

Year (Yıl) : 2019  
Volume (Cilt) : 6  
Issue Number (Sayı) : 2  
Doi : 10.5455/JNBS.1549566985

Received/Geliş 16.03.2019  
Accepted/Kabul 20.06.2019  
JNBS, 2019, 6(2):133-137

Muhsin Konuk {ORCID:0000-0002-6651-718X}  
Öznur Yılmaz {ORCID:0000-0003-0591-8075}  
Sezgin Kapıcı {ORCID:0000-0002-3999-911X}  
Canan Sercan {ORCID:0000-0002-2218-2234}  
Hasan Önal {ORCID:0000-0001-9676-7086}  
Abdurrahman Akgün {ORCID:0000-0002-2917-2469}  
Korkut Ulucan {ORCID:0000-0002-1304-9386}

# DİYETE DEVAM EDEN OTİZMLİ ÇOCUKLARDA METİLENTETRAHİDROFOLAT REDÜKTAZ (MTHFR) GENİ C677T POLİMORFİZMİNİN BELİRLENMESİ DETERMINATION OF METHYLTETRAHYDROFOLATE REDUCTASE (MTHFR) GENE C677T POLYMORPHISM IN CHILDREN WITH DIETARY DIETS

Öznur YILMAZ<sup>1</sup>, Sezgin KAPICI<sup>1</sup>, Canan SERCAN<sup>1</sup>, Hasan ÖNAL<sup>3</sup>, Abdurrahman AKGÜN<sup>3</sup>, Mesut KARAHAN<sup>1</sup>, Korkut ULUCAN<sup>2</sup>, Muhsin KONUK<sup>1\*</sup>

## Öz

Multifaktöriyel bir bozukluk olan Otizmin etiolojisinin büyük bir kısmını genetik ve çevresel risk faktörleri oluşturur. Çalışmamızda glutensiz - kazeinsiz ve GAPS (Bağırsak ve Psikoloji Sendromu) diyetlerine tabi tutulan Otistik çocuklarda MTHFR (Metilentetrahidrofolat Redüktaz Geni) C677T polimorfizminin incelenmesi ve MTHFR geninin 677T allelinden kaynaklanan enzim aktivitesi azalmasının Otizmle ilişkili olup olmadığının belirlenmesi amaçlandı.

Çalışmaya 30 Otistik ve 90 sağlıklı çocuk katıldı. DNA eldesi özel ticari kit (GeneAII, Kore) kullanılarak sağlandı. Genotipleme ise PZR - RFLP (Polimeraz Zincir Reaksiyonu - Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi) protokolü ile gerçekleştirildi ve agaroz jel elektroforezinde yürütülerek görüntü elde edildi.

MTHFR 677T allel frekansı hasta grubunda %13,33 ve kontrol grubunda %19,4 bulunması sonucunda p=0,285 olarak hesaplandığı için istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. Çalışmaya alınan hastaların sayısının istenilen sayıda ve homojen olmaması nedeniyle daha kapsamlı çalışmalar yapılmasının yanında MTHFR A1298C polimorfizmine ve COMT (katekol-O-metiltransferaz), BDNF (beyin-türevli nörotrofik faktör), PTEN (fosfat ve tensin homolog) genlerine bakılmasını öneririz.

**Anahtar Kelimeler:** Otizm, Genetik Analiz, Polimorfizm, Diyet.

<sup>1</sup> Üsküdar Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, İstanbul, Türkiye

<sup>2</sup> Marmara Üniversitesi, Dış Hekimliği Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Bölümü, İstanbul, Türkiye

<sup>3</sup> İstanbul Kanuni Sultan Süleyman Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Çocuk Metabolizma ve Beslenme Kliniği, İstanbul, Türkiye

\*Sorumlu Yazar: Muhsin Konuk, Üsküdar Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, İstanbul, Türkiye, e-mail: muhsin.konuk@uskudar.edu.tr

