大韓不妊學會誌: 第28卷 第3號 2001
Kor. J. Fertil. Steril., Vol. 28, No. 3, 2001, 9

반복자연유산에서 Methylenetetrahydrofolate Reductase 돌연변이에 대한 분석

포천중문의과대학 산부인과학교실[1], 임상의학연구소[2], 아주대학교 생명과학부[3]

남윤성[1] · 차광렬[1] · 김남근[2] · 김선희[2] · 임진우[2] · 강금덕[3]
강명서[2] · 김세현[2] · 오도연[2]

The Analysis of Methylenetetrahydrofolate Reductase Mutation in Recurrent Spontaneous Abortion

Yoon Sung Nam[1], Kwang Yul Cha[1], Nam Keun Kim[2], Sun Hee Kim[2], Jin Woo Lim[2], Geum Duk Kang[3], Myung Seo Kang[2], Se Hyun Kim[2], Doyeun Oh[2]

Department of Obstetrics and Gynecology[1], Institute for Clinical Research, College of Medicine, Pocheon CHA University, Sungnam[2], Department of Biological Science, Ajou University, Suwon[3], Korea

Objective: To analyze the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) mutation in patients with recurrent spontaneous abortion.

Material and Method: The blood samples of patients with recurrent spontaneous abortion were tested by PCR-RFLP method.

Results: Of 51 cases of study group, 14 (27.5%) were normal, 25 (49.0%) were heterozygosity, and 12 (23.5%) were homozygosity. Of 58 cases of control group, 20 (34.5%) were normal, 30 (51.7%) were heterozygosity, and 8 (13.8%) were homozygosity. But the difference between two groups was not significant (p=0.190).

Conclusion: Hyperhomocysteinemia due to MTHFR mutation is a cause of recurrent spontaneous abortion. Therefore, the study for MTHFR mutation should be included in the workup of recurrent spontaneous abortion.

Key Words: Recurrent spontaneous abortion, MTHFR mutation

혈액응고계는 임신의 세가지 결정적인 단계인 배란, 착상, 태반발달에 중요한 역할을 한다. 임신 중에는 혈액이 응고하기 쉬운 상태이며 혈전증은 반복유산 뿐만 아니라 임신말기에도 합병증을 유발할 것으로 추정된다. 모체에서 융모 사이의 혈류는 제태기간 8주까지는 그렇게 발달하지 않으므로 혈전증은 이 시기까지는 유산과 별로 관계가 없을 것이라 생각된다. 과거의 연구에서 유전적인 혈전증이 임신 1삼분기의 반복유산 환자에서는 대조군과 별로 차이가 없었지만 2, 3삼분기에서는 증가한다는 사실이 보고되었다.

Homocysteine은 황을 포함하고 있는 아미노산으로 동물성 단백질에서 유래한다. 전형적인 호모시스테인뇨증 (homocystinuria)은 유전질환으로 homocysteine 대사의 재메틸화 (remethylation) 혹은 황전환작용 (trans-sulfuration) 경로 중 하나에 문제가 생겨서 발생한다. 이 질환은 골격이상, 정신지체, 혈관질환 등을 유발한다. 이에 반하여 중등도의 homocysteine과다증은 동맥과 정맥의 혈전질환과 관련되어

있고 다른 이상은 나타나지 않는다. 많은 예의 homocysteine과다증은 cystathionine-â-synthase (CBS)와 연관되어 있지만 이것은 전체의 1.5%도 되지 않는다. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)의 무내열성 변이 (thermolabile variant)는 핵산염 (nucleotide) 677 부위에서 cytosine이 thymine으로 바뀌어 alanine이 valine으로 치환되는 것이다. 이 돌연변이는 혈관질환과는 그렇게 연관되어 있지 않지만 엽산의 농도가 낮으면 homocysteine 수치가 과도하게 상승한다. 엽산, 비타민 B_6, 비타민 B_{12}를 공급하면 homocysteine 수치를 낮출 수 있고 이것이 치료의 기본이다. 미국에서는 임산부에서 신경관결손의 위험성을 줄이기 위하여 곡물에 엽산을 보충하도록 되어 있다. 혈중 homocysteine 농도를 낮추면 연간 5만명에 달하는 생명을 구할 수 있을 것으로 추정된다.

