
Mina Stanić, Dušan Vlajin i Brankica Dimitrijević

Učestalost C677T mutacije MTHFR gena u uzorku populacije valjevskog stanovništva

Mutacija u genu za metilentetrahidrofolat reduktazu (MTHFR) može biti uzrok venskom tromboembolizmu, arterijskim trombotičkim bolestima kao što je šlog, bolestima koronarne i periferne cirkulacije, komplikacijama u trudnoći kao što su preklampsija, rani pobačaji i placentarne vaskularne komplikacije. U ovom radu određena je frekvencija C667T mutacije MTHFR gena. Učestalost C667T mutacije MTHFR gena određena je reakcijom lančanog umnožavanja posle čega su umnoženi fragmenti tretirani restrikcionim enzimima (PCR-RFLP analiza). 34 (35%) ispitanika nisu nosioci mutacije, 59 (62%) su heterozigotni nosioci, dok je homozigotnih nosilaca 3 (3%). Poređenjem našeg uzorka sa iranskom, jevrejskom, belom, španskom i japanskom populacijom dobijena je statistički značajna razlika u distribuciji alela C677T mutacije, što ukazuje na jedinstvenu distribuciju C677T mutacije MTHFR gena valjevske populacije.

Uvod

Gen za MTHFR čoveka je lokalizovan na kratkom kraku hromozoma 1. Složenost ekspresije ovog gena se ogleda u alternativnim obradama 5' nekodirajućeg regiona (Botto i Yang 2000).

Zamena citozina timinom na poziciji 677 u genu rezultuje supstitucijom alanina na poziciji 222 valinom u MTHFR proteinu (MTHFR C677T mutacija). Usled nastale promene u aminokiselinskoj sekvenci enzim postaje termolabilniji. MTHFR C677T polimorfizam ima relativno veliku učestalost u svetu

(frekvencija TT genotipa u globalnoj populaciji je približno 12%). Utvrđeno je da proteinski produkti osoba sa MTHFR TT genotipom imaju približno 30% in vitro, dok proteinski produkti CT genotip ima približno 65% standardne enzimske aktivnosti (Urlich *et al.* 1999). Smanjenje specifičnosti i funkcionalne sposobnosti termolabilne MTHFR remeti metabolizam folata i dovodi do znatnog povećanja nivoa homocisteina u krvi, otuda je C677T mutacija u MTHFR genu nedavno opisana kao uzrok umerene hiperhomocisteinemije (Frosst *et al.* 1995).

Trombofilija je multifaktorijalno oboljenje koje predisponira pojavu trombotičkih poremećaja i doprinosi riziku za dobijanje tromboza. Utvrđeno je da postoje mutacije u genima koji kodiraju hemostatske faktore (Bauduer i Lacombe 2005). Brojnim ispitivanjima je utvrđeno da čak i blago povećanje nivoa homocisteina u krvi predstavlja značajan faktor rizika za nastanak tromboza (Elezović 2000).

Iako je najčešći genetički faktor hiperhomocisteinemije nedostatak cistation- β -sintaze koje predstavlja prvi enzim u trans-sulfaciji homocisteina, umerena hiperhomocisteinemija nastaje i kao posledica poremećaja MTHFR. Otuda se sprovede brojne studije koje imaju za cilj da ispituju da li i MTHFR C677T mutacija može da se svrsta među genetičke faktore rizika za pojavu tromboza.

Cilj ovog rada je utvrđivanje zastupljenosti C677T mutacije u genu za metilentetrahidrofolat reduktazu u valjevskoj populaciji.

Mina Stanić (1991), Sombor, Nikole Tesle 50, učenica 3. razreda Gimnazije „Veljko Petrović“ u Somboru

Dušan Vlajin (1991), Niš, Homoljska 1, učenik 4. razreda Gimnazije „Bora Stanković“ u Nišu

Brankica Dimitrijević (1991), Gorobilje (Požega), učenica 3. razreda Gimnazije „Sveti Sava“ u Požegi

MENTOR: Iva Pruner, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

Materijal i metode

Ispitanici. Ispitivanu grupu je činilo 96 osoba, 42 žene i 54 muškarca sa teritorije Valjeva. Prosečna starost ispitanika bila je 30 ± 13 godina. Od ispitanika su prikupljeni uzorci bukalne sluzokože pomoću sterilnih štapića. Uzimanje uzoraka bilo je anonimno, od ispitanika su uzeti samo podaci o godinama i polu.

