

ОЦЕНКА РОЛИ ПОЛИМОРФНОГО ВАРИАНТА ГЕНА MTR (A2756G) В МЕХАНИЗМАХ РАЗВИТИЯ ВРОЖДЕННЫХ ПОРОКОВ ЧЕЛЮСТНО-ЛИЦЕВОЙ ОБЛАСТИ

П.Б. Гульмухамедов

Аннотация

Оценен вклад генетического полиморфизма MTR (A2756G) в механизмы формирования ВПЧЛО. Результаты наших исследований по исследованию особенностей распределения аллелей и генотипов по полиморфизму гена MTR (A2756G) между изученными группами больных с ВПЧЛО и контролем показали отсутствие статистически достоверных различий в их долях. Между тем, по данному генетическому полиморфизму статистически достоверное различие обнаружено лишь в носительстве гетерозиготного генотипа A/G, доля которого оказалась выше в 3.7 раз ($\chi^2=5.0$; $P=0.05$) среди больных с Q36 по сравнению с аналогичной в группе больных с Q37. Следовательно, генотип A/G в 3.7 раз повышает риск развития изолированной расщелины губы (Q36) по сравнению с сочетанной патологии расщелины нёба и губы (Q37), что позволяет рассматривать его в качестве генетического предиктора предрасполагающего риску развития Q36 в Узбекистане.

Ключевые слова: ВПЧЛО, расщелина нёба, расщелина губы, расщелина нёба и губы, полиморфизм гена MTR (A2756G), аллель, частота, генотип, доля носительства, риск формирования.

Актуальность. Врожденные пороки челюстно-лицевой области (ВПЧЛО) представляют собой весьма сложные по механизму развития и разнообразные по клиническим проявлениям заболевания, в основе которых лежит взаимодействие множества полигенных факторов [2,3]. Несмотря на достаточно глубокую изученность и широкое освещение вопроса о факторах, предрасполагающих возникновению ВПЧЛО, результаты существующих исследований об изучении роли и взаимосвязи разнообразных экзогенных и эндогенных причинных агентов, все же, наряду с недостаточной информативностью, имеют также и разноречивый характер [9,12].

Среди всего разнообразия предрасполагающих факторов, особое место в риске формирования ВПЧЛО отводится генетическим компонентам, в основе которых лежат полиморфность ряда генов [1,8]. В этом плане, согласно литературным данным, немаловажное значение в инициации развития ВПЧЛО отводится генам фолатного

цикла, занимающих ключевое место в регуляции каскадного процесса, где основным этапом является синтез метионина из гомоцистеина [11,14]. Данный синтез достигается непосредственно при участии фермента метилентетрагидрофолатредуктазы (MTHFR) за счет восстановления 5,10-метилентетрагидрофолата до 5-метилтетрагидрофолата [7]. Далее метильная группа из 5-метилтетрагидрофолата переносится на цианкоболамин, отдающий ее гомоцистеину, в результате чего при участии фермента метионинсинтазы (MTR) образуется метионин [14]. Нарушения в этих процессах приводят к накоплению гомоцистеина, что по литературным данным повышают риск развития различных патологий, в том числе и ВПЧЛО [11,13].

Результатами ряда исследований показано, что некоторые варианты полиморфных генов фолатного цикла, в частности MTR A2756G участвует в повышении риска развития ВПЧЛО [4,5,6,13]. Вместе с тем, существуют исследования, которые не обнаружили взаимосвязь между полиморфным геном MTR A2756G и развитием ВПЧЛО [8,10]. В частности, С. Jiang (2015) и W.Lei et al. (2018), на основе сравнительного и стратифицированного анализа различных исследований по оценке роли полиморфных генов фолатного цикла среди лиц с различной этнической принадлежностью не выявили значимой связи генетического полиморфизма MTR A2756G с риском развития ВПЧЛО (G против A: OR = 0,95, 95% ДИ = 0,82-1,11, p = 0,55) [8,10].