최근 들어 반복자연유산 환자들에 대한 연구에서 MTHFR유전자의 돌연변이에 따른 homocysteine과다증으로 인한 혈전과의 연관성이 보고되고 있다. 본 연구의 목적은 반복자연유산 환자에서 MTHFR 유전자의 돌연변이를 조사하고 이것을 대조군과 비교함으로써 MTHFR유전자의 돌연변이가 반복자연유산에 어떻게 영향을 미치는가를 조사하는데 있다.

연구대상 및 방법

1. 연구대상

1999년 3월부터 2001년 2월까지 차병원을 방문한 반복자연유산 환자 51명을 대상으로 하였다. 대조군으로는 유산병력이 없는 정상산모 58명을 대상으로 하였다.

2. 연구방법

DNA분리는 DNA추출키트 (extraction column, QIAmp blood kit, Qiagen)에 의해 제조자의 프로토콜에 따라 환자의 혈액에서 추출한 백혈구로부터 분리하였다. 분리한 DNA 표본은 시발체 세트 (primer set)인 sense primer (5'-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3')와 antisense primer (5'-AGGACGGTGCGGTGAGAGTG-3')를 사용하여 GeneAmp PCR machine (Perkin Elmer 2400)으로 증폭시켰다. 198 bp 생성물을 증폭시키기 위해 95℃에서 60초 동안 변성시킨 후 61℃에서 60초 동안 시발체를 아닐링시킨 다음 72℃에서 120초 동안 시발체 연장반응을 시행하는 과정을 35사이클 반복하였다. 증폭된 단편에서 단편들에서 677 C→T변이를 인식할 수 있는 제한효소 *Hinf*I (10 unit/reaction mixture)으로 37℃에서 3~4시간 동안 반응하였다. A (Ala) 대립유전자 (allele)에서 얻어진 198 bp 단편은 *Hinf*I로 분해되지 않는 반면에 V (Val) 대립유전자에서 얻어진 같은 길이의 단편들은 175 bp와 23 bp 단편으로 분해되었다. 이후 *Hinf*I으로 처리한 단편들을 2.5% agarose gel로 전기영동한 후 ethidium bromide로 염색하여 변이상태를 관찰하였다 (Figure 1).

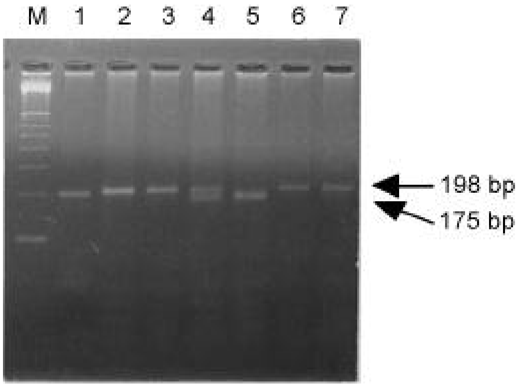

Figure 1. RFLP analysis of the MTHFR 677C→T mutation using enzyme *Hinf*I. M: 100-bp marker DNA, Lane 1: PCR product, Lane 2, 3, 6, 7: Normal homozygous type, Lane 4: Heterozygous type, Lane 5; Homozygous mutant type.

3. 통계분석

환자군과 정상대조군을 ÷^{2}-test로 비교하였고 odds 비값 (OR)과 95% 신뢰구간 (95% CI)을 구하였다. 모든 통계처리는 SAS release 6.12 for Windows를 이용하였다.

