

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И.М. СЕЧЕНОВА  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
(Сеченовский Университет)

*на правах рукописи*

МАРДАНОВ

Аяз Эльханович

ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ АНАЛИЗА МАТРИКСНЫХ  
МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ У ДЕТЕЙ С РАСЩЕЛИНОЙ ГУБЫ И НЕБА

14.01.14 – стоматология

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:  
Засл. врач России,  
доктор медицинских наук, профессор  
Мамедов Ад.А.

Москва – 2018

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ ПРИ РАСЩЕЛИНЕ ГУБЫ И НЕБА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).	
1.1. Расщелина губы и неба этиология, патогенез, влияние на макроорганизм.....	11
1.2. Пороки развития организма человека ассоциированные с матриксными металлопротеиназами, тканевыми ингибиторами матриксных металлопротеиназ и TGFβ2.....	14
1.3. Пороки развития, ассоциированные с дисплазией соединительной ткани у детей с расщелиной губы и неба.....	22
1.4. Сроки проведения хирургического вмешательства у детей с расщелиной губы и неба.....	27
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	
2.1. Общая характеристика детей с расщелиной губы и неба.....	30
2.2. Иммуноферментный анализ ММП2, ММП3, ТИМП2, TGFβ2.....	34
2.3. Статистические методы исследования.....	40
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЯ.	
3.1. Общая характеристика пациентов с расщелиной губы и неба.....	42
3.2. Иммуноферментный анализ матриксных металлопротеиназ 2 типа в мягких тканях при расщелине губы и неба.....	43
3.3. Иммуноферментный анализ матриксных металлопротеиназ 3 типа в мягких тканях при расщелине губы и неба.....	49

3.4. Иммуноферментный анализ тканевого ингибитора матричных металлопротеиназ 2 типа в мягких тканях при расщелине губы и неба.....	58
3.5. Иммуноферментный анализ тканевого фактора роста бета 2 в мягких тканях при расщелине губы и неба.....	63
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	70
ВЫВОДЫ.....	82
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	83
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	84
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	85
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	113

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

По статистическим данным в Российской Федерации врожденная патология челюстно-лицевой области занимает 3-5 место среди врожденных пороков развития человека. В России в среднем рождается один ребенок с расщелиной верхней губы и неба на 600-1000 новорожденных [123].

Анатомические и физиологические нарушения, сопутствующие расщелине губы и неба, приводят к нарушению жизненно важных, для ребенка, функций, таких как: сосание, глотание, жевание, дыхание, речевой артикуляции. Расщелина губы и неба является причиной развития у ребенка комплекса неполноценности [62,75,127,182,240].

На фоне РГН, развиваются дополнительные функциональные нарушения, связанные с неполноценным развитием различных органов [18, 22, 193, 205, 206]. Обусловленное генетической предрасположенностью к нарушению мезенхимальной миграции, объясняется образование многочисленных нарушений развития макроорганизма ребенка, проявляющиеся после рождения. Данный процесс обозначается термином соединительнотканная дисплазия. Соединительнотканная дисплазия формирует внешние фенотипические признаки данного порока и изменение развития внутренних органов [79, 135, 194].

На сегодняшний день существует множество мнений о сроках проведения оперативного вмешательства у детей РГН. Одни хирурги рекомендуют проводить первое вмешательство в 3-6 месяцев, другие старше года. Оперативное вмешательство на твердом и мягком небе порождает аналогичные споры, в связи с возможным развитием дефектов и деформаций верхней челюсти.

Матриксные металлопротеиназы (ММП) играют важную роль как в физиологических процессах (ремоделирование ткани, морфогенез, репродукция, эмбриональное развитие,). При патологических состояниях - онкозаболеваниях, заболевания ССС, дисплазией соединительной ткани [17,25,67,90, 140,141,144,152,166,171,209,216,224,231,242,244]. Исследователи уделяют внимание изучению разных типов матриксных металлопротеиназ – ферментов,

которые отвечают за расщепление компонентов соединительной ткани [27, 28, 37, 38, 84, 85, 181, 205, 210, 225].

Морфогенез верхней губы и неба представляет собой сложный процесс, связанный с жестко регламентированным взаимодействием между собой мезенхимальных и эпителиальных клеток. Генетические исследования доказывают роль активности матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов в процессе формирования губы и неба. Участие ММП в формировании губы и неба не вызывает сомнения, более достоверные данные функции ММП отражаются, при изучении изменения уровня их не только в системном кровотоке, а также непосредственно в мягких тканях зоны дефекта, а также можно сделать выводы о состоянии соединительной ткани макроорганизма при различных формах патологии расщелины верхней губы и неба при сравнении полученных результатов.

Семейство ММП состоит из более 20 цинк-зависимых эндопептидаз, секретируемых или связанных с поверхностью клетки, субстратами которых, кроме компонентов внеклеточного матрикса, могут служить также другие протеазы, хемотаксические молекулы, латентные формы факторов роста, растворимые белки, мембранно-ассоциированные белки, связывающий фактор роста [238].

Активность ММП в межклеточном пространстве специфически подавляется тканевыми ингибиторами (ТИМП) – структурно родственными белками, три из которых (ТИМП-1, 2 и 4) секретируются в растворимой форме, а один (ТИМП-3) – связан с внеклеточным матриксом [213]. Следует отметить что ТИМП2 включает в себя свойства и функции всех остальных типов ТИМП.

Изучение уровня ММП в тканях расщелины губы и неба позволит нам расширить знания о процессах происходящих в области расщелины губы и неба. Изучение уровня матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов позволит нам определить состояние соединительной ткани у пациентов с расщелиной губы и неба. Знание о уровне матриксных металлопротеиназ при разных формах и

степени тяжести патологии позволит нам скорректировать план лечения, что приведет к лучшей реабилитации детей с расщелиной губы и неба.

Таким образом **актуальность исследования** определяется следующими факторами:

1. Значительное количество детей, рождающихся с расщелиной губы и неба от 1:1000 до 1 :500.
2. Необходимость в ранней реабилитации пациентов с расщелиной губы и неба
3. Отсутствием исследований матриксных металлопротеиназ 2, матриксных металлопротеиназ 3, тканевых ингибиторов матриксных металлопротеиназ 2, тканевого фактора роста бета 2 при расщелине губы и неба в России, при том, что патология соединительной ткани у детей с РГН доказана.
4. Необходимость в обосновании раннего подхода к оперативному вмешательству у детей с расщелиной губы и неба

В связи с этим **цель исследования**: Повышение эффективности лечения детей с расщелиной губы и неба за счет хирургического лечения в периоде новорожденности

Для достижения цели исследования были поставлены следующие **задачи**.

