

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

امین خالقی پرست^۱، سعید مروتی^۲، زهرا نورمحمدی^۳

چکیده

سابقه و هدف

یکی از فاکتورهای مطرح در ایجاد ترومبوفیلی در زنان مبتلا به سقط مکرر، پلی مورفیسم های A1298C و C677T در ژن MTHFR است. هدف از این تحقیق، بررسی ارتباط این دو پلی مورفیسم با سندروم سقط مکرر به عنوان یکی از عوامل خطر ژنتیکی برای این سندروم بود.

مواد و روش ها

در یک مطالعه مورد شاهدهی از میان مراجعین بیمارستان بقیهاله و مرکز ناباروری ابن سینا، ۳۰ زن با سابقه سقط مکرر خود به خود با علت نامشخص به عنوان گروه بیمار و ۱۰ زن بدون سابقه سقط مکرر و دارای حداقل دو باروری موفق، به عنوان گروه شاهد انتخاب شدند. دو پلی مورفیسم ژن MTHFR با واکنش زنجیره ای پلی مراز و هضم آنزیمی محصولات PCR با آنزیم های اندونوکلاز محدودالانتر (PCR-RFLP) بررسی شدند. نتایج به دست آمده از تعیین ژنوتیپ هر پلی مورفیسم با نرم افزار SPSS ۱۶، دو آزمون χ^2 و همبستگی اسپیرمن تجزیه و تحلیل شدند.

یافته ها

بین دو پلی مورفیسم C677T و A1298C ارتباط متقابل وجود داشت. ۱۷ نفر از گروه مورد (۵۶/۶٪) و ۵ نفر از گروه شاهد (۵۰٪)، برای پلی مورفیسم C677T هتروزیگوت بودند. فراوانی آلل موتانت T در زنان دچار سقط، بیشتر از زنان گروه شاهد بود (۲۸/۴٪ در زنان دچار سقط مکرر و ۲۵٪ در زنان گروه شاهد، $p < ۰/۰۵$). فراوانی پلی مورفیسم A1298C در میان زنان دچار سقط مکرر و زنان گروه شاهد به ترتیب ۶۳/۳٪ و ۵۰٪ بود.

نتیجه گیری

نتایج به دست آمده در این پژوهش نشان داد که هیچ کدام از دو پلی مورفیسم MTHFR، نمی توانند توجیه کننده علت سقط مکرر در زنان مورد بررسی محسوب گردند.

کلمات کلیدی: متیلن تتراهیدروفولات ردوکتاز، ترومبوفیلی، سقط خود به خود، پلی مورفیسم (ژنتیک)

تاریخ دریافت: ۱۳/۴/۱۹

تاریخ پذیرش: ۳/۱۱/۱۹

۱- مؤلف مسئول: کارشناس ارشد زیست شناسی ژنتیک - دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی - واحد علوم و تحقیقات تهران - کدپستی: ۱۵۷۷۷۳۴۹۱۸

۲- PhD ژنتیک انسانی - استادیار مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی - دانشگاه علوم پزشکی بقیهاله (عج)

۳- PhD ژنتیک مولکولی - استادیار دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی - واحد علوم و تحقیقات تهران

مقدمه

شایع ترین عارضه در سه ماهه اول و دوم حاملگی، سقط جنین است. مفهوم سقط جنین، به ختم بارداری پیش از هفته بیستم اطلاق می شود. در این میان، زنانی که بیش از دو بار سقط جنین پی در پی را تجربه می کنند، دچار سقط مکرر هستند (۱). در سقط مکرر به عنوان یک بیماری چند عاملی، عوامل خطر متعددی دخیل هستند و مسایل ژنتیکی به خصوص فاکتورهای ترومبوفیلی (لخته دوستی) به عنوان یکی از دلایل سقط مکرر می توانند مطرح باشند. سلامت جنین، ارتباط مستقیم با گردش خون مادر دارد. هر عاملی که باعث اختلال در این ارتباط شود، برای جنین زیان آور است (۲).