결 과

환자에서 MTHFR 돌연변이를 검사한 결과 정상이 14명 (27.5%), 이형접합성 변이가 25명 (49.0%), 동형접합성 변이가 12명 (23.5%)로 밝혀졌다. 대조군에서는 정상이 20명 (34.5%), 이형접합성 변이가 30명

Table 1. Frequency of MTHFR gene mutation in patient with recurrent spontaneous abortion and control group

Group	Number	Genotypes of MTHFR (%)		
		677CC	677CT	677TT
RSA	51	14 (27.5)	25 (49.0)	12 (23.5)
Control	58	20 (34.5)	30 (51.7)	8 (13.8)

Table 2. Prevalence of 677TT MTHFR mutation in different countries

Country	Homozygous mutant (677TT) of MTHFR		
	RSA	Control	OR (95% CI)
Netherlands	16.0 (29/185)	5.0 (6/113)	3.3 (1.3~8.3)
Italy	18.1 (17/ 94)	18.7 (28/150)	1.0 (0.5~1.9)
France	20.0 (20/100)	14.0 (14/100)	1.5 (0.7~3.2)
Israel	9.7 (4/ 41)	22.2 (4/ 18)	0.4 (0.1~1.7)
U.K.	8.1 (11/129)	8.9 (6/ 67)	0.9 (0.3~2.7)
Korea	23.8 (12/ 51)	13.8 (8/ 58)	1.9 (0.7~5.1)

OR (95% CI): odds ratio and 95% confidence interval calculated for the TT genotype verus the other two genotypes in cases versus control

(51.7%), 동형접합성 변이가 8명 (13.8%)였다 (Table 1).

통계분석상 환자군과 대조군 사이에는 유의한 차이를 보이지 않았다 (p=0.190).

고 찰

Homocysteine은 thiol을 포함하는 아미노산으로 필수 아미노산인 methionine의 탈메틸화 부산물 (demethylated derivative)이며 methionine 회로의 중간물질이다. 혈중에서 homocysteine은 유리 homocysteine, cysteine-homocysteine 복합 disulphide 혹은 단백질과 결합된 homocysteine의 형태로 존재한다. Homocysteine이 대사되는 과정에는 2가지의 경로가 있다. 첫째가 methionine으로 재메틸화 (remethylation)되는 것이고 둘째는 cystathionine이나 cysteine으로 황전환작용 (trans-sulfuration)이 일어나는 것이다. 재메틸화에는 methionine synthase, 비타민 B_{12}가 조효소로, 엽산이 기질로 작용한다. 황전환작용에서서는 cystathionine â-synthase (CBS)와 활성형의 비타민 B_6가 조효소로 필요하다. 황전환작용이나 재메틸화 경로에 문제가 생기면 homocysteine이 축적되어 homocysteine 과다증이 생기게 된다.

CBS 부족으로 인하여 homocysteine뇨증 (homocystinuria)이 생긴 경우 homocysteine 과다증이 혈관질환을 일으키는 위험인자로 작용한다는 사실이 밝혀졌다. 이 경우 젊은 나이에 동맥질환과 혈전색전증 (thromboembolism)이 나타나는 경우가 매우 흔하다. 30세 이전에 합병증이 생길 확률이 50%에 달한다는 보고도 있다.[1] 그렇지만 이 질환의 빈도는 아주 낮기 때문에 전체적으로 건강에 미치는 영향은 미미하다.

더 흔한 것은 혈중 homocysteine 수치가 약간 상승하는 경증의 homocysteine 과다증이다. 내열성이 없는 돌연변이 효소에 대한 동형접합성 (homozygosity)으로 인하여 homocysteine이 methionine으로 전환하는데 필요한 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)의 활성이 감소한다. 이것이 homocysteine과다증의 흔한 원인으로 밝혀졌고 이 돌연변이 대립형질에 대한 이형접합성 (heterozygosity)의 빈도는 특정한 인구집단에서 50%에 달하는 것으로 보고되었다.[2,3] 재메틸화에 관여하는 methylenetetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase의 중요성은 연구 중에 있다. 위와 같은 유전학적 원인 뿐만 아니라 비타민 B결핍증, 신부전 등도 homocysteine과다증을 유발하는 원인이다.

