



بررسی ژنتیکی پلی مورفیسم MTHFR A1298C به عنوان عامل ایجاد بیماری‌های قلبی-عروقی در جمعیت ایران

واله هادوی^۱، هاشم ایمانیان^۱، آریانا کریمی نژاد^۱، نوید المدنی^۱، مریم رستمی^۱،
کریستین آبرکانینز^۲، حسین نجم‌آبادی^{۳*}

۱-مرکز پاتولوژی و ژنتیک کریمی نژاد-نجم آبادی، تهران، ایران

۲-آزمایشگاه تشخیصی ViennaLab، وین، اتریش

۳-مرکز تحقیقات ژنتیک، دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی، تهران، ایران

چکیده

در این بررسی، ۲۰۸ فرد بدون علائم بالینی بیماری‌های قلبی-عروقی و سابقه ترومبوز وریدی، از نقاط مختلف ایران با نژادهای متفاوت، مطالعه شدند. جهت ارزیابی توزیع پلی مورفیسم MTHFR A1298C، یکی از عوامل ژنتیکی ایجاد بیماری‌های قلبی-عروقی در جمعیت ایران، از روش هیبریدیزاسیون معکوس برای تشخیص سریع و دقیق استفاده شد. اساس آزمون روش Multiplex PCR و هیبریدیزاسیون بر روی نوار آزمون است. این نوار شامل خطوط موازی حاوی پروب‌های الیگونوکلوئیدی خاص آلی است. شیوع جهش MTHFR A1298C در جمعیت مورد بررسی ۴۲٪ بود که رقم بالایی است. فراوانی جهش MTHFR A1298C در ایران کمتر از اروپاست، اما بیشتر از فراوانی‌های گزارش شده از هندوستان و بیشتر کشورهای منطقه آسیاست. در این مطالعه، نحوه توزیع آلل جهش یافته MTHFR A1298C در نژادهای مختلف جمعیت ایران بررسی شده و نتایج آن با مطالعات صورت گرفته مقایسه شده است. پژوهش اخیر تنها مطالعه‌ای است که تاکنون بر روی پلی مورفیسم ژنی MTHFR A1298C در ایران انجام شده است. واژه‌های کلیدی: ترومبوز وریدی؛ پلی مورفیسم ژنی؛ متیلن تتراهیدروفولات ردوکتاز؛ فرکانس ژنی؛ ایران.

مقدمه

اطلاق می‌شود که در آنها قلب، سرخرگ‌ها و سیاهرگ‌ها عملکرد طبیعی خود را از دست می‌دهند. از میان این دسته از بیماری‌ها، ترومبوآمبولیسم

بیماری‌های قلبی-عروقی (CVD) به گروهی از نارسایی‌های چندگانه

* حسین نجم‌آبادی، Ph.D

استاد دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی / تهران، اوین، بلوار دانشجو، خیابان کودکان، دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی، مرکز تحقیقات ژنتیک / مرکز پاتولوژی و ژنتیک کریمی نژاد - نجم‌آبادی / E.mail: hnajm2@yahoo.com / تاریخ پذیرش: ۸۸/۱۱/۲۲ تاریخ دریافت: ۸۹/۳/۲

1. Cardiovascular Diseases
2. Venous Thromboembolism

واله هادی، هاشم ایمانیان، آریانا کریمی نژاد و همکاران

شده باشند و به علت فاصله کمی که از یکدیگر بر روی کروموزوم دارند، کراس اوورهای^۷ معدودی اتفاق بیفتد. ارتباط بین عوامل محیطی و بیماری‌های قلبی-عروقی در ایران به خوبی بررسی شده است، اما نقش مارکرهای ژنتیکی، به عنوان عامل مهم در بروز این گونه بیماری‌ها، هنوز در ایران ناشناخته است. تاکنون مطالعه‌ای بر روی شیوع جهش MTHFR A1298C در جمعیت ایران صورت نگرفته است. هدف از این بررسی تعیین فراوانی پلی مورفیسم یادشده در جمعیت ایران است که بتواند عوامل ژنتیکی تأثیرگذار بر ایجاد بیماری‌های قلبی-عروقی را در ایران مشخص و اطلاعات اپیدمیولوژیکی را برای مطالعات آتی فراهم کند.

