

بررسی ارتباط پلی مورفیسم ژن MTHFR و سطح هموسیستئین با دیابت و چاقی

مریم پرویزی^۱، مهناز شجاع پور^۲، جواد توکلی بزاز*^۱، حبیب الله ناظم^۲، حسین فخر زاده^۱، رامین حشمت^۱، مهسا محمد آملی^۱، پروین امیری^۱

چکیده

مقدمه: پلی مورفیسم ژن MTHFR به واسطه اعمال اثر بر سطح هموسیستئین خون، نقش مهمی در پاتوفیزیولوژی چاقی و دیابت دارا می‌باشد. ارتباط معنادار و محکمی بین سطح هموسیستئین و بیماری‌های مختلفی چون بیماری‌های عروق کرونر و عروق مغزی وجود دارد.

روش‌ها: به منظور بررسی ارتباط بین پلی مورفیسم C677T ژن MTHFR در افراد چاق و دیابتی با سطح هموسیستئین سرم، ۳۱۴ نفر در ۴ گروه (چاق، دیابتی، دیابتی چاق و نرمال) بررسی شدند. ژنوتیپ افراد برای پلی مورفیسم ژن MTHFR با روش PCR-RFLP تعیین شد. سطح هموسیستئین سرم با روش DHPLC اندازه گیری شد.

یافته‌ها: سطوح سرمی هموسیستئین در افرادی که دارای ژنوتیپ TT بودند ($34/6 \pm 26/5$ mol/L) به طور معناداری بالاتر از افراد دارای ژنوتیپ CC ($15/1 \pm 8$ μmol/L) و ژنوتیپ CT ($16/4 \pm 7/8$ μmol/L) بود ($P < 0/0001$). در گروه بیماران چاق، شیوع ژنوتیپ TT و CT در افرادی که سطح هموسیستئین خونشان بیشتر از 15 μmol/L بود در مقایسه با سایر افرادی که هموسیستئین پایین‌تر از 15 μmol/L داشتند، به طور معناداری بالاتر بود (TT + CT در مقابل CC، $OR = 1/5$ ، فاصله اطمینان $95\% = 1/5 - 17/1$ ؛ $P = 0/001$). در گروه دیابتی و چاق نیز شیوع ژنوتیپ TT یا CT در افرادی که هموسیستئین خون آنها بالاتر از 15 μmol/L بود به طور معناداری از بیمارانی که هموسیستئین کمتر از 15 μmol/L داشتند، بالاتر بود (TT + CT در مقابل CC، $OR = 3/7$ ، فاصله اطمینان $95\% = 0/8 - 17/5$ ؛ $P = 0/004$).

در سایر گروه‌ها ارتباط معناداری بین سطح هموسیستئین و ژنوتیپ MTHFR یافت نشد. همچنین تفاوت معناداری نیز بین آلل MTHFR و توالی ژنوتیپ بین گروه‌های مختلف یافت نشد.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه ما همانند آنچه که در سایر مطالعات در جوامع دیگر گزارش شده است، ارتباط بین هموسیستئین خون و ژنوتیپ C667T MTHFR را تأیید کرد. همچنین ارتباط میان ژنوتیپ MTHFR و هموسیستئین سرم تنها در گروه بیماران چاق و گروه بیماران چاق دیابتی مشاهده شد و این ارتباط در سایر گروه‌ها دیده نشد. این یافته بر این نکته تأکید دارد که اثر این پلی مورفیسم بر روی فعالیت آنزیم MTHFR و متابولیسم هموسیستئین در شرایط مختلف، متفاوت می‌باشد.