**Keywords:** Autism, Genetical Analysis, Polymorphism, Diet

Türkiye’de İstanbul Kanuni Sultan Süleyman Eğitim ve Araştırma Hastanesi Çocuk Metabolizma ve Beslenme Kliniğinde glutensiz-kazeinsiz ve GAPS diyetlerine tabi tutulan Otistik çocuklarda MTHFR C677T polimorfizmi incelendi Bu çalışmaya 1-18 yaş arası 30 Otistik hasta ve 90 sağlıklı çocuk katıldı. Bu polimorfizmi belirlemek için

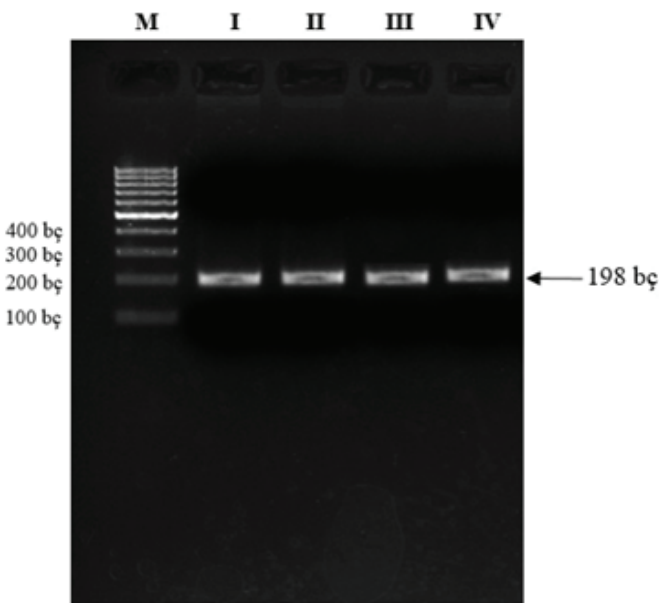
sırasıyla DNA izolasyonu ve PZR-RFLP analiz yöntemleri Üsküdar Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik laboratuvarında gerçekleştirildi.

## 2.2. DNA Eldesi ve Genotipleme

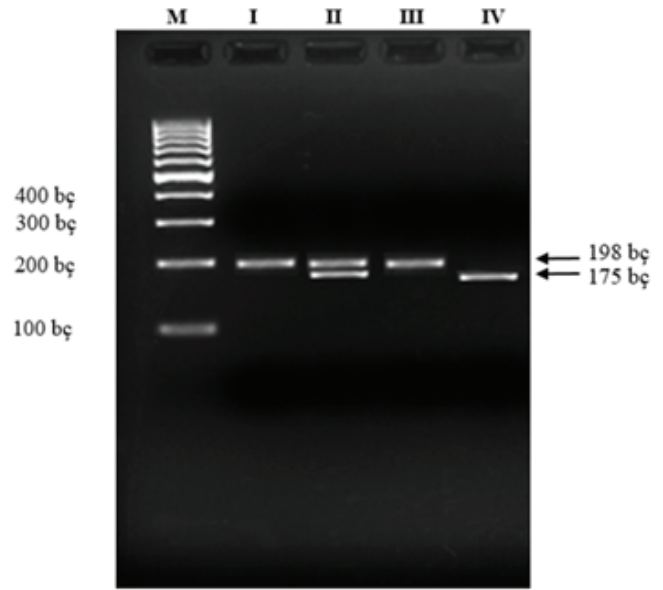
Çalışmamız için hasta ve kontrol gruplarından 2 ml periferik kan örneği toplandı. Bu kan örneklerinden DNA eldesi özel ticari kit (GeneAll, Kore) kullanılarak sağlandı. Genotiplemede ise MTHFR C677T polimorfizmini belirlemek için PZR-RFLP protokolü ile gerçekleştirildi. Elde edilen DNA örneklerinden MTHFR ekzon 4 bölgesinin amplifikasyonu için 25 µl'lik hacimde reaksiyon karışımı hazırlandı. Bu karışım 0,2 µl Taq DNA polimeraz, 2 µl MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µl dNTP, 2,5 µl Taq buffer, 3,5 µl DNA, ileri-geri primerler 0,4x2 ve 15,5 µl steril su içerir. İleri ve geri primerlerinin dizilimi tablo 1'de gösterildi. PZR döngüsü için 95 oC'de 3 dk ön denatürasyon sonrasında 35 döngü 95 oC'de 30 sn denatürasyon, 61 oC'de 45 sn eşleşme, 72 oC'de 10 dk sentez aşaması ve final uzaması olarak 72 oC'de 5 dk protokolü uygulandı. PZR ile çoğaltılan ürünlerin tanımlanmasında agaroz jel elektroforezinin uygulanması için %2'lik agaroz jel hazırlandı. Bu görüntüleme sonuçları şekil 2'de gösterildi. Elde edilen 198 bç'lik PZR ürünleri, Hemofilus influenza bakterisinden elde edilen HinfI enzimi ile kesim işlemi tablo 6'da belirtilen şekilde gerçekleştirildi ve 37 °C'de yarım saat kesime bırakıldı. Kesim sonuçları %3'lük agaroz jel elektroforezinde yürütülerek Jel Görüntüleme Fusion sisteminde değerlendirildi. Bu görüntüleme sonuçları şekil 3'de gösterildi.