مواد و روش‌ها

در پژوهش اخیر ۲۰۸ فرد سالم و بدون علائم بیماری‌های قلبی-عروقی و سابقه ترومبوز وریدی، شامل ۱۰۳ مرد و ۱۰۵ زن، در محدوده سنی بین ۱۸ تا ۵۵ سال، از افراد مراجعه کننده به مرکز تحقیقات ژنتیک دانشگاه بهزیستی و توانبخشی تهران، ارزیابی شدند. افراد به گونه‌ای انتخاب شدند که کلیه قومیت‌های مختلف ایرانی را در برگیرند و در ضمن، کلیه مناطق جغرافیایی کشور را پوشش دهند. کلیه افرادی که در مطالعه شرکت کردند، ابتدا رضایت خود را با پر کردن فرم رضایت‌نامه اعلام کردند. نمونه‌های خون محیطی مخلوط با سدیم EDTA از افراد تهیه شد. با استفاده از روش نمک اشباع DNA ژنومی استخراج شد (۱۲). شناسایی ناقلان با روش هیبریدیزاسیون معکوس انجام شد. در این روش، از کیت ViennaLab CVD StripAssay، اتریش) استفاده شد و بقیه مراحل بر اساس پروتکل کیت مورد آزمایش انجام شد (۱۳).

یافته‌ها

دویست و هشت نفر از نقاط مختلف ایران با نژادهای مختلف بررسی شدند. ژنوتیپ و فراوانی آلی پلی مورفیسم در نقاط مختلف ایران و نژادهای مختلف در جدول ۱ و ۲ ذکر شده است. جدول ۳ بیانگر شیوع پلی مورفیسم در جمعیت‌های مختلف، طبق آمارهای گزارش شده از محققان مختلف، در مقایسه با ایران است. شایع‌ترین آلل دیده شده در بررسی اخیر MTHFR 1298A، با فراوانی ۰/۵۸، بود. در گروه مورد مطالعه، فراوانی حالت هموزیگوت ژنوتیپ جهش یافته MTHFR A1298C بالای ۱۹/۲٪ بود.

وریدی (VTE)^۲ سومین عارضه قلبی-عروقی شایع در دنیا است که سالیانه ۱ در ۱۰۰۰ نفر را درگیر می‌سازد (۱). آبشار انعقادی مسیر اصلی محافظی است که با تنظیم واکنش‌های دقیق بین اجزاء دیواره عروق، پلاکت‌ها و پروتئین‌های پلاسما، باعث محدودیت در از دست رفتن خون می‌شود (۲). عدم تنظیم فعالیت این آبشار ممکن است به تشکیل ترومبوز وریدی و سرخرگی منجر شود و زندگی فرد را به خطر اندازد. ترومبوز وریدی ممکن است نتیجه اختلالات ژنتیکی باشد یا بر اثر تغییرات ایجادشده در روند لخته شدن خون یا بر اثر تعامل بین این دو ایجاد شود (۳). این عارضه یکی از علل عمده مرگومیر در کشورهای توسعه یافته و عامل اصلی بیماری و مرگومیر در دوران بارداری، کودکی و در بدخیمی هاست (۴).

متیلاسیون هموسیستئین به متیونین، به وسیله آنزیم ۵، ۱۰-متیلن ترراهیدروفولات ردوکتاز^۳ (MTHFR; 1p36.3) کاتالیز می‌شود. پلی مورفیسم‌های ژنی آنزیم‌هایی که در عملکرد MTHFR دخالت دارند، به خوبی شناخته شده‌اند. دو پلی مورفیسم شایع ژن MTHFR عبارتند از: C6۷T و A1۲۹۸C. جهش C6۷T (آلانین ← والین) به تولید آنزیمی ناپایدار منجر می‌شود که باعث افزایش هموسیستئین خون و ترومبوز وریدی می‌شود (۵).

