



ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Tıp Derg.
2015; 29 (2): 69 - 73
<http://www.fusabil.org>

MTHFR Geni C677T ve A1298C Polimorfizmlerinin Diyabetik Nöropati Etiyopatogenezindeki Rolü^{*,**}

Mine BALASAR
Mahmut Selman YILDIRIM

Necmettin Erbakan Üniversitesi,
Meram Tıp Fakültesi,
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı,
Konya, TÜRKİYE

Amaç: Bu çalışmada MTHFR geni C677T ve A1298C polimorfizmlerinin diyabetik periferik polinöropati patogeneze katkısı olup olmadığını araştırdık.

Gereç ve Yöntem: Hasta grubu, Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Endokrinoloji Polikliniğine başvuran, en az 10 yıldır Tip 2 DM tanısı nedeniyle takip edilen ve ENMG tetkiklerinde Diyabetik Periferik Polinöropatisi olan 103 hastadan oluşturuldu. Kontrol grubu ise 2010 yılında Konya ilinde yaşayan rastgele seçilmiş 100 sağlıklı gönüllüden seçildi. Hasta ve kontrol grubundan yazılı onay alındıktan sonra kanları alındı. Pyrosequence tekniği ile MTHFR geni C677T ve A1298C polimorfizmleri araştırıldı.

Bulgular: Araştırmamızda diyabetik nöropatili bireyler ile sağlıklı kontrol grubu karşılaştırıldığında MTHFR geni C677T ve A1298C polimorfizmlerinin genotip ve allel frekansları için istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamadı. Bununla birlikte 2 ve daha fazla mutant alleli olan bireylerin, 1 ve daha az mutant alleli olan bireylerle karşılaştırıldığında diyabetik nöropati grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde ($P=0.01$) yüksek olduğu tespit edildi.

Sonuç: Tip 2 DM hastalarında MTHFR geni C677T ve A1298C polimorfizmleri, polimorfik allel sayısı arttıkça diyabetik periferik polinöropati gelişimine yatkınlık sağlayabilir. Ancak diyabetik periferik polinöropatilerin poligenik doğası ve çevresel faktörlerden etkilenmesi, MTHFR gen polimorfizmlerinin tek başına etkisini ortaya koymayı zorlaştırmaktadır. Bu nedenle hasta ve kontrol gruplarının daha fazla sayıda olduğu, farklı etnik grupları içeren, çok merkezli daha geniş ölçekli araştırmalarla diyabetik periferik polinöropatilerin genetik nedenleri aydınlatılabilir.

Anahtar Kelimeler: Diabetes Mellitus, diyabetik polinöropati, genetik polimorfizm, pyrosequencing

The role of MTHFR C677T and A1298C Polymorphisms in the Etiopathogenesis of Diabetic Neuropathy

Objective: In this study, we investigated whether MTHFR gene C677T and A1298C polymorphisms contribute to the etiopathogenesis of diabetic peripheral neuropathies.

Materials and Methods: The patients group was constituted 103 individuals with diabetic peripheral polyneuropathy diagnosed by electrophysiological techniques who were followed the diagnosis of type 2 DM at least 10 years at the Selçuk University Meram Medical School, Department of Internal Medicine. The control group was constituted 100 healthy volunteers randomly selected and living in Konya. Blood samples were collected after written consent from patients and control group. MTHFR gene C677T and A1298C polymorphisms was investigated using pyrosequence technique.

Results: In our study, there was not found any statistically significant differences allele and genotype frequencies of MTHFR gene C677T and A1298C polymorphisms when patient and control groups were compared. Nevertheless, the number of individuals who had 2 or more the mutant allele in the patients group were significantly higher than the control group, compared with the number of individuals who had 1 and less than the mutant allele ($P=0.01$).

Conclusion: As the number of polymorphic alleles of MTHFR gene C677T and A1298C polymorphisms in type 2 DM patients may predispose to the development of diabetic peripheral polyneuropathy. But, polygenic nature of diabetic peripheral polyneuropathy and influenced of environmental factors makes it difficult to reveal the effect of MTHFR gene polymorphisms in diabetic peripheral polyneuropathy. Thus the genetic causes of diabetic peripheral polyneuropathies may be elucidated by large-scale multi-center studies containing different ethnic groups and consisting of more individuals.

