

بررسی همراهی پلی مورفیسم های rs4846049 و rs1801131 ژن *MTHFR* با میگرن در بیماران ایرانی

محدثه صالحی^۱، مونا امین بیدختی^{۲*}، غلامرضا جوادی^۱، بهنام صفرپور لیما^۳، رضا میرفخرایی^۲

۱- گروه زیست شناسی، واحد علوم تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- گروه ژنتیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۳- گروه مغز و اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: عوامل مختلفی مانند ژنتیک (از جمله جهش‌ها و پلی مورفیسم‌ها) و محیط در بروز میگرن دخالت دارند. هدف از این مطالعه بررسی ارتباط پلی مورفیسم‌های rs4846049 و rs1801131 ژن *MTHFR* با بیماری میگرن است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه موردی شاهی شامل ۱۴۸ بیمار و ۱۴۷ سالم، استخراج DNA از خون محیطی و سپس تعیین ژنوتیپ پلی مورفیسم‌های rs1801131 و rs4846049 به ترتیب با استفاده از PCR-RFLP و Tetra ARMS-PCR انجام گرفت.

یافته‌ها: در توزیع ژنوتیپی پلی مورفیسم rs4846049، فرکانس ژنوتیپ هتروزیگوت (GT) در بیماران مبتلا به میگرن در مقایسه با افراد سالم تفاوت معنی‌داری نشان داد (P value = 0.04; OR = 0.57; 95% CI, 0.34-0.96).

نتیجه‌گیری: چندشکلی 2572G>T در ژن *MTHFR* استعداد ابتلا به بیماری میگرن را افزایش می‌دهد ولی پلی مورفیسم A1298C با خطر بروز میگرن در جمعیت بیماران ایرانی تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. این نتایج نشان می‌دهد که پلی مورفیسم rs4846049 با بیماری میگرن در جمعیت ایرانی همراهی دارند. تفاوت معنی‌داری برای فراوانی ژنوتیپی و آلیلی یا هریک از مدل‌های ژنتیکی پلی مورفیسم A1298C بین گروه مورد و شاهد مشاهده نشد.

واژه‌های کلیدی: میگرن - ژن *MTHFR* (Methylenetetrahydrofolate Reductase) - پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی

مقدمه

کند و بیش‌ترین شیوع آن در خانم‌ها است (۵). شایع‌ترین علائم زمینه‌ساز که ممکن است تا ۸۰٪ از بیماران را شامل شود عبارتند از: تهوع، استفراغ، فنوفونی و فتوفوبی. برمبنای گروه-بندی انجمن بین‌المللی سردرد (IHS)^۱ دو نوع اصلی میگرن وجود دارد: میگرن با اورا (MWA)^۲ و میگرن بدون اورا (MWOA)^۳ (۲۹). میگرن با اورا یک اختلال بصری یا دیداری است که به مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه قبل از شروع حمله‌ها میگرن

میگرن یکی از رایج‌ترین اختلال‌های نورولوژیک در سراسر جهان است که حدود ۱۲٪ از جمعیت بزرگسال را درگیر می‌کند.

نویسنده مسئول:

گروه ژنتیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

پست الکترونیکی: monaaminbeidokhti@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۴/۱۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۵/۲۹

¹ - International headache society

² - Migraine with aura

³ - Migraine without aura

و rs4846049(2572G>T) با خطر بروز بیماری میگرن در نمونه‌ای از جمعیت ایرانی است.

مواد و روش‌ها

افراد مورد مطالعه

در یک مطالعه مورد-شاهدی، ۱۴۸ نفر مبتلا به میگرن (شامل ۴۳ نفر میگرن با اورا و ۱۰۵ نفر میگرن بدون اورا) با میانگین سنی $۸/۹۲ \pm ۳۳/۶۹$ سال و تعداد ۱۴۷ نفر افراد سالم با میانگین سنی $۱۰/۰۳ \pm ۳۴/۵$ سال که به بیمارستان امام حسین مراجعه کرده بودند، انتخاب شدند. سپس توسط متخصص داخلی و اعصاب نوع میگرن این افراد بر اساس دستورالعمل ICHD^۷ تعیین گردید (۷).

