

Л.Б. ЧОРНА, Г.Р. АКОПЯН,

Г.В. МАКУХ, І.М. ФЕДОРИК

ДУ «Інститут спадкової патології АМН України», Львів

E-mail: lilyachorna1@rambler.ru

АЛЕЛЬНИЙ ПОЛІМОРФІЗМ ГЕНІВ MTHFR, MTR ТА MTRR У ПАЦІЄНТІВ ІЗ ЩІЛИНАМИ ВЕРХНЬОЇ ГУБИ ТА/АБО ПІДНЕБІННЯ І У ЇХНІХ МАТЕРІВ



Досліджено розподіл поліморфних варіантів генів *MTHFR*, *MTR* та *MTRR* в контингенті пацієнтів з несиндромальними щілинами верхньої губи та/або піднебіння (ЩВГП), матерів дітей з ЩВГП і здорових жителів західного регіону України. Показано, що наявність гомозиготного генотипу *MTHFR* 677TT може збільшувати ризик виникнення ЩВГП в 3 рази, а для матерів ризик народити дитину з ЩВГП зростає майже в 2 рази у порівнянні із гомозиготами *MTHFR* 677CC ($OR = 3,3$, $OR = 1,92$ відповідно). Наявність гетерозиготного генотипу *MTR* 2756AG може збільшувати ризик виникнення ЩВГП у 1,5 разу в порівнянні з генотипом 2756AA ($OR = 1,48$). У випадку гетерозиготного генотипу *MTRR* 66AG ризик виникнення ЩВГП зростає у понад 5 разів ($OR = 5,56$), а для матерів ризик народити дитину з ЩВГП зростає у 2,6 разу ($OR = 2,6$). У жителів західного регіону України поширеність алельного варіанту *MTRR* 66G виявилась вищою, ніж 66A, а частота генотипу 66GG – вірогідно нижчою серед пацієнтів з ЩВГП та їхніх матерів у порівнянні з контрольною групою.

© Л.Б. ЧОРНА, Г.Р. АКОПЯН, Г.В. МАКУХ, І.М. ФЕДОРИК,
2011

Вступ. На вроджені щілини верхньої губи та/або піднебіння (ЩВГП) припадає 90 % черепно-лицьових вроджених вад розвитку. Частота цієї патології в світі, за даними ВООЗ, становить 0,6–1,6 випадків на 1000 новонароджених [1]. Несиндромальні ЩВГП мають мультифакторну етіологію та є результатом адитивної дії генетичних і середовищних чинників, внаслідок чого відбувається реалізація генетичної схильності у ваді. Активний пошук маркерів генетичної схильності до розвитку ЩВГП привернув увагу вчених до однієї із груп генетичних маркерів мультифакторної патології – генів фолатного обміну. До ключових ферментів фолатного циклу належить метилентетрагідрофолатредуктаза (*MTHFR*), метіонінсинтаза (*MTR*) та редуктаза метіонінсинтази (*MTRR*). *MTHFR* є ключовим ферментом фолатного циклу, який забезпечує перетворення фолієвої кислоти в її активну форму 5-метилтетрагідрофолат. Поліморфізм C677T (p.Ala222Val) гена *MTHFR* викликає зниження активності ферменту в гомозигот за поліморфним алелем на 70 %, а в гетерозигот – на 35 %. Гомозиготність за алелем 677T приводить до підвищення рівня гомоцистеїну в крові на 20 %. [2]. У гомозигот за поліморфним алелем 1298C (транзиція p.Glu429Ala в регуляторному домені *MTHFR*) активність ферменту становить 60 % у порівнянні із гомозиготами 1298AA [3]. В₁₂-залежна *MTR* безпосередньо здійснює метилювання гомоцистеїну, а поліморфний варіант A2756G гена *MTR* (p.Asp919Gly) веде до зниження активності ферменту. Для відновлення функції ферменту *MTR* необхідним є додаткове метилювання за допомогою шеперона – редуктази метіонінсинтази (*MTRR*). Поліморфізм A66G (p.Ile22Met) в гені *MTRR* впливає на активність білка і призводить до розвитку патології, яка зумовлюється гіпергомоцистеїнемією [4].