Учитывая отсутствие каких-либо убедительных доказательства за или против различных выводов о связи между полиморфным геном MTR A2756G и риском формирования ВПЧЛО, нам представилось интересным провести дополнительное в Узбекистане.

Цель исследования. Изучить роль полиморфного варианта гена MTR A2756G в повышении риска развития ВПЧЛО в Узбекистане.

Материал и методы: В исследование включено 105 детей в возрасте $6,5 \pm 1,8$ лет (основная группа) с врожденными пороками челюстно-лицевой области. Согласно МКБ 10 из 105 детей у 35 установлена расщелина нёба (Q35), у 33 установлена расщелина губы (Q36) и 37 – расщелина губы и нёба (Q37). Все больные наблюдались в клинике Ташкентского государственного стоматологического института (г. Ташкент) в период с 2019 по 2022 г.г. Контрольную группу составило 103 здоровых лиц, не имевших в анамнезе врожденных пороков развития, соответствовавших по полу и возрасту с обследованной основной группой детей с ВПЧЛО.

В данном исследовании у всех обследованных лиц проведен анализ полиморфного варианта гена MTR A2756G. Детекция полиморфного варианта гена MTR A2756G проводилась методом SNP-ПЦР посредством постановки полимеразно-цепной реакции

(ПЦР) в режиме Real Time на программируемом фирмы «Rotor Gene Q» (Quagen, Германия), с использованием тест-систем компании «Литех» (Россия), согласно инструкции производителя.

Статистический анализ результатов проведен с использованием пакета статистических программ «OpenEpi 2009, Version 9.2». Сравнительный анализ частот аллелей и генотипов полиморфизма гена MTR A2756G между исследованными выборками проведён с помощью критерия χ^2 и точного критерия Фишера. Различия оценивались статистически достоверными при $P \leq 0.05$

Результаты и обсуждение. В наших исследованиях распределение частот вариантов генотипов изученного полиморфного гена MTR (A2756G) соответствовало равновесию Харди-Вайнберга (РХВ) ($p > 0.05$).

Анализ распределения аллелей и генотипов по полиморфному гену MTR (A2756G) в основной группе больных с ВПЧЛО ($n=105$) и группе здоровых ($n=103$) показал, что носительство основного мажорного аллеля А определялось в 83.8% ($n=176$) и 86.1% ($n=168$) случаях, а минорного аллеля G в 16.2% ($n=34$) и 18.4% ($n=38$) случаях соответственно (Табл. 1).

Таблица 1

Распределение частот аллелей и генотипов полиморфизма гена MTR (A2756G) в группах пациентов с ВПЧЛО и здорового контроля

№	Группа	Частота аллелей				Частота распределения генотипов					
		A		G		A/A		A/G		G/G	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
I	Основная группа ВПЧЛО, $n=105$	176	83.8	34	16.2	75	71.4	26	24.8	4	3.8
II	Q35 (расщелина нёба), $n=35$	59	84.3	11	15.7	25	71.4	9	25.7	1	2.9
III	Q36 (расщелина губа), $n=33$	54	81.8	12	18.2	21	63.6	12	36.4	0	0.0
IV	Q37 (расщелина нёба и губы), $n=37$	63	85.1	11	14.9	29	78.4	5	13.5	3	8.1
V	Контрольная группа, $n=103$	168	81.6	38	18.4	70	68.0	28	27.2	5	4.8

Между тем, варианты генотипов A/A, A/G и G/G в основной группе с ВПЧЛО определялись у 71.4% (n=75), 26.8% (n=26) и 3.8% (n=4) больных, тогда как в группе здоровых таковые выявлялись в 68.0% (n=70), 27.2% (n=28) и 4.8% (n=5) случаях.