نمونه‌گیری و استخراج DNA جهت بررسی‌های ژنتیکی

از کلیه افراد مورد نظر بعد از اخذ رضایت‌نامه ۵ میلی‌لیتر خون محیطی در فالتون حاوی EDTA اخذ گردید. استخراج DNA با استفاده از کیت MTU انجام شد. DNA استخراج شده تا زمان آزمایش در دمای ۲۰- نگهداری شد.

بررسی پلی‌مورفیسم A1298C با روش PCR-RFLP

در این مطالعه جهت بررسی پلی‌مورفیسم A1298C پرایمرهای پیشنهاد شده در مطالعه Lorenz و همکاران مورد استفاده قرار گرفت (۱۹). توالی پرایمرها به صورت پرایمرهای رفت '5'CAT CTA CCT GAA GTC3' و برگشت '5'GAG3' GTC CAC AGC ATG GAG3' است. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل DNA با غلظت ۱۰۰ ng، هر جفت از پرایمرها با غلظت ۱۰ پیکومول بر لیتر و Taq DNA Polymerase 2X Master Mix Red (Ampliqon, Denmark) تهیه شد. تکثیر در ۳۲ سیکل، دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد. دناتوراسیون اولیه به مدت ۵ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد و طول‌سازی نهایی به مدت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. سپس محصول‌های PCR توسط آنزیم MboII تحت هضم آنزیمی قرار گرفتند. واکنش هضم آنزیمی شامل محصول PCR، ۱ واحد آنزیم، بافر 10x B و آب مقطر

پدیدار می‌شود. افسردگی گسترشی قشری^۴ که به انفجارهای فعالیت‌های عصبی اطلاق می‌شود و پس از آن عصب‌ها برای مدتی غیرفعال می‌شوند، در افراد مبتلا به میگرن با اورا دیده شده است. میگرن بدون اورا رایج‌ترین نوع میگرن است و گزارش شده است که حدود ۸۰٪ از مبتلایان به میگرن از این نوع هستند. میگرن با اورا با علائم عصبی کانونی مانند تاری دید، سرگیجه یا توهم مشخص می‌شود و این علائم قبل و یا حین حمله‌ها سردرد بروز می‌کند (۶). میگرن اغلب به صورت یک طرفه و ضربان دار بروز می‌کند و همراه با عودهای مکرر است (۲۹). مکانیسم‌های پاتوفیزیولوژیک که زمینه‌ساز میگرن می‌شوند پیچیده بوده و هنوز به طور کامل شناخته نشده اند. از جمله عواملی که در بروز میگرن نقش دارند می‌توان به عوامل ارثی، عوامل مسئول پاسخ ایمنی، استرس اکسیداتیو (سیتوکاین، متابولیسم تیروزین، هموسیستئین)، عوامل مرتبط با انتقال درد و احساس (سروتونین، گلوتامات، ژن وابسته به پپتید کلسی تونین و متابولیسم هورمون های جنسی) اشاره نمود (۵).

یکی از مهم‌ترین ژن‌هایی که پلی‌مورفیسم آن در بروز میگرن نقش دارد، ژن متیلن تترا هیدروفولات ردوکتاز (*MTHFR*) است. *MTHFR* در ناحیه ژنی 1p36.3 قرار گرفته که از ۱۱ اگزون تشکیل شده است و محصول پروتئینی آن آنزیم دخیل در متابولیسم فولات و مسئول تولید ۵-متیلن تتراهیدروفولات از ۵ و ۱۰ متیلن تتراهیدروفولات است که دهنده کربن در متیلاسیون مجدد هموسیستئین به متیونین است (۱۰). این آنزیم یک جز ضروری برای متابولیسم سلولی و متیلاسیون پروتئین است. یکی از نقش‌های اصلی این آنزیم تنظیم متابولیسم فولات و تنظیم سطح هموسیستئین پلاسما است (۱). نقص *MTHFR* سبب افزایش سطح هموسیستئین پلاسما می‌شود که به دنبال آن آسیب سلول‌های اندوتلیال و تغییر ویژگی‌های انعقادی و کاهش دائمی سلول‌های سه قلو^۵ رخ می‌دهد. این تغییرها در نهایت منجر به التهاب مننژ^۶ و گشادی ورید مغزی و درد میگرنی می‌شود (۱۰). پلی‌مورفیسم های ژنتیکی در ژن *MTHFR* می‌توانند سبب تغییر در فعالیت آنزیم شوند. بنابراین هدف این مطالعه بررسی همراهی بین پلی‌مورفیسم‌های ژنتیکی (A1298C) rs1801131

⁴ -cortical spreading depression

⁵ - Trigeminal

⁶ - Meninges

⁷ -International Classification of Headache Disorders

۲۲۴ و ۱۰۱ جفت باز و در افراد هتروزیگوت GT، ۲۲۴، ۱۷۷ و ۱۰۱ جفت باز بود.