Key Words: Diabetes Mellitus, diabetic polyneuropathy, genetic polymorphism, pyrosequencing

Giriş

Tip 2 DM hastalığı, akut ve kronik komplikasyonları nedeniyle yüksek mortalite ve morbiditeye sahip olan ve tüm dünyada oldukça yaygın görülen bir metabolizma hastalığıdır (1). Bu nedenle WHO, diyabet hastalığını 21. yüzyılın en önemli halk

Geliş Tarihi : 02.10.2015
Kabul Tarihi : 06.10.2015

Yazışma Adresi Correspondence

Mine BALASAR
Necmettin Erbakan
Üniversitesi,
Meram Tıp Fakültesi,
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı,
Konya - TÜRKİYE

minebalasar@hotmail.com

* European Cytogenetics Conference, 31 May-3 June 2014, Milano/ITALY.

** Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir (Proje No: 11102003).

sağlığı sorunu olarak ilan etmiştir (2). Tip 2 DM hastalığı, etiopatogenezinde çevresel ve genetik birçok faktörün suçlanması nedeniyle multifaktöryel bir hastalık olarak tanımlanmaktadır (3, 4). DM hastalığının yalnız gelişimi değil komplikasyonlarının oluşumunda da genetik yatkınlık olabileceği yönünde araştırmalar devam etmektedir.

Tip 2 DM'in vasküler komplikasyonlarına neden olabilecek genler arasında MTHFR geni de yer almaktadır (4).

Diyabetik nöropatiler, diyabet hastalığının kronik ve mikrovasküler komplikasyonlarından olup hastalığın morbidite ve mortalitesini artırmaktadır. Diyabetik nöropatiler içinde en yaygın gözlenen grup kronik sensorimotor distal simetrik polinöropatilerdir (DPN). DPN genellikle ayak ülserleri ile başlayıp, gangren ve organ kayıplarına kadar ilerleyebilmekte, hastanın yaşam kalitesini olumsuz yönde etkileyen nontravmatik ekstremitte amputasyonlarının yaklaşık %50-75'inden de sorumlu tutulmaktadır (5).

MTHFR geni, MTHFR enzimini kodlayan, 1 no'lu kromozomun telomer bölgesine (1p36.3) yerleşmiş fonksiyonel bir gendir. MTHFR geninin en yaygın polimorfik bölgeleri olan C677T ve A1298C bölgelerindeki değişiklikler DM hastalarındaki mikrovasküler komplikasyonlar ile ilişkilendirilmektedir (4). Literatürde MTHFR polimorfizmlerinin diabetik retinopati (6), diyabetik nefropati (7) gibi mikrovasküler komplikasyonların gelişimi için risk faktörü olduğuna ilişkin birçok yayın olmasına karşın MTHFR polimorfizmleri ile DPN gelişimi arasında ilişki durumunu araştıran oldukça az çalışma mevcuttur (8).

Bu çalışmada, DPN gelişen diyabet hastalarında ve sağlıklı gönüllülerde, MTHFR genindeki C677T ve A1298C polimorfizmleri araştırılarak, DPN gelişiminde bu polimorfizmlerin etkisinin var olup olmadığını ortaya çıkarmak amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Çalışma için Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi'ne bağlı Etik Kurul komisyonundan onay alınmış (24.11.2010 tarih ve 2010/162 sayılı etik kurul kararı) ve çalışmaya dahil edilen hastalardan ve kontrollerden onamları alınmıştır.

Hasta Grubu ve Kontrol Grubu: Hasta grubu, en az 10 yıldır tip 2 DM tanısı nedeniyle takip edilen ve elektronöromiyografi (ENMG) tetkiklerinde diabetik periferik polinöropatisi olan 103 hastadan oluşmaktadır. Hastalarda herhangi bir otoimmün hastalık ve nörolojik hastalık (DPN dışında) yoktu. Kontrol grubu ise rastgele seçilmiş 100 sağlıklı gönüllüden oluşmaktadır. Sağlıklı gönüllülerin hiçbirinde otoimmün, kardiyovasküler, nörolojik veya diğer sistemleri tutan kronik bir hastalık yoktu.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR): Hasta ve kontrol grubundaki bireylerden DNA izolasyonu EZ1