Таким образом, приведенные данные показывают наличие, хотя и незначительного, но все же меньшей встречаемости минорного аллеля G (16.2% против 18.4%), а также генотипов A/G (24.8% против 27.2%) и G/G (3.8% против 4.8%) среди основной группы с ВПЧЛО по сравнению с аналогичными в группе контроля.

Оценивая уровень распределения аллелей и генотипов по полиморфизму MTR (A2756G) в отдельности в группах с Q35 (n=35), Q36 (n=33) и Q37 (n=37) обнаружено, что аллель A соответственно исследованной группе определялся в 84.3% (n=59), 81.8% (n=54) и 85.1% (n=63) случаях, тогда как случаи выявления аллеля G составили 15.7% (n=11), 18.2 (n=12) и 14.9% (n=11) соответственно. Наряду с этим, среди больных с Q35, Q36 и Q37 носительство дикого генотипа A/A составило 71.4% (n=25), 63.6% (n=21) и 78.4% (n=29) соответственно, гетерозиготного генотипа A/G – 25.7% (n=9), 36.4% (n=12) и 13.5% (n=5) соответственно. В то же время доля мутантного генотипа G/G – определялась лишь среди больных с Q35 и Q37 соответственно в 2.9% (n=1), и 8.1% (n=3) случаях.

Таким образом, анализируя результаты распределения частот исследованных аллелей и генотипов по варианту гена MTR (A2756G) выявлено существенное различие в доле носительства гетерозиготного генотипа A/G, выявленного в максимальных значениях (36.4%) среди группы с Q36, среди которых, одновременно не выявлялось носительство мутантного генотипа G/G. Помимо этих особенностей по сравнению с группами Q35 и Q36, в группе с Q37 менее всего зарегистрировано носительство гетерозиготного генотипа A/G (13.5%), при максимальном носительстве мутантного генотипа G/G (8.1%) (Табл.1).

Для определения значимости выявленных различий в долях распределения аллелей и генотипов по варианту гена MTR (A2756G) между исследованными группами далее проведена сравнительная их оценка.

В отношении долей носительства аллелей и генотипов по полиморфизму гена MTR (A2756G) в основной группе с ВПЧЛО по сравнению с группой здоровых, обнаружено статистически незначимое снижение встречаемости минорного аллеля G менее чем в единицу (16.2% против 18.4%; $\chi^2=0.4$; P=0.6; OR=0.9; 95%CI: 0.51-1.42). Вместе с тем, среди основной группы больных напротив регистрировалась несколько большая частота основного генотипа A/A в 1.2 раза (71.4% против 68.0%; $\chi^2=0.3$; P=0.6; OR=1.2; 95%CI: 0.65-2.13) при меньшей регистрации долей гетерозиготного A/G (24.8% против 27.2%; $\chi^2=0.2$; P=0.7; OR=0.9; 95%CI: 0.47-1.64) и гомозиготного мутантного G/G

генотипов (3.8% против 4.9%; $\chi^2=0.1$; $P=0.8$; $OR=0.8$; 95%CI: 0.2-2.97) не достигая статистически значимого уровня (Табл. 2).

Таблица 2

Различия в частоте аллельных и генотипических вариантов полиморфизма гена MTR (A2756G) в основной группе пациентов с ВПЧЛО и здоровых

Аллели и генотипы	Количество обследованных аллелей и генотипов				χ^2	P	RR	95%CI	OR	95%CI
	Основная группа		Контрольная группа							
	n	%	n	%						
A	17									
	6	83.8	168	81.6	0.4	0.6	1.0	0.61-1.73	1.2	0.7 - 1.95
G	34	16.2	38	18.4	0.4	0.6	1.0	0.6 - 1.57	0.9	0.51 - 1.42
A /A	75	71.4	70	68.0	0.3	0.6	1.1	0.58 - 1.9	1.2	0.65 - 2.13
A /G	26	24.8	28	27.2	0.2	0.7	0.9	0.49-1.69	0.9	0.47 - 1.64
G/G	4	3.8	5	4.9	0.1	0.8	0.8	0.18-3.37	0.8	0.2 - 2.97

Следовательно, сравнительный анализ, проведенный между основной группой с ВПЧЛО и контроле показал отсутствие статистически значимых различий в доле распределения частот аллелей и генотипов по варианту гена MTR (A2756G), что доказывает отсутствие его роли в качестве генетического предиктора, предрасполагающего повышению риска формирования ВПЧЛО в целом.

