Journal of College of Education for pure sciences(JCEPS)
Web Site: http://eps.utq.edu.iq/ Email: com@eps.utq.edu.iq
Volume 7, Number 4, December 2017

تردد الطرز الوراثية للجين *MTHFR* للمصابين بتشوهات القلب الولادية في محافظة ذي قار

أ.م.د.حسن ريسان الركابي وديان كاطـــــع الفرطوسي

Hassanalrkaby@yahoo.com Widyan_89@yahoo.com

قسم علوم الحياة – كلية التربية للعلوم الصرفة – جامعة ذي قار

الخلاصة

هدفت الدراسة الحالية للكشف عن دور جين ***(MTHFR)*** **(C677T) Methylenetetrahydro folate reductase** وعلاقته في حدوث تشوهات القلب الولادية في محافظة ذي قار من خلال استخدام تقنية PCR- RFLP . للفترة من 6-11-2013 إلى 22- 2- 2014 وعلى هذا الأساس تم جمع 120 عينة دم (من مركز الناصرية للقلب) في أنابيب حاوية على مادة الـ EDTA من مرضى مصابين بتشوهات القلب الولادية بأعمار تتراوح بين (شهر – 17 سنة) و110 عينة من الأصحاء بأعمار تتراوح بين (شهر – 17 سنة) وحفظت مباشرة في درجة حرارة - 20 مْ لاستخدامها في استخلاص DNA وتقنية الـ PCR .

وأظهرت نتائج التحليل الإحصائي عدم وجود ارتباط بين تعدد الأشكال الوراثية للجين ***MTHFR*** والإصابة بتشوهات القلب الولادية عند مقارنتها بمجموعة المقارنة ولكل من الطراز الطافر المتجانس **(*TT*)** (OR= 0.86 ; 95%CI= 0.41-1.81) والطراز الطافر المتباين **(*CT*)** (OR=0.42 ; 95%CI= 0.22 - 0.79)، وبينت الدراسة الحالية زيادة خطر الاصابة بتشوهات القلب الولادية للإناث الذين يمتلكون الطراز الطافر المتباين **(*CT*)** مرتين تقريبا (OR= 1.63 ; 95%CI=0.61-4.29)، وكما أظهرت النتائج أن الذين يمتلكون الطراز الطافر المتباين **(*CT*)** وضمن الفئة العمرية (شهر – 9سنة) قد ازداد لديهم خطر الاصابة بتشوهات القلب الولادية (OR=1.5 ; 95%CI= 0.36-6.23)، وأظهرت النتائج زيادة خطر الإصابة لدى الأبوين المدخنين بحوالي ثلاث مرات تقريبا (OR=2.5) وبفترة ثقة (22 .8 - 0.76) بوجود الطراز الطافر المتجانس **(*TT*)** في حين الذي يمتلكون الطراز الطافر المتباين **(*CT*)** ازداد لديهم خطر الإصابة أكثرمن مرتين (OR=2.13) وبفترة ثقة (6.40 -0.71).

الكلمات المفتاحية : تشوهات القلب الولادية ، جين ***MTHFR***، Polymorphism ، PCR

Journal of College of Education for pure sciences(JCEPS)
Web Site: http://eps.utq.edu.iq/ Email: com@eps.utq.edu.iq
Volume 7, Number 4, December 2017

Frequency of genotypes of *MTHFR* gene for people with Congenital heart defects in the province of Thi Qar

Hassan Rissan AL-rikabi **Widyan Gataa AL-fartosi**

Hassanalrkaby@yahoo.com Widyan_89@yahoo.com

Department of Life Sciences - College of Education for Pure Science - University of Dhi Qar

Abstract:

The present study aimed to detect the role of ***MTHFR*** gene and their relationship in the incidence of Congenital heart defects in Dhi Qar province, through the use of PCR- RFLP technique on this basis were collected 120 blood samples (from Nasiriyah heart Center) in tubes container on EDTA from patients with congenital heart defects ages ranging between (a month - 17 years) and 110 samples from healthy people ages ranging between (a month - 17 years) and saved directly at a temperature of - 20 ° C for use in the extraction DNA and the PCR technique.

The results of the statistical analysis of the lack of correlation between polymorphism of the gene MTHFR and the incidence of congenital heart defects when compared to the comparison group And each of the mutant homogenized style(CT) (OR= 0.86 ; 95%CI= 0.41-1.81) The style of the mutant differential(TT) (OR=0.42 ; 95%CI= 0.22 - 0.79) .