Priprema uzoraka. Sterilni brisevi sa uzetim uzorcima su potopljeni u 200 μ L fosfatnog pufera (PBS) pH = 7.5 u tubama od 1.5 mL. Potom su uzorci vorteksovani i ostavljeni na sobnoj temperaturi 10 minuta. Štapići su ocedeni i izbačeni iz tuba, a ostatak pufera u tubi, sa ćelijama bukalne sluzokože, je korišćen za izvođenje PCR reakcije.

Sekvence prajmera. Sekvence prajmera za umnožavanje dela egzona 4 MTHFR gena su:

M1: 5'-TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA-3'

M2: 5'-AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG-3'

Reakcija lančanog umnožavanja DNK (PCR). Reakcija lančanog umnožavanja DNK polimerazom (PCR-Polymerase Chain Reaction) omogućava umnožavanje željenog fragmenta korišćenjem termostabilnih polimeraza (najčešće se koristi Taq polimeraza), iz male količine početnog uzorka do količine koja je pogodna za dalju manipulaciju. Za odvijanje PCR reakcije neophodni su prajmeri-oligonukleotidi od 10-30 baza, koji ograničavaju sekvencu koja se umnožava. PCR reakcija se sastoji iz ponovljenih ciklusa tri osnovna koraka: (1) denaturacija DNK; (2) vezivanje prajmera; (3) elongacija novog lanca DNK. Nakon 30-35 ciklusa sintetiše se oko 105 kopija ciljne sekvence. Ukoliko se PCR reakcija odvija bez prethodne izolacije DNK, na početku se koristi hot start, odnosno primenjuje se nekoliko ciklusa grejanja i hlađenja, kako bi se omogućila liza ćelija (Erllich 1989; McPherson *et al.* 1991).

Reakciona smeša zapremine 25 μ L je pravljena na sledeći način:

2.5 μ L 10xpufera za Taq polimerazu bez magnezijuma je pomešano sa 5 μ L 2.5 mM $MgCl_2$, 2.5 μ L smeše dNTP (2mM dATP, 2 mM dTTP, 2 mM dGTP, 2 mM dCTP), po 0.5 μ L 10 pmol/mL odgovarajućih prajmera, 1 μ L Taq polimeraze (5 U/ μ L) i 3 μ L uzorka. Zapreminu do 25 μ L je dopunjavana destilovanom vodom, a smeša je

pokrivena parafinskim uljem da bi se sprečilo isparavanje.

U program po kome se odvijala PCR reakcija na početku je ubačen „hot start“ korak, koji je podrazumevao zagrevanje smeše na 98°C, pa hlađenje na 55°C, čime se postiže razaranje membrana limfocita i oslobađanje DNK iz ćelija. Visoka temperatura, takođe, vrši denaturaciju DNK, kao i denaturaciju proteina koji bi mogli da inhibiraju enzimsku aktivnost Taq polimeraze. Taq polimeraza je dodavana nakon hot start koraka. PCR reakcija je vršena po sledećem programu:

98°C 2min

55°C 3min 3 ciklusa

94°C 1min

61°C 1min 33 ciklusa

72°C 1min

72°C 10min

Digestija DNK restrikcionim enzimima. Fragmenti DNK dobijeni u reakciji lančanog umnožavanja podvrgnuti su digestiji restrikcionim enzimom HinfI (Fermentas). Digestija je vršena u reakcionoj smeši zapremine 25 μ L koja je sadržala 15 μ L PCR produkta, 2.5 μ L 10xpufera R i 0.5 μ L (10U/ μ L) HinfI enzima. Konačna zapremina od 25 μ L je dostignuta dodavanjem 7 μ L destilovane vode. Reakciona smeša je inkubirana tokom noći na 37°C.

Ukoliko je alel mutiran, umnoženi fragment poseduje jedno restrikciono mesto za HinfI i produkti digestije su dva fragmenta dužine 175 bp i 23 bp, a ukoliko nije prisutna mutacija fragment nema mesto sečenja za enzim HinfI ostaje segment dužine 198 bp.