**Tablo 1.** MTHFR PZR protokolü için kullanılan primerler

| Kullanılan Primerler |                                                 |
|----------------------|-------------------------------------------------|
| Genomik DNA Bölgesi  | DNA disizi (5' → 3')                            |
| MTHFR (Ekzon 4)      | 5'-primer: 5'-TGA AAG AGA AGG TGT CTG GGG GA-3' |
|                      | 3'-primer: 5'-AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG-3'     |



**Şekil 2:** MTHFR gen bölgesinde hasta grubundaki PZR ürünlerinin %2'lik agaroz jel görüntüsü. M: Moleküler ağırlık belirleyici, bç: Baz çifti, I-II-III-IV: PZR ürünleri



**Şekil 3:** MTHFR C677T polimorfizminin %3'lük jel görüntüsü.

I-III: CC genotip (198 bç), II: CT genotip (198, 175 bç), IV: TT genotip (175 bç)

M: Moleküler ağırlık belirleyici, bç: Baz çifti, I-II-III-IV: PZR ürünleri

## 2.3. İstatistiksel Analizler

Elde edilen verilerin istatistiksel analizleri için SPSS 23 programı kullanıldı. Gruplar arasında değişkenlerin karşılaştırılması ki-kare testi ile gerçekleştirildi. Bu analizde istatistiksel olarak p<0,05 değeri anlamlı kabul edildi.

## 3. Bulgular

Çalışmamızda hasta grubunda 30 Otistik çocukta 24'ünde (%80) CC genotip, 4'ünde (%13,3) CT genotip ve 2'sinde (%6,66) TT genotip saptandı. Kontrol grubunda 90 kişiden 61'inde (%67,8) CC genotip, 23'ünde (%25,6) CT genotip ve 6'sında (%6,7) TT genotip saptandı. Hasta ve kontrol grupları arasında genotip dağılımları bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (p>0.05). Hasta-kontrol grupları arasında her bir genotip için ayrı dağılım farkları karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (p>0.05). Ayrıca hasta-kontrol grupları arasında allel dağılım farkları karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (p>0.05). Ki-kare testi sonucu elde edilen bu veriler tablo 2, 3 ve 4'te gösterildi.

**Tablo 2.** MTHFR C677T Genotip'inin Hasta ve Kontrol Gruplarında Dağılımı

|                       | Hasta grubu | Kontrol grubu | P* değeri |
|-----------------------|-------------|---------------|-----------|
| Homozigot doğal (CC)  | 24          | 61            | 0,384     |
| Heterozigot (CT)      | 4           | 23            |           |
| Homozigot mutant (TT) | 2           | 6             |           |

\* Khi-kare testi sonucu

**Tablo 3.** MTHFR C677T Genotip'inin Hasta Ve Kontrol Gruplarında Allel Frekansları

|                       | Hasta grubu | Kontrol grubu | P* değeri |
|-----------------------|-------------|---------------|-----------|
| Homozigot doğal (CC)  | 24 (%80)    | 61 (%67,8)    | 0,202     |
| Heterozigot (CT)      | 4 (%13,3)   | 23 (%25,6)    | 0,211     |
| Homozigot mutant (TT) | 2 (%6,7)    | 6 (%6,7)      | 1,000     |

