

## นิพนธ์ต้นฉบับ

# ยีนเมทีลีนเตตราไฮโดรโฟเลทรีดักเตสกับภาวะลิ่มเลือดอุดตันในหลอดเลือด

รุจิณี ปติรุพร<sup>1</sup> ปุณยนุช จินดาธรรมานุสาร<sup>2</sup> เจตนา เรืองประทีป<sup>1</sup> และ ภัสรา อาณัติ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ภาควิชาพยาธิวิทยา วิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้า <sup>2</sup>หน่วยโลหิตวิทยา กองกุมารเวชกรรม โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า

### บทคัดย่อ

**ความเป็นมา** ในปัจจุบันยังไม่พบรายงานเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างภาวะพหุสัญญาณแบบ เอ 1298 ซี ของยีนเมทีลีนเตตราไฮโดรโฟเลทรีดักเตส (เอ็มทีเฮซเอพาร์) กับความเสี่ยงของการเกิดภาวะลิ่มเลือดอุดตันในหลอดเลือดของชาวไทย **วัตถุประสงค์** เพื่อวิเคราะห์ภาวะพหุสัญญาณของ MTHFR\*A1298C ด้วยวิธี Polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) ในผู้ป่วยชาวไทยที่มีภาวะลิ่มเลือดอุดตันและในอาสาสมัครที่มีสุขภาพดี **วิธีการ** ดำเนินการวิเคราะห์ด้วยวิธี PCR-RFLP ในผู้ป่วยชาวไทยที่มีภาวะลิ่มเลือดอุดตันในหลอดเลือดจำนวน 200 รายและในอาสาสมัครชาวไทยที่มีสุขภาพดีจำนวน 102 ราย **ผลการศึกษา** พบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของภาวะพหุสัญญาณแบบ MTHFR\*A1298C ไม่มีความเกี่ยวข้องอย่างมีนัยสำคัญกับความเสี่ยงของการเกิดภาวะลิ่มเลือดอุดตันในหลอดเลือดในชาวไทย [Odds ratio (95% confidence interval) = 1.059 (0.66-1.71); p = 0.813] **สรุป** การเกิดภาวะลิ่มเลือดอุดตันในหลอดเลือดในชาวไทยไม่สัมพันธ์กับภาวะพหุสัญญาณแบบ เอ 1298 ซี ของยีนเอ็มทีเฮซเอพาร์

**คำสำคัญ:** ● ภาวะพหุสัญญาณแบบ เอ 1298 ซี ● ยีนเมทีลีนเตตราไฮโดรโฟเลทรีดักเตส ● ภาวะลิ่มเลือดอุดตันในหลอดเลือด  
**เวชสารแพทย์ทหารบก 2561;71:31-7.**

ได้รับต้นฉบับเมื่อ 22 สิงหาคม 2560 ได้ตีพิมพ์เมื่อ 10 ตุลาคม 2560

ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ พ.อ.หญิง รุจิณี ปติรุพร ภาควิชาพยาธิวิทยา วิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้า ถนนราชวิถี เขตราชเทวี กทม. 10400

## Original Article

# **Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene and Vascular Thrombosis**

Rujinee Paditaporn<sup>1</sup>, Punyanuch Jindatanmanusan<sup>2</sup>, Chetana Ruangpratheap<sup>1</sup> and Pasra Arnutti<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathology, Phramongkutklao College of Medicine; <sup>2</sup>Haematology - Oncology Unit, Division of Paediatrics, Phramongkutklao Hospital

---

### **Abstract:**

**Background:** Currently, the relationship between A1298C polymorphism of Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene and the risk of developing vascular thrombosis has not been reported in Thai people. **Objective:** To investigate the correlation between polymorphism of MTHFR gene and thrombosis in Thai people. **Methods:** MTHFR\*A1298C gene polymorphism was analysed in blood samples derived from 200 Thai patients with thrombosis and 102 healthy Thai volunteers by polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). **Results:** The genotypic variations in MTHFR\*A1298C polymorphism were not significantly associated with the risk of developing thrombosis in Thai people [Odds ratio (95% confidence interval) = 1.059 (0.66-1.71);  $p = 0.813$ ]. **Conclusion:** The development of thrombosis in Thai people is not related to A1298C polymorphism of MTHFR gene.