Вивченню взаємозв'язку поліморфізму генів фолатного обміну з вадами розвитку плоду, зокрема, з дефектами невральної трубки (аненцефалія, незрощення хребта – *spina bifida*) та незрощенням верхньої губи та/або піднебіння, присвячена ціла низка досліджень [5–11]. Отримані результати є доволі суперечливими: деякі з них засвідчують несприятливу роль низькофункціональних алелів генів фолатного циклу в розвитку ЩВГП [8, 9], інші заперечують її вірогідність [10, 11]. Більшість з відомих робіт зо-

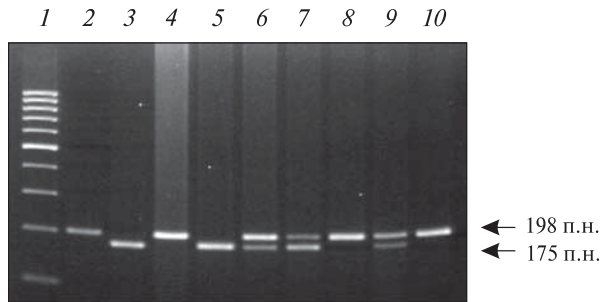


Рис. 1. Рестрикційний аналіз поліморфного локусу С677Т гена *MTHFR*, 2,5%-ний агарозний гел: 1 – маркер молекулярної маси рUC19 DNA/*MspI*; 2 – продукт ПЛР без рестрикції; 3, 5 – гомозиготні носії мутації С677Т; 4, 8, 10 – відсутність мутації С677Т; 6, 7, 9 – гетерозиготні носії мутації С677Т

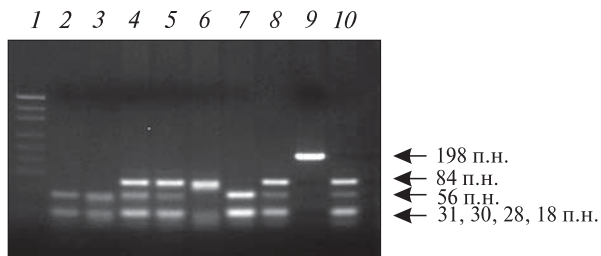


Рис. 2. Рестрикційний аналіз поліморфного локусу А1298С гена *MTHFR*, 2,5%-ний агарозний гел: 1 – маркер молекулярної маси рUC19 DNA/*MspI*; 2, 3, 7 – відсутність мутації А1298С; 4, 5, 8, 10 – гетерозиготні носії мутації А1298С; 6 – гомозиготний носій мутації А1298С; 9 – продукт ПЛР без рестрикції

середжені на вибірковому дослідженні пацієнтів із ЩВГП або їхніх батьків. Метою даного дослідження було встановити характер розподілу алелів та генотипів поліморфних локусів С677Т і А1298С гена *MTHFR*, А2756G гена *MTR* і А66G гена *MTRR* серед пацієнтів з ЩВГП та їхніх матерів із західного регіону України.

Матеріали і методи. Групу обстеження склали 33 пацієнти з ЩВГП та 27 матерів таких дітей – мешканців західноукраїнського регіону, які проходили обстеження в ДУ «Інститут спадкової патології АМНУ», Львівському міжобласному медико-генетичному центрі, Тернопільському медико-генетичному кабінеті та перебували на стаціонарному лікуванні у Львівській обласній спеціалізованій клінічній дитячій лікарні. Матеріалом для досліджень служила ДНК, виділена з лейкоцитів периферійної крові, яку забирали після отри-

мання інформованої згоди пацієнта. Контрольна вибірка була сформована з 50 здорових осіб (без ЩВГП), які народили двох та більше здорових дітей без ускладненого генетичного та акушерського анамнезу. Всі вони проживають у західному регіоні України. Проводили виділення та очистку ДНК із лейкоцитів периферійної крові методом висолювання [12]. На подальших етапах дослідження здійснювали ампліфікацію послідовностей ДНК *in vitro*, використовуючи метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), яку проводили в автоматичному режимі на термоциклері «Терцик» («ДНК-технологія», Росія). Олігонуклеотидні праймери синтезовані фірмою «Fermentas» (Литва). Використовували ендонуклеази рестрикції та термостабільну Таq-полімеразу («Fermentas», Литва). Для детекції поліморфних локусів С677Т та А1298С гена *MTHFR*, А2756G гена *MTR* та А66G гена *MTRR* застосовували аналіз продуктів ПЛР методом ПДРФ [13–16].