The results of the current study has shown an increased risk of congenital heart defects for women who have the mutant heterozygous (CT) almost twice (OR= 1.63 ; 95%CI=0.61-4.29). and the results also showed that who have the mutant heterozygous (CT) and within the age group (month - 9 years) has increased their risk of congenital heart defects (OR = 1.5 ; 95%CI= 0.36-6.23), results showed an increased risk of infection with parents smokers about almost three times (OR = 2.5) and the period of confidence (0.76 - 8.22) the presence of mutant homozygous (TT) while that possess the mutant heterozygous (CT) increased their risk more than injury twice (OR = 2.13) and the period of confidence (0.71 - 6.40).

Keywords: congenital heart abnormalities, MTHFR gene, Polymorphism, PCR

المقـــــدمـة Introduction

تشوهات القلب الولادية Congenital heart defects: هي وجود خلل في تركيب القلب والأوعية الدموية الكبيرة التي هي موجودة عند الولادة . وتوجد أنواع متعددة من هذه التشوهات ومعظمها أما عرقله أو انسداد تدفق الدم في القلب أو الأوعية بالقرب منه أو بسبب تدفق الدم خلال القلب في وضع غير طبيعي [1] . كما أن عيوب القلب هي من بين العيوب الخلقية الأكثر شيوعا والسبب الرئيسي للوفيات المرتبطة بعيب خلقي . تحدث CHD في ما يقرب 9 لكل 1000 ولادة حية. العديد من العيوب لا تحتاج للعلاج لكن بعض عيوب القلب الولادية معقده تتطلب الدواء أو الجراحة [2].

كما أنها تشير تركيبيا أو وظيفيا لأمراض القلب التي تكون موجودة عند الولادة [3]. ويعتقد أن هذه الإصابة لم تتغير كثيرا على مر السنين [4]. وتقريبا 33 - 50% من تلك التشوهات حرجه وتتطلب التدخل في السنة الأولى من الحياة نفسها[5] . مع ذلك، السبب الحقيقي في حدوث CHDs غير مفهومة. وتؤكد العديد من الدراسات ارتباط CHDs مع متلازمات وراثية (مثل متلازمة داون) أو أنها يمكن أن تكون منشأ متعدد العوامل، التي تنطوي على العوامل الوراثية والبيئية [7,6]. مثل التعرض للملوثات البيئية، نمط حياة الأمهات والاستعداد الوراثي لكل من الوالدين والجنين[8].

لوحظ ما يقرب 90% من المرضى الذين يعانون من CHDs في حاله تقييم القلب والأوعية الدموية مع نفخة قلبية ، عدم انتظام ضربات القلب ، سرعة التنفس ، صعوبة في التنفس ، قصور في النمو، زرقة ، خفقان وألم في الصدر[9] .

أكثر هذه التشوهات شيوعا عند الولادة هي عيب الحاجز ألبطيني (30%) ، عيب الحاجزالاذيني (7%)، تضيق الرئوي (7%) ، رباعية فالوت (5%) وتضيق الأبهر (5%) . وتكتشف هذه التشوهات بعد الولادة أو في سن الطفولة أو تمر بمرحلة سبات طويلة ولا تظهر أعراضها ألا بعد سن الطفولة وأحيانا الشباب [11,10] .

ومن أهم عوامل الخطر التي يجب تحديدها للحد من مخاطر التشوهات القلبية هي مرض السكري في الأمهات ، الحصبة الألمانية ، الإنجاب المتأخر(بعد سن الأربعين) واستخدام العقاقير العلاجية أثناء الحمل وتشير التقارير أن استخدام الأمهات للفيتامينات ، بما في ذلك حامض الفوليك ، يرتبط مع الحد من العيوب الخلقية القلبية الوعائية [13,12]. كما أن تدخين الأمهات وتعاطيها للمخدرات يزيد من الخطر النسبي لولادة الرضيع بعيب خلقي في القلب [15,14] .

الـهيموسيستين Homocysteine : هو حامض أميني موجود في الدم . وتعرف المستويات المرتفعة منه باسم الهايبرهيموسيستينيميا hyperhomocysteinemia حيث درس على نطاق واسع في علاقته بنمو أمراض الشرايين التاجية [16] . والمستوى المرتفع من Homocysteine قد يضعف من حركة ووظيفة بطانة القلب أو تلف الشرايين التاجية مما تسبب تدفق الدم بصورة غير طبيعية [17].