\* Khi-kare testi sonucu

**Tablo 4.** MTHFR C677T Genotip ve Alellerin Ayrı Ayrı Dağılımları

| Genotip | Hasta grubu / % | Kontrol grubu / % | P* değeri |
|---------|-----------------|-------------------|-----------|
| CC + CT | 28 / 93         | 84 / 85           | 1,00      |
| TT      | 2 / 7           | 6 / 15            |           |

| Allel | Hasta grubu / % | Kontrol grubu / % | P* değeri |
|-------|-----------------|-------------------|-----------|
| C     | 52 / 86,7       | 145 / 80,6        | 0,285     |
| T     | 8 / 13,3        | 35 / 19,4         |           |

\* Khi-kare testi sonucu

#### 4. Tartışma ve Sonuç

Otizmin etiyolojik faktörleri kesin bilinmemesine rağmen genetik, immünolojik ve çevresel faktörlerin nörogelişimsel süreçte etkileşimi sonucu meydana geldiği düşünülür (Vlassakova and Emmanouil, 2016, p.2). Epidemiyolojik çalışmalarda gebelik boyunca maternal folat durumu ile çocuklarda Otizm riski olabileceği bulunmuştur (DeVilbiss et al., 2015, p.663). Bu çalışmada MTHFR'nin C677T allelinden kaynaklanan enzim aktivitesi azalmasının Otizmle ilişkili olmadığı belirlendi. Ancak multifaktöriyel bir bozukluk olan Otizmde bağırsak-beyin ilişkisini daha iyi anlamak için geniş çaplı çalışmalar yapılmalıdır.

Sener vd. (2014) Kayseri / Türkiye'de PZR-RFLP yöntemlerini kullanarak Otistik çocuklarda %44,9 CC genotip, %52 CT genotip, %3,1 TT genotip saptamışlardır. T allel frekanslarını kıyasladıklarında hasta grubunda %29 ve kontrol grubunda %24 olarak bulmuşlardır ve sonuçta anlamlı fark saptamamışlardır. dos Santos et al. (2010) Brezilya'da PZR yöntemini kullanarak Otistik çocuklarda 677T allel frekansını kıyasladıklarında hasta grubunda %13,33 ve kontrol grubunda %19,4 saptamışlardır. Ayrıca allel ve genotipik dağılım farklarını istatistik hesaplamalar sonucu  $p=0,72$  olarak bularak CT+TT kombinasyonunda istatistiksel olarak anlamlı fark bulamamışlardır. Pasca et al. (2009) Romanya'da real time PCR ve erime eğrisi analiz yöntemlerini kullanarak Otistik çocuklarda T allel frekans farkını hasta grubunda 0,31 ve kontrol grubunda 0,25 olarak saptamışlardır. Ayrıca genotip dağılım frekans farkını  $p=0,85$  ve allel dağılım frekans farkını  $p=0,60$  saptayarak istatistiksel

