Biol 1998; 18: 1465-9.
7. Zetterberg H, Regland B, Palmér M, Ricksten A, Palmqvist L, Rymo L, et al. Increased frequency of combined methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C mutated alleles in spontaneously aborted embryos. Eur J Hum Genet 2002; 10: 113-18.
8. Stegmann K, Ziegler A, Ngo ET, Kohlschmidt N, Schröter B, Ermert A, et al. Linkage disequilibrium of MTHFR genotypes 677C/T-1298A/C in the German population and association studies with neural tube defects (NTD). Am J Med Genet 1999; 87: 23-9.
9. Goyette P, Sumner JS, Milos R, Duncan AM, Rosenblatt DS, Matthews RG, et al. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA mapping and mutation identification. Nat Genet 1994; 7 (4):551.

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 16:23 +0330 on Saturday January 20th 2018

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: 111-13.
11. Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. Mol Genet Metab 1998; 64:169-72.
12. Lubec B, Fang-Kircher S, Lubec T, Blom HJ, Boers GH. Evidence for McKusick's hypothesis of deficient collagen cross-linking in patients with homocystinuria. Biochim Biophys Acta 1996; 1315:159-62.
13. Rozen R. Genetic predisposition to hyperhomocysteinemia: deficiencyof methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). Thromb Haemost 1997; 78:523-6.
14. Yamada K, Chen Z, Rozen R, Matthews RG. Effects of common polymorphisms on the properties of recombinant human methylenetetrahydrofolate reductase. Proc Natl Acad Sci USA. 2001; 98 (26): 14853-8.
15. Brattstro¨m L, Wilcken DE, Ohrvik J. Common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation leads to hyperhomocysteinemia but not to vascular disease: the result of a meta-analysis. Circulation 1998; 98:2520-52.
16. Parle-McDermott A, Mills JL, Molloy AM. The MTHFR1298CC and 677TT genotypes have opposite associations with red cell folate levels. Mol Genet Metab 2006; 88:290-4.
17. Friedman G, Goldschmidt N, Friedlander Y. A common mutation A1298C in human methylenetetrahydrofolate reductase gene: association with plasma total homocysteine and folate concentrations. J Nutr 1999; 129:1656-61.
18. Klerk M, Verhoef P, Clarke R. MTHFR 677C/T polymorphism and risk of coronary heart disease: a metaanalysis. JAMA 2002; 288: 2023-31.
19. Parrot F, Redonnet-Vernhet I, Lacombe D, Gin H. Osteoporosis in late-diagnosed adult homocystinuric patients. J Inherit Metab Dis 2000; 23:338-40.
20. Van der Put NM, Gabreels F, Stevens EM, Smeitink JA, Trijbels FJ, Eskes TK, et al. Asecond common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: anadditional risk factor for neural-tube defects? Am J Hum Genet 1998; 62:1044-51.
21. Chen J, Giovannucci E, Kelsey K, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, et al. A methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and the risk of colorectal cancer. Cancer Res 1996; 56:4862-4.
22. Curtin K, Bigler J, Slattery ML, Caan B, Potter JD, Ulrich CM. MTHFR C677T and A1298C polymorphisms: diet, estrogen, and risk of colon cancer. Cancer Epidemiol Biomark Prev 2004; 13:285-92.
23. Jiang Q, Chen K, Ma X, Li Q, Yu W, Shu G, et al. Diets, polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase, and the susceptibility of colon cancer and rectal cancer. Cancer Detect Prev 2005; 29:146-54.
24. Keku T, Millikan R, Worley K, Winkel S, Eaton A, Biscocho L, et al. 5, 10-Methylenetetrahydrofolate reductase codon 677 and 1298 polymorphisms and colon cancer in African Americans and whites. Cancer Epidemiol Biomark Prev 2002; 11:1611-21.
25. Le Marchand L, Wilkens LR, Kolonel LN, Henderson BE. The MTHFR C677T polymorphism and colorectal cancer: the multiethnic cohort study. Cancer Epidemiol Biomark Prev 2005; 14:1198-203.