MTHFR의 유전적 이상은 homocysteine뇨증 환자에서 조사되었다. 이 경우 가장 흔한 원인은 CBS의 결핍인데 이것은 황전환작용에 작용하는 첫번째 효소이다.[4] MTHFR결핍증 때문에 homocysteine뇨증이 생기는 경우는 비교적 드물어서 지금까지 50예만이 보고되었다. 이 환자들은 심한 MTHFR결핍증이 있고 섬유아세포 (fibroblast)에서의 활성이 정상군에 비하여 15%밖에 되지 않는다.[5] 이 질환은 여러가지의 신경학적, 혈관증상들과 관련되어 있다. 최근에 homocysteine뇨증과 응고인자 V의 돌연변이로 인한 활성화 C단백질 내성 (activated protein C resistance: APCR)과의 연관성이 제시되었다.[6]

37℃에서 활성이 저하되고 46℃에서 내열성이 없는 MTHFR의 돌연변이가 관상동맥질환에서 보고되었다.[7] 대조군의 5%에 비하여 관상동맥질환 환자군에서는 17%가 이상을 보였다. PCR/RFLP 방법에 의한 조사결과 677 염기쌍에서 cytosine이 thymine으로 대치되어 alanine이 valine으로 치환되는 것으로 밝혀졌다. 이 돌연변이는 미국에서 아주 흔히 보고되었으며 대립형질의 빈도는 약35%이다.[8] 그 중 12%가 동형접합체이고 40~45%가 이형접합체이다. 그렇지만 이 빈도는 나라에 따라 많은 차이를 보인다 (Table 2). 동형접합체 돌연변이에서는 37℃에서 대조군의 40~50%에 해당하는 활성을 보이며 이형접합체인 경우에는 그 활성이 중간 정도이다. 동형접합체에서는 46℃에서 대조군에 비하여 35%의 잔여활성을 나타내고 이형접합체에서는 중간정도의 활성을 보인다. Alanine이 valine으로 치환되어 나타나는 활성은 높은 연관성을 보여서 전체인구 중에서 다른 MTHFR 돌연변이는 존재하지 않는다는 것을 시사한다.

동형접합체 돌연변이에서는 혈중 homocysteine 수치가 유의하게 높지만 엽산이 homocysteine 수치를 조절하는데 중요한 역할을 한다.[9] 동형접합체 돌연변이인 경우 혈중 엽산수치가 정상범위 이하에 있을 때 약간의 homocysteine과다증을 보인다.[10] 그렇지만 엽산수치가 정상이 되면 homocysteine과다증은 나타나지 않는다. 이런 관계는 심혈관질환 뿐만 아니라 정상군에서도 증명되었다. 이 사실은 엽산을 공급해주면 돌연변이를 가진 사람에서 homocysteine과다증을 방지할 수 있다는 것을 의미한다.

Homocysteine을 측정하는 방법으로는 homocysteine과 homocysteine thiolactone, 유리형의 homocysteine, 그리고 단백질과 결합한 homocysteine을 포함하는 총homocysteine 수치가 이용된다. 단백질과 결합된 homocysteine은 전체 양의 70~80%에 달한다.[11] 정상 총homocysteine의 농도는 공복시에 5~15 ì mol/L이다.[12] Homocysteine과다증은 15~30 ì mol/L, 30~100 ì mol/L, 100 ì mol/L 이상 등의 3가지로 분류할 수 있다.

공복시 homocysteine 수치가 정상이지만 homocysteine과다증이 의심되는 경우에는 methionine 부하검사 (methionone loading test)를 시행한다.[14] Methionine 부하검사시 수치가 2표준편차 이상이면 homocysteine 과다증이라고 진단할 수 있다. 그렇지만 methionine 부하검사에 대해서는 아직 많은 논란이 있다. 결론적으로 MTHFR은 homocysteine의 기저치를 조절하기 때문에 그 활성은 methionine 부하검사로 정확히 측정하기 어렵다. 반면에 황전환작용에 관여하는 효소는 일시적으로 발생한 식후의 homocysteine 상승을 낮추기 때문에 methionine 부하검사로 활성을 측정하는 것이 가능하다.