Blood 200µl Kit (Qiagen, Almanya) kullanılarak ile Bio Robot EZ1 (Qiagen, Almanya) cihazında otomatik olarak yapılmıştır. Elde edilen DNA'ların miktarları Nanodrop 2000 spektrofotometre (Thermo scientific, USA) cihazı ile ölçüldü. DNA konsantrasyonu ortalama 50 µL/ mL olacak şekilde ayarlandı. Her bir birey için 20 µL'lik PZR (PZR Master Mix 12.5 µL, PZR primerleri 1 µl ve RNaz içermeyen distile su 6.5 µL) reaksiyon karışımı hazırlandı. Bu karışıma her bireyin kendisine ait DNA'sından 5 µL eklendi. Son karışım ısı-döngü cihazına (Primus 96 plus, MWG AG Biotech, Almanya) konarak MTHFR C677T ve A1298C için belirlenen PZR protokolüne uygun program ile PZR çalışması yapıldı. PZR protokolü ise 95°C'de 15 dakika aktivasyon basamağından sonra, bir siklusu 94°C'de 30 saniye (denatürasyon), 60°C'de 30 saniye (bağlanma) ve 72°C'de 30 saniye (uzama) olmak üzere toplam 45 siklus yapıp, 72°C'de 10 dakika süren son uzama basamağından oluştu. Negatif kontrol olarak, DNA yerine 5 µL distile su kullanıldı. PZR sonucu oluşan MTHFR C677T ürünü (amplikon) 127 bp. A1298C ürünü ise 218 bp uzunluğundaydı.

Payrosekans: PZR ürünlerinin streptavidin sefaroz boncukları ile karşılaştırma işlemi üretici firmanın önerileri doğrultusunda yapıldı. Pyromark Q24 cihazında analiz işlemleri tamamlandı ve MTHFR C677T ve A1298C polimorfik bölgelerinin genotipleri belirlendi.

İstatistiksel Analiz: Araştırmadan elde edilen tüm veriler, bilgisayar ortamında SPSS 17.0 paket programı kullanılarak analiz edildi. Çalışmamızda, genotip ve allel frekansları Hardy-Weinberg eşitliği esas alınarak hesaplandı. MTHFR C677T ve A1298C genotipleri hem diabetik nöropati hemde kontrol gruplarındaki oranları tespit edildi ve bu genotiplerin hastalık gelişimine etkisi istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Bireylerdeki mevcut genotipin hastalık durumunu etkileyip etkilemediğini (kategorik veriler) belirlemek için ise ki-kare bağımsızlık test istatistiği ve Fisher testi kullanıldı. Bütün test sonuçlarında, P<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular

Çalışmaya yaş ortalaması 59.4±8.6 (40-82) yıl olan toplam 103 diyabetik polinöropati hastası ile yaş ortalaması 49.8±7.9 (37-84) yıl olan toplam 100 sağlıklı birey dahil edildi. Gruplardaki kadın-erkek dağılımı Tablo 1'de verilmiştir. Çalışmadaki MTHFR geni rs1801133 tek nükleotid polimorfizmi (SNP) (C677T) ve MTHFR geni rs1801131 SNP (A1298C) genotiplerinin allel sıklıklarının Hardy Weinberg eşitliğine uyduğu gözlemlendi.

Allel Frekansları: Hasta ve kontrol grubundaki MTHFR geni C677T ve A1298C polimorfik bölgelerinin allel dağılımı Tablo 2'de gösterilmiştir. Hasta ve sağlıklı kişiler arasında hem MTHFR C677T ve hem de MTHFR A1298C allel frekansları ve oranları bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki gözlenmedi (P>0.05).

Tablo 1. Hasta ve kontrol grubunda kadın-erkek olguların veri dağılımı

	Cinsiyet				Toplam
	Kadın		Erkek		
	n	%	n	%	
Hasta	57	58	46	43.8	103
Kontrol	41	42.0	59	56.2	100
Toplam	98	100.0	105	100.0	203

Genotip Frekansları: Gruplardaki MTHFR geni C677T ve A1298C polimorfik bölgelerine ait genotip dağılımı Tablo 3'de verilmiştir. Gruplar arasında genotip dağılımı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmedi ($P>0.05$).

Birleşik Genotip Frekansları: Hasta ve kontrol grupları arasında, MTHFR geni C677T ve A1298C polimorfik bölgelerine ait birleşik genotiplerinin dağılımı bakımından istatistiksel olarak anlamlı ($P>0.05$) bir ilişki bulunmadı (Tablo 4). İki polimorfik bölge için homozigot normal genotipler olan CC ve AA genotipleri ise kontrol grubunda hasta grubuna göre daha yüksek oranda görülmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı tespit edilmedi.