واژگان کلیدی: MTHFR، پلی مورفیسم، هموسیستئین، دیابت، چاقی

۱- مرکز تحقیقات غدد درون ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۲- دپارتمان علوم، دانشگاه پیام نور واحد تهران

* **نشانی:** تهران، خیابان کارگر شمالی، بیمارستان دکتر شریعتی، طبقه پنجم، مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم، تلفن: ۸۸۲۲۰۰۳۷-۲۸
نمبر: ۸۸۲۲۰۰۵۲، پست الکترونیک: emrc@tums.ac.ir

مقدمه

هموسیستئین، اثرات مختلفی بر فعال سازی پلاکت‌ها، افزایش انعقاد پذیری، استرس اکسیداتیو، اختلال فعالیت اندوتلیال، تکثیر سلولی عضلات صاف و اکسیداسیون و پراکسیداسیون لیپیدها دارد [۱-۳].

پراکسیداسیون لیپیدها دارد [۱-۳].

Methylen Tetrahydro Folate Reductase (MTHFR) آنزیمی است که تبدیل هموسیستئین به متیونین را کاتالیز می‌کند [۴]. ژن کد کننده MTHFR در ناحیه کروموزومی 1 p 36.3 واقع شده است [۲]. پلی مورفیسم‌های متعددی در ژن MTHFR گزارش شده‌اند. Frosst و همکاران جابجایی C677T را در ژن MTHFR گزارش کردند که در نتیجه این جابجایی والین جایگزین آلانین می‌شود [۵]. این پلی مورفیسم شایع در جوامع مختلف گزارش شده است و فعالیت آنزیم را کاهش داده و منجر به افزایش هموسیستئین خون به ویژه در افراد دارای کمبود فولات می‌شود [۶].

مطالعات مختلف، ارتباط بین ژنوتیپ MTHFR C677T و افزایش خطر بیماری‌های عروق کرونر (CAD) را نشان داده اند [۹-۷]. این ارتباط در جوامع اروپایی معنادار بوده ولی نتایج متفاوتی در مطالعات شمال آمریکا مشاهده شده که ممکن است ناشی از اثرات متقابل پلی مورفیسم MTHFR و وضعیت فولات باشد [۴]. Inamoto و همکاران نشان دادند که ژنوتیپ TT با پرفشاری خون و تنگی عروق کاروتید در زنان ارتباط دارد [۸]. در سال ۱۹۹۲ و ۱۹۹۳، Guttormsen و همکاران [۱۰] ۱۸۰۴۳ نفر در گروه سنی ۴۰-۶۷ سال را از نظر ارتباط بین هموسیستئین، پلی مورفیسم C677T و سطح فولات بررسی کردند و در نهایت دریافتند که اکثر افرادی که سطح هموسیستئین خون آنها بالاتر از ۴۰ $\mu\text{mol/L}$ بود، موتاسیون C667T همراه با سطح پایین فولات داشتند. در پایان نویسندگان پیشنهاد کردند مصرف روزانه اسید فولیک با دوز پایین، سطح هموسیستئین خون را کاهش داده و به حد نرمال می‌رساند. به نظر می‌رسد که فولات می‌تواند آنزیم ناپایدار و حساس به حرارت را که محصول موتاسیون C677T است، پایدار کند [۱۱]. سطوح سرمی

بالاتر از ۴ nm/۱۱۵ nm فولات، اثر موتاسیون C667T را خنثی می‌کند [۱۲].

در یک مطالعه، Thawnashom و همکاران [۱۳]، ارتباط بین پلی مورفیسم ژن MTHFR C677 T را با غلظت سرمی هموسیستئین، فولات و ویتامین B12 در داوطلبین چاق یا دارای اضافه وزن تایلندی بررسی کردند و دریافتند که در جمعیت دارای پلی مورفیسم طبیعی ژن (wild) (CC) (type) غلظت هموسیستئین در افراد چاق یا دارای اضافه وزن به طور قابل توجهی بالاتر از گروه کنترل بود.

Terruzzi و همکاران [۱۴] انواع ژن‌های مرتبط با چاقی را بررسی کردند و پیشنهاد کردند که در افراد چاق، کیفیت چرخه هموسیستئین به وسیله MTHFR، متیونین سنتاز (MTS) و متیونین سنتاز ردوکتاز (MTR) دچار اختلال شده که شواهدی برای ارتباط بین پلی مورفیسم‌های MTHFR، MTR و MTR با چاقی می‌باشد.