Elektroforeza na poliakrilamidnom gelu. Produkti digestije razdvajani su vertikalnom elektroforezom na 10% nedenaturišućem poliakrilamidnom gelu. Gel su činile sledeće komponente: 10% akrilamidni rastvor, 1xTBE pufer (100 mM TRIS, 83 mM borne kiseline, 1 mM EDTA pH =8), 0.1% amonijum-persulfat i 0.1% TEMED. Nanošeno je 8 mL produkata digestije, pomešanih sa 2 μ L boje (bromfenolplavo i ksilencijanol). Elektroforeza je tekla u 1xTBE puferu pri naponu od 150-200V.

Bojenje DNK u gelu solima srebra. Vizualizacija traka na gelu vršena je bojenjem srebro-nitratom. Gel je fiksiran u rastvoru 10% etanola i 0.5% sirćetne kiseline u trajanju od 20 minuta. Potom je bojen potapanjem u 0.1% rastvor srebro-nitrata tokom 10 minuta. Nakon toga, gel je ispiran

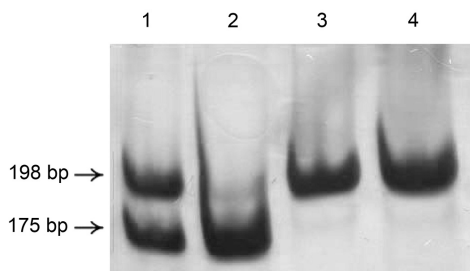
destilovanom vodom, radi ispiranja viška srebro-nitrata, a razvijanje boje je vršeno u rastvoru 1.5% NaOH, 0.01% NaBH₄ i 0.048% formaldehida u trajanju od 20 minuta (Radojković i Kušić 2000).

Statistička obrada rezultata. Statistička obrada podataka vršena je u MedCalc 9.6.2.0 programskom paketu. Da bi se utvrdilo da li postoji statistički značajna razlika između učestalosti genotipova u populaciji Valjeva i drugim populacijama korišćen je χ^2 -test. Uzimano je da je razlika u učestalostima statistički značajna ukoliko je $p < 0.05$.

Rezultati

Za detekciju MTHFR C677T mutacije iskorišćena je činjenica da ova mutacija uvodi mesto za restrikcioni enzim HinfI, tako da dolazi do sečenja PCR produkta od 198 bp na fragmente od 175 i 23 bp, pri čemu pod datim uslovima elektroforeze traka od 23 bp izlazi iz gela, pa se detektuje samo traka od 175 bp. Kod osobe koja ima oba normalna alela na gelu se detektuje traka dužine 198 bp, kod heterozigotnog nosioca se detektuju dve trake od 198 i 175 bp, dok se kod homozigotnog nosioca mutacije detektuje traka dužine 175 bp (slika 1).

Grupa ispitnika je brojala 96 osoba, 42 žene i 54 muškarca. 34 (35%) ispitanika nisu nosioci mutacije, 59 (62%) su heterozigotni nosioci, dok je homozigotnih nosilaca 3 (3%). Kod žena frekvencije



Slika 1. Detekcija MTHFR C677T mutacije

- 1: kontrola, heterozigot za 677T alel
- 2: homozigot za 677T alel
- 3, 4: homozigot za 677C alel

Figure 1. Detection of MTHFR C677T mutation

- 1: controle, heterozygote for allele 677T
- 2: homozygote for allele 677T
- 3, 4: homozygote for allele 677C

CC, CT i TT genotipa su 17.7, 24.0 i 2.1 procenata, a kod muškaraca 17.7, 37.5 i 1.0 respektivno (tabela 1). Ne postoji statistički značajna razlika između učestalosti mutacija kod muškaraca i žena ($\chi^2 = 3.6$; $p = 0.16$).

Tabela 1. Učestalost C677T MTHFR gena

	C677T MTHFR polimorfizam		
	homozigoti za 677CC	heterozigoti za 677CT	homozigoti za 677TT
žene	17 (17.7%)	23 (24.0%)	2 (2.2%)
muškarci	17 (17.7%)	36 (37.5%)	1 (1.0%)
ukupno	34 (35.4%)	59 (61.5%)	3 (3.1%)

Rezultati dobijeni ovim istraživanjem poređeni su sa učestalostima MTHFR C677T mutacije u drugim populacijama. U odnosu na iransku, jevrejsku, afričko-američku, belu, špansku, indonezijsko-javansku i japansku populaciju postoji povećana učestalost heterozigotnih nosioca, (62 procenta prema 39, 43, 22, 43, 44, 16, 48 procentata, respektivno) (Golbahar *et al.* 2005; Rady *et al.* 1999, Rady *et al.* 2002, Sadewa *et al.* 2002). U odnosu na iransku, jevrejsku, belu, špansku i japansku populaciju postoji smanjena učestalost homozigotnih nosioca (3 prema 5, 26, 11, 26 i 13 procentata, respektivno), a u odnosu na afričko-američku i indonezijsko-javansku postoji povećana učestalost homozigotnih nosioca (3 procenta prema 1, odnosno 0 procentata). U odnosu na sve populacije sa kojim smo poredili postoji statistički značajna razlika (tabela 2).