1. Обосновать ранние сроки оперативного вмешательства у детей с расщелиной губы и неба (РГН)
2. Провести оценку экспрессии матриксной металлопротеиназы 2,3 (ММП2, ММП3), тканевого ингибитора матриксных металлопротеиназ 2(ТИМП2), тканевого фактора роста бета 2 (TGF $\beta$ 2) в зоне патологии.
3. Установить взаимосвязь экспрессии изучаемых биохимических показателей с разными типами РГН
4. Сравнить данные ММП2,3, ТИМП2, TGF $\beta$ 2 с мягкими тканями из области патологии с тканями вне очага патологии.

## **Научная новизна исследования**

Впервые предложен новый подход к раннему оперативному лечению пациентов с расщелиной верхней губы и неба с использованием данных полученных о уровне матриксных металлопротеиназ

Впервые изучен уровень матриксных металлопротеиназ 2,3 непосредственно в мягких тканях у детей с расщелиной губы и неба

Впервые изучен уровень трансформирующего фактора роста бета 2 непосредственно в мягких тканях у детей с расщелиной губы и неба

В ходе исследования доказано изменение уровня матриксных металлопротеиназ 2,3; тканевого ингибитора матриксных металлопротеиназ 2, тканевого фактора роста бета 2 в мягких тканях из очага патологии по сравнению со здоровыми тканями вне очага патологии.

Впервые обоснованы ранние сроки оперативного вмешательства в зависимости от уровня матриксных металлопротеиназ в мягких тканях расщелины губы и неба.

## **Практическая значимость работы**

В ходе исследования содержания матриксной металлопротеиназы 2, матриксной металлопротеиназы 3, тканевого ингибитора матриксных металлопротеиназ 2, трансформирующего фактора роста бета 2 в мягких тканях, полученных из зоны расщелины, а также исследование содержания данных ферментов вне зоны патологии, проведен сравнительный анализ содержания данных ферментов. Полученные результаты являются обоснованием к раннему проведению оперативного вмешательства у детей с расщелиной губы и неба, что способствует более быстрому и качественному (меньшее рубцеобразование) заживлению, профилактике структурных нарушений и сокращению сроков реабилитации. Полученные в процессе исследования результаты были внедрены в рекомендации к хирургическому лечению пациентов с расщелиной губы и неба.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. При расщелине губы и неба наблюдается достоверное повышение уровня матриксных металлопротеиназ 2 и 3 в зоне патологии по сравнению с здоровыми тканями.
2. При исследовании мягких тканей, полученных из зоны расщелины губы и неба наблюдается достоверное повышение уровня тканевых ингибиторов матриксных металлопротеиназ 2 в зоне патологии по сравнению с здоровыми тканями.
3. При расщелине губы и неба наблюдается достоверное повышение уровня трансформирующего фактора роста бета 2 в зоне патологии по сравнению с здоровыми тканями.
4. Установлена достоверная связь уровня матриксных металлопротеиназ 2,3, трансформирующего фактора роста бета 2 и тканевого ингибитора матриксных металлопротеиназ 2, между двухсторонней расщелиной неба и другими формами патологии.
5. В связи с высокой активностью биологически активных компонентов соединительной ткани при расщелине верхней губы и неба имеет смысл проведение первичного хирургического вмешательства на первом месяце жизни ребенка.

### **Личный вклад автора**

Автором самостоятельно разработан план, определены цель и задачи исследования, вклад автора заключается в непосредственном участии на всех этапах процесса получения исходных данных, личное участие в хирургическом лечении и ведении пациентов с расщелиной губы неба, участие в проведении лабораторного этапа исследования, личном участии в апробации результатов исследования, в подготовке основных публикаций по выполненной работе.

### **Внедрение результатов исследования в практику**

Результаты представленной работы используются в практической деятельности отделения хирургии и реанимации новорожденных ФГАУ «Научный центр здоровья детей» НИИ Педиатрии Министерства



здравоохранения Российской Федерации, ГБУЗ Морозовская ДГКБ ДЗМ, отделение челюстно-лицевой хирургии, отделение неонатологии, отделение анестезиологии.

### **Апробация работы**

Симпозиум по хирургической стоматологии «Современные методы лечения врожденных и приобретенных деформаций челюстей» 20 апреля 2015; Ортопедическая реабилитация дефектов средней зоны лица на краниальных имплантах. Круглый стол «Актуальные вопросы хирургии головы и шеи у детей» в рамках III Междисциплинарного Конгресса по заболеваниям головы и шеи 26 мая 2015; «IX Всемирный конгресс Cleft2015». Всероссийская научно-практическая конференция по врожденной и наследственной патологии челюстно-лицевой области» 01 по 04 сент. 2015; На V Всероссийской научно-практической конференции «врожденная и наследственная патология головы, лица и шеи у детей: актуальные вопросы комплексного лечения», Москва, 24-25 ноября 2016.

### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Диссертационное исследование соответствует шифру специальности - 14.01.14 Стоматология. Отрасль науки – медицинские исследования.

Стоматология – область науки, занимающаяся изучением этиологии, патогенеза основных стоматологических заболеваний (кариес зубов, заболевания пародонта и др.), разработкой методов их профилактики, диагностики и лечения. Совершенствование методов профилактики, ранней диагностики и современных методов лечения стоматологических заболеваний будет способствовать сохранению здоровья населения страны.

Область исследования соответствует четвертому пункту - «изучение этиологии и патогенеза врожденных и приобретенных аномалий развития, дефектов и деформаций челюстно-лицевой области»

## **Публикации**

По материалам работы опубликовано 5 научных работ в отечественной литературе, из них 3 – в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ.

## **Объем и структура работы**

Диссертация изложена на 116 страницах машинописного текста, состоит из введения, четырех глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, приложений, список литературы включает 244 источников (129 отечественных и 115 зарубежных авторов). Работа иллюстрирована 19 таблицами и 31 рисунками.

# ГЛАВА 1. ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ ПРИ РАСЩЕЛИНЕ ГУБЫ И НЕБА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

## 1.1. Расщелина губы и неба этиология, патогенез, влияние на макроорганизм.

Как патологию врожденного характера, дефект неба впервые описал Pierre Franco (1561). Он писал: «Тех, кто имеет расщелину неба, более трудно вылечить и они всегда говорят через нос. Если небо затронуто частично, то это похоже на речь «с ватой во рту», пациент мог бы хорошо и более ясно говорить, или возможно даже так, как если бы не имелось расщелины». Взаимосвязь врожденной расщелины губы и неба и патологии речи, следовательно, признавали в XVI столетии [70].