정상 인간배아 발달시에 methionine 대사에 관한 흥미로운 연구가 발표되었다.[15] 이 연구에서 제태기간 8~12주 사이의 임산부 23명을 대상으로 산모의 혈액, 외배아 체강액 (extra-embryonic coelomic fluid)과 양수를 채취하였다. 검사결과 외배아 체강액과 양수에서의 methionine 수치가 산모혈액에서보다 높고 homocysteine 수치는 낮았다. 저자들은 methionine이 모체의 혈청으로부터 체강으로 이동되고 이것이 양수내로 들어간다고 추정하였다. Methinone은 다양한 황전환작용 반응에서 보편적인 메틸기인 S-adenosyl-methinone의 전구물질이므로 정상배아의 성장과 발달에 필수적이다. 이것은 S-adenosyl-methionine이 필요한 체강액과 양수에 methinone이 왜 많이 존재하는가를 설명해 준다. S-adenosyl-methionine/S-adenosyl-homocysteine의 비율이 낮으면 황전환작용 반응이 저하되고 S-adenosyl-methionine 형성이 증가되면 homocysteine 농도가 높아져서 쥐의 배아를 대상으로

한 실험에서 독성물질로 작용한다는 사실이 밝혀졌다.[16] 그러므로 초기 임신에서는 methionine 회로에 장애가 생기면 심각한 문제가 발생하며 이것이 반복자연유산을 초래할 수 있다. 전형적인 homocysteine 뇨증을 치료하지 않으면 유산율이 50%에 달한다. 유전적인 CBS결핍증이 없지만 반복자연유산 환자의 25~33%에서는 homocysteine과다증이 있거나 methionine 부하검사에서 이상이 발견되었다.[17,18] 원인불명의 반복자연 유산을 호소하는 여성들은 MTHFR 유전자의 돌연변이가 정상군에서보다 3배나 많았다.[19] 이 돌연변이는 활성이 적고 무내열성인 MTHFR 유전자를 생산하여 homocysteine이 methionine으로 변하는 재메틸화를 감소시킨다.

76명의 유산환자와 106명의 대조군을 대상으로 조사한 결과 무내열성의 동형접합성 MTHFR 돌연변이가 유산의 위험성을 증가시키는 것으로 판명되었다.[20] 정맥혈전이 있는 30세 이상의 여성들은 대조군보다 homocysteine 수치가 증가할 확률이 7배나 되었다.[21] 혈전이 재발되는 환자에서 homocysteine과다증은 대조군에서보다 2~3배나 흔하다. Homocysteine과다증과 임신중의 혈전과의 관계는 아직 확실하게 밝혀지지 않았다. 제태기간 17주 전에 2번 이상의 유산을 경험한 여성들은 대조군보다 무내열성의 동형접합성 MTHFR 돌연변이를 가지고 있을 확률이 2~3배나 높다.[22] 이것은 homocysteine과다증 혹은 낮은 엽산농도와 관계가 있다.[23] 전자간증이 조기에 발생한 산모의 18%에서 methionine 부하검사상 양성으로 판명되었다.[24] 최근 연구결과 태반조기박리 환자의 26%, 자궁내 태아사망의 11%, 자궁내 성장지연의 38%에서 homocysteine과다증이 발견되었다.[25] 현재까지의 연구를 종합한 결과 homocysteine과다증은 반복자연유산의 위험인자라는 사실이 밝혀졌다.[26]