Електрофорез проводили у 2,5%-ному агарозному гелі та сканували на УФ-трансліюмінаторі. Статистичний аналіз здійснювали з використанням критерію χ^2 та застосовували точний критерій Фішера. Відносний ризик оцінювали за величиною співвідношення шансів (OR).

Результати досліджень та їхнє обговорення. Проведено молекулярно-генетичний аналіз поліморфних локусів С677Т та А1298С гена *MTHFR*, А2756G гена *MTR*, а також А66G гена *MTRR* у 33 пацієнтів з ЩВГП, 27 матерів дітей з ЩВГП та у 50 осіб групи контролю. Молекулярно-генетичний аналіз поліморфного локусу С677Т та А1298С гена *MTHFR* методом ПДРФ наведено на електрофореграмах (рис. 1 та 2).

За результатами генетичного тестування і статистичних розрахунків встановлено розподіл генотипів поліморфних локусів генів *MTHFR*, *MTR* і *MTRR* серед пацієнтів ЩВГП (табл. 1) та серед матерів дітей з ЩВГП (табл. 2) у порівнянні з групою контролю. Для кожного із поліморфних локусів наведено результати статистичного обрахунку відносного ризику за рецесивною та домінантною моделями.

Аналіз розподілу генотипів поліморфного локусу С677Т гена *MTHFR* показав вищу частоту генотипу 677ТТ в групах пацієнтів з ЩВГП

Таблиця 1

Розподіл генотипів генів *MTHFR*, *MTR* і *MTRR* серед пацієнтів з ЩВГП

Генотип	Пацієнти з ЩВГП (n = 33)		Контроль (n = 50)		P	OR (CI–95 %)
	n	%	n	%		
<i>MTHFR</i> C677T						
C/C	12	36	22	44	–	1,00
C/T	17	52	26	52	>0,05	0,98 (0,41–2,36)
T/T	4	12	2	4	>0,05	3,31 (0,57–19,21)
C/T + T/T	21	64	28	56	>0,05	1,37 (0,56–3,39)
<i>MTHFR</i> A1298C						
A/A	19	58	24	48	–	1,00
A/C	12	36	22	44	>0,05	0,73 (0,3–1,79)
C/C	2	6	4	8	>0,05	0,74 (0,13–4,30)
A/C + C/C	14	42	26	52	>0,05	0,68 (0,28–1,65)
<i>MTR</i> A2756G						
A/A	16	49	26	52	–	1,00
A/G	15	45	18	36	>0,05	1,48 (0,60–3,56)
G/G	2	6	6	12	>0,05	0,47 (0,09–2,50)
A/G + G/G	17	51	24	48	>0,05	0,98 (0,41–2,36)
<i>MTRR</i> A66G						
A/A	0	0	2	4	–	–
A/G	25	76	18	36	<0,05 *	5,56 (2,08–14,85)
G/G	8	24	30	60	<0,05 *	0,21 (0,08–0,56)
A/G + G/G	33	100	48	96	–	–

* Статистично вірогідна відмінність.

(12 %) і матерів дітей з ЩВГП (8 %) у порівнянні з контрольною групою (4 %). Частота мутантного алеля 677T серед пацієнтів з ЩВГП та матерів дітей з ЩВГП становила 0,38 та 0,24 відповідно у порівнянні з 0,30 в контрольній групі. Показано, що наявність однієї копії алеля 677T може збільшувати ризик виникнення ЩВГП майже у 1,4 разу (OR = 1,37 CI – 95 %: 0,56–3,39, P > 0,05), а для гомозигот за алелем 677T в 3 рази (OR = 3,3 CI – 95 %: 0,57–19,21, P > 0,05). Для матерів ризик народити уражену дитину у випадку гомозиготного носійства алеля 677T може зростати майже у 2 рази (OR = 1,92 CI – 95 %: 0,25–14,45, P > 0,05), проте наведені результати не були статистично вірогідними, що, мабуть, пов'язано з недостатньою вибіркою груп обстеження.