İki ve Daha Fazla Mutant Allel Taşıyanlar: Hasta ve kontrol grubunda MTHFR geni C677T ve A1298C polimorfizmlerine ait en fazla 1 mutant allel taşıyanlar ile en az 2 mutant allel taşıyanlar karşılaştırılmış olup (Tablo 5), hasta grubunda sağlıklı kontrol grubuna göre 2 ve daha fazla mutant allel taşıyan sayısının istatistiksel olarak yüksek olduğu tespit edildi ($P<0.05$).

Tablo 2. Hasta ve sağlıklı kişilerdeki MTHFR C677T ve MTHFR A1298C allel frekans ve oranlarının karşılaştırılması

MTHFR C677T		Hasta	Kontrol	Toplam	P
ALLEL	C	n	134	137	271
		%	65.0	68.5	66.75
	T	n	72	63	135
		%	35.0	31.5	33.25
	Toplam	n	206	200	406
		%	100.0	100.0	100.0
MTHFR A1298C		Hasta	Kontrol	Toplam	P
ALLEL	A	n	116	130	246
		%	56.3	65.0	60.6
	C	n	90	70	160
		%	43.7	35.0	39.4
	Toplam	n	206	200	406
		%	100.0	100.0	100.0

Tablo 3. MTHFR C677T ve MTHFR A1298C polimorfizmleri için hasta ve kontrol grubunda normal, heterozigot ve homozigot genotip verilerinin karşılaştırılması

MTHFR C677T		Hasta	Kontrol	Toplam	P
Normal	n	45	45	90	0.429
CC	%	43.7	45.0	44.3	
Heterozigot	n	44	47	91	
CT	%	42.7	47.0	44.8	
Homozigot	n	14	8	22	
TT	%	13.6	8.0	10.8	
Toplam	n	103	100	203	
	%	100.0	100.0	100.0	
MTHFR A1298C		Hasta	Kontrol	Toplam	P
Normal	n	34	43	77	0.216
AA	%	33.0	43.0	37.9	
Heterozigot	n	48	44	92	
AC	%	46.6	44.0	45.3	
Homozigot	n	21	13	34	
CC	%	20.4	13.0	16.7	
Toplam	n	103	100	203	
	%	100.0	100.0	100.0	

Tablo 4. Hasta ve kontrol grubunda MTHFR C677T ve MTHFR A1298C polimorfizmlerinin birleşik genotip analizinin değerlendirilmesi

MTHFR C677T / A1298C	Hasta		Kontrol		Toplam		P
	n	%	n	%	n	%	
TT/CC	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0.258
Homozigot/ Homozigot							
CT/CC	1	0.95	0	0.0	1	0.5	
Heterozigot/ Homozigot							
CC/CC	20	19.4	14	14.0	34	16.74	
Normal/ Homozigot							
TT/AC	1	0.95	0	0.0	1	0.5	
Homozigot/ Heterozigot							
CT/AC	29	28.5	22	22.0	51	25.12	
Heterozigot/ Heterozigot							
CC/AC	18	17.5	22	22.0	40	19.70	
Normal/ Heterozigot							
TT/AA	13	12.6	8	8.0	21	10.34	
Homozigot/Normal							
CT/AA	14	13.6	25	25.0	39	19.2	
Heterozigot/Normal							
CC/AA	7	6.8	9	9.0	16	7.9	
Normal/Normal							
Toplam	103	100.0	100	100.0	203	100.0	

Tablo 5. Hasta ve kontrol gruplarında, en fazla 1 mutant allel taşıyanlar ile en az 2 mutant allel taşıyanların karşılaştırılması

MTHFR C677T / A1298C	Hasta		Kontrol		Toplam		P
	n	%	n	%	n	%	
MUTANT 2≥	64	62.0	44	44.0	108	53.0	0.010
MUTANT 1≤	39	38.0	56	56.0	95	47.0	
Toplam	103	100.0	100	100.0	203	100.0	