Diskusija

Široka rasprostranjenost C677T mutacija i njena visoka frekvencija navodi na pitanje da li se radi o genetičkom poremećaju sa štetnim efektom po fenotip, ili mutacija predstavlja selektivnu prednost. Na osnovu velike učestanosti ove mutacije u globalnoj populaciji može se pretpostaviti da je ona evolutivno dosta stara. Kao objašnjenje za ovo postoje dve hipoteze (Fodinger *et al.* 2000). Prema prvoj hipotezi u vreme velike oskudice u hrani, redukovana aktivnost MTHFR, koja vodi smanjenju metilacije homocisteina, omogućila je da C1 jedinice tetrahidrofolatnog metabolizma budu dostupne za vitalno značajnu sintezu nukleotida. Prema drugoj

Tabela 2. Učestalosti C677T mutacija MTHFR gena u drugim populacijama (u procentima)

	uzorci iz populacije							
	valjevska	iranska	jevrejska	afričko-ame rička	belačka	španska	indonez.- javanska	japanska
677TT	3	5	26	1	11	26	0	13
C677T	62	39	43	22	43	44	16	48
677CC	35	56	31	77	46	30	84	39
χ^2		10.6	21.9	35.8	9.5	21.7	50.3	8.2
p		0.005	0.0001	0.001	0.009	0.0001	0.0001	0.02

hipotezi, mutacija predstavlja selektivno prednost tako što pojedinci koji nasleđuju mutirani alel imaju manji rizik za dobijanje kolorektalnog karcinoma. Navedene pretpostavke mogle bi se smatrati mogućim razlozima zbog kojih, dejstvom pozitivne selekcije, tokom vremena učestalost ove mutacije postepeno raste. Međutim, potrebna su dalja istraživanja za utvrđivanje tačnih interakcija između MTHFR C677T genotipa i fenotipa.

Pri poređenju populacije Valjevskog stanovništva sa drugim populacijama dobijena je značajna statistička razlika u učestalosti mutacije. Stoga, rezultati ukazuju na specifičnost distribucije C667T mutacije kod valjevske populacije.

Mutacija C667T u genu za MTHFR dovodi do sinteze termolabilne forme proteine (t-MTHFR), u kojoj je alanin na poziciji 222 zamenjen valinom. Mutacija dovodi do smanjene aktivnosti MTHFR, usled čega se javlja hiperhomocisteinemija, naročito ako je nivo folata u plazmi nizak (Đorđević 2000). Iako je poznato da su povišeni nivoi homocisteina primećeni u većoj meri kod ljudi sa trombozom i aterosklerozom, nejasno je da li povišeni nivo homocisteina sam vodi do oštećenja ili je rast u nivou homocisteina rezultat toga. Dalje, slabo je istraženo kako homocistein može ispoljiti razarajuća svojstva (Boss *et al.* 2005; Toole *et al.* 2004). Po jednoj hipotezi, homocistein ima toksične efekte na ćelije koje grade unutrašnji zid krvnog suda. Dalje studije su potrebne da se razjasni uloga homocisteina u aterosklerozi i trombozi i da bi se utvrdilo da li je snižavanje nivoa homocisteina efektivno za smanjenje rizika pojavljivanja krvnih ugrušaka. Rezultati iz studije Ray i saradnika (2002) indiciraju da sve dok je nivo homocisteina normalan, MTHFR muta-

cije ne povećavaju značajno rizik od srčanog napada ili šloga.