Расщелина губы и неба является одним из самых тяжелых пороков развития челюстно - лицевой области с высокой распространенностью – от 12 до 36% врожденных пороков человека. [32,46,58,95,159,166,176,190,240]. Наибольшая распространенность данного заболевания в Китае и Японии– 1:165-1, 7:100, в США и Европе - от 1:500 до 1:1000, распространенность у негроидов 0,41:1000 рождений. В Российской Федерации рождается 1 ребенок на 600 рождений. В настоящее время наблюдается тенденция к увеличению данного порока развития [4,142,168,196,214,206,227,131,147,150,182,228].

Распространенность РГН имеет статистическую значимость для определения рождаемости детей с другими пороками развития, оценки различных факторов на возникновение данной патологии и оценки эффективности профилактики [116].

По данным Ад. А. Мамедова(2009) по Оренбуржью количество рождений детей с РГН составляет 1:700 новорожденных [70]. Также наблюдается увеличение рождаемости детей с РГН в Узбекистане с 1:1230 в 1995 г. до 1:745 в 2003 году Частота рождения детей с врожденным пороком в Узбекистане увеличилась с 1:1230 в 1995г до 1:745 в 2003 году [3, 30]. В неблагоприятных районах республики Башкортостан выявлен рост рождения детей с РГН [119].В

Липецкой области частота рождаемости детей с расщелиной губы и неба изменилась от 1:954 до 1:800 [104]. После аварии в 1986 году на Чернобыльской АЭС был отмечен рост числа врожденных аномалий в России [19,20]. По данным других исследователей частота рождения детей с РГН остается неизменной [48].

Данные литературы свидетельствует о вариабельности статистических данных, которые зависят от методов регистрации РГН, географического положения, детской смертности. Данные о распространенности РГН необходимы для медико-статистического анализа, выявление факторов, провоцирующих развитие РГН, уровень специализированной медицинской помощи в различных регионах страны [105].

Расщелину губы и неба провоцируют множество факторов. РГН может проявляться как отдельная патология и как часть врожденного синдрома. Врожденные пороки развития зачастую связаны с мутациями и не имеют социально детерминации [81,114]. Огромную роль в развитии расщелины губы и неба играет качество жизни, здоровье и характер трудовой деятельности матери. Особенно ярко проявляется такое влияние в первом триместре беременности [48,2,108]. На развитие эмбриона экзогенные факторы оказывают наибольшее влияние в первом триместре по той причине, что происходит закладка структур лица, что приводит к развитию РГН [13,16,34,51,70,110,113,154,163,179,191,196,203,223,243]. Разными исследователями доказан факт, что совокупность внутреннего и внешнего негативного влияния на организм матери провоцирует развитие расщелины губы и неба [93,124,177,187,239].

Факторы влияющие на рождение детей с пороками развития: токсикоз, травмы во время беременности, вирусные инфекции, нехватка витаминов, беспокойное состояние, сверх нагрузки, тяжелое течение беременности [105,121]. По результатам исследований 60% женщин у которых родились дети с пороком развития лица, имел место контакт с различными химическими факторами [109].

На развитие эмбриона через изменение и повреждение половых клеток родителей могут оказывать влияние такие факторы как: злоупотребление

алкоголем [146], загрязнение окружающей среды. Под влиянием перечисленных факторов частота рождения детей с РГН увеличивается [48,53,174].

По результатам исследований выяснилось, что в селе распространенность рождения детей с РГН ниже чем в городе [81], хотя в Китае наоборот данный показатель выше [189]. В Мексике, на частоту проявления РГН исследовали влияние солнечного затмения [165]. Существуют данные о влиянии возраста родителей на рождение детей с РГН и они противоречивы. Одни исследователи констатировали учащение рождения детей с врожденными аномалиями ЧЛЮ [29], другие такой взаимосвязи не установили [1]. Как уже отмечалось ранее на развитие РГН оказывает характер труда и экзогенное влияние негативных химических факторов, это особенно актуально в России где 90% женщин заняты производственной деятельностью, а на химических предприятиях женщин в 1,5-2,0 раза больше чем мужчин [56,89]. В том числе работа в отрасли нефтегазоперерабатывающей промышленности оказывает влияние на распространенность РГН[105].

Несмотря на многочисленные исследования в области врожденной патологии челюстно-лицевой области, окончательно неизвестна этиология РГН [57,82,115]. Существуют три выдвинутые теории возникновения расщелины губы и неба: теория слияния отростков E.Dursey (1869) и W.His (1901) [156,172], теория миграции мезодермы (Fleischman-Veau)[174] и комбинированная теория В.М. Petten (1961)[103], экологические факторы и генетическая предрасположенность, которые были описаны выше. Исследования в данной области остаются актуальными по той причине, что при расщелине губы и неба нарушаются жизненно важные функции такие как: сосание, глотание, жевание, внешнее дыхание, в более позднем возрасте – речь [73,82,127,182]. Множество заболеваний ЛОР наблюдаются при расщелине губы и неба такие как: катар дыхательных путей, пневмония, отит, евстахиит, ринит, бронхит. Дополнительную нагрузку на местный иммунитет оказывает постоянное попадание пищи из полости рта в полость носа, что имеет определенные последствия [77,80,83,122,147,126,194,204,229].

Дети с расщелиной губы и неба отстают по определенным антропометрическим показателям от детей без расщелины губы и неба. Такими показателями являются масса тела, которая меньше на 500 грамм, рост, который меньше на 3 сантиметра [58,219]. РГН является предрасполагающим фактором для развития таких патологий, как аллергодерматоз, железодефицитная анемия, гипотрофия [68].

Дети с РГН испытывают трудности в психоэмоциональной сфере, потому, что ощущают себя не такими как все, иногда это усугубляется чувством собственной неполноценности из-за неадекватной реакции сверстников [22,59].

При врожденной расщелине губы и неба, дефект ЧЛО сопровождается, как правило, сопутствующими пороками развития, что отягощает состояние ребенка. Этиологические факторы, которые привели к развитию расщелины губы и неба провоцируют развитие другой сопутствующей патологии высокодифференцированных тканевых образований у плода во время беременности [18,20,92,93,206]. Количественное соотношение сопутствующей патологии колеблется от 13,1 до 15,5% пациентов. К сопутствующим нарушениям относится атрезия наружных слуховых проходов, глухонемота и аплазия ушных раковин [23,51,117,148,169,197,213,221,223].