مطالعات گذاشته حاکی از این هستند که مقادیر بالای هموسیستئین ($> 15 \mu\text{mol/L}$)، با افزایش خطر بیماری‌های عروق کرونر در ارتباط می‌باشد [۱۵].

هدف از این مطالعه بررسی ارتباط بین پلی مورفیسم C677T ژن MTHFR در دیابت و چاقی و همچنین ارتباط آن با سطح هموسیستئین خون در جامعه ایرانی می‌باشد.

روش‌ها

بیماران مورد مطالعه ۱۱۵ فرد مبتلا به دیابت نوع ۲ بودند. تشخیص دیابت با قند خون ناشتای بالاتر یا مساوی ۱۲۶ mg/dl در دو نوبت مجزا داده شد. معیارهای خروج از مطالعه مصرف انسولین و مثبت بودن آنتی بادی‌های ضد انسولین و یا آنتی بادی anti-GAD بودند. گروه کنترل که شامل ۶۷ نفر چاق ($\text{BMI} \leq 30 \text{ kg/m}^2$) بدون دیابت و ۷۲ نفر نرمال (بدون دیابت و چاقی) بودند نیز از جمعیت مشابه انتخاب شدند. تمام افراد فرم رضایتنامه شرکت در مطالعه را امضا کردند و پروتکل مطالعه نیز توسط کمیته اخلاق مرکز تحقیقات غدد دانشگاه تهران مورد بررسی و تأیید قرار گرفت. قد و وزن کلیه افراد دو مرتبه با استفاده از وسایل استاندارد اندازه‌گیری شده و میانگین آنها محاسبه شد و در نهایت نمایه توده بدنی (BMI) محاسبه گردید.

یافته‌ها

شیوع ژنوتیپ و آلل پلی مورفیسم ژن MTHFR در گروه‌های مختلف

توزیع آلل‌ها و ژنوتیپ‌های پلی مورفیسم ژن MTHFR بین گروه‌های مختلف مقایسه شد. هیچ تفاوت معناداری در آلل MTHFR و شیوع ژنوتیپ‌ها بین گروه‌های مختلف مشاهده نشد (جدول ۲).

افزایش قابل توجهی در میانگین سطح سرمی هموسیستئین در افراد دارای ژنوتیپ TT ($34/6 \pm 26/5$ $\mu\text{mol/L}$) در مقایسه با ژنوتیپ CC ($8 \pm 15/1$ $\mu\text{mol/L}$) یا CT ($7/8 \pm 16/6$ $\mu\text{mol/L}$) مشاهده شد که این تفاوت از نظر آماری نیز معنادار بود ($P < 0/0001$) (شکل ۱).

ارتباط بین پلی مورفیسم ژن MTHFR و سطوح خونی هموسیستئین در گروه‌های مختلف

در این مطالعه شیوع ژنوتیپ MTHFR، در بین افرادی که هموسیستئین بالاتر از $15 \mu\text{mol/L}$ و یا کمتر از $15 \mu\text{mol/L}$ داشتند با یکدیگر مقایسه شد. در گروه افراد چاق، در بین افرادی که هموسیستئین خون بالاتر از $15 \mu\text{mol/L}$ داشتند در مقایسه با افرادی که هموسیستئین خون آنها پایین‌تر از $15 \mu\text{mol/L}$ بود، تفاوت معناداری در ژنوتیپ MTHFR مشاهده شد ($P = 0/003$). همچنین در گروه افراد چاق، شیوع ژنوتیپ CT و TT به طور معناداری در افرادی که هموسیستئین خون بالاتر از $15 \mu\text{mol/L}$ داشتند، بالا بود (TT + CT در مقابل CC $OR = 5/1$ ، فاصله اطمینان $95\% = 17/1 - 1/5$ ؛ $P = 0/001$).