Trudnoća predstavlja specifično stanje u kome se dešavaju značajne promene u hemostatskom statusu žene. Povećava se aktivnost prokoagulacionih faktora, čime se organizam pomera ka hiperkoagulacionom stanju, što za cilj ima zaštitu organizma od hemoragije i pripremu za porođaj, koji je svojevrsan izazov za hemostatski sistem. Istovremeno, smanjuje se aktivnost fibrinolitičkog sistema, čime se organizam pomera ka hipofibrinolitičkom stanju, što dodatno doprinosi ukupnom hiperkoagulacionom statusu tokom trudnoće. Poremećaj ravnoteže između ova dva procesa rezultuje poremećajima ploda i na kraju spontanim pobačajima ili smrću majke. Žene koje su nosioci mutacije na MTHFR genu mogu biti ugrožene, jer tokom života prolaze kroz trudnoću koja je sama po sebi hiperkoagulaciono stanje, iz čega sledi da postoji povećan rizik od nastanka tromboze.

Zaključak

Na uzorku od 100 zdravih individua, dobijeni su podaci o učestalosti MTHFR C677T polimorfizama u populaciji valjevskog kraja. Učestalost homozigota za 677C alel u genu za MTHFR u valjevskoj populaciji je bila 35%, heterozigota 62%, a homozigota 3%. Utvrđeno je još da nema statistički značajne razlike između učestalosti mutacija kod muškaraca i došli smo do zaključeno je da postoji statistički značajna razlika u poređenju sa iranskom, jevrejskom, belom, španskom i japanskom populacijom u distribuciji alela C677T mutacije.

Zahvalnost. Zahvaljujemo se Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo na

pruženoj podršci, hemikalijama i aparaturi. Zahvaljujemo se i saradnicima koji su bili prisutni u Stanici tokom letnjeg seminara molekularne biomedicine 2009. na pristanku da učestvuju u radu. Veliko hvala Alekseju Drinu na pomoći pri skupljanju uzoraka.

Literatura

- Bauduer F., Lacombe D. 2005. Factor V Leiden, prothrombin 20210A, methylenetetrahydrofolate reductase 677T, and population genetics. *Molecular Genetics and Metabolism*, **86**: 91.
- Bos M. J. *et al.* 2004. Homocysteine lowering by B vitamins and the secondary prevention of deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a first randomized, placebo-controlled, double-blind trial. *Blood*, **104**: 142a. Abstract.
- Botto L. i Yang Q. 2000. 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Variants and Congenital Anomalies. *American Journal of Epidemiology*, 151 (9): 862.
- Đorđević V. 2000. Zastupljenost G20210A mutacije u genu za protrombin i C677T mutacije u genu za metilentetrahydrofolat reduktazu u zdravoj jugoslovenskoj populaciji i kod pacijenata sa dubokim venskim trombozama. Magistarski rad. Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet. Beograd.
- Erllich D. A. 1989. *PCR technology. Principles and Applications for DNA Amplification*. New York: Stockton Press
- Elezović I. Urođene i stečene trombofilije. *Bilten za transfuziologiju 2000*. (Suppl): 16.
- Fodinger M., Horl W., Sunder-Plassman G. 2000. Molecular biology of 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase. *Journal of nephrology*, **13** (1): 20.
- Frosst P. *et al.* 1995. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature Genetics*, **10** (1): 111.
- Golbahar J., Fathi Z., Tamadon M. 2005. Distribution of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (C667T) polymorphism and its association with red blood cell 5-methyltetrahydrofolate in the healthy Iranians. *Clinical nutrition*, **24** (1): 83.
- Goyette P. *et al.* 1998. Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Mammalian Genome*, **9**: 652.
- Kang S. S. *et al.* 1991. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase: an inherited risk factor for coronary artery disease. *American Journal of Human Genetics*, **48**: 536.
- McPherson M. J., Quireke P., Taylor G. R. 1991. *PCR. A practical approach*. Oxford: Oxford University Press.
- Radojković D., Kušić J. 2000. Silver staining of denaturing gradient gel electrophoresis gels. *Clin Chem*. 46 (6 Pt1): 883.
- Rady P. L. *et al.* 1999. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): the incidence of mutations C677T and A1298C in the Ashkenazi Jewish population. *American Journal of Medical Genetics*, **86**: 380.
- Rady P. L. *et al.* 2002. Genetic Polymorphisms of Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) and Methionine Synthase Reductase (MTRR) in Ethnic Populations in Texas; a Report of a Novel MTHFR Polymorphic Site, G1793A. *American Journal of Medical Genetics*, **107**: 162.
- Ray J. G., Shmorgun D., Chan W. S. 2002. Common C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene and the risk of venous thromboembolism: meta-analysis of 31 studies. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*, **32**: 51.
- Rozen R. 1997. Genetic predisposition to hyperhomocysteinemia: deficiency of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Thrombosis Haemostasis*. **78**: 523.
- Rosenblatt D. S. 1995. Inherited disorders of folate transport and metabolism. U *The metabolic and molecular bases of inherited disease* (ur. Scriver C. R. *et al.*), 7th ed. McGraw-Hill, str. 3111.
- Rosenquist T. H., Ratashak S. A., Selhub J. 1996. Homocysteine induces congenital defects of the heart and neural tube: effect of folic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **93**: 15227.
- Sadewa A. H. *et al.* 2002. The C667T mutation in the methylenetetrahydrofolate gene among the Indonesian Javanese population. *The Kobe journal of medical sciences*, **48** (5-6): 137.
- Toole J. F. *et al.* 2004. Lowering homocysteine in patients with ischemic stroke to prevent recurrent stroke, myocardial infarction, and death. *JAMA*. **291**: 565.
- Ulrich C. *et al.* 1999. Colorectal Adenomas and the C677T MTHFR Polymorphism: Evidence for General Environment Interaction. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, **8**: 659..