Отримані нами результати корелюють з даними досліджень, які проведені в італійських пацієнтів з ЩВГП, серед яких виявилось значно більше гомозигот за поліморфним

алелем 677T у порівнянні з групою здорових осіб. Серед матерів дітей з ЩВГП з італійської популяції зареєстровано більш високі показники частоти генотипу 677TT (21 %) [17] та алеля 677T (0,51) [18], ніж за нашими даними (12 % та 0,38 відповідно). При цьому в дослідженні 122 польських матерів дітей з ЩВГП не виявлено достовірного зв'язку між С677T поліморфізмом і щілинами губи та піднебіння [19].

За результатами молекулярно-генетичного аналізу поліморфного локусу A1298C гена *MTHFR* встановлено наступне співвідношення за частотою А та С алелів: 0,70 та 0,30 в контрольній групі, 0,76 та 0,24 серед пацієнтів з ЩВГП, 0,69 та 0,31 серед матерів дітей з ЩВГП. Розподіл алелів і відповідних генотипів поліморфного локусу A1298C гена *MTHFR* у групах пацієнтів з ЩВГП та їхніх матерів вірогідно не відрізнявся від показників контрольної групи (P > 0,05).

Розподіл генотипів генів *MTHFR*, *MTR* і *MTRR* серед матерів дітей з ЩВГП

Генотип	Матері дітей з ЩВГП (n = 27)		Контроль (n = 50)		P	OR (CI–95 %)
	n	%	n	%		
<i>MTHFR</i> C677T						
C/C	16	59	22	44	–	1,00
C/T	9	33	26	52	>0,05	0,46 (0,17–1,22)
T/T	2	8	2	4	>0,05	1,92 (0,25–14,45)
C/T + T/T	11	41	28	56	>0,05	0,54 (0,21–1,39)
<i>MTHFR</i> A1298C						
A/A	12	45	24	48	–	1,00
A/C	13	48	22	44	>0,05	1,18 (0,46–3,02)
C/C	2	7	4	8	>0,05	0,92 (0,16–5,38)
A/C + C/C	15	55	26	52	>0,05	1,15 (0,45–2,95)
<i>MTR</i> A2756G						
A/A	15	55	26	52	–	1,00
A/G	8	30	18	36	>0,05	0,75 (0,2–2,05)
G/G	4	15	6	12	>0,05	1,30 (0,33–4,98)
A/G + G/G	12	44	24	48	>0,05	0,87 (0,34–2,22)
<i>MTRR</i> A66G						
A/A	3	11	2	4	–	1,00
A/G	16	59	18	36	>0,05	2,6 (0,99–6,76)
G/G	8	30	30	60	<0,05 *	0,28 (0,10–0,76)
A/G + G/G	24	89	48	96	>0,05	0,33 (0,05–2,13)

*Статистично вірогідна відмінність.

При аналізі розподілу генотипів та алелів поліморфного локусу 2756AG гена *MTR* статистично вірогідних відмінностей у частотах не встановлено ні в групі пацієнтів з ЩВГП, ні в групі матерів дітей з ЩВГП ($P > 0,05$). Генотип 2756GG гена *MTR* в групі пацієнтів з ЩВГП зустрічався з меншою частотою, ніж в контрольній групі, хоча серед пацієнтів виявилось більше гетерозигот за генотипом 2756AG (45 % при 36 % у контрольній групі). Використовуючи генотип 2756AA як референтний встановили, що гетерозиготний генотип *MTR* 2756AG може збільшувати ризик виникнення ЩВГП в 1,5 разу (OR = 1,48 CI – 95 %: 0,60–3,56, $P > 0,05$), а для матерів ризик народження дітей з ЩВГП може зростати в 1,3 разу (OR = 1,3 CI – 95 %: 0,33 – 4,98 $P > 0,05$). Значно вищий ризик для матерів за наявності *MTR* 2756G алеля встановлено для польської популяції: 2,195 у випадку 2756AG або 2756GG генотипів в порівнянні з AA генотипом [19].