olarak anlamlı bir fark bulamamışlardır. Liu et al. (2009) Kuzey Amerika'da PZR ve Dizi Analizi (ABI Prism 7900HT) yöntemlerini kullanarak T allelini hasta grubunda %42,9 ve kontrol grubunda %32,3 saptamışlardır ( $p=0,0004$ ). Ayrıca CT allelini hasta grubunda %47,8 ve kontrol grubunda %43,2 olarak bulmuşlardır. Sonuçta T allel frekansında anlamlı fark bulmalarına rağmen CT genotip frekansında anlamlı fark bulamamışlardır. Naushad et al. (2009) Hindistan'da PZR-RFLP yöntemlerini kullanarak 677T allel frekans farkını hasta grubunda %16,3 ve kontrol grubunda %6,5 saptamışlardır ( $p<0,0001$ ). Ayrıca MTHFR C677T polimorfizmine ek olarak A1298C polimorfizmini de incelemişlerdir. 1298C allel frekans farkı hasta grubunda %53,3 ve kontrol grubunda %53,6 buldukları için istatistiksel olarak anlamlı fark olmamasına rağmen 1298C/677T kombinasyonunda anlamlı fark saptamışlardır. Shawky et al. (2009) PZR ve reverse hibridizasyon yöntemlerini kullanarak hasta grubunun %50'sinde CT genotip ve %15'inde TT genotip bularak istatistiksel olarak anlamlı fark saptamışlardır. James et al. (2009) New York ve Florida'da PZR ve Dizi Analizi (ABI Prism 7700 ve 7900 sistem) yöntemlerini kullanarak MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmlerini incelemişlerdir. Bu polimorfizmlerin ayrı ayrı görüldükleri zaman fark olmamasına rağmen 677CT/1298AC bileşik heterozigot görüldüğünde istatistiksel olarak anlamlı fark saptamışlardır. Park et al. (2014) Kore'de MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmlerini inceleyerek 677CT/1298AC bileşik heterozigotu, 677CC/1298AA bileşik homozigot kombinasyonları ile karşılaştırıldığında 2,11 kat Otizmle ilişkili olduğunu bulmuşlardır. Boris et al. (2004) Amerika'da PZR yöntemini kullanarak TT genotipi hasta grubunda %23 ve kontrol grubunda %11 ( $p<0,0001$ ) olarak ve CT genotipi hasta grubunda %56 ve kontrol grubunda %41 bulmaları sonucunda ( $p=0,0001$ ) istatistiksel olarak anlamlı fark saptamışlardır.

Araştırmamızda çalışılan kan örneklerinden öncelikle DNA elde etmek için izolasyon işlemi gerçekleştirildi. Elde edilen DNA örneklerinde PZR-RFLP işlemi uygulandı ve agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Sonuçlarımıza göre CC, CT, TT frekansları otizmlili olgularda 24 (%80), 4 (%13,3), 2 (%6,6) TT ve kontrol grubunda 61 (%67,8), 23 (%25,6), 6 (%6,7) saptanmıştır. Ki-kare testi kullanılarak yapılan hesaplama sonucunda  $p=0,384$  bulunduğu için hasta - kontrol grupları arasında genotip dağılımları bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ( $p>0,05$ ). Hasta - kontrol grupları arasında her bir genotip için ayrı ayrı dağılım farkları karşılaştırıldığında, CC genotip için  $p=0,202$  CT genotip için  $p=0,211$  ve TT genotip için  $p=1,000$  bulunduğu için istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ( $p>0,05$ ).

Otizmde diyetin öneminin anlaşılabilmesi için yaptığımız bu çalışmadan yola çıkarak sonraki çalışmalarda C677T polimorfizmine etkisini ve Otizm etiyolojisindeki rolünü anlamak için MTHFR A1298C polimorfizmi de incelenmelidir. Ayrıca multifaktöriyel bir bozukluk olan Otizmde, bağırsak-beyin ilişkisini daha iyi anlamak için diyet tabi tutulan ve diyet uygulanmayan çocuklarda COMT, BDNF ve PTEN genlerinin de incelenmesi daha anlamlı ve ileri çalışmalara yol açabilecektir.



Onam bilgisi: Onam formu sunulmuştur.

Etik kurul onayı: Etik kurul onayı sunulmuştur.

Çıkar çatışması: Çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Finansal destek: Finansal destek bulunmamaktadır.