Prevalence of the C677T Substitution of the Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Gene in Valjevo

The 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene is located on chromosome 1 at 1p36.3. The complementary DNA sequence is 2.2 kilobases long and consists of 11 exons (Goyette *et al.* 1998). MTHFR catalyzes the synthesis of the 5-methyltetrahydrofolate cosubstrate used in the remethylation of homocysteine to methionine.

The identification of hyperhomocysteinemia as a risk factor for the development of arteriosclerosis and vascular disease has generated renewed interest in the enzymes and cofactors involved in homocysteine metabolism. The C677T allele is characterized by a point mutation at position 677 of the MTHFR gene that converts a cytosine (C) into a thymine (T). This mutation results in an amino acid substitution (alanine to valine) in the enzyme (Rozen 1997; Frost *et al.* 1995). The C677T allele is commonly called "thermolabile", because the activity of the encoded enzyme is reduced at 37°C or more (Kang *et al.* 1991). Thus, MTHFR activity among C677T homozygotes is 50-60 percent lower at 37°C and approximately 65 percent lower at 46°C than in similarly treated controls. Heterozygotes are in the intermediate range. People who are homozygous for the C677T allele tend to have mildly increased blood homocysteine levels if their folate intake is insufficient but normal blood levels if their folate intake is adequate (Rozen 1997).

To investigate the MTHFR genotype buccal swabs were collected from 96 randomly chosen subjects aged 30±13 (42 of the subjects were female and 54 male). The prevalence of the C677T muta-

tion of the MTHFR gene was determined by polymerase chain reaction (PCR) mediated restriction fragment length polymorphism analysis. The digestion products were analysed using polyacrilamide gel electrophoresis and visualized using silver-nitrate staining.

Polymorphism C677T creates a recognition sequence for the restriction enzyme HinfI, and this is detected by digestion of the 198 bp PCR product, generating 23 bp and 175 bp fragments for the polymorphism in homozygosis (genotype TT), because the 23 bp fragment is not retained in the gel. Genotype CC is characterized by the presence of a 198 bp fragment, and genotype CT is characterized by the presence of two fragments, one with 198 bp and the other with 175 bp.

Statistical analyses was accomplished by using MedCalc 9.6.2.0 statistical software package. The Chi-square test was used to determine the association between the allele and genotype frequencies of different populations. The difference in the prevalence variant C677T mutation is statistically significant if $p < 0.05$.

Among 96 subjects, 35% (34) had a CC homozygous genotype, 62% (59) had a CT heterozygous genotype, and the remaining 3% (3) had a TT homozygous genotype. Data from subjects from Valjevo territory were compared with other studies that have been published in previous literature (Golbaha, Fathi and Tamadon, 2005; Rady *et al.* 1999; Rady *et al.* 2002; Sadewa *et al.* 2002). The frequency of the MTHFR C667T allele was significantly higher among Valjevo citizens (62%), compared to 39% Iranians ($p < 0.005$), 43% Ashkenazi Jews ($p < 0.0001$), 22% African-Americans ($p < 0.001$), 43% Caucasians ($p < 0.009$), 44% Hispanics ($p < 0.0001$), 16% Indonesians ($p < 0.0001$) and 48% Japanese ($p < 0.02$). Results indicate that the frequency of the C677T MTHFR polymorphism of Valjevo territory compared to other populations give a unique allele distribution. 