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 16:23 +0330 on Saturday January 20th 2018

26. Levine AJ, Figueiredo JC, Lee W, Poynter JN, Conti D, Duggan DJ, et al. Geneticvariability in the MTHFR gene and colorectal cancer risk using the colorectalcancer family registry. Cancer Epidemiol Biomark Prev 2010; 19:89-100.
27. Ma J, Stampfer MJ, Giovannucci E, Artigas C, Hunter DJ, Fuchs C, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, dietary interactions, and risk of colorectal cancer. Cancer Res 1997; 57:1098-102.
28. Macis D, Maisonneuve P, Johansson H, Bonanni B, Botteri E, Iodice S, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and breast cancer risk: a nestedcase-control study and a pooled meta-analysis. Breast Cancer Res Treat 2007; 106:263-71.
29. Franco RF, Simẽs BP, Tone LG, Gabellini SM, Zago MA, Falco RP. The methylenetetrahydrofolate reductase C677T gene polymorphism decreases the risk of childhood acute lymphocytic leukaemia. Br J Haematol 2001; 115(3):616-8.
30. Jiang H, Gu LJ, Xue HL. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism of childhood acute lymphocytic leukaemia. Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi 2004; 25(7):439-40.
31. 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. Nature (Genet) 1995; 10: 111-11.
32. Selhub J, Jacques PF, Wilson PW, Rush D, Rosenberg IH. Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. J Am Med Assoc 1993; 270: 2693-8.
33. Ghazouani L, Abboud N, Mtiraoui N. Homocysteine and methylenetetrahydrofolatereductase C677T and A1298C polymorphisms in Tunisian patients with severe coronary artery disease. J Thromb Thrombolysis 2009; 27:191-7.
34. Gardemann A, Weidemann H, Philipp M. The TT genotype of the methylenetetrahydrofolate reductase C677T gene polymorphism is associated with the extent of coronary atherosclerosis in patients at high risk for coronary artery disease. Eur Heart J 1999; 20:584-92.
35. Gulec S, Aras O, Akar E. Methylentetrahydrofolate reductase gene polymorphism and risk of premature myocardial infarction. Clin Cardiol 2001; 21:281-4.
36. Ilhan N, Kucuksu M, Kaman D. The 677 C/T MTHFR polymorphism is associated with essential hypertension, coronary artery disease, and higher homocysteine levels. Arch Med Res 2008; 39:125-13.
37. Meta-analysis of all published Schizophrenia-association studies (case-control only) for rs1801133 (C677T) polymorphism, MTHFR gene. Schizophr Res Forum 2007; 03-11.
38. Morita H, Taguchi J, Kurihara H, Kitaoka M, Kaneda H, Kurihara Y, et al. Gene polymorphism of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase as a coronary risk factor. J Cardiol 1997; 29 (6), 309-15.
39. Schneider JA, Rees DC, Liu YT, Clegg JB. Worldwide distribution of a common methylenetetrahydrofolate reductase mutation. Am J Hum Genet 1998; 62 (5): 1258-60.
40. Friedman G, Goldschmidt N, Friedlander Y, Ben-Yehuda A, Selhub J, Babaey S, et al. A common mutation A1298C in human methylenetetrahydrofolate reductase gene: association with plasma total homocysteine and folate concentrations. J Nutr 1999; 129: 1656-61.
41. Isotalo PA, Donnelly JG. Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase mutations in

patients with venous thrombosis. Mol Diagn 2000; 5:59-66.

42. Volcik KA, Blanton SH, Northrup H. Examinations of methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C mutations - and in utero viability. Am J Hum Genet 2001; 69: 1150-2.

43. Bagheri M, Abdi Rad I, Omrani M, Nanbakhsh F. C677T and A1298C Mutations in the Methylenetetrahydrofolate reductase gene in patients with recurrent abortion from the Iranian Azeri Turkish. Hum Fertil (Camb) 2010; 4:134-9.

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 16:23 +0330 on Saturday January 20th 2018