Homocysteine과다증의 치료는 원인질환에 따라 다르지만 일반적으로 비타민을 공급하여 치료할 수 있다. 치료에 필요한 최소한의 엽산과 pyridoxine의 양은 확실히 밝혀지지 않았다. 대부분의 환자에서 하루에 1~5 mg의 엽산을 복용하면 homocysteine 수치가 급격히 감소한다.[27] 엽산을 단독으로 사용하거나 엽산과 비타민 B_{12}, B_6, 그리고 비타민 B_6과 B_{12} 등을 복합적으로 투여하여도 homocysteine을 감소시킬 수 있다. 대개 치료 4~6주 후 homocysteine 수치가 정상화되지만 2주만에 회복되는 경우도 있다. 흥미롭게도 1960년부터 비타민 B_6소비량이 늘어난 이후 심혈관질환으로 인한 사망률이 감소되었다.[28]

지금까지 동맥질환의 원인으로 homocysteine과다증이 제시되었지만 정맥혈전과의 관계는 명확히 증명되지 않았다. Homocysteine 수치가 상위 20%에 속하면 동맥경화의 위험도가 2배 증가한다. 경증의 homocysteine과다증은 고혈압과 같은 위험인자와 동반하여 혈전을 유발하는데 상승작용을 한다. 그렇기 때문에 이런 위험인자가 있는 경우 homocysteine 수치를 낮추는 치료를 받아야 한다. 소량의 엽산이 여기에 효과가 있는 것으로 밝혀졌다. Methionine 부하검사시 생기는 homocysteine과다증에는 비타민 B_6도 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 그렇지만 현재 이런 치료에 관한 명확한 통계가 나와 있지 않으므로 앞으로 여기에 관하여 심도있는 연구가 있어야 할 것으로 생각된다.

본 연구에서는 반복자연유산 환자에서 MTHFR 돌연변이를 조사하고 이것을 대조군과 비교하였으나 유의성이 없는 것으로 판명되었다. 그렇지만 혈전기호증전우병 (thrombophilia)은 복합적으로 나타나는 경향이 많고 최근 이것이 반복자연유산과 관련이 있다는 보고가 발표되고 있기 때문에 여기에 따른 종합적인 접근이 필요하다.

참 고 문 헌

1. Mudd SH, Skovby F, Levy HL, Pettigrew KD, Wilcken B, Pyeritz RE, et al. The natural history of homocystinuria due to cystathionine â-synthase deficiency. Am J Hum Genet 1985; 37: 1-31.
2. Kluijtmans IAJ, van de Heuvel LPWJ, Boers GHJ, Frosst P, Stevens EMB, van Oost BA, et al. Molecular genetic analysis in mild hyperhomocysteinemia: A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk for cardiovascular disease. Am J Hum Genet 1996; 58: 35-41.
3. Engbersen AMT, Franken DG, Boers GHJ, Stevens EMB, Trijbels FJM, Blom HJ. Thermolabile 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase as a cause of mild hyperhomocysteinemia. Am J Hum Genet

1995; 56: 142-50.