ومن الجينات المرشحة للحدوث تشوهات القلب الولادية هو جين ***MTHFR*** يقع على الذراع القصير لكروموسوم رقم 1 في الحزمة 36.3 ويحتوي على 11 أكسون يختزل 5,10- tetrahydrofolate methylene إلى 5-methyltetrahydrofolate ويمتلك هذا ألجين تعدد شكلي إذ تسبب الطفرة في جين ***MTHFR*** تغيير الحامض الاميني ألانين Alanine الى الحامض الاميني الفالين Valine [18] .

تشفر هذه الجينات الى الانزيمات التي تعمل على أيض الهيموسيستين أو حامض الفوليك حيث النقص وأن تعدد الأشكال في أي من هذه الإنزيمات قد تؤدي إلى خطأ خلقي في التمثيل الغذائي لل Homocysteine وتتسبب أيضا في حدوث homocystinuria. وهذا النقص قد يؤدي الى حدوث أمراض الشرايين التاجية [19].

المواد وطرائق العمل Materials and Methods

1. جمع عينات الدم Collection of Blood Samples

جمعت 120 عينة دم من المرضى المصابين بتشوهات القلب الولادية بعد تشخيص أصابتهم بالمرض من قبل الطبيب المختص في مركز الناصرية للقلب، إذ تراوحت أعمار المرضى بين شهر _ 17 سنة كذلك جمعت 110 عينة دم لأشخاص أصحاء كمجموعة مقارنة تراوحت أعمارهم بين شهر _ 17 سنة. سحب 2 مل من الدم ووضعت في أنابيب معقمة سعة 2.5 مل تحتوي على مادة مانعة للتخثر EDTA إذ حفظت بشكل مباشر في المجمدة بدرجة حرارة - 20 مْ لحين استخلاص DNA.

2. استخلاص DNA من الدم Extraction of DNA from Blood

تم استخلاص DNA من مجموعة المرضى والمقارنة باتباع طريقة Sambrook *et al* (1989)[20]

3. الترحيل الكهربائي Electrophoresis

اتبعت Sambrook *et al* (1989)[20] باستخدام هلام الاكاروز للكشف عن الحامض النووي منقوص الاوكسجين DNA.

4. Polymerase Chain Reaction

استعملت تقنية Polymerase Chain Reaction في تضخيم جين ***MTHFR*** اعتمـــــــــاداً على طريقـــة [16].

جدول(1): تسلسل البادئات المستعملة في تقنية Polymerase chain reaction

Gene	Primer Sequences 5 - 3	Length	Tm	T_A
MTHFR	F5-TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA-3	23	70	67
	R5-AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG-3	20	70	67

Tm=Melting temperature

TA=Annealing temperature

تم إضافة المواد بحسب ما موضح في الجدول (2) إذ تمزج المواد فـي أنبوب PCR وكما موضح في أدناه

جدول(2): مواد التفاعل لتقنية Polymerase chain reaction

Chemicals	Volume
Master mix.	5 µL
Primer Forward .	1µL
Primer Reverse.	1µL

DNA	5µL
D. W.	8µL
Total volume	20 µL

بعد أكمال جميع الإضافات مزجت العينات بجهاز Vortex ثم نقلت العينات إلى جهاز Thermo cycler وشغل الجهاز حسب البرنامج التالي :-

الجدول(3): خطوات تشغيل برنامج (PCR) للجين *MTHFR*

St.No.	Steps	Temperature	Time	No. of Cycles
1	Denaturation	94Cº	5min	1
2	Denaturation	94Cº	30 s	30
3	Annealing	67Cº	30 s	
4	Extension 1	72 Cº	30 s	
5	Extension 2	72 Cº	10min	1

وبعد انتهاء عمل جهاز Thermo cycler رحلت نواتج الـ PCR بواسطة جهاز الترحيل الكهربائي باستعمال هلام الاكاروز بتركيز 2%. بعدها نقل هلام الاكاروز إلى جهاز كشف الحزم بوساطة الأشعة فوق البنفسجية UV Light ؛ إذ تم ملاحظة ظهور حزمة عند الزوج القاعدي 198bp مما يدل على وجود الجين ***MTHFR*** بعد مقارنته مع DNA marker (100 – 2000 bp).

قطع الجين ***MTHFR*** باستعمال أنزيم القطع Hinf1 وحسب النشرة المرفقة مع الأنزيم من شركة Bioworld .