در گروه بیماران چاق و دیابتی، شیوع ژنوتیپ CT و TT در افرادی که هموسیستئین خون بالاتر از $15 \mu\text{mol/L}$ داشتند در مقایسه با بیمارانی که هموسیستئین زیر $15 \mu\text{mol/L}$ داشتند، به طور معناداری بالاتر بود. (TT + CT در مقابل CC $OR = 3/7$ ، فاصله اطمینان $95\% = 17/5 - 0/8$ ؛ $P = 0/04$).

در سایر گروه‌ها هیچ تفاوت معناداری بین ژنوتیپ MTHFR و مقادیر هموسیستئین سرم یافت نشد.

نمونه خون وریدی از همه شرکت‌کنندگان گرفته شد و سطح هموسیستئین خون با تکنیک HPLC تعیین گردید. از افراد تحت مطالعه نمونه خون در لوله حاوی EDTA گرفته و DNA آن استخراج شد.

آنالیز مولکولی پلی مورفیسم ژن MTHFR

برای تعیین ژنوتیپ از روش PCR - RFLP^۱ استفاده شد. توالی پرایمرها به قرار زیر بود:

5'-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3'
5'-AGGACGGTTCGGTGAGAGTG-3'

برای انجام واکنش PCR، ۱۰۰ نانوگرم از DNA ژنومی در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر که محتوی ۳ mM MgCl₂، ۰/۲۵ mM dNTP'S (Bioline)، ۵ پیکومول از هر پرایمر و ۱ واحد از Taq پلی مراز بود، به کار رفت. مراحل PCR به ترتیب زیر انجام شدند: دناتوراسیون اولیه ۴ دقیقه در ۹۴ °C، سپس برای ۳۵ چرخه در شرایط زیر قرار گرفت: ۳۰ ثانیه در ۹۴ °C، ۳۰ ثانیه در ۶۱ °C و نهایتاً ۳۰ ثانیه در ۷۲ °C و extension نهایی در ۷۲ °C به مدت ۷ دقیقه. محصول PCR (۱۹۸ bps) بر روی ژل آگارز ۲٪ که با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شده بود، مورد بررسی قرار گرفت. محصولات PCR توسط Hinf I در یک حجم نهایی ۱۵ μl که شامل ۱۰ μl محصول PCR، NE $1 \times$ بافر، ۱۰ واحد Hinf I بود، مورد هضم آنزیمی قرار گرفت و در دمای ۳۷ °C برای مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. در نهایت محصولات هضم شده بر روی ژل ۴٪ آگارز که با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شده بود، مشاهده گردید.

آنالیز آماری

قدرت ارتباط بین گروه‌ها و آلل‌های مختلف پلی مورفیسم ژن MTHFR با استفاده از نسبت شانس (OR) و فاصله اطمینان ۹۵٪ (CI) برآورد شد. میزان معنی دار بودن با آزمون‌های آماری Chi-squar و فیشر (Fisher Exact) محاسبه شد. همه روش‌های آماری با استفاده از نرم افزار STATA (ویرایش ۸) انجام گرفت.