Далее проведена сравнительная оценка достоверности различий в частотах аналогичных аллелей и генотипов по варианту гена MTR (A2756G) между группами с Q35, Q36 и Q37 относительно контроля.

В отношении долей носительства аллелей и генотипов по полиморфизму гена MTR (A2756G) в группе с Q35 по сравнению с группой здоровых, обнаружено статистически незначимое снижение встречаемости минорного аллеля G менее чем в единицу (15.7% против 18.4%; $\chi^2=0.3$; $P=0.7$; $OR=0.8$; 95%CI: 0.4-1.72). Вместе с тем, среди основной группы больных напротив регистрировалась несколько большая частота основного генотипа A/A в 1.2 раза (71.4% против 68.0%; $\chi^2=0.1$; $P=0.8$; $OR=1.2$; 95%CI: 0.51-2.73) при меньшей регистрации долей гетерозиготного A/G (25.7% против 27.2%; $\chi^2<3.84$; $P=0.9$; $OR=0.9$; 95%CI: 0.39-2.22) и гомозиготного мутантного G/G генотипов (2.9% против 4.9%; $\chi^2=0.3$; $P=0.7$; $OR=0.6$; 95%CI: 0.07-4.98) не достигая статистически значимого уровня (Табл. 3).

Таблица 3

Различия в частоте аллельных и генотипических вариантов полиморфизма гена MTR (A2756G) в группах больных с Q35 и здоровых

Аллели и генотипы	Количество обследованных аллелей и генотипов				χ^2	P	RR	95%CI	OR	95%CI
	Q35		Контрольная группа							
	n	%	n	%						
A	59	84.3	168	81.6	0.3	0.7	1.0	0.34-3.13	1.2	0.58 - 2.52
G	11	15.7	38	18.4	0.3	0.7	1.0	0.69-1.35	0.8	0.4 - 1.72
A /A	25	71.4	70	68.0	0.1	0.8	1.1	0.3 - 3.68	1.2	0.51 - 2.73
A /G	9	25.7	28	27.2	0.0	0.9	0.9	0.26-3.43	0.9	0.39 - 2.22
G/G	1	2.9	5	4.9	0.3	0.7	0.6	0.02-20.5	0.6	0.07 - 4.98

Таким образом, ассоциации полиморфного гена MTR (A2756G) с повышенным риском формирования Q35 также не установлено.

Исследования, проведенные между группами с Q36 и здоровыми не отличались наличием статистически значимым различий в носительстве аллеля G в связи с их почти одинаковой частотой в обеих изученных группах (18.2% против 18.4%; $\chi^2 < 3.84$; P=0.98; OR=1.0; 95%CI: 0.48-2.01). При этом, хотелось бы отметить, что в распределении частоты генотипа A/G обнаружено её увеличение среди больных с Q36 по сравнению с контролем в 1.5 раз (36.4% против 27.2%; $\chi^2 = 1.0$; P=0.4; OR=1.5; 95%CI: 0.67-3.5), но с отсутствием достоверной значимости (Табл. 4). В этой связи, очевидно, что полиморфный ген MTR (A2756G) не имеет вклада в повышении риска формирования Q36.