**Keywords:** ● A1298C polymorphism ● Methylenetetrahydrofolate reductase gene ● Vascular thrombosis

**RTA Med J 2018;71:31-7.**

### บทนำ

ภาวะลิ่มเลือดอุดตันในหลอดเลือด (Vascular thrombosis) สามารถเกิดขึ้นได้ทั้งในหลอดเลือดดำ (Vein) และหลอดเลือดแดง (Artery) ภาวะนี้พบได้ทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ สาเหตุอาจมาจากพันธุกรรม (Hereditary) หรือเกิดขึ้นมาในภายหลัง (Acquired) รวมทั้งอาจเกิดจากการมีปัจจัยเสี่ยงหลายชนิดรวมกันก็ได้ (Multicausal disease) ได้แก่ อายุ การตั้งครรภ์ การทานยาคุมกำเนิด ความอ้วน การผ่าตัด เป็นต้น<sup>1</sup> การศึกษาในคนไทยพบว่าสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดภาวะอุดตันในหลอดเลือดจากพันธุกรรมนั้นเกิดจากการมี Natural anticoagulant ในร่างกายลดลง ซึ่งเป็นการถ่ายทอดแบบ Autosomal dominant ได้แก่ Protein C, Protein S และ Antithrombin ในขณะที่การตรวจ Activated protein C resistance (APC-R) สามารถนำไปสู่การค้นพบความผิดปกติในระดับโมเลกุลของ Coagulation factor ต่างๆ ได้<sup>1-3</sup> อย่างไรก็ตามพบว่าสาเหตุทางพันธุกรรมในคนยุโรป (Caucasian) และคนเอเชีย (Asian) มีความแตกต่างกัน ยีนกลายพันธุ์ที่มีการศึกษาและพบว่าเป็นสาเหตุหลักของการเกิดภาวะลิ่มเลือดอุดตันในคนยุโรป ได้แก่ ยีน *Factor V Leiden (FVL)* ยีน *Prothrombin G20210A* และยีน *Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T* ในขณะที่คนเอเชียโดยเฉพาะในคนไทยยังมีการศึกษาเกี่ยวกับเรื่องนี้ค่อนข้างน้อย<sup>4-6</sup>

เอนไซม์ *Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)* เป็นเอนไซม์สำคัญในกระบวนการ Metabolism ของ Homocysteine มีรายงานพบเอนไซม์นี้เกิดการแปรผันของยีนแบบภาวะพหุสัณฐาน (Polymorphism) ได้บ่อย 2 ตำแหน่ง คือ ที่นิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง 677 เปลี่ยนจาก Cytosine เป็น Thymine (C677T) ทำให้ Amino acid ที่ตำแหน่ง 222 เปลี่ยนจาก Alanine เป็น Valine (A222V) ส่งผลให้การทำงานของเอนไซม์ MTHFR ลดลง ทำให้ปริมาณของ Homocysteine ในเลือดสูงขึ้น (Hyperhomocysteinaemia) และปริมาณของ Folic acid ในเลือดลดลง มีรายงานพบว่าการเปลี่ยนแปลงแบบ Homozygous (TT) จะส่งผลให้ปริมาณของ Homocysteine สูงขึ้นร้อยละ 20<sup>7</sup> การแปรผันอีกแบบเกิดที่นิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง 1,298 เปลี่ยนจาก Adenine เป็น Cytosine (A1298C) ทำให้สมรรถนะของเอนไซม์ MTHFR ลดลง การเกิด Remethylation ของ Homocysteine ไปเป็น Methioine เสียไป ส่งผลให้ระดับของ Homocysteine ในเลือดสูงขึ้นได้เช่นกัน การเกิด Polymorphism ทั้ง 2 ตำแหน่ง

มีผลทำให้เกิด Hyperhomocysteinaemia ซึ่งชักนำให้เกิดการบาดเจ็บจากภาวะออกซิเดชันของเซลล์ผนังหลอดเลือดทำให้สูญเสียความสามารถในการทำหน้าที่ของหลอดเลือดส่งผลให้เกิดกระบวนการ Atherosclerosis และเป็นปัจจัยเสี่ยงในการเกิดลิ่มเลือดอุดตัน<sup>8-12</sup>