## Referanslar

- Awwad, N., Yousef, A.-M., Abuhaliema, A., Abdalla, I., Yousef, M. (2015). Relationship between Genetic Polymorphisms in MTHFR (C677T, A1298C and their Haplotypes) and the Incidence Of Breast Cancer among Jordanian Females - Case-Control Study. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16(12), 5007-5011. doi: 10.7314/APJCP.2015.16.12.5007
- Bicer, A. H., Alsaffar, A. A. (2013). Body mass index, dietary intake and feeding problems of Turkish children with autism spectrum disorder (ASD). *Research in Developmental Disabilities*, 34(11), 3978-3987. doi: 10.1016/j.ridd.2013.08.024
- Boris, M., Goldblatt, A., Galanko, J., James, S. J. (2004). Association of MTHFR Gene Variants with Autism. *Journal of American Physicians and Surgeons*, 9(4), 106-108. Erişim adresi: <https://www.jpands.org/vol9no4/boris.pdf>
- Chen, S., Li, Z., He, Y., Zhang, F., Li, H., Liao, Y., Wei, Z., Wan, G., Xiang X., Hu, M., Xia, K., Chen, X., Tang, J. (2015). Elevated mitochondrial DNA copy number in peripheral blood cells is associated with childhood autism. *BMC Psychiatry*, 15(50), 1-7. doi: 10.1186/s12888-015-0432-y
- Damiano, C. R., Cockrell, D. C., Dunlap, K., Hanna, E. K., Miller, S., Bizzell, J., Kovac, M., Turner-Brown, L., Sideris, J., Kinard, J., Dichter, G. S. (2015). Neural mechanisms of negative reinforcement in children and adolescents with autism spectrum disorders. *Journal of Neurodevelopmental Disorders*, 7(12), 1-11. doi: 10.1186/s11689-015-9107-8
- DeVilbiss, E. A., Gardner, R. M., Newschaffer, C. J., Lee, B. K. (2015). Maternal folate status as a risk factor for autism spectrum disorders: a review of existing evidence. *British Journal of Nutrition*, 114(5), 663-672. doi: 10.1017/S0007114515002470
- DiCicco-Bloom, E., Lord, C., Zwaigenbaum, L., Courchesne, E., Dager, S. R., Schmitz, C., Schultz, R. T., Crawley, J., Young, L. J. (2006). The Developmental Neurobiology of Autism Spectrum Disorder. *The Journal of Neuroscience*, 26(26), 6897-6906. doi:10.1523/JNEUROSCI.1712-06.2006
- dos Santos, P. A., Longo, D., Brandalize, A. P., Schuler-Faccini, L. (2010). MTHFR C677T is not a risk factor for autism spectrum disorders in South Brazil. *Porto Alegre. Psychiatric Genetics*, 20(4), 187-189. doi: 10.1097/YPG.0b013e32833a2220
- Inanir, A., Yigit, S., Tekcan, A., Alpaslan Pinarli, F., Inanir, S., Karakus, N. (2015). Angiotensin converting enzyme and methylenetetrahydrofolate reductase gene variations in fibromyalgia syndrome. *Gene*, 564(2), 188-192. doi:10.1016/j.gene.2015.03.051
- James, S. J., Melnyk, S., Jernigan, S., Cleves, M. A., Halsted, C. H., Wong, D. H., Cutler, P., Bock, K., Boris, M., Bradstreet, J. J., Baker, S. M., Gaylor, D. W. (2006). Metabolic endophenotype and related genotypes are associated with oxidative stress in children with autism. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 141B(8), 947-956. doi: 10.1002/ajmg.b.30366
- Keser, N., Pazarbaşı, A., Özpak, L. (2014). Metilentetrahydrofolat Redüktaz Aktivitesi ve Folat Metabolizması. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 23(2), 237-256. doi:10.17827/akt.52722
- Khan, I. A., Shaik, N. A., Kamineni, V., Jahan, P., Hasan, Q., Rao, P. (2015). Evaluation of Gestational Diabetes Mellitus Risk in South Indian Women Based on MTHFR (C677T) and FVL (G1691A) Mutations. *Frontiers in Pediatrics*, 3(34), 1-5. doi: 10.3389/fped.2015.00034
- Kezurer, N., Galronb, D., Golana, H. M. (2013). "Increased susceptibility to mild neonatal stress in MTHFR deficient." *Beer-Sheva: Behavioural Brain Research*. 253, 240-252. doi: 10.1016/j.bbr.2013.07.037
- Liu, X., Cohen, I. L., Gonzalez, M. G., Jenkins, E. C., Lewis, M. E., Holden, J. J. (2011). Population- and Family-Based Studies Associate the MTHFR Gene with Idiopathic Autism in Simplex Families. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 41(7), 938-944. doi: 10.1007/s10803-010-1120-x