الجدول (4): مواد التفاعل لقطع ألجين *MTHFR*

Chemicals	Volume
PCR reaction mixture	10 µL
Nuclease – free water.	18 µL
10 X Buffer R.	2 µL
Hinf1.	1 µL
Total volume	31 µL

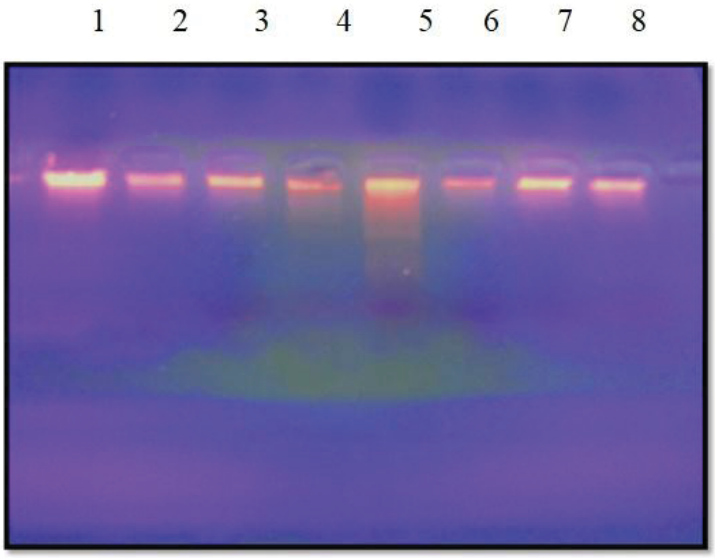
بعد ذلك حضنت المكونات بدرجة حرارة 37 مْ ولمدة 16 ساعة ثم رحلت العينات بواسطة جهاز الترحيل الكهربائي وكانت النتائج كالأتي : ظهور حزمة عند الزوج القاعدي 198bp يدل على الطراز البري Wild **(*CC*)** ، وظهور حزم عند القواعد الزوجية 198,175,23bp يدل على الطراز الطافر المتباين Heterozygous **(*CT*)** ، في حين ظهور حزم عند القواعد الزوجية 23,175bp يدل على الطراز الطافر المتجانس Homozygous **(*TT*)** .

التحليل الاحصائي Statistical Analysis

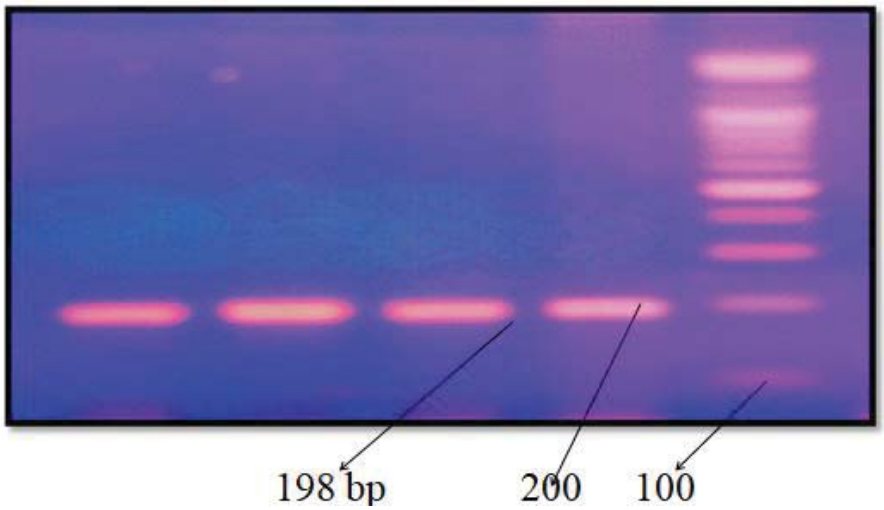
تم اختبار الفروق المعنوية للعينات المدروسة باستعمال اختبار مربع كاي χ^2 وOR بوساطة برنامج (SPSS ver. 17) تحت مستوى معنوية $P \leq 0.05$ للمقارنة بين العينات ودراسة تردد الطرز الوراثية للجين ***MTHFR*** .