Tartışma

Diabetes Mellitus, hiperglisemi ile seyreden ve en sık görülen sistemik bir metabolizma hastalığıdır. Hastaların büyük çoğunluğunda ortaya çıkan akut ve kronik komplikasyonlar ile ciddi mortalite ve morbiditeye neden olabilmektedir (3). Son 20 yılda yapılan çalışmalar, genomdaki belirli bölgelerdeki polimorfizmlerin tip 2 DM hastalarında vasküler hasar gelişme riskini artırdığını göstermiştir. Bu polimorfik genlerden birisi de *MTHFR* genidir. *MTHFR* C677T polimorfizminin tip 2 DM hastalarında, koroner kalp hastalığı (9), inme (10) ve periferik arteriyel hastalık gelişme riskini artırdığı ile ilgili yayınlar (11) mevcuttur. Literatürde tip 2 diyabetin mikrovasküler komplikasyonları ile *MTHFR* polimorfizmlerinin ilişkisi üzerine yapılan çalışmalarda *MTHFR* C677T polimorfizminin tip 2 DM'li hastalarda diyabetik nefropati (12) ve retinopati (13) için genetik bir risk faktörü olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Ancak *MTHFR* geni C677T polimorfizmlerinin tip 2 DM'in mikrovasküler komplikasyonları ile ilişkisi olduğunu belirten yayınlar da mevcuttur (14, 15).

Ukinç ve ark. (7)'nin yaptığı bir çalışmada ise *MTHFR* C677T polimorfizminin diyabetin mikrovasküler komplikasyonları ile ilişkisi araştırılmış ve bu amaçla daha önce makrovasküler komplikasyon öyküsü olmayan tip 2 DM hastalarında retinopati, nefropati ve nöropati

gelişimi ile birlikte *MTHFR* C677T genotipini karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada *MTHFR* C677T polimorfizminin diyabetin mikrovasküler komplikasyonlarından nöropati ve retinopati ile ilişkisi bulunamazken, nefropati gelişimine katkıda bulunduğu sonucuna ulaşılmıştır. Ambrosch ve ark. (16)'nın yaptıkları bir çalışmada tip 2 DM hastalarında *MTHFR* geni C677T polimorfizminin diyabetik nöropati gelişimine etkisinin olmadığı, artmış homosistein düzeylerinin ise ilişkili olabileceği sonucuna varılmıştır. Her ne kadar çalışmamızdaki diyabetik nöropati grubunda *MTHFR* C677T polimorfizmi için mutant T allel frekansı kontrol grubundan yüksek olsa da istatistiksel olarak diyabetik nöropati ile ilişkisi bulunmamıştır. Benzer şekilde çalışmamızda hasta ve kontrol grubunda *MTHFR* geni C677T polimorfizmi için homozigot mutant genotip (TT) frekansında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmamakla beraber hasta grubunda daha yüksek oranda olduğu tespit edilmiştir. Literatürde tip 2 DM'in mikrovasküler komplikasyonlarının *MTHFR* C677T ve A1298C polimorfizmlerinin her ikisi ile ilişkisini beraber araştıran yayınlar da mevcut olup, bazı yayınlar A1298C polimorfizminin diyabetik nefropati gelişiminde bir risk faktörü olduğunu tespit ederken (17), diğerleri ise etkisinin olmadığı yönünde gözlemlerde bulunmuştur (18, 19).

Literatürde tip 2 diyabetin mikrovasküler komplikasyonları ile *MTHFR* polimorfizmlerinin ilişkisi

üzerine yapılan çalışmalar olmakla birlikte özellikle diyabetik polinöropati gelişiminde *MTHFR* geninin hem C677T ve hem de A1298C polimorfizmlerinin incelendiği bir çalışma mevcut değildir. Çalışmada hasta grubunda *MTHFR* A1298C polimorfik bölgesindeki homozigot mutant genotip (CC) frekansı ve mutant C allel frekansı yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir.

Gruplar arasında en fazla 1 mutant allele sahip birey sayıları ile 2 ve daha fazla mutant allele sahip birey sayıları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilmiştir. Diyabetik nöropati grubunda 2 ve daha fazla mutant allele sahip birey sayısı anlamlı bir şekilde yükseldi. Bu durum mutant allel sayısı arttıkça diyabetik nöropati gelişimine yatkınlık sağlayabileceği yönünde yorumlanmakla birlikte *MTHFR*

polimorfizmlerinin diyabetik polinöropati etiopatogeneze katkısı olup olmadığını kesin olarak açıklayamamaktadır.

Multifaktöryel bir hastalık olan tip 2 diyabetin vasküler komplikasyonlarının poligenik doğası, çeşitli çevresel faktörlerle etkileşim halinde olması, *MTHFR* gen polimorfizmlerinin tek başına etkisini ortaya koymayı zorlaştırmaktadır. Hasta ve kontrol gruplarının daha fazla sayıda olduğu, farklı etnik grupları içeren, çok merkezli ve hatta tüm genomun SNP taramalarının yapılacağı daha geniş ölçekli araştırmalarla diyabetik polinöropatilerin poligenik doğası aydınlatılabilir. Böylece erken tanı koyarak hastalığın gelişmesini önlemek mümkün olabilir veya hedefe yönelik daha etkin tedaviler geliştirilebilir.