การรายงานที่เกี่ยวข้องกับยีนที่มีผลต่อการเกิดภาวะลิ่มเลือดอุดตันในผู้ป่วยชาวไทยยังมีไม่มากนัก ก่อนหน้านี้เคยมีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับยีน *FVL* ยีน *Prothrombin G20210A* และยีน *MTHFR C677T* ในผู้ป่วยชาวไทยพบทั้งมีความสำคัญและไม่มีความสำคัญต่อการเกิดภาวะลิ่มเลือดอุดตัน<sup>4-6,13-14</sup> ซึ่งการศึกษาถึงภาวะพหุสัณฐานของยีน *MTHFR* ที่ตำแหน่ง C677T ในผู้ป่วยชาวไทยพบว่า C677T *MTHFR* gene mutation ไม่มีความสัมพันธ์กันในผู้ป่วยไทยที่มีภาวะ Deep vein thrombosis (DVT) ซึ่งอาจแตกต่างจากประชากรที่มีชาติพันธุ์อื่นๆ ที่พบว่ามีความเกี่ยวข้องกัน<sup>4</sup> แต่ยังไม่เคยมีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับภาวะพหุสัณฐานแบบ A1298C ของยีน *MTHFR* ในชาวไทยจึงเป็นเหตุให้คณะผู้วิจัยมีความสนใจที่จะศึกษาในครั้งนี้ ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในเรื่องการหาสาเหตุและความเสี่ยงของการเกิดภาวะลิ่มเลือดอุดตันในหลอดเลือดต่อไปได้

### วัตถุประสงค์

การศึกษานี้ผู้วิจัยมีความประสงค์ที่จะตรวจหาภาวะพหุสัณฐานแบบ A1298C ของยีน *MTHFR* ในกลุ่มผู้ป่วยชาวไทยที่มีภาวะลิ่มเลือดอุดตันในหลอดเลือดและในกลุ่มชาวไทยที่ไม่มีภาวะลิ่มเลือดอุดตันในหลอดเลือด โดยวิธี Polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)

### วิธีดำเนินการ

#### ระเบียบวิธีวิจัย

การศึกษานี้เป็นการวิจัยแบบเก็บข้อมูลย้อนหลัง (Retrospective cohort study) เพื่อทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างภาวะพหุสัณฐาน A1298C ของยีน *MTHFR* ต่อการเกิดภาวะลิ่มเลือดอุดตันในหลอดเลือดของชาวไทยด้วยวิธี PCR-RFLP

#### ประชากรกลุ่มตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างเลือดที่เหลือของเลือดจากผู้ป่วยชาวไทยที่มีประวัติ

ภาวะลิ้มเลือดอุดตันในหลอดเลือดจำนวน 200 ราย ซึ่งส่งมาตรวจวิเคราะห์ ณ ห้องปฏิบัติการภาควิทยาศาสตร์วิทยา วิทยาลัยแพทย-ศาสตร์พระมงกุฎเกล้า และตัวอย่างเลือดที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุมนั้นคือเลือดของชาวไทยที่ได้รับการบริจาคแต่หมดอายุการใช้งานแล้วของหน่วยธนาคารเลือด กองพยาธิวิทยา โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้าจำนวน 102 ราย โดยเลือดที่ได้รับการบริจาดังกล่าวนี้มาจากชาวไทยที่ไม่เคยมีประวัติภาวะลิ้มเลือดอุดตันในหลอดเลือด

#### การสกัดดีเอ็นเอ

นำเซลล์เม็ดเลือดขาวจากตัวอย่างเลือดทั้งสองกลุ่มดังกล่าวข้างต้นมาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ (Blood Genomic DNA Miniprep kit)

#### การวิเคราะห์จีโนไทป์ (Genotype Analysis)

การศึกษาวิเคราะห์ภาวะพหุสัณฐานแบบ A1298C ของยีน *MTHFR* โดยการทำให้ PCR-RFLP เพื่อตรวจการแปรผันของนิวคลีโอไทด์ที่เปลี่ยนจาก Adenine เป็น Cytosine (A1298C) ของลำดับเบสที่ตำแหน่ง 1298 ของยีน *MTHFR* ซึ่งใช้ Forward primer คือ 5'-CTT TGG GGA GCT GAA GGA CTA CTA-3' และ Reverse primer คือ 5'-CAC TTT GTG ACC ATT CCG GTT TG-3'