4. Mudd SH, Levy HL, Skovby B. Disorders of trans-sulfuration. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editor. The metabolic and molecular bases of inherited disease. 7 th ed. New York: McGraw-Hill; 1995. P.1279-327.
5. Rosenblatt DS. Inherited disorders of folate transport and metabolism. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editor. The metabolic and molecular bases of inherited disease. 7 th ed. New York: Mc-Graw-Hill; 1995. P.3111-28.
6. Mandel H, Brenner B, Berant M, Rosenberg N, Lanir N, Jakobs C, et al. Coexistence of hereditary homocystinuria and Factor V Leiden effect on thrombosis. N Engl J Med 1996; 334: 763-8.
7. Kang SS, Wong PWK, Susmano A, Sora J, Norusis M, Ruggie N. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase: an inherited risk factor for coronary disease. Am J Hum Genet 1991; 48: 536-45.
8. Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, Ellison RC, Eckfeldt JH, Rosenberg IH, et al. Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. Circulation 1996; 93: 7-9.
9. Van der Put NMJ, Steegers-Theunissen RPM, Frosst P, Trijbels FJM, Eskes TKAB, van den Heuvel LP, et al. Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. Lancet 1995; 346: 1070-1.
10. Ma J, Stampfer MJ, Hennekens CH, Frosst P, Selhub J, Horsford J, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, plasma folate, homocysteine, and risk of myocardial infarction in U.S. physicians. Circulation 1996; 94: 2410-6.
11. Carey MC, Donovan DE, FutzGerald O, McAuley FD. Homocystinuria: A clinical and pathological study of nine subjects in six families. Am J Med 1968; 48: 7-25.
12. Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, Malinow MR, Andersson A, Allen RH. Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications. Clin Chem 1993; 39: 1764-79.
13. Kang SS, Wong PW, Manilow MR. Homocysteinemia as a risk factor for occlusive vascular disease. Ann Rev Nutr 1992; 12: 279-98.
14. Dudman NP, Wilcken DE, Wang J, Lynch JF, Macey D, Lundberg P. Disordered methionine/homocysteine metabolism in premature vascular disease: its occurrence, cofactor therapy and enzymology. Arterioscler Thromb 1993; 13: 1253-60.
15. Steegers-Theunissen RP, Wathen NC, Eskes TK. Maternal and fetal levels of methionine and homocysteine in early human pregnancy. Br J Obstet Gynecol 1997; 104: 20-4.
16. Van Aerts LA, Blom HJ, Deabreu RA. Prevention of neural tube defects by and toxicity of L-homocysteine in cultured postimplantation rat embryos. Tetratology 1994; 50: 348-60.
17. Steegers-Theunissen RP, Boers GH, Blom HJ. Hyperhomocysteinaemia and recurrent spontaneous abortion or abruptio placentae. Lancet 1992; 339: 1122-3.
18. Wouters MG, Boers GH, Blom HJ. Hyperhomocysteinemia: a risk factor in women with unexplained recurrent pregnancy loss. Fertil Steril 1993; 60: 820-5.
19. Frosst P, Blom HJ, Milos R. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. Nature Genet 1995; 10: 111-3.
20. Brenner B, Sarig G, Weinner Z, Younis Y, Blumfeld Z, Lanir N. Thrombophilic polymorphisms are common in women with fetal loss without apparent cause. Thromb Haemost 1999; 82: 6-9.
21. Girling J, de Swiet M. Inherited thrombophilia and pregnancy. Curr Opin Obstet Gynecol 1998; 10: 135-44.
22. Nelson WLDM, Steegers EAP, Eskes TKAB, Blom JH. Genetic risk factor for unexplained recurrent early pregnancy loss. Lancet 1997; 350: 861.
23. Nelen WLDM, Heil SG, Steegers EAP, Eskes TKAB. Recurrent early pregnancy loss and genetic-related

disturbances in folate and homocysteine metabolism. Br J Hosp Med 1997; 58: 511-3.

24. Dekker GA, de Vries JIP, Doelitzsch PM, Huijgens PC, von Blomberg BME, Kakobs C, et al. Underlying disorders associated with severe early onset preeclampsia. Am J Obstet Gynecol 1995; 173: 1042-8.
25. de Vries JIP, Dekker GA, Huijgens PC, Jakobs C, Blomberg BME, van Geijn HP. Hyperhomocysteinaemia and protein S deficiency in complicated pregnancies. Br J Obstet Gynecol 1997; 104: 1248-54.
26. Nelen WLDM, Blom HJ, Steegers EAP, Heijer MD, Eskes TKAB. Hyperhomocysteinemia and recurrent early pregnancy loss: meta-analysis. Fertil Steril 2000; 74: 1196-9.
27. Brattstrom LE, Israelsson B, Jeppsson JO, Hultberg BL. Folic acid --- an innocuous means to reduce plasma homocysteine. Scand J Clin Lab Invest 1988; 48: 215-21.
28. McCully KS. Homocysteine and vascular disease. Nat Med 1996; 2: 386-9.