برای تأیید یافته‌های تعیین ژنوتیپ، ده درصد از نمونه‌ها توسط شرکت ماکروژن در کره با دستگاه ABI 3730xl DNA analyser توالی‌یابی گردید.

تحلیل آماری

جهت تعیین وجود تعادل هاردی واینبرگ و هم‌چنین فرکانس آلی و ژنوتیپی دو پلی‌مورفیسم مورد مطالعه از آزمون مربع کای و نرم افزار SNPSTAT استفاده شد (۲۴).

یافته‌ها

نتایج حاصل از Tetra-ARMS PCR و PCR-RFLP دارای هم‌خوانی ۱۰۰ درصد با نتایج حاصل از توالی‌یابی بود. توزیع ژنوتیپی در افراد بیمار و سالم در تعادل هاردی واینبرگ برای هردو پلی‌مورفیسم مورد مطالعه بودند.

فراوانی آلی و فراوانی ژنوتیپی پلی‌مورفیسم A1298C در جداول ۱ و ۲ و هم‌چنین فراوانی آلی و فراوانی ژنوتیپی پلی‌مورفیسم 2572G>T در جداول ۳ و ۴ ارائه شده است.

آنالیز فرکانس ژنوتیپی پلی‌مورفیسم A1298C تفاوت معناداری را بین دو گروه بیمار و سالم نشان نداد.

آنالیز فرکانس ژنوتیپی پلی‌مورفیسم 2572G>T نشان داد فرکانس ژنوتیپ هتروزیگوت بین افراد بیمار و سالم دارای تفاوت معناداری است ($P\text{ value} = 0.04$; 95% CI, 0.34-0.96). هم‌چنین در حالت مغلوب هم بین افراد بیمار و سالم تفاوت معناداری را نشان می‌دهد.

($P\text{ value} = 0.02$; OR = 1.76; 95% CI, 1.08-2.87)

بحث

در این مطالعه، ارتباط پلی‌مورفیسم‌های A1298C و 2572G>T در ژن *MTHFR* با خطر بروز بیماری میگرن مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد چندشکلی 2572G>T استعداد ابتلا به بیماری میگرن را افزایش می‌دهد. پلی‌مورفیسم A1298C با خطر بروز میگرن در جمعیت بیماران ایرانی تفاوت معناداری را نشان نداد.

استریل در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت حدود ۳ ساعت انجام گرفت. سپس قطعه‌های ایجاد شده ناشی از هضم آنزیمی بر روی ژل پلی‌آکریل آمید ۸٪ از یکدیگر تفکیک و مورد بررسی قرار گرفت. برای افراد دارای ژنوتیپ AA چهار قطعه ۱۷۶-۳۰-۲۸-۲۲ جفت بازی، افراد دارای ژنوتیپ CC سه قطعه ۲۰۴-۳۰-۲۲ جفت بازی و افراد با ژنوتیپ AC پنج قطعه به طول ۲۰۴-۱۷۶-۳۰-۲۸-۲۲ جفت باز بر روی ژل مشاهده شد.

برای تأیید یافته‌های تعیین ژنوتیپ، ده درصد از نمونه‌ها توسط شرکت ماکروژن در کره با دستگاه ABI 3730xl DNA analyser توالی‌یابی گردید.

بررسی پلی‌مورفیسم 2572G>T با استفاده از روش Tetra ARMS PCR

در این مطالعه جهت بررسی پلی‌مورفیسم 2572G>T از روش Tetra ARMS PCR استفاده شد. به این منظور پرایمرهای مورد با استفاده از نرم‌افزار آنلاین Primer1 طراحی گردید (۲۸). این پرایمرها شامل یک جفت پرایمر داخلی و یک جفت پرایمر خارجی هستند.