## **1.2. Пороки развития организма человека ассоциированные с матриксными металлопротеиназами, тканевыми ингибиторами матриксныхметалоротеиназ и TGFβ2.**

Матриксные металлопротеиназы (ММП) - семейство цинк - зависимых эндопептидаз, основными функциями семейства являются расщепление всех компонентов экстрацеллюлярного матрикса, клеточных поверхностных белков и базальных мембран. Матриксные металлопротеиназы локализуются в эндоплазматическом ретикулуме, плазматических мембранах, митохондриях, экстрацеллюлярном матриксе, цитоплазме, и т.д., и содержатся в очень небольшом количестве. В организме человека данные процессы неотъемлемая часть жизнедеятельности организма, и необходимы как для физиологических

процессов, так и для патологических. К физиологическим относятся: эмбриональное развитие, морфогенез, тканевая резорбция, ангиогенез, апоптоз и т.д. Изменение уровня ММП сопутствует многим патологическим процессам таким как: артрит, язвенная болезнь, заболевание сердца, онкология и т.д [99,199,202,170,178, 149].

Первое упоминание металлопротеиназ датируется 1962 годом. Матриксные металлопротеиназы были обнаружены в ткани хвоста головастика. Среди ММП выделены 4 подсемейства это желатиназы, стромелизины, коллагеназы и неклассифицированные ММП [236]. Первая коллагеназа человека была получена в 1975 году больного ревматоидным артритом из синовиальной жидкости, полученный фермент расщеплял коллаген I типа, как и коллагеназа полученная из хвоста головастика [152].

Существуют факторы, влияющие на синтез и секрецию матриксных металлопротеиназ к ним относятся: интегрины, ряд химических соединений, такие как форболовы эфиры, липополисахариды, цитокины. Следует отметить, что основные факторы, влияющие на синтез и секрецию ММП это провоспалительные цитокины, а главным источником продукции являются активированные нейтрофилы, макрофаги, фибробласты [153].

Функциональность ферментного аппарата протеиназ ограничена активностью в отношении функциональных белков защищая их от «преждевременного» протеолиза. Активность их обусловлена нуждаемостью организма. Также активность протеолитических ферментов контролируется ингибиторами. Состарившиеся, чужеродные, неправильно синтезированные белки распознаются системой деградации белка – протеосомами, которые локализованы в цитоплазме клетки. Протеосомы пропускают такие клетки в ядро, где осуществляется их гидролиз[128].

Все ММП нуждаются в активации для проявления протеолитического действия [241]. На экспрессию ММП при физиологических и патологических состояниях оказывают влияние - наличие активаторов, активность генов, наличие ингибиторов в окружающей среде [148]. Активность регулируется на разных

стадиях в том числе: транскрипция, активация белка и взаимодействие с ТИМП – эндогенными ингибиторами матриксных металлопротеиназ. Разные типы ММП отличаются друг от друга способом активации проферментов, а также характером взаимодействия с ТИМП [186].

Молекулярное строение ММП обладает достаточно сложным устройством. Характерными частями ММП являются пропептидный и каталитические домены, которые регулируют протеолитическую активность. Разные типы ММП осуществляют различные функции, обусловлено это наличием в некоторых из ММП определенных зон таких как: гемопексин-подобный, фибронектин-связывающий, трансмембранный и др. Выше перечисленные особенности определяют выборочную связь ММП с компонентами ЭЦМ, ТИМП и клеточными поверхностям [99,143,185,198,202]. В связи со спецификой действия выделяют шесть групп ММП: оклагеназы, стромелизины, желатиназы, матрилизины, ММП мембранного типа и другие ММП [185].

Активация проферментов складывается из нескольких ступеней. Первый этап — это активатор оказывает влияние на участок пептидной цепи, локализованный по центру пропептида, в результате образуется промежуточный слабоактивный продукт. Следующей ступенью происходит удаление остатка пропептида с помощью внутримолекулярной реакции или воздействием других форм матриксных металлопротеиназ, которые находятся в активном состоянии. Аминокислотные остатки – их последовательность в гидролизуемом участке пропептида является определяющим тип протеиназ, способных активировать ММП [208]. Для проявления полного функционального потенциала ММП в структуре необходим N- концевой домен, что доказано для ММП1, ММП8 и ММП3 [201]. Про-ММП могут быть активированы тиол-аминофенилмеркуриацетатом (APMA), модифицирующими агентами, этилмаленидом, иодацетамидом, окисленным глутатионом, хаотропными агентами, а также при нагревании. [200]. Активация про-ММП осуществляется при участии «цистеинового включателя», у которого содержится в пропептидной области консервативная последовательность PRSGV/NPDи остаток цистеина, в



активном состоянии которой связан с цинком [232]. При влиянии активатора на ММП происходит разрыв координационной связи, данный процесс приводит к высвобождению ионов цинка. При этом активирующее начало взаимодействует с цистеиновым остатком, тем самым предотвращая реассоциацию остатка цистеина с ионом цинка. В таком ферменте происходит внутренняя перестройка, в результате чего в пропептиде гидролизуется одна – две связи и возникают конфигурации ферментов с частичной активностью. Так, при действии АРМА на про-ММП-1 образуются продукты с 15-40% активностью фермента. Последующая активация этих продуктов, например, с помощью ММП-2 или ММП-7 приводит к образованию полностью активной формы ММП-1 [130].

Совокупность влияния ММП вызывает не только деградацию компонентов ЭЦМ, они так же играют важную роль в активации рецепторов клетки, расположенных на поверхности, хемокинов и секреторных низкомолекулярных пептидов, под воздействием которых, осуществляется миграция лейкоцитов [226].

В случае если синтез ММП зависит от транскрипционного регулирования, то для деградации ЭЦМ необходима активация "скрытых" ферментов. По последним данным в литературе встречается упоминание о трех различных механизмах активации: активация поверхности клетки, интрацеллюлярная активация, пошаговая активация [236,201].

Первая совокупность факторов, активирующих протеиназы вовлекаются плазмин, трипсин, химаза или каллекреин. Самым мощным физиологическим активатором считается плазмин [198, 47]. Известно, что в "media», лейкоциты активируют при помощи плазмينا, пролиферация гладкомышечных клеток к миграции в "intima" сосудистой стенки, в то время как с помощью и-осуществляется процесс миграции самих гладкомышечных клеток [137]. В дополнение к плазминогенной системе наступает активация других ферментов, которые принимают участие в трансформировании плазменной мембраны. В 1994 году Sato H. с соавторами, удалось определить активатор "скрытой" ММП-2 на плазменной мембране [218].