به نظر می رسد که ایجاد لخته نابجا یا ترومبوز می تواند در مویرگ های جفت، باعث اختلال در روند تبادلات مواد بین مادر و جنین شده و نهایتاً منجر به سقط گردد (۳). پلی مورفیسم های نوکلئوتیدهای منفرد در ژن های کدکننده آنزیم های تنظیم کننده مسیرهای مهم متابولیکی همانند متیلن تتراهیدروفولات ردوکتاز (MTHFR)، به عنوان یکی از فاکتورهای مطرح در ایجاد ترومبوفیلی در نظر گرفته می شوند. آنزیم MTHFR، نقش محوری در متابولیسم فولات، متیونین و هموسیستئین دارد (۴). هموسیستئین پلاسما یک آمینواسید بالقوه سمی است که افزایش آن به علت اثرات پاتولوژیک منفی که بر روی آندوتلیوم عروق، آتروژنسیس و فعالیت فاکتورهای انعقادی V و VIII می گذارد، منجر به افزایش سطح ترومبین، تجمع پلاکت ها و در نتیجه ترومبوز وریدی می شود (۵، ۴). بنابراین، با تبدیل این اسید آمینه به متیونین در بدن، اثرات سمی آن خنثی می شود. آنزیم MTHFR موجب تبدیل برگشت ناپذیر ۵ و ۱۰ متیلن تتراهیدروفولات به ۵ متیل تتراهیدروفولات می گردد که شکل غالب فولات موجود در گردش خون است. سپس هموسیستئین با اخذ یک گروه متیل از ۵- متیل تتراهیدروفولات، به متیونین تبدیل می شود. این واکنش توسط متیونین سنتتاز، کاتالیز می شود (۷-۵).

کاهش در فعالیت آنزیم MTHFR، منجر به کاهش در سوبسترا برای متیونین سنتتاز می شود که به دنبال آن باعث

توقف تشکیل هموسیستئین و در نتیجه افزایش سطح هموسیستئین می گردد (۷). ژن کدکننده آنزیم کاتالیتیک MTHFR در انتهای بازوی کوتاه کروموزوم یک (1p36.3) قرار داشته و دارای ۱۱ اگزون است (۸).

دو پلی مورفیسم C677T و A1298C که به طور بارزی در فعالیت آنزیمی MTHFR تغییر ایجاد می کنند، در این ژن تشخیص داده شده است. تبدیل سیتوزین به تیمین در نتیجه یک جهش نقطه ای 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 می شود. این جهش نقطه ای، منجر به ایجاد یک آنزیم MTHFR ناپایدار و حساس به حرارت با فعالیت کم می گردد. به علت فعالیت آنزیمی کمتر MTHFR توانست، میزان هموسیستئین سرمی افزایش می یابد. آنزیم MTHFR، در افراد هموزیگوت ۳۰ درصد عملکرد و در افراد هتروزیگوت ۶۵ درصد عملکرد را در مقایسه با افراد نرمال دارد. هموزیگوت ها به شرط دریافت فولات کافی، دارای سطوح طبیعی هموسیستئین در خون هستند؛ ولی اگر فولات کافی دریافت نکنند، میزان هموسیستئین در آن ها افزایش می یابد (۹-۱۱).

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 می شود. مطالعه های چندانی روی پلی مورفیسم A1298C انجام نگرفته، اما مشخص شده است که ژنوتیپ CC، عملکردی معادل ۶۰ درصد عملکرد ژنوتیپ AA را دارا است. افراد هموزیگوت برای آلل A1298C، سطوح بالای هموسیستئین سرمی را نشان نمی دهند. اما افراد دارای هتروزیگوت ترکیبی پلی مورفیسم A1298C و C677T، دارای مشخصات بیوشیمیایی مشابه هموزیگوت های C677T، مانند سطوح افزایش یافته هموسیستئین و سطوح کاهش یافته فولات هستند (۱۲، ۱۱). با توجه به اهمیت و نقش MTHFR در هموستاز و اثرات پلی مورفیسم های آن در افزایش سطح هموسیستئین، ابتدا به ترومبوز وریدی و نیز ارتباط ترومبوز با افزایش احتمال سقط مکرر، در مطالعه حاضر ارتباط دو

پلی مورفیسم A1298C و C677T در ژن MTHFR با سقط مکرر بررسی شده است.

مواد و روشها

در یک مطالعه مورد - شاهدی، ۳۰ زن با سابقه سقط مکرر خود به خودی 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... (عج) و مرکز ناباروری ابن سینا در ماه های شهریور تا اسفند سال ۱۳۸۸ با توجه به پرونده پزشکی بیماران و نظر متخصص زنان، انتخاب شدند. معیارهای خروج از مطالعه شامل سایر علل مطرح در سقط از جمله وجود ناهنجاری های کروموزومی در جنین، مشکلات آناتومیکی 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 گرفته شد.