برای اولین بار، ون در پوت^۴ و همکاران، در سال ۱۹۹۸، دومین جهش شایع ژن کدکننده آنزیم متیلن ترراهیدروفولات ردوکتاز را گزارش کردند که به میزان قابل توجهی فعالیت کاتالیک آنزیم را کاهش می‌داد. جهش شناسایی شده اهمیت زیادی دارد، زیرا نقش قابل ملاحظه‌ای در متابولیسم فولات، و در نهایت متابولیسم هموسیستئین دارد. محققان یادشده این جهش را MTHFR 1298 (A→C) نام گذاری کردند، چون در حوزه تنظیمی انتهای C^۵ آنزیم، گلوتامات به آلانین تغییر می‌یابد (۶). معمولاً بر اثر وجود پلی مورفیسم 1298A/C، آنزیم MTHFR ناپایدار می‌شود و فعالیت آن کاهش می‌یابد (۷). با این حال، به نظر می‌رسد که پلی مورفیسم A1298C به تنهایی تأثیر قابل توجهی بر روی هموسیستئین پلاسما ندارد و نقش تعیین کننده خود را در ترکیب با واریانت 677T ژن MTHFR ایفا می‌کند (۸). جهش MTHFR 677T به ایجاد آنزیمی ناپایدار و در نتیجه افزایش هموسیستئین پلاسما و ترومبوز وریدی می‌انجامد (۹). هموزیگوت بودن فرد برای پلی مورفیسم 677C/T و حالت هتروزیگوت مرکب^۶ برای دو جهش 677C/T و 1298A/C می‌تواند فعالیت آنزیم را تا بیش از ۵۰٪ کاهش دهد (۹). پژوهش‌های زیادی بر روی توزیع ژنوتیپ ترکیبی این دو پلی مورفیسم MTHFR صورت گرفته است و نتایج آنها نشان داده است که آلل‌های 677T و 1298C هیچ‌گاه در موقعیت cis قرار نمی‌گیرند و یا بسیار به ندرت در این حالت دیده می‌شوند (۶، ۱۰ و ۱۱). احتمال دارد که دو پلی مورفیسم جدا از هم، بر روی آلل‌های مختلف ایجاد

3. 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase

4. van der Put

5. Regulatory C-terminal Domain

6. Compound Heterozygosity

7. Crossing-over

جدول ۱: ژنوتیپها (%) و فرکانس آللی پلی مورفیسم MTHFR 1298A/C در نقاط مختلف ایران

ژنوتیپ	مرکز	شمال	شمال شرق	شمال غرب	جنوب	جنوب شرق	جنوب غرب	غرب	جمع
AA	۲۵/۸	۴۴/۸	۸۴/۶	۳۵/۳	-	۱۷/۹	۳۵/۹	۳۷/۹	۳۵/۶
AC	۶۴/۵	۳۷/۹	۷/۷	۴۴/۱	۶۰/۰	۵۰/۰	۴۸/۷	۳۷/۹	۴۵/۲
CC	۹/۷	۱۷/۲	۷/۷	۲۰/۶	۴۰/۰	۳۲/۱	۱۵/۴	۲۴/۱	۱۹/۲
آلل A	۰/۵۸۰	۰/۶۳۸	۰/۸۸۵	۰/۵۷۴	۰/۳۰۰	۰/۴۲۹	۰/۶۰۳	۰/۵۶۹	۰/۵۸۲
آلل C	۰/۴۲۰	۰/۳۶۲	۰/۱۱۵	۰/۴۲۶	۰/۷۰۰	۰/۵۷۱	۰/۳۹۷	۰/۴۳۱	۰/۴۱۸

جدول ۲: ژنوتیپها (%) و فراوانی آللی پلی مورفیسم MTHFR 1298A/C در نژادهای مختلف جمعیت ایران

ژنوتیپ	فارس	آذری	لر	کرد	بلوچ	گیلک	عرب	جمع
AA	۳۷/۳	۳۱/۰	۳۸/۹	۳۸/۹	۱۷/۴	۵۰/۰	۳۱/۶	۳۵/۶
AC	۴۶/۷	۴۴/۸	۳۸/۹	۴۴/۴	۵۶/۵	۳۴/۶	۴۷/۴	۴۵/۲
CC	۱۶/۰	۲۴/۱	۲۲/۲	۱۶/۷	۲۶/۱	۱۵/۴	۲۱/۱	۱۹/۲
آلل A	۰/۶۰۷	۰/۵۳۵	۰/۵۸۴	۰/۶۱۱	۰/۴۵۷	۰/۶۷۳	۰/۵۵۳	۰/۵۸۲
آلل C	۰/۳۹۳	۰/۴۶۵	۰/۴۱۶	۰/۳۸۹	۰/۵۴۳	۰/۳۲۷	۰/۴۴۷	۰/۴۱۸