1-Polymerase chain reaction- restriction fragment length polymorphism

جدول ۱- ویژگی‌های دموگرافیک گروه‌های مورد بررسی

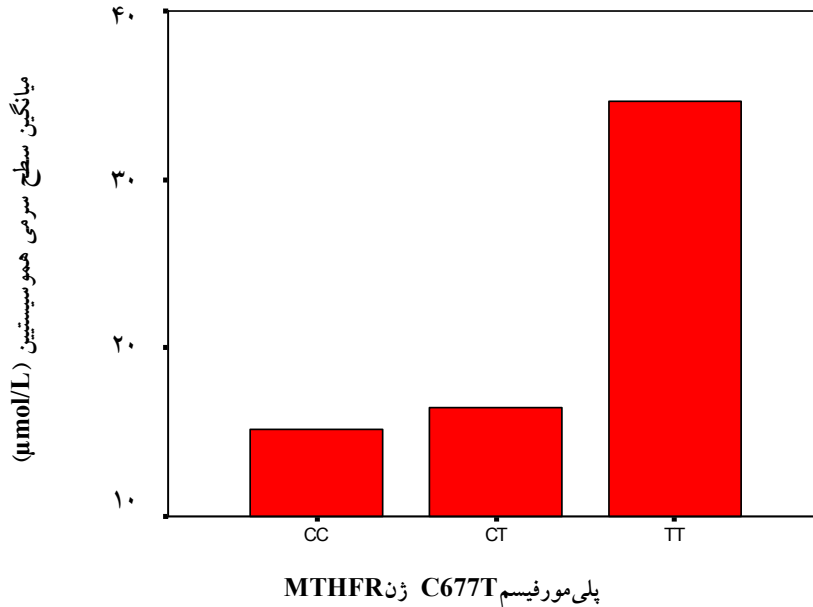
گروه	جنس	سن	نمایه توده بدنی (BMI)
نرمال (گروه کنترل)	مرد	۳۵/۲ ± ۱۱/۳	۲۴/۸ ± ۲/۹
	زن		
چاق (گروه کنترل)	مرد	۴۴/۸ ± ۱۱/۴	۳۳/۸ ± ۳/۴
	زن		
دیابتی	مرد	۵۱/۹ ± ۱۱/۳	۲۶/۱ ± ۲/۸
	زن		
چاق و دیابتی	مرد	۵۱/۰۷ ± ۱۰/۶	۳۴/۶ ± ۴/۳
	زن		

مقادیر ± نشانگر میانگین ± انحراف معیار است. نوع مطالعه مورد-شاهدی
 گروه نرمال: ۸۰ نفر
 گروه دیابتی: ۸۷ نفر
 گروه چاق: ۷۴ نفر
 گروه چاق و دیابتی: ۷۳ نفر

جدول ۲- شیوع ژنوتیپ‌های متفاوت پلی مورفیسم C677T ژن MTHFR در گروه‌های مختلف

ژنوتیپ	دیابتی چاق	دیابتی	چاق	نرمال	تعداد نمونه‌ها
CC	۵۰ (٪۶۸/۵)	۴۹ (٪۵۶/۵)	۴۴ (٪۵۹/۵)	۴۵ (٪۵۶/۳)	۸۰
CT	۱۸ (٪۲۴/۷)	۲۶ (٪۲۹/۹)	۲۱ (٪۲۸/۴)	۳۲ (٪۴۰)	۷۴
TT	۵ (٪۶/۸)	۱۲ (٪۱۳/۸)	۹ (٪۱۲/۲)	۳ (٪۳/۸)	۸۷
آلل	C	۱۱۸ (٪۸۰/۸)	۱۰۹ (٪۷۳/۶)	۱۲۲ (٪۷۶/۲)	
	T	۲۸ (٪۱۹/۱)	۵۰ (٪۷/۲۸)	۳۸ (٪۲۳/۷)	

در مقایسه هیچ یک از گروه‌ها تفاوت معنی داری مشاهده نشد (P> ۰/۰۵).
 نوع مطالعه: مورد-شاهدی



نمودار ۱- میانگین سطح هموسیستئین خون در ژنوتیپ های مختلف

تفاوت معنی داری در میانگین سطح سرمی هموسیستئین در افراد دارای ژنوتیپ TT در مقایسه با ژنوتیپ CC یا CT مشاهده شد ($P < 0.0001$).

می باشند و همچنین سطح سرمی هموسیستئین در این افراد بالاتر می باشد [۱۹ و ۱۸].

آلل T در پلی مورفیسم C677T آنزیم MTHFR، آنزیم را حساس به حرارت می کند، فعالیت آن را کاهش داده و تشکیل ۵- متیل تترای هیدروفولات که به عنوان دهنده گروه متیل در حین رمتیلاسیون^۱ هموسیستئین به متیونین استفاده می شود، را مهار می کند. همین مسأله علت بالاتر بودن مقادیر هموسیستئین در هموزیگوت TT در مقایسه با هتروزیگوت CT و هموزیگوت CC در اکثر مطالعات می باشد [۹ و ۱]. با این وجود، برخی از مطالعات نیز ارتباطی بین ژنوتیپ MTHFR و مقادیر هموسیستئین سرم نشان نداده اند [۱۶]. در یک مطالعه بین مقادیر کلی هموسیستئین و مقدار چربی بدن ارتباط مشاهده شده است [۲۰].