بررسی ژنوتیپ ها

DNA ژنومی از نمونه خون هایی که در لوله های حاوی ماده ضد انعقاد EDTA گرفته شده بود به روش استاندارد رسوب نمکی استخراج گردید. تعیین ژنوتیپ با استفاده از روش PCR-RFLP صورت گرفت. آغازگرهای مناسب برای هر پلی مورفیسم طراحی شد و سپس واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) برای هر جفت آغازگر، بهینه سازی شد (جدول ۱). مواد لازم برای واکنش PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر، شامل ۴۰ نانوگرم DNA ژنومی، ۲ میلی مول $MgCl_2$ ، ۰/۲۵ میلی مول dNTPs، ۰/۴ میلی مول از هر جفت

آغازگر و ۱ واحد آنزیم Taq پلی مرز بود. مراحل انجام روش PCR به ترتیب زیر 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 (۹۵ °C به مدت ۱ دقیقه، ۶۱ °C به مدت ۱ دقیقه، ۷۲ °C به مدت ۱ دقیقه) و برای پلی مورفیسم A1298C MTHFR در ۳۰ سیکل (۹۵ °C به مدت ۱ دقیقه، ۶۳ °C به مدت ۱ دقیقه، ۷۲ °C به مدت ۲ دقیقه) تکثیر یافتند و به دنبال آن، مرحله طولی 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 محدودالایر Hinf I و Mbo II و مطابق دستورالعمل شرکت تولید کننده 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، ۱۹۸ طول دارد.

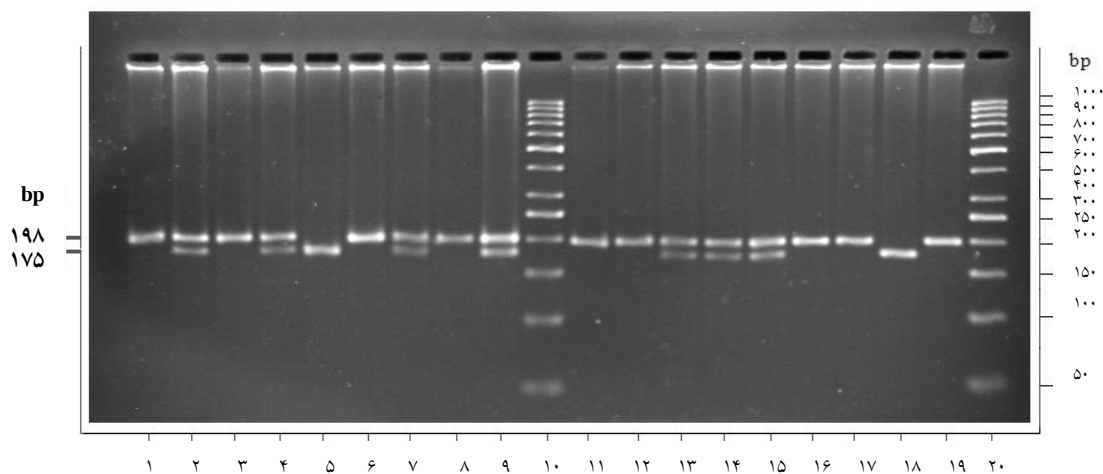
آل نرمال برای آنزیم Hinf I هیچ توالی قابل شناسایی ندارد، اما در آل جهش یافته، به علت جهش رخ داده، یک جایگاه شناسایی برای آنزیم ایجاد می شود. حاصل این تغییر، ایجاد دو قطعه ۱۷۵ bp و ۲۳ bp پس از هضم آنزیمی است. باند ۲۳ bp به علت کوچکی اندازه در ژل آگاروز ۳ درصد مشاهده نمی شود، بنابراین، ملاک بررسی برای تعیین ژنوتیپ C677T، باند ۱۷۵ bp است (شکل ۱).