النتائج Results

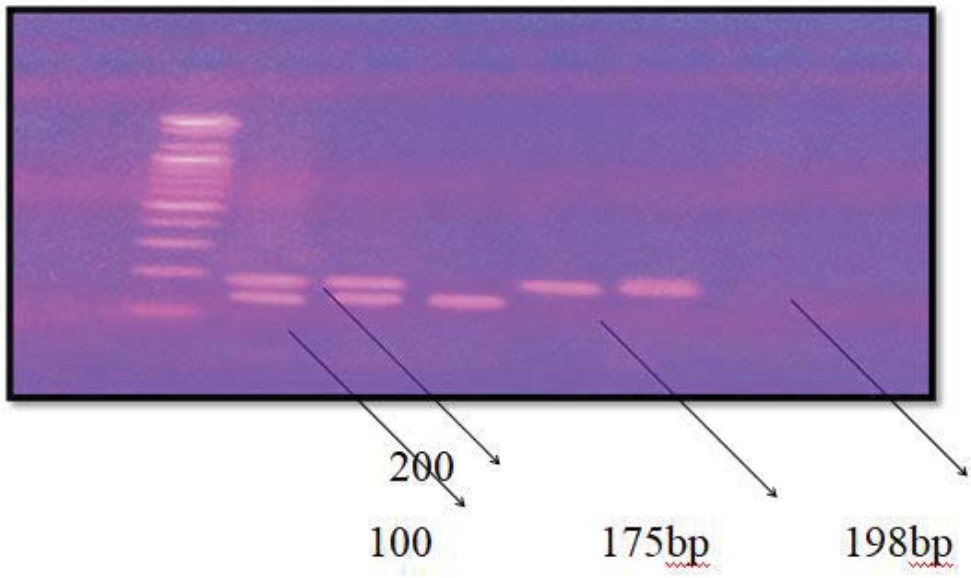
توضح الصورة رقم (1) الترحيل الكهربائي لحزم الحامض النووي DNA المستخلص من عينات المقارنة والمرضى على هلام الاكاروز بتركيز 0.8%.



توضح الصورة رقم (2): الترحيل الكهربائي لنواتج تضخيم ألجين ***MTHFR*** بوساطة تقنية PCR إذ ناحظ وجود حزم ألجين عند الزوج القاعدي 198bp في الاكسون 4 على هلام الاكاروز بتركيز 2%.



توضح الصورة رقم (3): تحليل نواتج تقنية PCR- RFLP للجين ***MTHFR*** باستعمال أنزيم القطع Hinf1 اذ تبين الصورة الطرز الوراثية المختلفة بعد أن قطعت بالأنزيم المذكور وكما مبين في أدناه.



نتائج التحليل الإحصائي للدراسة الحالية أظهرت عدم وجود ارتباط بين تعدد الطرز الوراثية للجين ***MTHFR*** والإصابة بتشوهات القلب الولادية عند مقارنة المرضى بمجموعة المقارنة وكما مبين في الجدول (5).

جدول(5):تردد الطرز الوراثية لجين *MTHFR* لمجموعتي المقارنة والمرضى

الطرز الجينية	مجموعة المقارنة (%)n=110	مجموعة المرضى (%)n=120	OR	95% CI
CC	(% 52.73) 58	(% 66.67) 80	1.0	———
TT	(% 14.55)16	(%15.83)19	0.86	0.41 – 1.81
CT	(% 32.73)36	(% 17.5)21	0.42	0.22 – 0.79

OR = Odds Ratio

95 %CI= Confidence Interval

من نتائج الدراسة الحالية وملاحظة الجدول (6) نجد أن الاناث يزداد لديهم خطر الاصابة بتشوهات القلب الولادية بحوالي مرتين تقريبا (OR=1.63) اكثر من الذكور في حالة وجود الطرازالطافر المتباين (*CT*) بينما وجود الطراز (*TT*) لم يظهر أي فروق معنوية.

جدول (6): تردد الطرز الوراثية لجين *MTHFR* حسب الجنس

الطرز الجينية	ذكور (%) n=62	اناث (%)n=58	OR	95% CI
CC	**(% 70.96)44**	**(% 62)36**	**1.0**	**———**
TT	**(% 14.52)9**	**(% 17.25)10**	**1.35**	**0.49 – 3.70**
CT	**(% 14.52)9**	**(% 20.68)12**	**1.63**	**0.61 – 4.29**

OR=Odds Ratio

95%CI= Confidence Interval

تشير النتائج المبينة في الجدول (7) الى أن خطر الاصابة بتشوهات القلب الولادية يزداد بمقدار مرتين تقريبا لمن هم ضمن الفئة العمرية (شهر- 9 سنة) ويحملون الطراز الطافر المتباين (*CT*) بينما لم يلاحظ فرق معنوي لحاملي الطراز الطافر المتجانس (*TT*).