از آنجایی که مقاومت به انسولین با توده چربی بدن در ارتباط می باشد، به نظر می رسد که مقادیر هموسیستئین نیز

بحث

آنزیم MTHFR یک آنزیم کلیدی در متابولیسم هموسیستئین است و به نظر می رسد که نقش مهمی را در پرفشاری خون و بیماری های قلبی عروقی ایفا می کند [۱۶ و ۹]. در این مطالعه مشابه مطالعات گذشته، ارتباط معناداری بین پلی مورفیسم MTHFR با مقادیر هموسیستئین سرم در جامعه مورد بررسی یافت شد. مطالعات روی فعالیت آنزیم MTHFR نشان داده اند که C677T هتروزیگوت، ۵۶٪ فعالیت آنزیمی را در مقایسه با نوع هموزیگوت (CC) در محیط In vitro دارد و نوع هموزیگوت (TT) ۳۰٪ از فعالیت آنزیمی را دارا می باشد [۱۶].

بررسی های میکروبیولوژیک نشان داده اند که سطح فولات گلبول های قرمز در هتروزیگوت ها ۱۰ درصد و در هموزیگوت های TT ۱۸٪ پایین تر از هموزیگوت های CC می باشد [۱۷]. همچنین افراد دارای پلی مورفیسم TT، مقادیر پایین تری از فولات و ویتامین B12 سرم دارا

1- Remethylation

بین سطح هموسیستین و بیماری‌های ارگان‌های مختلف [۲۳] شامل بیماری عروق قلبی [۲۴] بیماری‌های عروق مغز [۲۵]، دمانس و آلزایمر [۲۶]، خطر شکستگی در استخوان هیپ [۲۷] و عوارض حاملگی [۲۸] وجود دارد.

یکی از محدودیت‌های مطالعه حاضر، ساختار مقطعی آن می‌باشد که مدل مناسبی برای تعیین روابط علل و معلولی نیست. همچنین محدودیت دیگر مطالعه، پایین بودن حجم نمونه است.

در این مطالعه دریافتیم که پلی مورفیسم ژن MTHFR نقش مهمی را در تعیین مقدار هموسیستین خون در افراد چاق و افراد دیابتی چاق ایفا می‌کند. این یافته با اثر این پلی مورفیسم در فعالیت آنزیم MTHFR و متابولیسم هموسیستین قابل توضیح می‌باشد. به منظور اثبات این یافته‌ها مطالعات بیشتری با حجم بالاتر در جمعیت‌های دیگر و با در نظر گرفتن فاکتورهای دخیل دیگر توصیه می‌شود.

سیاسگزاری

این پژوهش در مرکز تحقیقات غدد درون ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران و با حمایت مالی این مرکز انجام گرفته است و مولفین مراتب تقدیر و تشکر خود را از کلیه پرسنل و آزمایشگاه این مرکز اعلام می‌دارند.

با مقاومت به انسولین و دیابت مربوط باشد. اما مطالعه‌ای دیگر، ارتباطی بین توده چربی بدن و مقادیر هموسیستین نشان نداده [۲] که ممکن است به همه کنش‌های بین عوامل ژنتیکی و تغذیه‌ای که در متابولیسم هموسیستین دخیل می‌باشند مربوط باشد [۴].

حاملین آلل T در افراد چاقی که سطح هموسیستین سرمی بالایی داشتند بیشتر بوده همچنین در بیماران دیابتی چاق نیز همین وضعیت مشاهده شده است. اما ارتباطی بین ژنوتیپ MTHFR و سطح هموسیستین در افراد دیابتی لاغر و افراد نرمال مشاهده نشد. به نظر می‌رسد که ارتباط بن ژنوتیپ MTHFR و سطح هموسیستین پلاسما در شرایط مختلف متفاوت می‌باشد.