Fi : 5'TTT ATA TGT ACT GCA CGG GCT CCA GGT3'

Ri: 5'TAT ACT GGG ACT CCC AGT GAA CTT GCC 3'

Fo: 5'TAT AAC ATC TCT TCT ACG ATG CCA CCA GTG3'

Ro:5'ATA TAC TCT TTT GGT GGG GAG CAC TTG C3'

واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل DNA با غلظت ۱۰۰ ng، پرایمرها با غلظت ۱۰ پیکو مول بر لیتر و Taq DNA Polymerase 2X Master Mix Red (Ampliqon, Denmark) تهیه شد. تکثیر در ۳۲ سیکل، دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه ۶۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد. دناتوراسیون اولیه به مدت ۵ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد و طویل‌سازی نهایی به مدت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. سپس محصول‌های PCR بر روی ژل آگارز ۲ درصد مورد بررسی قرار گرفتند. طول محصول‌های PCR در افراد دارای ژنوتیپ TT، ۲۲۴ و ۱۷۷ جفت باز، در افراد GG،

درصد سگته های مغزی و فاکتورهای خطر بیماری های قلبی عروقی مانند دیابت، فشار خون بالا و کلسترول بالا بیش تر از سایر افراد است (۱۷).

همچنین در بررسی های انجام شده مشخص شده است که پلی-مورفیسم A1298C با بیماری های قلبی عروقی نیز ارتباط دارد و باعث ترومبوز وریدی و اترواسکلروز می شود (۲۰).

ارتباط بین پلی مورفیسم 2572G>T در ژن *MTHFR* و بیماری میگرن تاکنون مورد مطالعه قرار نگرفته است. مطالعه حاضر اولین مطالعه ای بود که ارتباط پلی مورفیسم 2572G>T با بیماری میگرن را نشان داد. پلی مورفیسم 2572G>T که در ناحیه UTR 3' ژن *MTHFR* قرار دارد با افزایش سطح هموسیستئین و کاهش سطح فولات ارتباط دارد و یک پلی مورفیسم بالقوه برای تعدیل کردن اثر miRNAهاست که اتصال miR149 را تحت تأثیر قرار می دهد و در نتیجه باعث کاهش بیان *MTHFR* می شود (۱۱).

miRNAها بیان ژن را پس از رونویسی از طریق مهار ترجمه یا القا تجزیه آن کنترل می کنند و این کار را از طریق اتصال به ناحیه 3'UTR انتهای mRNAها انجام می دهند (۲۵). این مولکولها می توانند فرآیندهای ایمنی و عصبی را تنظیم نمایند و در بیماران مبتلا به میگرن و ایسکمی مغزی- قلبی به عنوان شاخص های مولکولی جدید برای مداخله گره های بالینی و دارویی استفاده شوند. همچنین miR149 بر استعداد ابتلا به سرطان های مختلف مثل سرطان پستان، روده بزرگ، کبد و غیره تأثیر می گذارد (۹). مشخص شده است پلی مورفیسم دیگری (rs71428439) که در منطقه حلقه بنیادی، miR149 قرار دارد سطح هموسیستئین پلاسما را تحت تأثیر قرار می دهد (۱۴، ۲۷). بنابراین miR149 می تواند از طریق ژن *MTHFR* در بیماری میگرن نقش داشته باشد، زیرا کمبود اسید فولیک باعث افزایش بیان miR149 می شود و در نتیجه فعالیت *MTHFR* را مهار می کند که این خود باعث کاهش سطح فولات و افزایش هموسیستئین می شود (۴).

نتیجه گیری

طبق نتایج حاصل از مطالعه حاضر، آنالیز فراوانی ژنوتیپی پلی-مورفیسم 2572G>T نشان داد که فراوانی ژنوتیپ هتروزایگوت GT بین دو گروه مورد مطالعه تفاوت معناداری داشت. (P value) بین دو گروه مورد مطالعه تفاوت معناداری داشت. (P value) = 0.04; OR = 0.57; 95% CI, 0.34-0.96 معناداری در حالت مغلوب بین گروه مورد و شاهد مشاهده شد. (P value) = 0.02; OR = 1.76; 95% CI, 1.08-2.87 تفاوت

ژن *MTHFR* که در موقعیت کروموزومی 1p36.3 قرار گرفته دارای بیش از ۴۰ پلی مورفیسم است. پلی مورفیسم A1298C دومین پلی مورفیسم شایع این ژن است که در آگرون ۷ قرار گرفته است و باعث تبدیل گلوتامات به آلانین در موقعیت ۴۲۹ می شود که به میزان قابل توجهی فعالیت آنزیم *MTHFR* را کاهش می دهد. این پلی مورفیسم اهمیت زیادی دارد، زیرا در متابولیسم فولات و در نهایت متابولیسم هموسیستئین نقش قابل توجهی دارد. آلل C پلی مورفیسم A1298C سبب ناپایداری آنزیم *MTHFR* می شود و فعالیت آن کاهش می یابد (۲۰).