สารละลายสำหรับปฏิกิริยา PCR เตรียมในหลอดทดลองปริมาตร 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอเริ่มต้นจำนวน 4-5 นาโนกรัม, Forward primer จำนวน 30 pmole, Reverse primer จำนวน 30 pmole,  $MgCl_2$  จำนวน 1.5 mM, dNTP จำนวน 0.2 mM และ เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (KAPA Biosystem, USA) จำนวน 0.5 Unit/25  $\mu$ L reaction ส่วนปฏิกิริยา PCR ทำในเครื่อง Mastercycler pro (Eppendorf®) จำนวน 35 รอบ (Cycles) แต่ละรอบประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ได้แก่ ขั้นตอน Denaturation ใช้อุณหภูมิ 95°C นาน 30 วินาที ขั้นตอน Annealing ใช้อุณหภูมิ 62°C นาน 20 วินาที และขั้นตอน Extension ใช้อุณหภูมิ 72°C นาน 1 วินาที ทั้งหมดนี้ทำซ้ำ 35 รอบ ให้ผลผลิต PCR ขนาด 163 base pairs (bp)

จากนั้นนำผลผลิต PCR ของ A1298C *MTHFR* gene polymorphism มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme) *MboII* 5 Unit (Thermo scientific, USA) ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 18 ชั่วโมง ตรวจผลด้วยการทำ Electrophoresis ใน 4%

Agarose gel (Invitrogen, USA) โดยมี 10 base pairs DNA ladder (Biotech rabbit, Germany) เป็น DNA marker

RFLP product ของ A1298C *MTHFR* gene polymorphism จะแสดงลักษณะที่ต่างกัน 3 ลักษณะได้แก่ AA คือ Wild-type homozygote (homozygous normal allele) (56, 31, 30, 28, 18 bp fragments), AC คือ Heterozygote (84, 56, 30 bp), และ CC คือ Polymorphic homozygote (homozygous mutant) (84, 31, 30, 18 bp)

#### การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ผลการทดลองที่ได้จะถูกนำมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยการเปรียบเทียบความแตกต่างของอัตราการเกิด *MTHFR*\*A1298C polymorphism ชนิด Heterozygote ในกลุ่มคนปกติกับในกลุ่มผู้ป่วยที่มีภาวะลิ้มเลือดอุดตันในหลอดเลือดด้วย Chi-square test ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05

#### ผลการวิจัย

จากการวิเคราะห์จีโนไทป์ใน *MTHFR*\*A1298C gene polymorphism ของกลุ่มผู้ป่วยชาวไทยที่มีภาวะลิ้มเลือดอุดตันในหลอดเลือดและของกลุ่มชาวไทยที่ไม่มีภาวะลิ้มเลือดอุดตันในหลอดเลือด (Figure 1) พบว่ามี Wild-type homozygote จำนวน 97 ราย (48.5%), Polymorphic homozygote จำนวน 20 ราย (10%) และ Heterozygote จำนวน 83 ราย (41.5%)

ผลการศึกษาความถี่ของอัลลีล (Allele) ของยีน *MTHFR* ในผู้ป่วยที่มีภาวะลิ้มเลือดอุดตันในหลอดเลือดชาวไทย เทียบกับกลุ่มคนปกติ (Table 1) พบว่า ความถี่ของอัลลีลชนิด Wild type (AA) ปรากฏในกลุ่มผู้ป่วยชาวไทยที่มีภาวะลิ้มเลือดอุดตันในหลอดเลือดและในกลุ่มชาวไทยที่ปกติคือ 0.69 และ 0.71 ตามลำดับสำหรับค่าความถี่ของอัลลีลแบบ *MTHFR*\*A1298C polymorphism จะปรากฏในกลุ่มผู้ป่วยเท่ากับ 0.31 และในกลุ่มคนปกติเท่ากับ 0.29