جدول (7): تردد الطرز الوراثية لجين *MTHFR* حسب الفئات العمرية

الطرز الجينية	شهر- 9 سنة (%)n=107	19 - 10 (%)n=13	OR	95% CI
CC	(% 67.28) 72	(% 61.53) 8	1.0	———
TT	(% 15.88)17	(% 15.38)2	1.0	0.20 – 5.44
CT	(% 16.82)18	(% 23.1)3	1.5	0.36 – 6.23

OR= Odds Ratio

95%CI= Confidence Interval

أشارت نتائج الدراسة الحالية أن زيادة خطر الإصابة بتشوهات القلب الولادية لدى الأبوين المدخنين بحوالي ثلاث مرات تقريبا (OR= 2.5) عن الأبوين الغير مدخنين بوجود الطراز الطافر المتجانس (*TT*) ، بينما زيادة خطر الإصابة بوجود الطراز الطافر المتباين (*CT*) لدى الأبوين المدخنين بحوالي مرتين أكثر (OR=2.133) عن الأبوين الغير مدخنين وكما مبين في الجدول (8).

جدول (8): تردد الطرز الوراثية لجين *MTHFR* حسب التدخين

الطرز الجينية	غير مدخنين (%)n=41	مدخنين (%) n=79	OR	95% CI
CC	(% 78)32	(% 60.75)48	1.0	———
TT	(% 9.75)4	(% 18.98)15	2.5	0.76 – 8.22
CT	(% 12.2)5	(% 20.25)16	2.13	0.71 – 6.40

OR= Odds Ratio

95%CI= Confidence Interval

المناقشة Discussion

اظهرت نتائج التحليل الاحصائي عدم وجود فروق معنوية بين الطراز الطافر المتجانس (OR= 0.86 ; 95%Cl= 0.41 - 1.81) والطراز الطافر المتباين (OR= 0.42 ; 95%Cl= 0.22 - 0.79) وهذا يدل على عدم وجود ارتباط بين تعدد الاشكال الوراثية للجين ***MTHFR*** والاصابة بتشوهات القلب الولادية كما في الجدول (5) وجاءت نتائج هذه الدراسة متوافقة مع ما توصل اليه[21] . أذ لاحظ عدم وجود فروق معنوية لكلا الطرازين (***TT,CT***) (OR= 0.97 ; 95%Cl = 0.91-1.03) حيث اظهرت الدراسة أن النمط الوراثي لـ ***MTHFR*** يؤثر بشكل مباشر على مستويات حامض الفوليك وذلك باستخدام مبادئ "العشوائية المندلية" وبالتالي يكون التأثير متفاوت على خطر الاصابة بتشوهات القلب الولادية ويتوقف هذا على مستويات حامض الفوليك.

وكذلك اتفقت نتائج هذه الدراسة مع [22]. حيث وجدت عدم وجود علاقة بين النمط الجيني وخطر CHD ويفسر هذا على أن لم تكون هناك زيادة في تركيز الهيموسيستين ومع ذلك تركيز الهيموسيستين عموما اعلى بين هؤلاء الذين لديهم النمط الوراثي ***(TT)***. وكذلك قد يكون ارتفاع مستوى الهيموسيستين ليس في حد ذاته عامل خطر CHD ولكن هدف لانخفاض حامض الفوليك والذي يؤثر على خطرCHD[23].

بالمقابل لم تتفق نتائج هذه الدراسة مع [24]. أذ لاحظ أن خطر الاصابة يزداد للذين يمتلكون الطراز الطافر المتجانس (***TT***) (OR= 6.3 ; 95%Cl = 2.32- 17.27)) وكذلك دراسة [25]. حيث أظهرت هناك ارتباط بين CHD والطرز الوراثية لجين ***MTHFR*** (OR= 3.49 ; 95%Cl = 1.23 - 9.88) ويعزى ذلك الى ارتفاع كمية حامض الفوليك.