Таблица 4

Различия в частоте аллельных и генотипических вариантов полиморфизма гена MTR (A2756G) в группах пациентов с Q36 и здоровых

Аллели и генотипы	Количество обследованных аллелей и генотипов				χ^2	P	RR	95%CI	OR	95%CI
	Q36		Контрольная группа							
	n	%	n	%						
A	54	81.8	168	81.6	0.0	0.98	1.0	0.34-2.92	1.0	0.5 - 2.09

G	12	18.2	38	18.4	0.0	0.9	1.0	0.71 - 1.4	1.0	0.48 - 2.01
A /A	21	63.6	70	68.0	0.2	0.7	0.9	0.28-3.11	0.8	0.36 - 1.87
A /G	12	36.4	28	27.2	1.0	0.4	1.3	0.41-4.38	1.5	0.67 - 3.5

Результаты исследования, между группами с Q37 и контролем показывают снижение случаев носительства минорного аллеля G среди больных менее чем в один раз (14.9% против 18.4%; $\chi^2=0.5$; P=0.5; OR=0.8; 95%CI: 0.37-1.6). Тогда как, в распределении частоты дикого генотипа A/A (78.4% против 68.0%; $\chi^2=1.4$; p=0.3; OR=1.7; 95%CI: 0.71-4.12) замечено его недостоверное повышение и снижение частоты гетерозиготного варианта генотипа A/G (13.5% против 27.2%; $\chi^2=2.8$; P=0.1; OR=0.4; 95%CI: 0.15-1.16) в группе больных с Q37 по сравнению с контролем. Помимо этого, в отношении мутантного варианта генотипа G/G выявлено его повышение среди больных с Q37 в 1.7 раз (8.1% против 4.9%; $\chi^2=0.5$; P=0.5; OR=1.7; 95%CI: 0.4-7.51) без достижения значимости по сравнению с таковым в контроле (Табл. 5). Таким образом, полученные результаты показывают отсутствие вклада полиморфного гена MTR (A2756G) в повышение риска формирования Q37 в качестве самостоятельного генетического маркера.

Таблица 5

Различия в частоте аллельных и генотипических вариантов полиморфизма гена MTR (A2756G) в группах пациентов с Q37 и здоровых

Аллели и генотипы	Количество обследованных аллелей и генотипов				χ^2	P	RR	95%CI	OR	95%CI
	Q37		Контрольная группа							
	n	%	n	%						
A	63	85.1	168	81.6	0.5	0.5	1.0	0.35-3.14	1.3	0.62 - 2.69
G	11	14.9	38	18.4	0.5	0.5	1.0	0.69-1.34	0.8	0.37 - 1.6
A /A	29	78.4	70	68.0	1.4	0.3	1.2	0.3 - 4.48	1.7	0.71 - 4.12
A /G	5	13.5	28	27.2	2.8	0.1	0.5	0.09-2.67	0.4	0.15 - 1.16
G/G	3	8.1	5	4.9	0.5	0.5	1.7	0.26-10.6	1.7	0.4 - 7.51

Результаты сравнительного анализа долей носительства аллелей и генотипов полиморфизма гена MTR (A2756G) между группами больных с Q35 и Q36 характеризовались отсутствием статистически значимых различий в доле носительства минорного аллеля G (15.7% против 18.2%; $\chi^2<3.84$; P=0.8; OR=0.8; 95%CI: 0.34-2.06).

Различия в распределении частот гомозиготного A/A (71.4% против 63.6%; $\chi^2=0.5$; P=0.5; OR=1.4; 95%CI: 0.52-3.96) и гетерозиготного генотипа A/G (25.7% против 36.4%; $\chi^2=0.9$; P=0.4; OR=0.6; 95%CI: 0.22-1.7) между исследованными группами также не отличались статистической значимостью. Следовательно, анализ показывает отсутствие значимости полиморфного гена MTR (A2756G) в повышении риска формирования Q35 по сравнению с Q36.