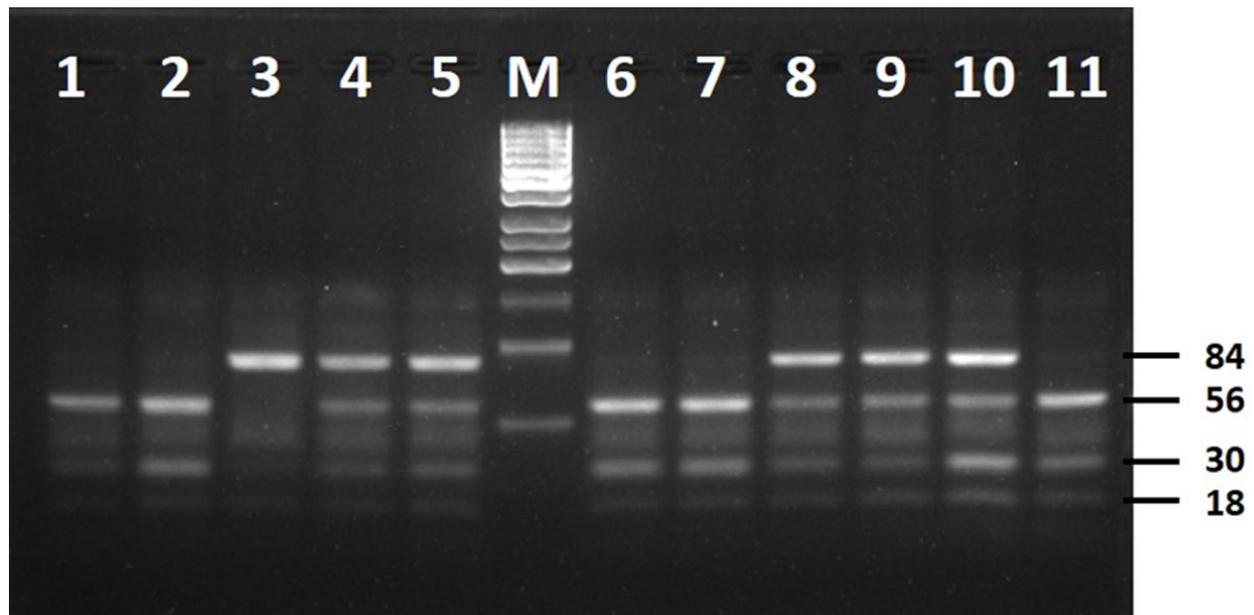
การศึกษานี้ไม่พบความเกี่ยวข้องอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างภาวะพหุสัณฐานแบบ *MTHFR*\*A1298C กับความความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะลิ้มเลือดอุดตันในหลอดเลือดในชาวไทย [Odds ratio (95% confidence interval) = 1.059 (0.66 - 1.71);  $p = 0.813$ ]

**Table 1:** ลักษณะการแปรผันของยีนแบบภาวะพหุสัณฐานของยีน *MTHFR* ในผู้ป่วยชาวไทยที่มีภาวะลิ่มเลือดอุดตันในหลอดเลือดกับชาวไทยปกติ

| Genotypes                                     | Thrombosis (n = 200) | Control (n = 102) | OR, 95%CI*           | p-value |
|---|----------------------|-------------------|----------------------|---------|
| <i>MTHFR</i> *A1298C <sup>a</sup>             |                      |                   |                      |         |
| Wild type (AA)                                | 97 (48.5%)           | 48 (47.06%)       |                      |         |
| Heterozygous (AC)                             | 83 (41.5%)           | 48 (47.06%)       | 1.059 (0.6592-1.712) | 0.813   |
| Homozygous (CC)                               | 20 (10%)             | 6 (5.88%)         |                      |         |
| Allele Frequency of <i>MTHFR</i> <sup>b</sup> |                      |                   |                      |         |
| A   | 0.69                 | 0.71              |                      |         |
| C   | 0.31                 | 0.29              |                      |         |

a = *MTHFR*, odds ratio (OR) was calculated by comparison of control individuals and vascular thrombosis groups for *MTHFR* \*A1298C; b = *MTHFR*, the frequency of C polymorphism in the vascular thrombosis cases was 0.31.

\*wild type VS heterozygote + Homozygote



**Figure 1** PCR-RFLP analysis of *MTHFR* genotype of vascular thrombosis. The PCR product was digested by *MboII* restriction enzyme, electrophoresed in 4% agarose gel, and stained with Nucleic acid gel stain (GelStar Lonza, USA). Fifty bp DNA molecular weight marker (Fermentas, Life Sciences): Lane M; Wild type: Lanes 2, 4, 5, 9, 10; Heterozygote polymorphism: Lanes 3, 6, 7, 11; and Homozygote polymorphism: Lanes 1, 8

**วิจารณ์**

โดยปกติแล้วยีน *MTHFR* จะสร้างเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการ Metabolism ของ Homocysteine ซึ่งการกลายพันธุ์ของยีนนี้จะก่อให้เกิดภาวะ Hyperhomocysteinaemia อันนำไปสู่การเกิดภาวะ Atherosclerosis ของหลอดเลือดแดงและภาวะลิ่มเลือดอุดตันในหลอดเลือดได้ตามลำดับ ในปี ค.ศ. 2015 มีรายงานการ