مقادیر بالای هموسیستین خون به عنوان یک عامل خطر مستقل برای آترواسکلروز عروق مغزی، کرونر و عروق محیطی به شمار می‌آید اگر چه سازوکار اثر آن به طور کامل شناخته نشده است.

یک متا آنالیز جدید بیان کرده است که در افراد دارای ژنوتیپ 677TT، احتمال ابتلای به بیماری عروق کرونر در مقایسه با ژنوتیپ CC به میزان ۱۵٪ افزایش می‌یابد [۲]. همچنین نتایج این مطالعه نشان داده‌اند که پلی مورفیسم MTHFR نقش مهمی را در پاتوفیزیولوژی چاقی و دیابت همراه با چاقی بواسطه اثرش بر سطح هموسیستین خون دارا می‌باشد. ارتباط معنادار و در بعضی موارد بسیار قوی

ماخذ

1. Refsume H, Ueland PM. Recent data are not in conflict with homocystein as a cardiovascular risk factor. *Curr Opin Lipidol* 1998;9: 533-539.
2. Outinen PA, Sood SK, Liaw PC, Sarge KD, Maeda N, Hirsh J, et al. Characterization of the stress-inducing effects of homocysteine. *Biochem J* 1998;332:213-221.
3. Upchurch GR Jr, Welch GN, Fabian AJ, Freedman JE, Johnson JL, Keane JF Jr, et al. Homocyst(e)ine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 1997;272:17012-17017.
4. Ana I. Freitas, Isabel Mendonca, Graca Guerra, Maria Brion, Roberto P. Reis, Angel Carracedo, Antonio Brehm. Methylenetetrahydrofolate reductase gene, homocysteine and coronary artery disease: The A1298C polymorphism does matter. Inferences from a case study (Madeira, Portugal). *Thromb Res* (2008), doi:10-1016/j. *Thromb Res*. 2008.02.005.
5. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthew RG, et al. A candidate genetic risk factors for vascular disease: A common mutation in