مطالعه های متعددی در مورد ارتباط بین پلی مورفیسم های ژن *MTHFR* با بیماری میگرن در جمعیت های مختلف انجام گرفته است. Kara و همکاران در سال ۲۰۰۳ به بررسی ارتباط پلی-مورفیسم A1298C ژن *MTHFR* در بیماری میگرن در جمعیت ترکیه پرداختند. در نهایت به این نتیجه رسیدند که از نظر فراوانی آللی، شیوع آلل C در گروه بیمار نسبت به گروه سالم بالاتر بود. همچنین از نظر فراوانی ژنوتیپی نیز، ژنوتیپ CC تفاوت معناداری را بین دو گروه بیمار و سالم نشان داد (۱۲). در مطالعه دیگر که در سال ۲۰۱۴ توسط Lorenz و همکاران در روسیه انجام شد، در میان دختران با میگرن با اورا ژنوتیپ های AC و AA شیوع بالاتری را نسبت به پسران نشان می داد، ولی این مطالعه از نظر آماری معنادار نبود (۱۹). در سال ۲۰۱۵ اولین مطالعه درباره ارتباط پلی مورفیسم A1298C با بیماری میگرن توسط سعیدی و همکاران در ایران صورت گرفت که تفاوت معناداری در شیوع ژنوتیپ های پلی مورفیسم A1298C در مقایسه با گروه کنترل مشاهده نشد (۲۲).

نقص *MTHFR* علاوه بر این که موجب نقص فولات می شود، موجب افزایش هموسیستئین در خون شده و با بیماری های مختلفی چون بیماری های قلبی، آلزایمر، سرطان کولون، لوکمی، دیابت شیرین، سندرم داون، نقایص لوله عصبی و اختلال های نورولوژیکی در ارتباط است. کوفاکتورهای این مسیر آنزیمی اسید فولیک، ویتامین B₆ و B₁₂ هستند (۸). کمبود ویتامین B₁₂ و B₆ و فولیک اسید و یا نقص ژنتیکی در مسیر متابولیسمی منجر به افزایش سطح هموسیستئین می شود، که به دنبال آن پدیده Thrombophilia یا لخته شدن خون ایجاد می شود. این پدیده به دلیل نقص در سیستم انعقاد خون رخ می دهد. به طوری که در داخل رگ های بدن لخته های خونی ایجاد می شود. پلی مورفیسم A1298C باعث افزایش سطح هموسیستئین شده که به دنبال آن پدیده لخته شدن خون صورت می گیرد. به همین دلیل در افراد مبتلا به میگرن

معناداری برای فراوانی ژنوتیپی و آللی یا هریک از مدل های ژنتیکی پلی مورفیسم A1298C بین گروه مورد و شاهد مشاهده نشد.

سیاسگزاری

بدین وسیله از تمام شرکت کنندگان در این مطالعه قدردانی می-شود. این مطالعه با کمک مالی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی حمایت شد.

جدول ۱: فراوانی آللی پلی مورفیسم A1298C در جمعیت مورد مطالعه

Allele	Case (%)	Control (%)	OR (95% CI)	P value
A	177 (59.8)	183 (62.2)	0.90 (0.65 - 1.26)	0.54
C	119 (40.2)	111 (37.8)	1.11 (0.80 - 1.54)	0.54

جدول ۲: بررسی همراهی ژنوتیپ و الگوی های توارث پلی مورفیسم A1298C با وقوع میگرن

Genotype	Case (%)	Control (%)	OR (95% CI)	P value
AA	56 (37.8%)	56 (38.1)	1.00	
AC	65 (43.9%)	71 (48.3)	0.92 (0.55 - 1.51)	0.73
CC	27 (18.3%)	20 (13.6)	1.35 (0.68 - 2.68)	0.39
CC+AC vs AA			1.01 (0.63 - 1.62)	0.96
CC vs AC+ AA			1.42 (0.76 - 2.66)	0.28
total	148	147		