ศึกษาพบว่าภาวะพหุสัณฐานของยีน *MTHFR* ที่ตำแหน่ง C677T และ A1298C ในชาวอิหร่านมีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะ DVT<sup>15</sup> อย่างไรก็ตามภาวะพหุสัณฐานดังกล่าวนี้ในชาวอเมริกันไม่มีความเกี่ยวข้องอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการเพิ่มความเข้มข้นของ Total homocysteine ในพลาสมา<sup>16</sup> อีกทั้งภาวะพหุสัณฐานแบบ C677T และ A1298C ของยีน *MTHFR* ก็ไม่

พบความสัมพันธ์กับความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะ Venous thromboembolism ในสตรีชาวโรมาเนียที่ตั้งครรภ์<sup>17</sup> ซึ่งการศึกษาในผู้ป่วยชาวไทยที่มีภาวะ DVT พบว่าการเกิด C677T *MTHF* gene mutation ไม่มีความสัมพันธ์กับการเกิดภาวะลิ่มเลือดอุดตันในหลอดเลือด<sup>4</sup> สำหรับรายงานการศึกษาเกี่ยวกับภาวะพหุสัณฐานแบบ A1298C ของยีน *MTHFR* นั้น พบว่าการกลายพันธุ์แบบ Heterozygous ไม่มีความสัมพันธ์กับการเกิดภาวะลิ่มเลือดอุดตันในหลอดเลือดของชาวตุรกี<sup>18,19</sup> และการกลายพันธุ์แบบ Homozygous ก็ไม่มีความสัมพันธ์กับการเกิด Cerebral venous thrombosis ในชาวอิหร่าน<sup>20,21</sup> ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ก็สอดคล้องกับรายงานการศึกษาดังกล่าวข้างต้น เมื่อพิจารณาถึงเชื้อชาติอาจกล่าวได้ว่าภาวะพหุสัณฐานแบบ *MTHFR*\*A1298C สามารถพบได้ทั้งในชาวยุโรปและชาวเอเชีย โดยภาวะพหุสัณฐานดังกล่าวนี้อาจไม่มีความเกี่ยวข้องกับความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะลิ่มเลือดอุดตันในหลอดเลือดของประชากรทั้งสองเชื้อชาติ อย่างไรก็ตามจำแนกกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษานี้ยังนับว่ามีจำนวนน้อยเมื่อเทียบกับประชากรไทยทั้งประเทศ ดังนั้นหากมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยใช้กลุ่มตัวอย่างชาวไทยที่มีจำนวนเพิ่มมากขึ้น อาจทำให้สามารถสรุปได้แน่นอนว่าการเกิดภาวะลิ่มเลือดอุดตันในหลอดเลือดของชาวไทยมีความเกี่ยวข้องกับภาวะพหุสัณฐานของยีน *MTHFR* หรือไม่

### สรุป

ภาวะพหุสัณฐานแบบ A1298C ของยีน *MTHFR* ที่พบในชาวไทยไม่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการเกิดภาวะลิ่มเลือดอุดตันในหลอดเลือด