Аналіз розподілу генотипів та алелів поліморфного локусу A66G гена *MTRR* показав вищу частоту генотипу 66GG, ніж генотипу 66AA як в групах обстеження, так і контрольній групі (табл. 1 і 2). Частота генотипу *MTRR* 66GG виявилась вірогідно нижчою серед дітей з ЩВГП та матерів таких пацієнтів, ніж у контрольній групі ($P < 0,05$). За нашими даними, наявність гетерозиготного генотипу 66AG гена *MTRR* збільшує ризик виникнення щілини у понад 5 разів (OR = 5,56 CI – 95 %: 2,08–14,85, $P < 0,05$), а для матерів ризик народити дитину з ЩВГП зростає у 2,6 разу (OR = 2,6 CI – 95 %: 0,99–6,76, $P < 0,05$).

Частота алеля 66G в обстежених нами випадках становила 0,62–0,78. Отримані нами дані корелюють з дослідженнями, проведеними в Російській Федерації, де частота алеля *MTRR* 66G становила 0,64 [20]. Частота алеля 66G у Польщі становила 0,59 [19], Франції – 0,57, Італії – 0,52, Ізраїлі – 0,42 [20]. Проте, частота

алеля 66G в інших популяціях була нижчою, наприклад, у мешканців Південної Африки становила 0,12, у бразилійців – 0,07, у мексиканців – 0,21 [20]. На сьогодні між ученими існує дискусія щодо визначення алеля дикого типу, деякі дослідники пропонують вважати алель 66G диким типом [21].

Негативний вплив на гісто- та органогенез мутантних варіантів генів фолатного обміну може бути пов'язаний як з прямою ембріотоксичною дією гомоцистеїну, так і з порушенням процесів проліферації і диференціювання клітин внаслідок дефіциту метильних груп. Недостатність активного фолату в організмі, особливо в умовах дефіциту вітаміну В₁₂ та дисфункції ферментів метаболізму гомоцистеїну, веде до його накопичення в плазмі крові (гіпергомоцистеїнемія), а в критичний період ембріогенезу може сприяти формуванню вроджених вад розвитку, зокрема, незрощень верхньої губи та/або піднебіння [22, 23].

Висновки. Отримані результати підтверджують гіпотезу про асоціацію окремих алельних варіантів генів фолатного обміну із виникненням щілин верхньої губи та/або піднебіння. У порівнянні з генотипом *MTHFR* 677CC генотип 677TT асоціюється із трикратним збільшенням ризику виникнення ЩВГП (OR = 3,3) у плода.

Для матерів з генотипом 677TT встановлено двократне (OR = 1,92) зростання ризику народити дитину з ЩВГП. Відмінності щодо розподілу алелів та генотипів поліморфних локусів *MTHFR* A1298C та *MTR* 2756AG не були вірогідними. Частота генотипу 66GG гена *MTRR* є вірогідно нижчою серед пацієнтів з ЩВГП та їхніх матерів у порівнянні з контрольною групою. У всіх досліджених групах алельний варіант *MTRR* 66G має вищу частоту, ніж *MTRR* 66A.

Автори щиро вдячні лікарям О.І. Могіляку (Львівська обласна дитяча спеціалізована клінічна лікарня), В.І. Шуварській, Н.В. Маркевич, Н.І. Кіцери (Львівський міжобласний медико-генетичний центр) та Ю.А. Гарбуз (Тернопільський медико-генетичний кабінет) за співпрацю.