ММП2, ММП3 играют важную роль в развитии неба. И иммуногистохимическое возрастание ММП-2 обнаружил Brown et al. (2002) на протяжении палатогенезиса у мышей [237]. ММП-2 играют специфичную роль в эпителиальной миграции [237]. Выборочное выделение ММП-9 в зоны оксификации обнаружил Baliver et al. 2001, по срединной линии развивающейся верхней челюсти. Экспрессия ММП-9 выше в тканях пациентов оперативное вмешательство у которых производилось в ранние сроки в сравнение с пациентами у которых операция проводилась в 2-3 месяца, но разница была незначительной [136]. Экспрессия ММП-9 во время заживления на коже ведет к образованию рубцов [162]. Рубцовая ткань, образующаяся после оперативного вмешательства у новорожденных состоит из коллагеновых волокон I типа [173].

ММП требуются для заживления повреждений кожи, характерной чертой которых является то, что ММП способствуют рубцобразованию. Семейство коллагенов важный компонент экстрацеллюлярного матрикса раны, и основная мишень для активности ММП [162]. В ремоделировании коллагена I типа принимают участие несколько ММП включая ММП-9 [173].

Тканевые ингибиторы матричных металлопротеиназ (ТИМП) являются ключевыми ингибиторами ММП в тканях. Они формируют комплексы энзим-ингибитор в соотношении 1:1. N- терминальная части молекулы позволяет ТИМП проявлять присущую ей ингибиторную активность. Она состоит из шести сохраненных цистеиновых остатков, образующих три дисульфидные петли, и способна внедряться в активные центры каталитического домена про-ММП. Выборочное связывание ТИМП с различными составляющими ЭЦМ зависит от С-терминальной области молекулы. На сегодняшний день ТИМП подразделяются на 4 формы, отличающиеся строением и ингибиторной активностью [143,164,234].

Активность ММП в сыворотке крови пациентов артритами была выше, чем у здоровых детей и не различались при разных типах артритов. Это означает, что повышение активности ММП, синтез, секреция и процессинг которых

активируется провоспалительными цитокинами, является закономерным для всех артритов, возникающих вследствие воспаления на иммунной основе, как реактивных (РеА), так и идиопатических (ЮИА и ЮРА) [129].

У пациентов со стабильной стенокардией содержание ММП9 связано с распространенностью атеросклероза, в сочетании с сахарным диабетом второго типа содержание ММП2 и ММП9 повышено по сравнению с больными с ИБС без проблем с углеводным обменом [49].

Повышение ТИМП1 и снижение соотношения ММП9, ТИМП1 в сыворотке крови отмечается при концентрической гипертрофии левого желудочка у пациентов с диагнозом - аортальный стеноз. Снижение сократительной способности левого желудочка миокарда ассоциировано с увеличением экспрессии ТИМП1. Увеличение ММП9 в сыворотке крови также сопровождает пациентов с аортальной и митральной недостаточностью с объемной перегрузкой левого желудочка. Снижение концентрации ММП9 в сыворотке крови наблюдается после операции у пациентов с объёмной перегрузкой левого желудочка направленной на уменьшение конечного систолического размера левого желудочка сердца [27]. При бронхиальной астме, эмфиземе, идиопатическом легочном фиброзе, криптогенной организующей пневмонии также наблюдается повышенная экспрессия ММП 9 [132].

У недоношенных детей в трахеальном аспирате и в сыворотке крови наблюдается повышение содержания ММП 1,2,9 и ТИМП2 в процессе течения бронхолегочной дисплазии. Это указывает на длительную деструкцию внеклеточного матрикса и процессов фиброобразования легочной ткани [7]. Повышение экспрессии ММП1, ММП2, ММП9 ведет к деградации коллагена внеклеточного матрикса альвеолярной ткани, а также является триггером нерегулируемого производства компонентов матрикса и приводит к развитию фиброза у детей с бронхолегочной дисплазией [220].

Снижение про-ММП 1 и повышение ТИМП-1 наблюдается у пациентов с бронхиальной астмой. При этом содержание матриксных металлопротеиназ 2,8 и

нейтрафильной эластазы в норме, что свидетельствует о преобладании воспалительных процессов [111].

Можно рассматривать как звено патогенеза гиперпластических процессов эндометрия высокую активность ММП2 и ММП9 в тканях и сыворотке крови. Также выделение ММП2, ММА9 и ТИМП2 наблюдается при хроническом гломерулонефрите [63, 82].

Установлена прямая корреляционная связь активности ММП3, ММП7 и ММП9 в сыворотке крови количеством у пульмонологических, ревматологических кардиологических пациентов. Кобальт является одним из активаторов противовоспалительных цитокинов, которые способствуют усилению запуску цитокинового механизма, лейкопоза, активации свободно радикальных и перекисных реакций с последующим развитием воспалительно-деструктивных процессов [107]. Высокое содержание матриксных металлопротеиназ 1 и 9 в цитоплазме опухолевых клеток эпителиальных тяжей, характеризуется язвенно-нодулярный базальноклеточный рак при этом уровень ингибиторов ММП1 - ТИМП1 и ТИМП2 сохраняется.

При инвазии опухолевых клеток у пациентов с метатипическим раком определяется экспрессия ММП1 и ММП9 в цитоплазме опухолевых клеток эпителиальных тяжей и в строме опухоли. Наблюдается дисбаланс содержания ТИМП1 и ТИМП2 с матриксными металлопротеиназами. Экспрессия ТИМП1 и ТИМП2 резко снижена или отсутствует [98].

При хроническом генерализованном парадонтите возникает каскад биохимических реакций. В результате происходящих реакций происходит активация ММП, которая является ответом на воздействие этиологических фактором. Следует отметить, что более выраженная реакция наблюдалась у пациентов с металлическими конструкциями в полости рта чем без них [61].

При исследовании соотношение ММП9 и ТИМП1 было аналогично ММП2 и ТИМП1. Нарушение баланса компонентов матрикса слизистой ЖКТ происходит при повышении уровня ММП9, при параллельном уменьшении ТИМП1 и сопровождается протеолитическим разложением ее фибриллярных структур.

Данные процессы способствует развитию осложненных кровотечением, деструктивных изменений слизистой оболочки. Напротив, увеличение активности ТИМП1 и снижение уровней ММП9 приводят к снижению утилизации протеинов ВКМ, способствуют перестройке архитектоники слизистой желудка и двенадцатиперстной кишки с формированием соединительнотканых рубцов. [96].

Тканевой ингибитор матриксных металлопротеиназ (ТИМП) – способен ингибировать матриксные металлопротеиназы (ММП), активность клеточного роста и ангиогенез. ТИМП может содействовать активности клеточного роста и регулировать клеточный апоптоз. ТИМП-2 принимает участие в активации про-ММП2 и стимулирует пролиферацию пульпы зуба, фибробластов – таких как клетки, фибробласты десны, а также эпителиальных клеток. Кроме того, ТИМП-1 и ТИМП-2 обладают замедляющим апоптоз действием [186,233,235].