جدول ۱: توالی آغازگرها، آنزیم های محدودالایر و محصولات PCR و RFLP دو پلی مورفیسم ژن MTHFR

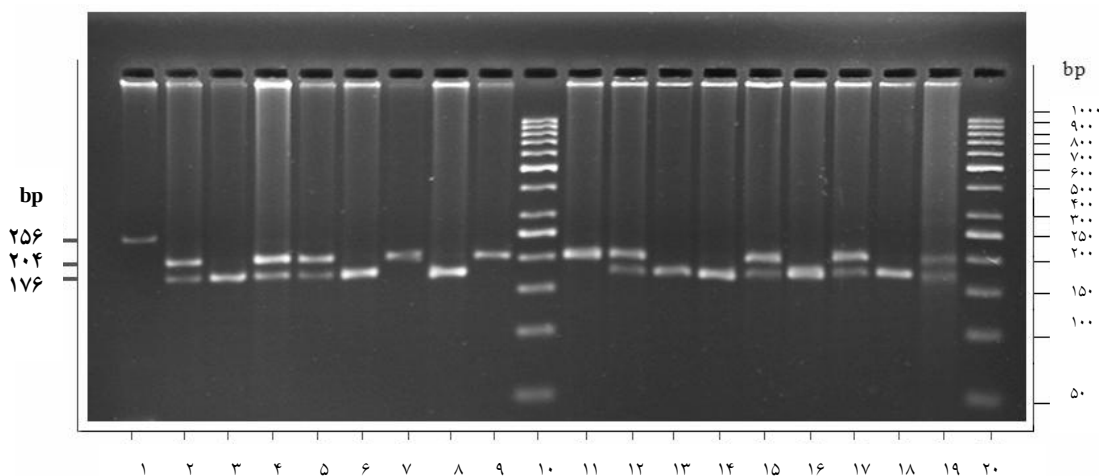
پلی مورفیسم	توالی آغازگرها	محصول PCR (bp)	آنزیم محدودالایر	محصول RFLP (bp)
MTHFR	F: 5'-CTTCTACCTGAAGAGCAAGTC-3'	۲۵۶	Mbo II	(۱۷۶، ۳۰، ۲۸، ۲۲) *
A1298C	R: 5'-CATGTCCACAGCATGGAG-3'			(۲۰۴، ۳۰، ۲۲) **
MTHFR	F: 5'-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3'	۱۹۸	Hinf I	(۱۹۸) *
C677T	R: 5'-AGGACGGTGCGGTGAGAGTG-3'			(۱۷۵، ۲۳) **

** آل موتانت

* آل نرمال



شکل ۱: نتایج الکتروفورز محصولات PCR پس از RFLP برای پلی مورفیسم C677T. ۱: نمونه محصولات PCR قبل از RFLP. ۱۶، ۱۷، ۱۹. ۲: هموزیگوت (کنترل مثبت). ۱۳، ۱۴، ۱۵. ۳: نرمال. ۱۸/۵. ۴، ۷، ۹، ۱۳، ۱۴، ۱۵. ۵: هموزیگوت. ۲۰. ۱۰: DNA Ladder (۵۰ bp). ۱۶، ۱۷، ۱۹.



شکل ۲: نتایج الکتروفورز محصولات PCR پس از RFLP برای پلی مورفیسم A1298C. ۱: نمونه محصولات PCR قبل از RFLP. ۱۴، ۱۶، ۱۸. ۲: هموزیگوت. ۱۱، ۱۳، ۱۵، ۱۷، ۱۹. ۳: نرمال. ۱۸/۵. ۴، ۷، ۹، ۱۳، ۱۴، ۱۵. ۵: هموزیگوت. ۲۰. ۱۰: DNA Ladder (۵۰ bp). ۱۶، ۱۷، ۱۹.

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 ۱۶ 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 $p < 0/05$ معنی دار تلقی گردیدند.

محصول PCR برای پلی مورفیسم A1298C نیز ۲۵۶ bp طول دارد که پس از هضم با آنزیم Mbo II، در آلل نرمال چهار قطعه و در آلل جهش یافته ۳ قطعه حاصل می شود. قطعات ۳۰، ۲۸ و ۲۲ جفت بازی، به علت کوچکی اندازه، در ژل مشاهده نمی شوند. بنابراین، ملاک بررسی برای تشخیص آلل C، مشاهده قطعه ۲۰۴ bp و برای آلل A، مشاهده قطعه ۱۷۶ bp در ژل آگاروز ۳ درصد است (شکل ۲).