جدول ۳: فراوانی آلی پلی مورفیسم 2572G>T در جمعیت مورد مطالعه

Allele	Case (%)	Control (%)	OR (95% CI)	P value
G	182(61.5)	156(53.1)	1.41 (1.02 - 1.96)	0.04
T	114(38.5)	138(46.9)	0.71 (0.51 - 0.98)	0.04

جدول ۴: بررسی همراهی ژنوتیپ و الگوهای توارث پلی مورفیسم 2572G>T با وقوع میگرن در جمعیت مورد مطالعه

Genotype	Case (%)	Control (%)	OR (95% CI)	P value
GG	60 (39.2%)	41 (27.9%)	1.00	
GT	62 (43.2%)	74 (50.3%)	0.57 (0.34 - 0.96)	0.04
TT	26 (17.6%)	32 (21.8%)	0.56 (0.29 - 1.07)	0.08
GG +GT vs TT			1.31 (0.73 - 2.32)	0.36
GG vs GT+ TT			1.76 (1.08 - 2.87)	0.02
Total	148	147		

منابع

1. Awwad N, Yousef AM, Abuhaliema A, Abdalla I, Yousef M. Relationship between Genetic Polymorphisms in MTHFR (C677T, A1298C and their Haplotypes) and the Incidence Of Breast Cancer among Jordanian Females--Case-Control Study. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2015;16(12):5007-11.
2. Azimova JE, Sergeev AV, Korobeynikova LA, Kondratieva NS, Kokaeva ZG, Shaikhaev GO, *et al.* Effects of *MTHFR* gene polymorphism on the clinical and electrophysiological characteristics of migraine. *BMC Neurol*, 2013;13:103.
3. Bahadir A, Eroz R, Dikici S. Investigation of *MTHFR* C677T gene polymorphism, biochemical and clinical parameters in Turkish migraine patients: association with allodynia and fatigue. *Cell Mol Neurobiol*, 2013;33(8):1055-63.
4. Chen QY, Liu N, Ma J, Fang Y, Cao Y, Li H, *et al.* Effect of a pre-microRNA-149 (miR-149) genetic variation on the risk of ischemic stroke in a Chinese Han population. *Genet Mol Res*, 2015;14(1):2582-9.
5. Coskun S, Varol S, Ozdemir HH, Agacayak E, Aydin B, Kapan O, *et al.* Association of brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor gene polymorphisms with susceptibility to migraine. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2016;12:1779-85.
6. Farago P, Tuka B, Toth E, Szabo N, Kiraly A, Csete G, *et al.* Interictal brain activity differs in migraine with and without aura: resting state fMRI study. *J Headache Pain*, 2017;18(1):8.
7. Farhadi Z, Alidoost S, Behzadifar M, Mohammadibakhsh R, Khodadadi N, Sepehrian R, *et al.* The Prevalence of Migraine in Iran: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Iran Red Crescent Med J*, 2016;18(10):e40061.(Persian in text full)
8. Forges T, Monnier-Barbarino P, Alberto JM, Gueant-Rodriguez RM, Daval JL, Gueant JL. Impact of folate and homocysteine metabolism on human reproductive health. *Hum Reprod Update*, 2007;13(3):225-38.
9. Gallelli L, Siniscalchi A, Carotenuto M, Caroleo MC, Cione E, Guidetti V. microRNAs-based predictor factor in patients with migraine-ischemic stroke. *Microna*, 2017.
10. Hemat K, Haghjooy Javanmard SH, Saadatnia M, Zandifar A, Rafiee L, and Tajaddini MH. Genetic Polymorphisms of C677T MTHFR Gene in Migraine Patients Compared with Controls. *Jims*, 2012. 30. 214, 4. (Persian in text full)
11. Jeon YJ, Kim JW, Park HM, Kim JO, Jang HG, Oh J, *et al.* Genetic variants in 3'-UTRs of methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) predict colorectal cancer susceptibility in Koreans. *Sci Rep*, 2015;5:11006.
12. Kara I, Sazci A, Ergul E, Kaya G, Kilic G. Association of the C677T and A1298C polymorphisms in the 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase gene in patients with migraine risk. *Brain Res Mol Brain Res*, 2003;111(1-2):84-90.
13. Kowalska M, Prendecki M, Kozubski W, Lianeri M, Dorszewska J. Molecular factors in migraine. *Oncotarget*, 2016;7(31):50708-18.
14. Li Q, Chen L, Chen D, Wu X, Chen M. Influence of microRNA-related polymorphisms on clinical outcomes in coronary artery disease. *Am J Transl Res*, 2015;7(2):393-400.
15. Li WX, Dai SX, Zheng JJ, Liu JQ, Huang JF. Homocysteine Metabolism Gene Polymorphisms (*MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C, *MTR* A2756G and *MTRR* A66G) Jointly Elevate the Risk of Folate Deficiency. *Nutrients*, 2015;7(8):6670-87.
16. Li Z, Yadav U, Mahemuti A, Tang BP, Upur H. Association of *MTHFR* genetic polymorphisms with venous thromboembolism in Uyghur population in Xinjiang, China. *Int J Clin Exp Med*, 2015;8(10):17703-11.
17. Liew SC, Gupta ED. Methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) C677T polymorphism: epidemiology, metabolism and the associated diseases. *Eur J Med Genet*, 2015;58(1):1-10.