ТИМП широко распространены в тканях организма. Тканевое ремоделирование важный процесс, происходящий на протяжении эмбриогенеза. Баланс между активацией ММП и ТИМП контролирует степень ремоделирования экстрацеллюлярного матрикса [205]. Пониженная экспрессия ТИМП1 в период раннего созревания тканей кожи может стать условием преимущественно препятствующего рубцеванию, в то время как повышенное выделение данного ингибитора наблюдается при рубцовом заживлении в позднем созревании и в зрелой коже [145]. Трансформирующий фактор роста бета (TGF- $\beta$ ) принадлежит семейству димерных полипептидов массой 25 kDa, повсеместно представленных в тканях и синтезируемых многими типами клеток [183].

Факторы TGF-бета обладают тремя основными биологическими функциями: они ингибируют пролиферацию большей части клеток, но могут стимулировать рост некоторых мезенхимальных клеток; они оказывают иммуносупрессивное влияние, и они усиливают формирование экстрацеллюлярного матрикса. Два вида мембранных рецепторов, обладающих киназной активностью, участвуют в передаче сигнала мишеням. Факторы TGF- $\beta$  вовлечены в процессы репарации раны и воспалительной реакции на начальных

стадиях и затем на стадии заживления через хемотаксическое привлечение клеток, участвующих в воспалительном ответе, и фибробластов (7). В отличие от TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 не синтезируется тромбоцитами. TGF- $\beta$ 2 - мощнейший цитокин, который модулирует эмбриональное развитие, формирование кости, развитие молочных желез, заживление ран, гемопоэз, последовательность клеточного цикла и синтез экстрацеллюлярного матрикса. У мышей с отсутствием TGF- $\beta$ 2 отмечалась перинатальная смертность и описано множество дефектов развития, связанных с единственным геном, которые включают пороки сердца, легких, дефекты лицевой части черепа, конечностей, позвоночника, глаз, внутреннего уха и урогенитальной сферы [217].

### **1.3. Пороки развития при расщелине губы и неба, ассоциированные с дисплазией соединительной ткани.**

ММП преимущественно участвуют в процессах деструкции ЭЦМ соединительной ткани. Соединительная ткань, которая развивается из мезенхимы дает начало внешне различным друг на друга, костной и хрящевой ткани, гладким мышцам, коже, крови, лимфе. [74]. На протяжении онтогенеза происходит дифференцировка и организация тканей, на которую оказывает воздействие сложное эпителиальное-мезенхимально влияние. В эмбриональном периоде проявляется структурообразующее свойство соединительной ткани [14,15,26,43,57].

Во время эмбриогенеза формирование соединительной ткани может претерпевать определенные отклонения. Такие отклонения обусловлены дисплазией соединительной ткани при котором происходит снижение содержания определенных видов коллагена или нарушение их баланса [39,49,60,76,94,97,101,112]. Количество патологических состояний, связанных с элементами соединительной ткани, обусловлена широким разнообразием, морфологической сложностью и значительным количеством функций соединительной ткани [39,125].

Объем соединительной ткани представлен несколькими образованиями одним из них является внеклеточное пространство, которое занимает значительную часть. Внеклеточное пространство заполнено макромолекулами, которые образуют внеклеточный матрикс. В состав внеклеточного матрикса входят сложные углеводы – гликозамингликаны. Эластин, коллаген, фибронектин, ламинин играет важную роль в процесса прикрепления клеток к внеклеточному матриксу. Между собой данные белки образуют специализированные структуры ЭЦМ к ним относятся: базальные мембраны - пластинчатые образования, в состав которых входит коллаген IV типа, ламинин и фибронектин, а также разного рода волокна (коллагеновые, эластиновые или фибронектиновые). Волокна погружены в гель, образуемый переплетенными цепями гликозаминогликанов, что обеспечивает упругость ЭЦМ [42, 90, 175].

Соединительная ткань обладает уникальной функцией, которая характерна только для нее – это самосборка ее внеклеточных компонентов в фибриллы и волокна. В межклеточном матриксе содержатся 3 типа волокнистых структур – эластиновые, коллагеновые, ретикулиновые. Нерастворимый белок коллаген является основным компонентом волокнистых структур. Коллаген состоит из свернутых в спираль трех полипептидных цепей, и участвующий в формировании структуры ЭЦМ. На его долю приходится около 25-30% всего белка, содержащегося в организме [155].

В соединительной ткани преобладает коллаген I и III типов, а в базальной мембране - коллаген IV и V типов. Для каждого типа коллагена за процесс расщепления отвечают специфичные ММП, причем следует добавить, что синтез и расщепление коллагена происходит постоянно. Коллагеновые волокна состоят из фибриллярного белка коллагена и присутствуют во всех видах соединительной ткани [230]. Принято считать, что, коллагеновые фибриллы обеспечивают механическую поддержку ЭЦМ [173]. Именно протеогликианы совместно с волокнистыми структурами обеспечивают большинство функциональных свойств основного вещества соединительной ткани [207].

Кроме типичных составляющих соединительной ткани в строении многих органов встречаются ретикулиновые волокна. Ретикулиновые волокна образованы специфичным коллагеном – ретикулином и участвуют в формировании каркаса органов, они встречаются в мышечных волокнах, жировых клетках и т.д. [158]. Глобулярный гликопротеин - эластин - является основой, эластических волокон, который синтезируется фибробластами и гладкомышечными клетками. Они способны легко растягиваться и сохранять при этом высокую прочность, нарушая только гидрофобные взаимодействия и изменяя расположение молекулы воды. После данных процессов система самопроизвольно возвращается в исходное состояние [230].

Другим видом специализированных клеток являются фибробласты, с помощью продуктов метаболизма, которых происходит одна из форм соединения клеток. Фибробласты вырабатывают макромолекулы протеогликаны, волокнистые белки типа коллагена, эластина [117] и основное вещество соединительной ткани, аморфное желеподобное вещество, заполняющее пространство между клетками и волокнами [91]. Вторым клеточным типом по численности в соединительной ткани являются макрофаги (гистиоциты), к которым относятся остеокласты в костной ткани, купферовские клетки печени, клетки микроглии головного мозга. Основная функция этих клеток заключается в защите организма от чужеродных агентов [178]. Исследования о тучных клетках малочисленны, в научной литературе описывается их участие в формировании общего адаптационного синдрома, а повышенный уровень в периферической крови связывают с развитием аллергической реакции. Их функция связана с синтезом, накоплением и секрецией ряда биологических активных веществ, главным образом - гепарина, гистамина, серотонина, интерлейкинов, факторов роста [151].