Kaynaklar

1. Hilary K, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995-2025. *Diabetes Care* 1998; 21: 1414-1431.
2. WHO. "Diabetes programme". <http://www.who.int/features/factfiles/diabetes/en/index.html/29.09.2015>.
3. Gloyn AL, McCarthy MI. The genetics of type 2 diabetes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2001; 15: 293-308.
4. Farbstein D, Lewy AP. The Genetics of vascular complications in diabetes mellitus. *Cardiol Clin* 2010; 28: 477-496.
5. Vinik A, Ullal J, Parson HK, Casellini CM. Diabetic neuropathies: Clinical manifestations and current treatment options. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2006; 2: 269-281.
6. Maeda M, Yamamoto I, Fukuda M, et al. *MTHFR* gene polymorphism is susceptible to diabetic retinopathy but not to diabetic nephropathy in Japanese type 2 diabetic patients. *J Diabetes Complications* 2008; 22: 119-125.
7. Ukinc K, Ersoz HO, Karahan C, et al. Methyltetrahydrofolate reductase C677T gene mutation and hyperhomocysteinemia as a novel risk factor for diabetic nephropathy. *Endocr* 2009; 36: 255-261.
8. Yiğit S, Karakuş N, Inanır A. Association of *MTHFR* gene C677T mutation with diabetic peripheral neuropathy and diabetic retinopathy. *Molecular Vision* 2013; 19: 1626-1630.
9. Sun J, Xu Y, Xue J, Zhu Y, Lu H. Methylene tetrahydrofolate reductase polymorphism associated with susceptibility to coronary heart disease in Chinese type 2 diabetic patients. *Mol Cell Endocrinol* 2005; 229: 95-101.
10. Sun JS, Xu Y, Lu H, Zhu Y. Polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene association with homocysteine and ischemic stroke in type 2 diabetes. *Neurology India* 2009; 57: 589-593
11. Pollex RL, Mamakeesick M, Zinman B, et al. Methylene tetrahydrofolate reductase polymorphism 677C>T is associated with peripheral arterial disease in type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol* 2005; 17: 1-7.
12. Sun J, Xu Y, Zhu Y, Lu H. Genetic polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for diabetic nephropathy in Chinese type 2 diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract* 2004; 64: 185-190.
13. Sun J, Xu Y, Zhu Y, et al. The relationship between *MTHFR* gene polymorphisms, plasma homocysteine levels and diabetic retinopathy in type 2 diabetes mellitus. *Chin Med J* 2003; 116: 145-147.
14. Russo GT, Benedetto AD, Magazzu D, et al. Mild hyperhomocysteinemia, C677T polymorphism on methylenetetrahydrofolate reductase gene and the risk of macroangiopathy in type 2 diabetes: A prospective study. *Acta Diabetol* 2011; 48: 95-101.
15. Kaye JM, Stanton KG, McCann VJ, et al. Homocysteine, folate, methylenetetrahydrofolate reductase genotype and vascular morbidity in diabetic subjects. *Clin Sci* 2002; 102: 631-637.
16. Ambrosch A, Dierkes J, Lobmann R, et al. Relation between homocysteinaemia and diabetic neuropathy in patients with Type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med* 2000; 18: 185-192.
17. Rahimi M, Hasanvand A, Rahimi Z, et al. Synergistic effects of the *MTHFR* C677T and A1298C polymorphisms on the increased risk of micro- and macro-albuminuria and progression of diabetic nephropathy among Iranians with type 2 diabetes mellitus *Clin Biochem* 2010; 43: 1333-1339.
18. Mtiraoui N, Ezzidi I, Chaieb M, et al. *MTHFR* C677T and A1298C gene polymorphisms and hyperhomocysteinemia as risk factors of diabetic nephropathy in type 2 diabetes patients. *Diabetes Res Clin Pract* 2007; 75: 99-106.
19. Moczułski D, Fojcik H, Zukowska-Szczechowska E, Szydłowska I, Grzeszczak W. Effects of the C677T and A1298C polymorphisms of the *MTHFR* gene on the genetic predisposition for diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18: 1535-1540.