- Moll, S., Varga, E. A. (2015). Homocysteine and MTHFR Mutations. *Cardiology Patient Page*, e6-e9. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.114.013311
- Al-Motasseem, Y., Shomaf, M., Said, I., Berger, S., Ababneh, N., Diab, O., Obeidat, N., Awidi, A. (2015). Allele and Genotype Frequencies of the Polymorphic Methylenetetrahydrofolate Reductase and Lung Cancer in the Jordanian Population: a Case Control Study. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16(8), 3101-3109. doi:10.7314/APJCP.2015.16.8.3101
- Naushad, S. M., Jain, J. M., Chintakindi, K. P., Singh, R. P., Naik, U., & Akella, R. R. (2009). Aberrations in folate metabolic pathway and altered susceptibility to autism. *Psychiatric Genetics*, 19, 171-176. doi: 10.1097/YPG.0b013e32832832cebd2
- Ornoy, A., Weinstein-Fudim, L., & Ergaz, Z. (2015). Prenatal factors associated with autism spectrum disorder (ASD). *Reproductive Toxicology*, 56, 1-15. doi: 10.1016/j.reprotox.2015.05.007
- Park, J., Ro, M., Pyun, J. A., Nam, M., Bang, H. J., Yang, J. W., Choi, K. S., Kim, S. K., Chung, J. H., Kwack, K. (2014). MTHFR 1298A>C is a risk factor for autism spectrum disorder in the Korean population. *Psychiatry Research*, 215(1), 258-259. doi: 10.1016/j.psychres.2013.11.006
- Paşca, S. P., Dronca, E., Nemeş, B., Kaucsár, T., Endreffy, E., Iftene, F., Benga, I., Cornean, R., Banerjee, R., Dronca, M. (2010). Paraoxonase 1 activities and polymorphisms in autism spectrum disorders. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(3), 600-607. doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00414.x
- Sener, E. F., Oztotop, D. B., & Ozkul, Y. (2014). MTHFR Gene C677T Polymorphism in Autism Spectrum Disorders. *Genetics Research International*, 2014(698574), 1-5. doi:10.1155/2014/698574
- Shawky, R. M., El-baz, F., Kamal, T. M., Elhossiny, R. M., Ahmed, M. A., & El Nady, G. H. (2014). Study of genotype-phenotype correlation of methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene polymorphisms in a sample of Egyptian autistic children. *The Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, 335-341. doi:10.1016/j.ejmhg.2014.05.004
- Shen, W., Zhang, B., Liu, S., Wu, H., Gu, X., Qin, L., Tian, P., Zeng, Y., Ye, L., Ni, Z., Wang, Q. (2015). Association of Blood Lead Levels with Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphisms among Chinese Pregnant Women in Wuhan City. *Plos One*, 10(2), 1-13. doi: 10.1371/journal.pone.0117366
- Ulucan, K., Akcay, A., Kirac, D., Taskin, N., Ergec, Akcay, T., Konuk, M., Guney, A. I., Heath, K. E., Campos-Barros, A. (2014). Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism is associated with non-syndromic cleft lip with or without palate in a Turkish population. *Sylwan*, 158(6), 249-265. doi: 10.13140/2.1.1292.1606
- Ulucan, K., Karahan, M., & Sağlam, E. (2013). Folik asit metabolizmasının biyokimyasal ve moleküler açıdan Parkinson, Alzheimer, bipolar ve Gıfrenik bozukluklara etkisi. *Anatolian Journal of Psychiatry*, 378-382. doi: 10.5455/apd.40636
- Vanilla, S., Dayanand, C. D., Kotur, P. F., Kutty, M. A., & Vegi, P. K. (2015). Evidence of Paternal N5, N10 - Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) C677T Gene Polymorphism in Couples with Recurrent Spontaneous Abortions (RSAs) in Kolar District- A South West of India. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 9(2), 15-18. doi: 10.7860/JCDR/2015/10856.5579
- Vlassakova, B. G., & Emmanouil, D. E. (2016). Perioperative considerations in children with autism spectrum disorder. *Current Opinion in Anesthesiology*, 29(3), 1-8. doi: 10.1097/ACO.0000000000000325