Данные литературы свидетельствуют о том, что нарушения обменных процессов в соединительной ткани играют важную роль в патогенезе развития хронической обструктивной болезни легких [21] атеросклероза сосудов [192] структурных изменений костной ткани [212,215].



Формирование врожденных пороков развития логично объяснить со стороны мультифакторной теории соединительно тканной дисплазии. В.П. Козлова (1994), А.Ф. Сулимов с соавт (2004), А. В.Клеменев (2003) указывали на возможность развития врожденной патологии ЧЛО сопровождающиеся нарушением процесса формирования тканевых структур в результате дисплазии соединительной ткани.

Соединительная ткань в организме человека отвечает за многие важнейшие функции такие как: формирование каркаса органов и тканей, поддерживает водно-солевой баланс, участвует в иммунном ответе организма, формировании органов и онтогенезе, процессу агрегации тромбоцитов, регенерации костей и тканей [15,26,102]. Дисплазия соединительной ткани ведет к снижению содержания или соотношения определенных типов коллагена что ведет к патологии в развитии соединительно-тканых структур во время эмбрионального развития [40,50,60,68,94,97,101].

Закладка и дифференцировка всех соединительнотканых элементов в период эмбрионального развития зависит от мезенхимы, которая является эмбриональной соединительной тканью. Исходя из этого можно считать расщелину губы и неба как одно из проявлений соединительно тканной дисплазии [36,119]. Исходя из этого подтверждается теория R. Stark, о том, что формирование РГН дефекта, является следствием неполного наполнения мезодермой эмбриональных отростков, расположенных около ротовой ямки плода [5,68,40, 22, 60].

Синдром дисплазии соединительной ткани (СДСТ) является системным процессом, который во время онтогенеза определяет межтканевые и межклеточные взаимодействия, полостей, образование формы тканей, органов. Т.е. соотношения частей всего тела [41,52,55,184].

Полученные данные, в результате многочисленных исследований свидетельствуют о разнообразии внешних и висцеральных фенотипических признаков СТД. Данные признаки определяют широкое разнообразие клинических проявлений патологии соединительной ткани.

Дети с РГН и неба по сравнению с детьми, без РГН, подвержены более частому клиническому проявлению внешних признаков СТД. Локализация данных проявлений- голова (41%), тело (32%), конечности (27%). Признаки дисплазии соединительной ткани у детей с РГН: слабые волосы (40,5%), эпикант (21%), короткая уздечка губы, короткая уздечка языка (92,4%), гипертелоризм глаз (33,5%), деформации позвоночника (52,0%), миопия (36,7%), лицо узкое и удлиненное (55,9%), сандалевидная щель (43,1%), девиация мизинца кисти (47%), повышенная мобильность суставов (45,1%), гипертелоризм глаз, низкий индекс массы тела (53%), (42,2%) [5].

Фенотипическими признаками соединительной ткани у 40,4% детей с РГН сопровождаются гипоплазией скуловой кости, гипоплазией челюсти, гипо и аплазией ушной раковины. Также наблюдается образование свищей челюстно-лицевой области, которые образуются с рождения, пороки развития органов зрения. До крайне высоких значений увеличиваются внешние признаки СТД у 20% детей с РГН и частичной расщелиной неба. У детей с односторонней расщелиной верхней губы, расщелиной твердого и мягкого неба, расщелиной альвеолярного отростка. При двусторонней расщелине верхней губы- у 63% детей, альвеолярного отростка, твердого и мягкого неба. Признаки нарушенной организации соединительной ткани в морфоструктуре тканей верхней губы, мочеточников и сердца при РГН наблюдались с образованием зон массивного фиброза с разрастанием волокон коллагена [6].

Термином "дисплазия" обозначается нарушение формирования соединительнотканых структур в процессе эмбриогенеза, выходящие за пределы общепризнанной нормы [33,58,88]. В основе дисплазии соединительной ткани лежит патология структуры ткани, следствием которой является снижение содержание определенных типов коллагена и нарушение их баланса [93,74,113].

Обусловленные генетическими деформациями структурные дефекты различных частей соединительной ткани, следствием которых, является снижение ее устойчивости, стабильности и прочности, приведут к образованию определенных клинических проявлений в органах, в которых саморазвитие и

единообразии соединительной ткани имеет приоритетное значение [86]. Установлено, что у пациентов с ДСТ изменяется послеоперационное состояние и результаты после оперативного вмешательства, проводимого в зоне лица в эстетических целях. Зачастую, можно подчеркнуть выраженный и сохраняющийся более длительное время отек мягких тканей, во время которого образуются кровоизлияния и гематомы. Также частое осложнение хирургического лечения у таких пациентов – это фиброз и некроз мягких тканей [100].

Исследуя детально строение слизистой оболочки полости рта с помощью гистологических препаратов у пациентов с внешними проявлениями дисплазии соединительной ткани О. Л. Мишутина (2002) обнаружила определенные особенности. Они выражались в ороговении соединительной ткани доходящего до образования склероза в определённой области, а также снижение уровня фибронектина, очаговом распределении его под эпителием и строме, а в ряде случаев - его полном отсутствии [78].

Поскольку сомиты мезодермы формируют мезенхиму - так называемую "эмбриональную соединительную ткань", определяющую на этапе эмбриогенеза механизм образования и дифференцировки всех соединительных элементов, развитие расщелины верхней губы и неба в этой связи вполне логично рассматривать как следствие дисплазии соединительной ткани [116].

#### **1.4. Сроки проведения хирургического вмешательства у детей с расщелиной губы и неба**

К лечению пациентов с РГН приступают с рождения ребенка и продолжается довольно долгое время. Следует отметить, что зачастую лечение не бывает успешным. Результаты лечения не оправдываются ожидания по причине того, что предлагаемые подходы несовершенны. Самыми тяжёлыми ошибками с далеко идущими последствиями, являются ошибки, в самом раннем возрасте. Такие ошибки приводят к усугублению вторичных деформаций ЧЛЮ следствием этого является поздняя и не полная реабилитация пациентов [19,35]. Основная масса программ реабилитации ориентированы на раннюю реабилитацию, так как

такой подход обеспечивает наилучшие условия для гармоничного развития здоровья и личности ребенка [45,49]. По данным исследователей 95% детей с расщелиной губы и неба, при правильном подходе к лечению и оказанию должных реабилитационных программ могут стать полноценными членами общества [103].