یافته‌ها

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 ($p < 0/005$ و $r = 0/508$). فراوانی آلل 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، $p < 0/05$). ۱۷ نفر از زنان دچار سقط مکرر (۵۶/۷٪) 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).

جدول ۲: مقایسه ژنوتیپ‌ها و آلل‌های پلی مورفیسم C677T ژن MTHFR در زنان دچار سقط مکرر و زنان نرمال

ژنوتیپ	نمونه (n= ۳۰)	شاهد (n= ۱۰)
TT + CT	۱۷ (۵۶/۶)	۵ (۵۰)
TT	۰ (۰)	۰ (۰)
CT	۱۷ (۵۶/۷)	۵ (۵۰)
CC	۱۳ (۴۳/۳)	۵ (۵۰)
آلل		
T	۱۷ (۲۸/۴)	۵ (۲۵)
C	۴۳ (۷۱/۶)	۱۵ (۷۵)

در مقایسه بین دو گروه، در هیچ یک از ژنوتیپ‌ها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

پلی مورفیسم در ژن MTHFR بودند. تعداد افرادی که دو پلی مورفیسم MTHFR را به طور هم زمان داشتند در گروه بیماران، ۹ نفر (۳۰٪) و در گروه شاهد، ۱ نفر (۱۰٪) بودند.

جدول ۳: مقایسه ژنوتیپ‌ها و آلل‌های پلی مورفیسم A1298C ژن MTHFR در زنان دچار سقط مکرر و زنان نرمال

ژنوتیپ	نمونه (n= ۳۰)	شاهد (n= ۱۰)
CC + AC	۱۹ (۶۳/۳)	۵ (۵۰)
CC	۶ (۲۰)	۳ (۳۰)
AC	۱۳ (۴۳/۳)	۲ (۲۰)
AA	۱۱ (۳۶/۷)	۵ (۵۰)
آلل		
C	۳۵ (۴۱/۷)	۸ (۴۰)
A	۲۵ (۴۸/۳)	۱۲ (۶۰)

در مقایسه بین دو گروه، در هیچ یک از ژنوتیپ‌ها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

بحث

بررسی‌هایی که در جمعیت‌های مختلف صورت گرفته، نتایج متفاوتی را برای ارتباط میان پلی مورفیسم‌های ژن MTHFR با سندروم سقط مکرر نشان داده است. برخی مطالعه‌ها نشان داده که کمبود فولات، هایپرهموسیستینمیا و هموزیگوتی برای پلی مورفیسم‌های ژن MTHFR، عامل خطر برای سقط خود به خودی و تخریب جفت هستند. در حالی که مطالعه‌های دیگر ارتباط میان این پلی مورفیسم‌ها و سقط مکرر را نفی کرده‌اند (۱۴، ۱۳، ۵). وانگ و همکاران در چین، شیوع پلی مورفیسم‌های 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 خود به 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 677CC/1298AA در میان زنان دچار سقط مکرر، به طور معناداری پایین‌تر از گروه کنترل است (۱۵). تیرائو و همکاران نیز بر مبنای آنالیز ژنتیکی دو گروه از

فراوانی پلی مورفیسم 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 آلل 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

موضوع را در نظر گرفت که سطح هموسیستین می تواند متأثر از پلی مورفیسم C677T در ژن MTHFR و نیز کوفاکتورهای مسیر هموسیستین - متیونین همانند فولیک اسید، ویتامین B12 و ویتامین B6 باشد (۷). کمبود این عوامل نیز می تواند باعث هایپرهموسیستینمیا 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 تواند علت سقط مکرر در زنان مورد بررسی محسوب گردند.

تشکر و قدردانی

از آقایان دکتر مهران آزاده و رضا پایون در بیمارستان فوق تخصصی بقیه... (عج) و کارشناسان مرکز تحقیقات بیولوژی - مولکولی - دانشگاه علوم پزشکی بقیه... (عج) به ویژه خانم ها زهرا سفیری، فاطمه پورعلی و عذرا باقری که در انجام این مطالعه ما را یاری کردند و نیز از هم فکری های آقایان دکتر محمود جدی تهرانی و فخرالدین ریحانی ثابت در پژوهشگاه فن آوری های نوین علوم زیستی جهاد دانشگاهی - ابن سینا کمال تشکر و امتنان را داریم.