Различия в носительстве аллелей и генотипов по полиморфизму гена MTR (A2756G) между группами больных с Q35 и Q37 также характеризовались отсутствием статистической значимости в доле носительства минорного аллеля G (15.7% против 14.9%; $\chi^2<3.85$; P=0.9; OR=1.1; 95%CI: 0.43-2.65), а также и в доле носительства генотипов A/A (71.4% против 78.4%; $\chi^2=0.5$; P=0.5; OR=0.7; 95%CI: 0.24-2.01), A/G (25.7% против 13.5%; $\chi^2=1.7$; P=0.2; OR=2.2; 95%CI: 0.67-7.3) и G/G (2.9% против 8.1%; $\chi^2=0.9$; p=0.4; OR=0.3; 95%CI: 0.04-3.05).

Сравнивая доли носительства аллелей и генотипов полиморфизма гена MTR (A2756G) между группами больных с Q36 и Q37 зарегистрирована большая доля носительства минорного аллеля G в группе больных с Q36 по сравнению с Q37 в 1.3 раза (15.7% против 14.9%; $\chi^2<3.85$; P=0.6; OR=1.3; 95%CI: 0.52-3.11), однако обнаруженное различие не достигало статистически значимого уровня. Кроме того, между этими группами, статистической значимости не отличалось различие в носительстве основного генотипа A/A (63.6% против 78.4%; $\chi^2=1.9$; P=0.2; OR=0.5; 95%CI: 0.17-1.38). Однако, интересные факты выявлены в отношении носительства мутантного генотипа A/G, доля которого установлено статистически достоверное превышение его доли среди больных с Q36 в 3.7 раз по сравнению с таковой среди больных с Q37 (36.4% против 13.5%; $\chi^2=5.0$; P=0.05; OR=3.7; 95%CI: 1.17-11.5).

Таким образом, по полиморфному варианту гена MTR (A2756G) статистически достоверное различие обнаружено только в носительстве гетерозиготного генотипа A/G, доля которого оказалась выше в 3.7 раз ($\chi^2=5.0$; P=0.05) среди больных с Q36 по сравнению с аналогичной в группе больных с Q37. Следовательно, генотип A/G в 3.7 раз повышает риск развития изолированной расщелины губы (Q36) по сравнению с сочетанной патологией расщелины нёба и губы (Q36), что позволяет рассматривать его в качестве генетического предиктора предрасполагающего риску развития Q37 в Узбекистане.

Заключение. ВПЧЛО является мультифакторной группой заболеваний, в формировании которой важная роль отводится генетическому компоненту [9,12]. В литературе приведены исследования по изучению вклада генов фолатного цикла в механизмы формирования ВПЧЛО [11,13]. Результаты этих исследований позволяют

предположить, что эти гены, за счет влияния на процессы фолатного обмена в организме, приводя к гипергомоцистеинемии, могут иметь вклад в механизмы развития ВПЧЛО.

В настоящем исследовании изучен вклад генетического полиморфизма MTR (A2756G) в механизмы формирования ВПЧЛО. Результаты наших исследований по исследованию особенностей распределения аллелей и генотипов по полиморфизму гена MTR (A2756G) между изученными группами больных с ВПЧЛО и контролем показали отсутствие статистически достоверных различий в их долях. Между тем, по данному генетическому полиморфизму статистически достоверное различие обнаружено лишь в носительстве гетерозиготного генотипа A/G, доля которого оказалась выше в 3.7 раз ($\chi^2=5.0$; $P=0.05$) среди больных с Q36 по сравнению с аналогичной в группе больных с Q37. Следовательно, генотип A/G в 3.7 раз повышает риск развития изолированной расщелины губы (Q36) по сравнению с сочетанной расщелины нёба и губы (Q37), что позволяет рассматривать его в качестве генетического предиктора предрасполагающего риску развития Q36 в Узбекистане.