*L.B. Chorna, H.R. Akopyan,
H.V. Makukh, I.M. Fedoryk*

ALLELIC POLYMORPHISM
OF *MTHFR*, *MTR* AND *MTRR* GENES
IN PATIENTS WITH CLEFT LIP
AND/OR PALATE AND THEIR MOTHERS

The frequency of common *MTHFR*, *MTR* and *MTRR* genes polymorphisms was evaluated among patients with non-syndromic cleft lip and/or palate (CL/P), their mothers and healthy persons from West-Ukrainian region. *MTHFR* 677TT genotype was shown to increase more than three-fold risk of CL/P and for mothers the risk of having CL/P children may increase two-fold compared with homozygous carriers of *MTHFR* 677CC genotype (OR = 3.3, OR = 1.92, respectively). The heterozygous *MTR* 2756AG genotype was associated with 1.5-fold increased risk of CL/P compared with the AA genotype (OR = 1.48). The heterozygous genotype *MTRR* 66AG was associated with the 5.56-fold increased CL/P risk (OR = 5.56) and for mothers with 2.6-fold increased risk of delivering a CL/P offspring (OR = 2.6). The results showed that *MTRR* 66G allele is more prevalent than *MTRR* 66A (wild type) and the *MTRR* 66GG genotype frequency was significantly lower among CL/P patients and their mothers than in control group among Western Ukrainian inhabitants.

*Л.Б. Чорная, Г.Р. Акопян,
Г.В. Макух, И.М. Федорик*

АЛЛЕЛЬНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ
ГЕНОВ *MTHFR*, *MTR* И *MTRR*
У ПАЦИЕНТОВ С РАСЩЕЛИНАМИ ВЕРХНЕЙ
ГУБЫ И/ИЛИ НЕБА И У ИХ МАТЕРЕЙ