- methylenetetrahydrofolate reductase: Isolation of C_{dna}, mapping and mutation identification. *Nat Genet* 1995;10:110-3.
6. F. Rassoul, V. Richter, B. Hentschel, J. Geisel, W. Herrmann, T. Kuntze. Plasma homocysteine levels & 677C→T methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism in patients with coronary artery disease of different severity. *Indian J Med Res* 2008; 127: 154-158.
 7. Klerk M, Verhoef P, Clarke R, Blom HJ, Kok FJ, Schouten EG. MTHFR studies collaboration group. MTHFR 677C→T polymorphism and risk of coronary heart disease: a meta-analysis. *JAMA* 2002;288:2023-31.
 8. Inamoto N, Katsuya T, Kokubo Y, Mannami T, Asai T, Baba S, et al. Association of methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism with carotid atherosclerosis depending on smoking status in a Japanese general population. *Stroke* 2003;34:1628-1633.
 9. Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, Malinow MR, Andersson A, Allen RH. Total homocysteine in plasma and serum: methods and clinical applications. *Clin Biochem* 1993;93:1764-1779.
 10. Guttormsen, A. B.; Ueland, P. M.; Nesthus, I.; Nygard, O.; Schneede, J.; Vollset, S. E.; Refsum. Determinants and vitamin responsiveness of intermediate hyperhomocysteinemia (equal to or greater than 40 micromole/liter): the Hordaland homocysteine study. *J Clin Invest* 1996; 98: 2174-2183.
 11. Frosst, P.; Zhang, Z.-X.; Pai, A.; Rozen, R. The methylenetetrahydrofolate reductase (Mthfr) gene maps to distal mouse chromosome 4. *Mammalian Genome* 1996; 7: 864-869.
 12. Jacques, P. F.; Bostom, A. G.; Williams, R. R.; Ellison, R. C.; Eckfeldt, J. H.; Rosenberg, I. H.; Selhub, J.; Rozen, R. Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation* 1996; 93: 7-9.
 13. Thawnashom K, Tungtrongchitr R, Petmitr S, Pongpaew P, Phonrat B, Tungtrongchitr A, Schelp FP. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphism (C677T) in relation to homocysteine concentration in overweight and obese Thais. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2005;36(2):459-66.
 14. Terruzzi I, Senesi P, Fermo I, Lattuada G, Luzi L. Are genetic variants of the methyl group metabolism enzymes risk factors predisposing to obesity? *J Endocrinol Invest* 2007;30(9):747-53.
 15. Song C, Xing D, Tan W, Wei Q, Lin D. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism increase risk of esophageal squamous cell carcinoma in a Chinese population. *Cancer Res* 2001;61:3272-3275.
 16. Nygård O, Nordrehaug JE, Refsum H, Ueland PM, Farstad M, Vollset SE. Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 1997; 24: 337(4):230-6.
 17. Molloy AM, Daly S, Mills JL, et al. Thermolabile variant of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase associated with low red-cell folates: implications for folate intake recommendations. *Lancet* 1997;349:1591-3.
 18. Ma J, Stampfer MJ, Giovannucci E, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, dietary interactions and risk of colorectal cancer. *Cancer Res* 1997;57:1098-102.
 19. Ma J, Stampfer MJ, Christensen B, et al. A polymorphism of the methionine synthase gene: association with plasma folate, vitamin B12, homocysteine, and colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999; 8: 825-9.
 20. Gallisti S, Sudi k, Mangge H, Erwa W, Borkenstein M. Insuline is an independent correlate of plasma homocysteine levels in obese children and adolescents. *Diabetes Care* 2000; 23: 1348-1352.
 21. Jonatan R. Ruiz, Anita Hurtig-Wennlof, Francisco B. Ortega, Emma Patterson, Torbjorn K. Nilsson, et al. Homocysteine levels in children and adolescents are associated with the methylenetetrahydrofolate reductase 677C>T genotype, but not with physical activity, fitness or fatness: The European Youth Heart Study. *British J of Nutrition* 2007; 97: 255-262.
 22. Nakai K, Itoh C, Nakai K, Habano W, Gurwitz D. Correlation between C677T MTHFR gene polymorphism, plasma homocysteine levels and the incidence of CAD. *Am J Cardiovasc Drugs* 2001;1(5):353-61.
 23. Virtanen JK, Voutilainen S, Alftan G, Korhonen MJ, Rissanen TH, Mursu J, Kaplan GA & Salonen JT. Homocysteine as a risk factor for CVD mortality in men with other CVD risk factors: the Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor (KIHD) Study. *J Intern* 2005; 257: 255-262.
 24. Vrentzos GE, Papadakis JA, Malliaraki N, Zacharis EA, Mazokopakis E, Margioris A, Ganotakis ES & Kafatos A. Diet, serum homocysteine levels and ischaemic heart disease in a Mediterranean population. *Br J Nutr* 2004; 91: 1013-1019.
 25. Ford ES, Smith SJ, Stroup DF, Steinberg KK, Mueller PW & Thacker SB. Homocyst(e)ine and cardiovascular disease: a systematic review of the evidence with special emphasis on case-control studies and nested case -

- control studies. *Int J Epidemiol* 2002; 31: 59-70.
26. Seshadri S, Beiser A, Selhub J, Jacques PF, Rosenberg IH, D'Agostino RB, Wilson PW & Wolf PA. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2002; 346: 476-483.
27. McLean RR, Jacques PF, Selhub J, Tucker KL, Samelson EJ, Broe KE, Hannan MT, Cupples LA & Kiel DP. Homocysteine as a predictive factor for hip fracture in older persons. *N Engl J Med* 2004; 350: 2042-2049.
28. Hague WM. Homocysteine and pregnancy. *Best Practice Res Clin Obstet Gynaecol* 2003; 17: 459-469.