18. Liu R, Geng P, Ma M, Yu S, Yang M, He M, *et al.* *MTHFR* C677T polymorphism and migraine risk: a meta-analysis. *J Neurol Sci* , 2014;336(1-2):68-73.
19. Lorenz AL, Kahre T, Mihailov E , Nikopensus T , Lotman EM,Metspal A,Kolk A. Are Methylenetetrahydrofolate Reductase (*MTHFR*) Gene Polymorphisms C677T and A1298C Associated with Higher Risk of Pediatric Migraine in Boys and Girls? *Jbise* , 2014;7:464-72.
20. Najmabadi H, Hadavi V, Imanian H, Kariminejad A, Almadani N, Rostami M *et al.* . Study of *MTHFR* A1298C Polymorphism as a Genetic Risk Factor for Cardiovascular Disease in the Iranian Population. *G3M* , 2010; 8 (1) :1962-1966. (Persian in text full)
21. Pizza V, Bisogno A, Lamaida E, Agresta A, Bandieramonte G, Volpe A, *et al.* Migraine and coronary artery disease: an open study on the genetic polymorphism of the 5, 10 methylenetetrahydrofolate (*MTHFR*) and angiotensin I-converting enzyme (*ACE*) genes. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem* , 2010;10(2):91-6.
22. Saeedi S, Owji AK, Ansari M ,Ghafarpour M ,Ebrahimi A ,Fallah MS.*MTHFR* Gene polymorphisms and susceptibility to Migraine Attacks. *Amls* , . 2015;1.
23. Shaik MM, Gan SH. Vitamin supplementation as possible prophylactic treatment against migraine with aura and menstrual migraine. *Biomed Res Int* , 2015;2015:469529.
24. Sole X, Guino E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* , 2006;22(15):1928-9.
25. Sushma PS, Jamil K, Kumar PU, Satyanarayana U, Ramakrishna M, Triveni B. Genetic Variation in MicroRNAs and Risk of Oral Squamous Cell Carcinoma in South Indian Population. *Asian Pac J Cancer Prev* , 2015;16(17):7589-94.
26. Wu C, Gong Y, Sun A, Zhang Y, Zhang C, Zhang W, *et al.* The human *MTHFR* rs4846049 polymorphism increases coronary heart disease risk through modifying miRNA binding. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* , 2013;23(7):693-8.
27. Wu J, Lv S, An J, Lu C. Pre-miR-149 rs71428439 polymorphism is associated with increased cancer risk and AKT1/cyclinD1 signaling in hepatocellular carcinoma. *Int J Clin Exp Med* , 2015;8(8):13628-33.
28. Ye S, Dhillon S, Ke X, Collins AR, Day IN. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res* , 2001;29(17):E88-8.
29. Yucel Y, Coskun S, Cengiz B, Ozdemir HH, Uzar E, Cim A, *et al.* Association of Polymorphisms within the Serotonin Receptor Genes 5-HTR1A, 5-HTR1B, 5-HTR2A and 5-HTR2C and Migraine Susceptibility in a Turkish Population. *Clin Psychopharmacol Neurosci* , 2016;14(3):250-5.
30. Zhu Q, Chen Y, Dai J, Wang B, Liu M, Wang Y, *et al.* Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms at 3'-untranslated region are associated with susceptibility to preterm birth. *Transl Pediatr* , 2015;4(1):57-62.