Литература:

1. Алельний поліморфізм генів MTHFR, MTR TA, MTRR у пацієнтів із щілинами верхньої губи та/або піднебіння і у їхніх матерів / Л.Б. Чорна, Г.Р. Акоюян, Г.В. Макух, І.М. Федорик // Цитология и генетика. – 2011. – №3. – С. 51–56.
2. Чуйкин, С.В. Врожденная расщелина верхней губы и неба / С.В. Чуйкин, О.З. Топольницкий, Л.С. Персин. – Saarbruchen: LAPLAMBERT Academic Publishing, 2012. – 584 с.
3. Чуйкин, С.В. Применение генетических маркеров в прогнозировании стоматологических заболеваний / С.В. Чуйкин, С.В. Викторов, О.С. Чуйкин. – Saarbruchen: LAPLAMBERT Academic Publishing, 2013. – 352 с.
4. Borges AD, Sa J, Hoshi R, et al. (2015) Genetic risk factors for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in a Brazilian population with high African ancestry. *Am J Med Genet A* 167A:2344–2349.
5. Chorna LB, Akopian HR, Makukh HV, et al. (2011) Allelic polymorphism of MTHFR, MTR and MTRR genes in patients with cleft lip and/or palate and their mothers [in Ukrainian]. *Tsitol Genet* 45:51–56.
6. Coppede F, Bosco P, Lorenzoni V, et al. (2013) The MTR 2756A>G polymorphism and maternal risk of birth of a child with Down syndrome: a case-control study and a metaanalysis. *Mol Biol Rep* 40:6913–6925.

7. Ebadifar A, Khorram Khorshid HR, Kamali K, et al. (2015) Maternal supplementary folate intake, methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T and A1298C polymorphisms and the risk of orofacial cleft in Iranian children. *Avicenna J Med Biotechnol* 7:80–84.
8. Jiang, C., Yin, N., Zhao, Z., Wu, D., Wang, Y., Li, H., & Song, T. (2015). Lack of Association between MTHFR, MTR, MTRR, and TCN2 Genes and Nonsyndromic CL±P in a Chinese Population: Case-Control Study and Meta-Analysis. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal*, 52(5), 579–587. doi:10.1597/14.067.
9. Kalra S. Cleft lips and palates: A societal perspective. *Journal of Cleft Lip Palate and Craniofacial Anomalies*. Medknow, 2014, no. 1 (2), pp. 100. doi: <http://dx.doi.org/10.4103/2348-2125.137901>.
10. Lei, W., Xia, Y., Wu, Y., Fu, G., & Ren, A. (2018). Associations Between MTR A2756G, MTRR A66G, and TCN2 C776G Polymorphisms and Risk of Nonsyndromic Cleft Lip With or Without Cleft Palate: A Meta-Analysis. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 22(8), 465–473. doi:10.1089/gtmb.2018.0037.
11. Murthy J, Gurramkondab VB, Lakkakula BV. (2015) Genetic variant in MTRR A66G, but not MTR A2756G, is associated with risk of non-syndromic cleft lip and palate in Indian population. *J Oral Maxillofac Surg* 27:782–785.
12. Stuppia, L., Capogreco, M., Marzo, G., La Rovere, D., Antonucci, I., Gatta, V., ... Tetè, S. (2011). Genetics of Syndromic and Nonsyndromic Cleft Lip and Palate. *Journal of Craniofacial Surgery*, 22(5), 1722–1726. doi:10.1097/scs.0b013e31822e5e4d
13. Wang W., Jiao X.-H., Wang X.-P., Sun X.-Y., Dong C. MTR, MTRR, and MTHFR Gene Polymorphisms and Susceptibility to Nonsyndromic Cleft Lip With or Without Cleft Palate. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 2016, no. 20 (6), pp. 297–303. doi:10.1089/gtmb. 2015.0186.
14. Weiner AS, Boyarskikh UA, Voronina EN, et al. (2014) Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and methionine synthase A2756G polymorphisms influence on leukocyte genomic DNA methylation level. *Gene* 533:168–172.