زنان تونسسی برای پلی مورفیسم های MTHFR در سال ۲۰۰۶ گزارش دادند که فراوانی ژنوتیپ های 1298AA و 677CC در زنان دچار سقط مکرر، به طور معناداری بیشتر از گروه کنترل است (۱۶). مشاهده ها در سایر نقاط جهان، کاملاً متفاوت از این یافته ها است. کارپ 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). مورالس - ماچین و همکاران در ونزوئلا نیز پس از بررسی ارتباط میان پلی مورفیسم C677T با سقط مکرر، در سال ۲۰۰۹ گزارش کردند که اختلاف معناداری را در فراوانی آللی میان زنان دچار سقط مکرر و گروه کنترل مشاهده نکردند (۱۸). یونفرد 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 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 مطالعه ها به دست آمده می تواند به علت تعریف متفاوت از سقط مکرر، تفاوت در معیارهای انتخاب نمونه و توزیع جغرافیایی باشد. بایستی این

References :

- 1- Meka A, Reddy BM. Recurrent spontaneous abortions: An overview of the Genetic and Non-Genetic backgrounds. *Int J Hum Genet* 2006; 6(2): 109-117.
- 2- James AH. Venous thromboembolism in pregnancy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29(3): 326-31.
- 3- Kupfermanc MJ. Trombophilia and pregnancy. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1: 111.
- 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, et al. ethylenetetrahydrofolate 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, et al. 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.

- 7- van der Put NM, van der Molen EF, Kluijtmans LA, Heil SG, Trijbels JM, Eskes TK, *et al.* 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, *et al.* Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Mamm Genome* 1998; 9(8): 652-6.
- 9- Bailey LB, Gregory JF 3rd. 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, *et al.* 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, *et al.* 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, *et al.* 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, *et al.* 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, *et al.* C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene as risk factor in women with recurrent abortion. *Invest Clin* 2009; 50(3): 327-33.
- 19- Hohlagschwandtner M, Unfried G, 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.

Original Article

Evaluation of the association between the C677T and A1298C polymorphisms of MTHFR gene and recurrent miscarriage

Khaleghparast A.¹, Morovvati S.², Noormohammadi Z.¹

¹Research Branch of Islamic Azad University, Tehran, Iran

²Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

Two factors known to cause thrombophilia in women with unexplained recurrent spontaneous abortion (RSA) are MTHFR polymorphisms including C677T and A1298C. This study aimed to determine the association between RSA and two polymorphisms of MTHFR in Iranian patients.

Materials and Methods

In this case-control study, 30 patients with the background of two or more consecutive unexplained abortions and 10 women with at least two live births without a miscarriage who referred to Baqiyatallah Hospital and Avicenna Infertility Clinic were analyzed for MTHFR C677T and A1298C polymorphisms by the PCR-RFLP method. Results achieved from estimating the genotype of each polymorphism were analyzed by the SPSS16. The Spearman method was also used to evaluate the correlation between the two polymorphisms.

Results

Data has shown a significant correlation between MTHFR C677T and MTHFR A1298C polymorphisms. Seventeen women (56.6%) with recurrent spontaneous abortions and 5 women (50%) among the controls were heterozygote for MTHFR C677T polymorphism. T allele frequency in the patient group was more than the control group (28.4% for patients and 25% for controls). Frequency of the MTHFR A1298C polymorphism was 63.3% in patients and 50% in controls. For A1298C polymorphism, 43.3% of patients and 20% of controls were heterozygote. Furthermore, 20% of patients and 30% of controls were homozygote for this polymorphism.

Conclusions

The prevalence of MTHFR C677T and MTHFR A1298C polymorphisms were slightly higher in RSA patients compared to controls. These findings failed to support the relationship between thrombophilia polymorphisms and the increasing risk of RSA in evaluated Iranian women.

Key words: Methylenetetrahydrofolate Reductase (NADPH2), Thrombophilia, Spontaneous Abortion, Polymorphism (Genetic)

Sci J Iran Blood Transfus Org 2011; 8 (2): 88-95

Received: 4 July 2010

Accepted: 23 Jan 2011

Correspondence: Khaleghparast A., MS of Biology-Genetics. Faculty of Science, Tehran Science and Research Branch, Islamic Azad University.
Postal Code: 157774918, Tehran, Iran. Tel: (+9821)88506576; Fax : (+9821) 88679546
E-mail: keyvan_1878@yahoo.com