### เอกสารอ้างอิง

- Fritsma GA. Hemostasis and thrombosis. In: Rodak BF. Ed. Hematology clinical principles and applications. 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: W.B. Saunders. 2002:607-768.
- Martinelli NC, Santos KG, Biolo A, La Porta VL, Cohen CR, Silvello D, et al. Polymorphisms of endothelial nitric oxide synthase gene in systolic heart failure: an haplotype analysis. Nitric Oxide. 2012;26:141-7.
- Mannucci PM, Franchini M. Classic thrombophilic gene variants. ThrombHaemost. 2015;114:885-9.
- Angchaisuksiri P, Pingsuthiwong S, Sura T, Aryuchai K, Busabaratana M, Atichartakam V. Prevalence of the C677T methylenetetra - hydrofolatereductase mutation in Thai patients with deep vein thrombosis. ActaHaematol. 2000;103:191-6.
- Angchaisuksiri P, Pingsuthiwong S, Aryuchai K, Busabaratana M, Sura T, Atichartakam V, et al. Prevalence of the G1691A mutation in the factor V gene (factor V Leiden) and the G20210A prothrombin gene mutation in the Thai population. Am J Hematol. 2000;65:119-22.
- Prayoonwivat W, Amutti P, Hiyoshi M, Nathalang O, Suwanasophon C, Kokaseam R, et al. Detection of factor V Leiden in Thai patients with venous thrombosis. Asian Pac J of Allergy Immunol. 2000;18:105-8.
- Bozokçetintaş V, Gündüz C. Association between polymorphism of *MTHFR* c.677C>T and risk of cardiovascular disease in Turkish population: a meta-analysis for 2.780 cases and 3.022 controls. MolBiol Rep. 2014;41:397-409.
- Simone B, De Stefano V, Leoncini E, Zacho J, Martinelli I, Emmerich J, et al. Risk of venous thromboembolism associated with single and combined effects of Factor V Leiden, Prothrombin 20210A and Methylenetetrahydrofolatereductase C677T: a meta-analysis involving over 11,000 cases and 21,000 controls. Eur J Epidemiol. 2013;28:621-47.
- Gohil R, Peck G, Shama P. The genetics of venous thromboembolism. A meta-analysis involving approximately 120,000 cases and 180,000 controls. ThrombHaemost. 2009;102:360-70.
- Ghaffari K, Ghasemi A, Ghotaslou A, Mohammadi M, Salmanpour Z. Correlation between C677T and A1298C Mutations on the *MTHFR* Gene with Plasma Homocysteine Levels and Venous Thrombosis in Pregnant Women at Risk of Thrombosis. Zahedan J Res Med Sci. 2015;15:29-34.
- Wayne TF, Jr. Methylenetetrahydrofolatereductase C677T polymorphism, venous thrombosis, cardiovascular risk, and other effects. Angiology. 2015;66:401-4.
- Zhang P, Gao X, Zhang Y, Hu Y, Ma H, Wang W, et al. Association between *MTHFR* C677T polymorphism and venous thromboembolism risk in the Chinese population: a meta-analysis of 24 case-controlled studies. Angiology. 2015;66:422-32.
- Amutti P, Hiyoshi M, Prayoonwivat W, Nathalang O, Suwanasophon C, Kokaseam R, et al. Coagulation Factor V Leiden mutation was detected in the patients with activated protein C resistance in Thailand. ThrombHaemost. 1998;80:344-5.
- Amutti P, Prayoonwivat W, Nathalang O, Lumkul R, Pulket C. Laboratory approach in Thai patients with venous thrombosis. J Med Assoc Thai. 2005;88(Suppl 3):116-20.
- Hosseini S, Kalantar E, Hosseini MS, Tabibian S, Shamsizadeh M, Dorgalaleh A. Genetic risk factors in patients with deep venous thrombosis, a retrospective case control study on Iranian population. Thromb J. 2015;13:35.

16. Hanson NQ, Aras O, Yang F, Tsai MY. C677T and A1298C polymorphisms of the are not associated with Methylenetetrahydrofolate reductase gene: Incidence and effect of combined genotypes on plasma fasting and post-methionine load homocysteine in vascular disease. *Clinical Chemistry* 2001;47:661-6.
17. Coriu L, Ungureanu R, Talmaci R, Uscatescu V, Cirstoiu M1, Coriu D2, Copaciu E. Hereditary Thrombophilia and thrombotic events in pregnancy: single-center experience. *J Med Life*. 2014;7:567-71.
18. Demirok G, Kocamaz MF, Topalak Y, Sengün A, Hasanreisoglu B. Unilateral sequential papillophlebitis and central retinal artery occlusion in a young healthy patient. *Indian J Ophthalmol*. 2015;63:921-4.
19. Fatih A, Dilek Gürlek Gökçebay, Betül Tavil, Pamir Işık, Bahattin Tunç, Duygu Uçkan. Venous Thromboembolism after Allogeneic Pediatric Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Single-Center Study. *Turk J Haematol*. 2015;63:921-4.
20. Habib G, Zahra S, Shahram S, Soltanpour MS. Association study of methylenetetrahydrofolate reductase A1298C mutation with cerebral venous thrombosis risk in an Iranian population. *Int J Appl Basic Med Res*. 2015;5:172-6.
21. Ghaznavi H, Soheili Z, Samiei S, Soltanpour MS. Plasma homocysteine levels, methylenetetrahydrofolate reductase A1298C gene polymorphism and risk of retinal vein thrombosis. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2016;27:679-83.