بحث و نتیجه گیری

بیماری‌های قلبی-عروقی سریع و ناگهانی بروز می‌کنند و یکی از عمده‌ترین مشکلات بهداشتی کشورهای در حال توسعه، مانند ایران، هستند. این دسته از بیماری‌ها با شیوع ۳۹ درصدی نخستین علت مرگ‌ومیر در ایران به‌شمار می‌آیند (۹). تنها در آمریکا، هر سال بیش از ۳۰۰۰۰۰ نفر به‌طور ناگهانی، به‌علل عوارض قلبی، می‌میرند. با اینکه شیوه‌های درمانی بیماری‌های قلبی-عروقی توسعه و بهبود یافته است، شیوع آن همچنان روندی صعودی دارد (۹).
MTHFR C677T، عامل ۵ لایدن و پروترومبین G20210A،

به‌طور کلی، شیوع آلل جهش‌یافته C در جنوب و جنوب غرب ایران با بیشترین فراوانی‌ها (به‌ترتیب، ۰/۷۰ و ۰/۵۷) تعیین شد (جدول ۱). از میان نژادهای مختلف فارس، لر، کرد، گیلک، بلوچ، آذری و عرب مورد بررسی، آلل جهش‌یافته C در نژاد بلوچ، آذری و عرب بالاترین فراوانی‌ها (به‌ترتیب ۰/۵۴، ۰/۴۶ و ۰/۴۴) و در نژاد کرد و گیلک کمترین فراوانی‌ها (به‌ترتیب، ۰/۳۸ و ۰/۳۲) را داشت (جدول ۲). جمعیت مورد بررسی از تعادل هاردی-واینبرگ برخوردار بود.

جدول ۳: فراوانی آللی پلی مورفیسم MTHFR 1298A/C در جمعیت‌های مختلف در مقایسه با ایران

فراوانی آللی		جمعیت (مرجع)
C	A	
۰/۳۵	۰/۶۵	یونان (۱۸)
۰/۴۹	۰/۵۱	لبنان (۱۷)
۰/۲۸	۰/۷۲	ترکیه (۱۹)
۰/۴۲	۰/۵۸	ایران (بررسی حاضر)
۰/۳۹	۰/۶۱	هند (۲۱)
۰/۱۸	۰/۸۱	شرق آسیا (۲۰)

MTHFR 677C/T (۰/۲۴)، مخصوصاً در شکل هوموزیگوت آن، در جمعیت ایران، بررسی این پلی مورفیسم در بیمارانی که در معرض خطر ترومبوز وریدی هستند و هموسیستتین پلاسمای آنان بالاتر از سطح طبیعی است و نیز بیماران سرطانی، به ویژه اگر سطح فولات سرمی آنها پایین باشد، ضروری به نظر می‌رسد.

پلی مورفیسم MTHFR 677C/T فعالیت MTHFR را تا ۵۰٪ کاهش می‌دهد، خصوصاً زمانی که پلی مورفیسم‌های MTHFR در حالت هتروزیگوت مرکب باشند (C677T/A1298C). این تأثیر هم‌افزایی منجر به افزایش سطح هموسیستتین پلاسمای می‌شود. توارث هر دو این پلی مورفیسم‌ها با افزایش خطر ترومبوز وریدی همراه است و تغییرات انکوژنی را از راه تأثیر بر فرایند متیلاسیون DNA ایجاد می‌کند، خاصه در افرادی که میزان مصرف فولات کمی دارند (۲۴). در تحلیل فراوانی‌های ترکیبی دو پلی مورفیسم MTHFR، فراوانی هتروزیگوت مرکب ۱۵/۴٪ (۳۲ نفر از ۲۰۸ فرد مورد بررسی) به دست آمد و حالت هوموزیگوت مرکب برای این دو جهش در جمعیت مورد مطالعه دیده نشد. فراوانی هتروزیگوتی مرکب C677T/A1298C در کشورهای اطراف، نظیر ترکیه (۲۱/۶٪)، بسیار بالاست و حتی از مقادیر بالای گزارش شده از کانادا (۱۵٪)، آمریکا (۱۷٪) و هلند (۲۰٪) هم بیشتر است، در حالی که این رقم در ایران کمتر و به ۱۵/۴٪ کاهش یافته است (۱۹).