Исследовали распределение полиморфных вариантов генов *MTHFR*, *MTR* и *MTRR* в контингентах пациентов с несиндромальными расщелинами верхней губы и/или неба (РВГН), их матерей и здоровых жителей западного региона Украины. Результаты показали, что гомозиготный генотип *MTHFR* 677TT может увеличивать риск возникновения РВГН в 3 раза, а у матерей риск рождения ребенка с РВГН в 2 раза выше, чем у гомозигот *MTHFR* 677CC (OR = 3,3, OR = 1,92, соответственно). Гетерозиготный генотип *MTR* 2756AG может увеличивать риск возникновения РВГН в 1,5 раза в сравнении с генотипом 2756AA (OR = 1,48). В случае носительства гетерозиготного генотипа *MTRR* 66AG риск возникновения РВГН возрастает более чем в 5 раз (OR = 5,56), а для матерей риск рождения ребенка с РВГН увеличивается в 2,6 раза (OR = 2,6). У жителей западного региона Украины распространенность аллельного варианта *MTRR* 66G выше, чем 66A, а частота генотипа *MTRR* 66GG была статистически достоверно ниже в контингентах пациентов с РВГН и их матерей, чем в контрольной группе.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Shaw W., Semb G., Nelson P. et al. The Eurocleft Project 1996–2000: overview // *J. Cranio-Maxillofacial Surg.* – 2001. – **29**. – P. 131–140.
2. Martin Y.N., Salavaggione O.E., Eckloff B.W et al. Human methylenetetrahydrofolate reductase pharmacogenomics: gene resequencing and functional genomics // *Pharmacogenet. Genom.* – 2006. – **16**. – P. 265–277.
3. Castro R., Rivera I., Ravasco P. et al. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase 677C/T and 1298A/C mutations are genetic determinants of elevated homocysteine // *QLM : Int. J. Med.* – 2003. – **96**. – P. 297–303.
4. Hobbs C.A., Sherman S.L., Hopkins S.E. et al. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome // *Hum. Genet.* – 2000. – **67**. – P. 623–630.
5. Гречанина Е.Я., Гусар В.А., Гречанина Ю.Б. Сравнительная характеристика частот пороков ЦНС и аллеля C677T MTHFR // *Ультразвук. перинат. диагностика.* – 2009. – № 27/28. – С. 4–13.
6. Tatarsky P., Kucherenko A., Kravchenko S. et al. F2 G20210A, F5 G1691A, MTHFR C677T polymorphisms – involvement in stroke // *Biopolym. and Cell.* – 2010. – **26**, № 4. – P. 299–305.
7. Lucock M., Daskalakis I., Briggs D. et al. Altered folate metabolism and disposition in mothers affected by a spina bifida pregnancy: influence of 677 c→t methylenetetrahydrofolate reductase and 2756 a→g methionine synthase genotypes // *Mol. Genet. Metab.* – 2000. – **70**. – P. 27–44.
8. Pezzetti F., Martinelli M., Scapoli L. et al. Maternal MTHFR variant forms increase the risk in offspring of isolated nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate // *Hum. Mutat.* – 2004. – № 24. – P. 104–105.
9. Zhu J., Ren A., Hao L. et al. Variable contribution of the MTHFR C677T polymorphism to non-syndromic cleft lip and palate risk in China // *Amer. J. Med. Genet.* – 2006. – **140**. – P. 551–557.
10. Wyszynski D.F., Diehl S.R. Infant C677T mutation in MTHFR, maternal periconceptional vitamin use, and risk of nonsyndromic cleft lip // *Amer. J. Med. Genet.* – 2000. – **92**. – P. 79–80.
11. Blanton S.H., Patel S., Hecht J.T., Mulliken J.B. MTHFR is not a risk factor in the development of isolated nonsyndromic cleft lip and palate // *Amer. J. Med. Genet.* – 2002. – **110**. – P. 404–405.
12. Пат. 32044 UA, МПК G01N33/49 (2006.01) Макух Г.В., Заставна Д.В., Тиркус М.Я., Третяк Б.І., Чорна Л.Б. Спосіб виділення ДНК з лейкоцитів периферійної крові / Заявник Державна установа «Інститут спадкової патології» АМН України. – № у 200801896; заявл. 14.02.2008; опубл. 25.04.2008; Бюл. № 8.
13. Frosst P., Bloom H.J., Milos R. et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase // *Nature Genet.* – 1995. – № 10. – P. 111–113.
14. Van der Put N.M., Gabreels F., Stevens E.M. et al. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? // *Amer. J. Hum. Genet.* – 1998. – **62**. – P. 1044–1051.
15. Van der Put N.M., Vandermolene F., Kluijtmans A. Sequence analysis of the coding region of human methionine synthase: relevance to hyperhomocysteinemia in neural-tube defects and vascular disease // *Q. J. Med.* – 1997. – № 90. – P. 511–517.
16. Wilson A., Platt R., Wu Q. et al. A common variant in methionine synthase reductase combined with low cobalamin (vitamin B12) increases risk for spina bifida // *Mol. Genet. Metab.* – 1999. – **67**. – P. 317–323.
17. Martinelli M., Scapoli L., Pezzetti F. et al. C677T variant form at the MTHFR gene and CL/P: a risk factor for mothers? // *Amer. J. Med. Genet.* – 2001. – **98**. – P. 357–360.
18. Pezzetti F., Martinelli M., Scapoli L. et al. Maternal MTHFR variant forms increase the risk in offspring of isolated nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate // *Hum. Mutat.* – 2004. – **24**. – P. 104–105.
19. Mostowska A., Hozyaszk K.K., Jagodzinski P.P. Maternal MTR genotype contributes to the risk of non-syndromic cleft lip and palate in the Polish population // *Clin. Genet.* – 2006. – **69**. – P. 512–517.
20. Shi M., Caprau D., Romitti P. et al. Genotype frequencies and linkage disequilibrium in the CEPH human diversity panel for variants in folate pathway genes MTHFR, MTHFD, MTRR, RFC1, and GCP2 // *Birth Defects Res. (Part A), Clin. and molecular teratology.* – 2003. – **67**. – P. 545–549.
21. Zhengdong Z. Polymorphisms of methionine synthase and methionine synthase reductase and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck : A case-control analysis // *Cancer Epidem. Biomark. Preven.* – 2005. – **14**(5). – P. 1188–1193.
22. Van Rooij I.A., Swinkels D.W., Blom H.J. et al. Vitamin and homocysteine status of mothers and infants and the risk of nonsyndromic orofacial clefts // *Amer. J. Obstet. Gynecol.* – 2003. – **189**. – P. 1155–1160.
23. McKay J.A., Williams E.A., Mathers J.C. Folate and DNA methylation during in utero development and aging // *Biochem. Soc. Trans.* – 2004. – **32**. – P. 1006–1007.

Надійшла 30.04.10