بينت نتائج التحليل الاحصائي للدراسة الحالية أن الاناث الذين يمتلكون الطراز الطافر المتباين ***(CT)*** ازدادت لديهم الاصابة بتشوهات القلب الولادية بحوالي مرتين تقريبا أكثر من الذكور (OR=1.63) بينما لم تظهر فروق معنوية لدى الذين يمتلكون الطراز الطافر المتجانس ***(TT)*** (OR=1.35). وقد يعود سبب ذلك أن الذكور ذو الطراز الطافر المتجانس ***(TT)*** يكون تركيز الهيموسيستين طبيعي وهذا يفسر عدم وجود علاقة بين النمط الوراثي ***(TT)*** ومخاطرCHD [22] . وكذلك لم يترافق النمط الوراثي ***(TT)*** مع خطر CHD في الذكور الذين يعانون من عوامل الخطر التقليدية ، وانخفاض حامض الفوليك وفيتامين B12 (أنزيم لمثيلة الهيموسيستين الى المثيونين) أو فيتامين B6(أنزيم تقويضي لايض الهيموسيستين) [22].

تشير النتائج الى أن خطر الاصابة بتشوهات القلب الولادية يزداد بمقدار مرتين تقريبا لمن هم ضمن الفئة العمرية (شهر- 9 سنة) ويحملون الطراز الطافر المتباين ***(CT)*** (OR=1.5) بينما لم يلاحظ فرق معنوي لحاملي الطراز الطافر المتجانس ***(TT)***. بالمقابل لم تتفق نتائج هذه الدراسة مع [26]. حيث ذكرت زيادة النمط الوراثي ***(TT)*** بين نفس الفئة العمرية في الاطفال من أصل اسباني ويرجع سبب ذلك الى زيادة تركيز الهيموسيستين. بينما يكون النمط الوراثي ***(TT)*** منخفض في الاطفال من الاصل الافريقي[27].

أشارت نتائج هذه الدراسة أن الاصابة بتشوهات القلب الولادية ازدادت بمقدار ثلاث مرات تقريبا للأبوين المدخنين الذين يمتلكون الطراز الطافر المتجانس (***TT***) (OR= 2.5 ; 95%Cl= 0.76 - 8.22) بينما حاملي الطراز الوراثي الطافر المتباين ***(CT)*** فانهم يصابون بمقدار مرتين أكثر في الابوين المدخنين (OR=2.13 ; 95%Cl= 0.71- 6.40) وجاءت نتائج هذه الدراسة متوافقة مع ماتوصل اليه [18]. حيث أظهر أن هناك ارتباط مهم بين التدخين والانماط الوراثية ***(CT)*** ***(TT)***. ويمكن تفسير خطر التدخين على حدوث CHD ، تدخين الام قبل الحمل لشهر واحد أو خلال الاشهر الثلاث الاولى من الحمل ارتبط بحدوث الاصابة [28]. ويعتقد سبب ذلك هو أول اوكسيد الكاربون والنيكوتين حيث CO يقلل امدادات الاوكسيجين لأنسجه الجسم والنيكوتين يحفز افراز الهرمونات التي تؤدي الى انقباض الاوعية من الرحم والمشيمة مما يؤدي الى وصول اقل للأوكسيجين والمواد المغذية الى الجنين.

References المصادر

[1].Lozano, R (Dec 15, 2012). "Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010.". Lancet**380(9859): 2095–128.**

"**[2].**Congenital Heart Defects in Children Fact Sheet". American Heart Retrieved **30 July 2010.**

[3].Fyler DC, Buckley LP, Hellenbrand WE,Cohn HE(1980). Report of the New England Regional infant Care Program.Pediatrie **;65 Supp:375-461.**

[4].Abdulla R (1997) . What is the Prevalence of Congenital heart disease? Pediatr Cardiol **;18:268.**

[5].Hoffman JIE, Kaplan S (2002). The incidence of congenital heart disease. J Am Coll Cardiol **; 39: 1890-1900.**

[6]. Tennstedt C, Chaoui R, Korner H and Dietel M (1999). Spectrum of congenital heart defects and extracardiac malformations associated with chromosomal abnormalities: results of a seven year necropsy study. Heart **82: 34-39.**

[7]. Botto, LD. & Correa, A (2003). Decreasing the burden of congenital heart anomalies: an epidemiologic evaluation of risk factors and survival. Progress in Pediatric Cardiology, Vol.18, pp. **111–121, ISSN 1058-9813**.

[8]. Botto LD, Correa A (2003). Decreasing the burden of congenital heart anomalies: an epidemiologic evaluation of risk factors and survival. Prog Pediatr Cardiol.**; 18: 111-21**.