از آنجایی که اطلاعات مشابهی از میزان جهش MTHFR A1298C در کشورهای همسایه، نظیر آذربایجان، پاکستان، عراق و عربستان سعودی وجود ندارد، نتیجه‌گیری اینکه فراوانی این جهش از غرب به شرق کاهش می‌یابد یا خیر، مشکل است. شیوع بالای هتروزیگوت مرکب MTHFR 677C/T/MTHFR 1298A/C که نزدیک به آمارهای کشورهای اروپایی و آمریکایی است و همراهی آن با افزایش خطر ترومبوز وریدی در این افراد اهمیت بررسی این پلی مورفیسم‌ها را در جمعیت ایران بیش از پیش روشن می‌سازد. بررسی‌های بیشتری، برای تعیین ارتباط پلی مورفیسم MTHFR 1298C با بیماری‌های قلبی-عروقی، سرخرگی و ترومبوز وریدی، در جمعیت ایران لازم است.

با فراوانی ۱۰، ۵ و ۳ درصدی در ناقلان هتروزیگوت، سه پلی مورفیسمی هستند که بیشترین عامل ایجاد ترومبوفیلی در جمعیت قفقازی‌ها شناخته شده‌اند. این سه پلی مورفیسم از زمان اشتقاق گونه‌ای جمعیت قفقازی از آسیای شرقی، یعنی در حدود بیست تا سی و چهار هزار سال پیش، شکل گرفته‌اند. شیوع این سه پلی مورفیسم در جمعیت‌های مختلف و بر اساس تفاوت‌های نژادی و منطقه جغرافیایی که حاصل رانش ژنی^۸، مهاجرت جمعیت‌ها یا انتخاب طبیعی^۹ است، متفاوت است (۱۴).

پژوهش‌های اخیر حاکی از آن است که فراوانی آلل C در کدون ۱۲۹۸ در میان آمریکایی‌های آفریقایی‌تبار کمتر از سفیدپوستان آمریکا و اروپایی‌هاست (۱۴). فراوانی آلل جهش‌یافته C در میان سفیدپوستان آمریکا ۰/۳۴ گزارش شده، در حالی که این مقدار در آمریکایی‌های آفریقایی‌تبار ۰/۱۹ است (۱۶). بالاترین فراوانی‌ها از جمعیت اروپا و لبنانی‌ها گزارش شده است. فراوانی جهش در لبنان ۰/۴۹ است در حالی که در یونان و ترکیه، به ترتیب، ۰/۳۵ و ۰/۳۳ گزارش شده است (۱۷ تا ۱۹). تاکنون گزارشی مبنی بر میزان شیوع پلی مورفیسم MTHFR A1298C در کشورهای اطراف، نظیر عراق، عربستان سعودی، پاکستان و آذربایجان، منتشر شده است. همان‌طوری که در جدول ۳ مشاهده می‌کنید، فراوانی به دست آمده برای آلل MTHFR 1298C در این بررسی ۰/۴۲ است که با مقادیر گزارش شده از جمعیت لبنان برابری می‌کند، اما بیش از دو برابر آمارهای گزارش شده از شرق آسیاست (۰/۱۸) (۱۷ و ۲۰). در ایران نیز، همچون بسیاری از کشورهای همسایه، پیش از این مطالعه‌ای بر روی میزان شیوع پلی مورفیسم MTHFR A1298C صورت نگرفته بود. فراوانی هوموزیگوسیتی به دست آمده برای MTHFR 1298C در این بررسی ۱۹/۲٪ بود (جدول ۱). این در حالی است که این میزان در جمعیت آلمان کمتر (۱۳/۸٪) و در جمعیت ترکیه ۱۰٪ و در هندوستان بسیار کمتر (۱/۴٪) گزارش شده است (۲۰ تا ۲۲). فراوانی MTHFR C677T بیشتر در همین گروه مورد مطالعه شده بود و نتایج آن بیانگر فراوانی بالای ۰/۲۴ آلل T و هوموزیگوسیتی بالا، به میزان ۶/۷٪، در جمعیت ایران بود (۲۳). با چنین فراوانی‌های بالایی از آلل MTHFR 1298C (۰/۴۲) و آلل

References

1. Menon J, Salman MM, MdGH. Venous thrombolysis: Current perspectives. *Curr Treat Options Cardiovasc Med* 2004;6:159-68.
2. Konkle BA. Bleeding and thrombosis. In: Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, Hauser SL, et al. Editors. *Harrison's principles of internal medicine*. 17th ed.

- New York: McGraw Hill; 2008.P.363-9.
3. Cardiovascular disease: prevention and control [Internet]. World Health Organization. Available from: <http://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/Fact/cvd/en>.
4. Reitsma PH, Rosendaal FR. Past and future of genetic research in thrombosis. *J Thromb Haemost* 2007;S1:264-9.

8. Genetic Drift

9. Natural Selection

5. Varga EA, Sturm AC, Misita CP, et al. Homocysteine and MTHFR mutations. Relation to thrombosis and coronary artery disease. *Circulation* 2005;111:e289-e93.
6. van der Put NM, Gabreels F, Stevens EM, et al. A second mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural tube defects? *Am J Hum Genet* 1998;62:1044-51.
7. Viel A, Dall'Agnese L, Simone F, et al. Loss of heterozygosity at the 5,10- methylenetetrahydrofolate reductase locus in human ovarian carcinomas. *Br J Cancer* 1997;75:1105-10.
8. Weisberg IS, Jacques PF, Selhub J, et al. The 1298A3C polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): in vitro expression and association with homocysteine. *Atherosclerosis* 2001;156:409-15.
9. Varga EA, Sturm AC, Misita CP, et al. Homocysteine and MTHFR mutations. Relation to thrombosis and coronary artery disease. *Circulation* 2005;111:e289-e93.
10. Falchi A, Giovannoni L, Piras IS, et al. Prevalence of genetic risk factors for coronary artery disease in Corsica island (France). *Exp Mol Path* 2005;79:210-3.
11. Rady PL, Tying SK, Hudnall SD, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): the incidence of mutations C677T and A1298C in the Ashkenazi Jewish population. *Am J Med Genet* 1999;86:380-4.
12. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res* 1988;16:1215.
13. Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 2005;1:47-50.
14. Lerman A, Suwaidi JA, Velianou JL. L-Arginine: a novel therapy for coronary artery disease? *Expert Opin Investig Drugs* 1999;8:1785-93.
15. Botto L, Yang Q. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital abnormalities: a HUGE review. *Am J Epidemiol* 2000;151:862-77.
16. Keku T, Millikan R, Worley K, et al. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase codon 677 and 1298 Polymorphisms and colon cancer in African Americans and whites. *Cancer Epidemiol Biomark Preven* 2002;11:1611-21.
17. Mahfouz RA, Otrrock ZK, Ghasham MA, et al. Oral contraceptive pills and inherited thrombophilia in a young woman with deep venous thrombosis. *East Mediterr Health J* 2009; 15:235-8.
18. Gialeraki A, Politou M, Rallidis L, et al. Prevalence of prothrombotic polymorphisms in Greece. *Genetic Testing* 2008;12:541-7.
19. Sazci A, Ergul E, Kaya G, et al. Genotype and allele frequencies of the polymorphic methylenetetrahydrofolate reductase gene in Turkey. *Cell Biochem Funct* 2005;23:51-4.
20. Rees DC, Cox M, Clegg JB. World distribution of factor V Leiden. *Lancet* 1995;346:1133-4.
21. Rothenbacher D, Fischer HG, Hoffmeister A, et al. Homocysteine and methylenetetrahydrofolate reductase genotype: association with risk of coronary heart disease and relation to inflammatory, hemostatic, and lipid parameters. *Atherosclerosis* 2002;162:193-200.
22. Angeline T, Jeyaraj N, Granito S, et al. Prevalence of MTHFR gene polymorphisms (C677T and A1298C) among Tamilians. *Exp Mol Pathol* 2004;77:85-8.
23. Oberkanins C, Kahrizi K, Puhlinger H, et al. Study of MTHFR C677T polymorphism as a genetic risk factor for cardiovascular disease in the Iranian population. *Genetics 3rd Millennium Year* 2009;7(2):1632-7.
24. Yi P, Pogribny I, Jill James S. Multiplex PCR for simultaneous detection of 677 C→T and 1298 A→C polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase gene for population studies of cancer risk. *Cancer Lett* 2002;181:209-13.