[9]. Borzouee, M. & Jannati, M. (2008). Distribution and Characteristecs of the Heart Disease in Pediatric Age Group in Southern Iran. Iranian Cardiovascular Research Journal, Vol.2 , No.1, pp. **48-51, ISSN1735-8868**.

[10]. Hoffman JI (1995). Incidence of congenital heart disease: I. Postnatal incidence. Pediatr Cardiol**;16:103-13**.

[11]. Dadvand P, Rankin J, Shirley MD, Rushton S, Pless-Mulloli T(2009). Descriptive epidemiology of congenital heart disease in Northern England. Paediatr Perinat Epidemiol **; 23: 58-65**.

[12]. Smedts HP, de Vries JH, Rakhshandehroo M, Wildhagen MF, Verkleij-Hagoort AC, Steegers EA, Steegers-Theunissen RP(**2009**). High maternal vitamin E intake by diet or supplements is associated with congenital heart defects in the offspring. BJOG**; 116: 416-23**.

[13]. Loffredo CA, Wilson PD, Ferencz C (2001). Maternal diabetes: an independent risk factor for major cardiovascular malformations with increased mortality of affected infants . Teratology **; 64: 98-106.**

[14]. Autti-Ramo I, Fagerlund A, Ervalahti N, Loimu L, Korkman M, Hoyme HE (2006). Fetal alcohol spectrum disorders in Finland: clinical delineation of 77 older children and adolescents. Am J Med Genet Part A**; 140: 137-43.**

[15]. Källen K (1999). Maternal smoking and congenital heart defects. Eur J Epidemiol**; 15: 731-7**.

[16]. Deeparani, T., Pillai, M. R., and Elavazhagan T(2009). Detection of *MTHFR* C677T and A1298C Gene Polymorphism in Congenital Heart Disease. Middle East Journal of Scientific Research**. 4(2), 127-2**.

[17]. Bruneau, B. G (2008). The developmental genetics of congenital heart disease. Nature.**. 451(7181), 943-48**.

[18]. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Gyette P, Sheppard CA, Matthews RG et al. (1995). A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*). Nat Genet **10, 111–113**.

[19]. García-Fragoso, L., García-García, I., Leavitt G., Renta, J., Ayala, M. A., and Cadilla, C. L(2010). MTHFR polymorphisms in Puerto Rican children with isolated congenital heart disease and their mothers. International journal of genetics and molecular biology**. 2(3), 43-7**.

[20].Sambrook,K.J. ;Fritsh,E.F. and Maniatis,T.(1989). Molecular cloning laboratory manual, 2nd ed., cold spring Harbor laboratory prees. U.S.A.

[21].Yin M, Dong L, Zheng J, Zhang H, Liu J, Xu Z(2012). Meta-analysis of the association between MTHFR C677T polymorphism and the risk of congenital heart defects. Ann Hum Genet**;76:9-16.**

[22].Ma J, Stampfer MJ, Hennekens CH, *et al* (1996). Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, plasma folate, homocysteine, and risk of myocardial infarction in US physicians. Circulation **;94:2410–6.**

[23].Rees MM, Rodgers GM (1993). Homocysteinemia: association of a metabolic disorder with vascular disease and thrombosis. Thromb Res**;71:337–59.**

[24]. van der Put NMJ, Steegers-Theunissen RPM, Frosst P, Trijbels FJM, Eskes TKAB, vanden Heuvel LP, Mariman ECM, den Heijer M, Rozen R, Blom HJ(1995). Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. Lancet **;346:1070–1071.**

[25].Lewis SJ, Shah E, Smith GD(2005). Meta-analysis of MTHFR 677 C→T polymorphism and coronary heart disease. Does totality of evidence support casual role for homocysteine and preventive potential of folate. BMJ**; 331 : 1053-70.**

[26].Vilaseca MA, Moyano D, Ferrer I, Artuch R (1997). Total homocysteine in pediatric patients. Clin Chem **; 43 : 690-1.**

[27].Wilcken B, Bamforth F, Li Z(2003). Geographical and ethnic variation of the 677C-T allele of 5, 10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): findings from over 7000 newborns from 16 areas world wide. J Med Genet **;40:619-625**.

[28]. Honein MA, Rasmussen SA, Reefhuis J, Romitti P, Lammer EJ, Sunl, *et al* (2007). Maternal smoking, environmental tobacco smoke, and the risk of oral clefts. Epidemiology**;18(2):226–33.**