Значительный недостаток поздних операций (6-8 лет) – неполное восстановление функций, которые были нарушены в результате заболевания РГН, а также развитие вторичных воспалительных заболеваний ЛОР органов. В настоящее время общепризнано, возраст не имеет никакого особого значения для решения о проведении пластики неба. Основными критериями являются: тяжесть врожденного порока развития, возможность лечения ортодонтически, а также сопутствующая патология. В настоящее время пластику расщелины неба проводят детям от 2 - 3 лет до 5-6 лет. На определение возраста хирургического лечения влияет тяжесть патологии. Детям от 2-3 лет можно провести хирургическое лечение частичной расщелины мягкого неба, а в возрасте от 3 до 5 лет детям с расщелиной мягкого и твердого неба. Следует отметить, что пластика неба должна быть проведена максимально щадящими способами, не затрагивая костную ткань и при обязательном ортодонтическом лечении в послеоперационном периоде, это обусловлено тем, что при раннем вмешательстве на костной ткани более вероятна вторичная деформация неба.

А.А. Лимберг (1968, 1975) полагает, что при расщелине мягкого неба и частичной расщелине твердого неба операция допустима в возрасте 5-7 лет, а при полных – в 10-12 лет, так как считает, что ранние операции на небе вызывают в дальнейшем недоразвитие и деформацию верхней челюсти [64,65]

Ю.И. Бернадский (1978) считает, что при частичной расщелине неба операция возможна в возрасте 2-3 лет. При наличии расщелины части твердого неба и всего мягкого неба, операцию следует проводить в возрасте 3-4 лет, осуществляя после этого логопедическое обучение под наблюдением ортодонта. При полной РГН операцию следует проводить в возрасте 7-8 лет [8,9,10].

J. Bardach с соавт. (1984) оперировал детей сначала в возрасте 6 лет, а затем в возрасте от 1 года до 2 лет. Этому способствовали три обстоятельства. 1. Совершенствование ортодонтической помощи в пред- и послеоперационные периоды. 2. Благоприятная оценка исходного состояния детей педиатрами и заинтересованность логопедов в ранних операциях. 3. Отсутствие послеоперационных зубочелюстных деформаций при ранних операциях у детей с частичной расщелиной неба.

Учитывая, что рост верхней челюсти может влиять и отсутствие равновесия в тяге мышц и что речь лучше развивается у детей, оперированных в возрасте до 2х лет, авторы считают, что при всех формах расщелины неба операцию целесообразно выполнять именно в этом возрасте. Такого же мнения придерживаются J. Bardach (1984)

Несмотря на еще имеющиеся расхождения во взглядах на сроки выполнения операции, в последнее время определяется четкая тенденция – хирургическое лечение расщелин неба целесообразно проводить в более ранние сроки. Возросшее качество хирургического лечения расщелины неба на фоне уменьшения травматичности вмешательства, а также совершенствование анестезиологического пособия, позволили выполнять, ураностафилопластику в возрасте 2-4 лет, в зависимости от вида формы расщелины.

Однако при этом становится задача дальнейшего снижения возрастного ценза с целью наиболее эффективного восстановления функций и социальной реабилитации.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Общая характеристика пациентов с расщелиной губы и неба

Клиническое обследование и сбор материала для иммуноферментного анализа на содержание ММП2, ММП3, ТИМП2, TGFβ2 осуществлялся в Научном Центре Здоровья Детей, г. Москвы, у пациентов, поступивших с 2013 до 2016 года.

Для оценки вида, типа и формы расщелины губы и неба, у пациентов при проведении первичной хейлопластики и уранопластики, нами использована в клинике классификация Ад. Мамедова (1998) (Рисунок 1).

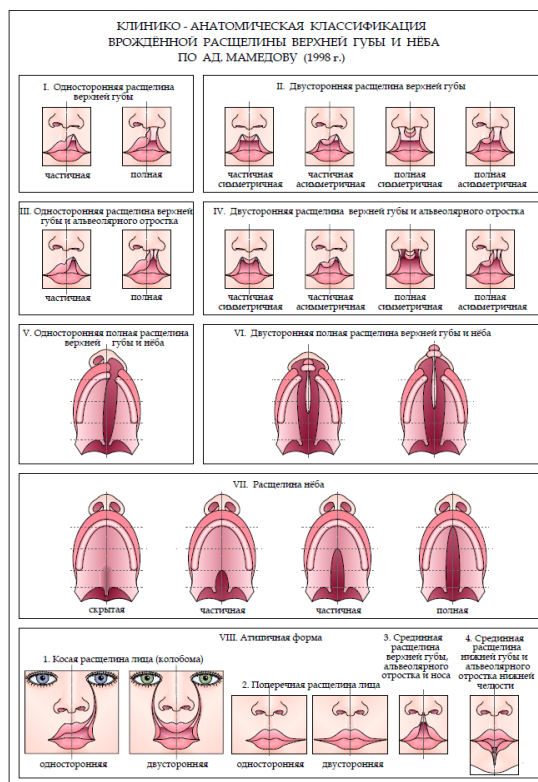


Рисунок 1 – Клинико-анатомическая классификация расщелины губы и неба  
Ад. Мамедова (1998)

#### I. Односторонняя расщелина верхней губы

- частичная,            полная

#### II. Двусторонняя расщелина верхней губы

- частичная, асимметричная,

- полная симметричная, полная асимметричная

### **III. Односторонняя расщелина верхней губы и альвеолярного отростка**

- частичная, полная

### **IV. Двусторонняя расщелина верхней губы и альвеолярного отростка**

- частичная ассиметричная
- частичная симметричная
- полная ассиметричная
- полная симметричная

### **V. Односторонняя полная расщелина верхней губы и нёба**

### **VI. Двусторонняя полная расщелина верхней губы и нёба**

### **VII. Расщелина неба**

- скрытая,
- частичная,
- полная.

### **VIII. Атипичная форма**

#### **1. Косая расщелина лица (колобома)**

- односторонняя
- двусторонняя

#### **2. Поперечная расщелина лица**

- односторонняя
- двусторонняя

#### **3. Срединная расщелина верхней губы альвеолярного отростка и носа.**

#### **4. Срединная расщелина нижней губы и альвеолярного отростка нижней челюсти.**

В исследовании приняли участие с согласия родителей или представителей пациенты с расщелиной губы, расщелина губы и неба односторонняя, расщелина губы и неба двусторонняя, расщелина неба частичная.

Распределение пациентов по клиническому диагнозу указано в таблице 1.

Таблица 1 - Распределение пациентов по клиническому диагнозу

Вид расщелины	Количество пациентов		95%-ные доверительные границы	
	Абсолютное число	%	от	до
Односторонняя	23	27,4%	19,2%	36,9%
Двусторонняя	35	41,7%	32,1%	51,7%
Расщелина губы	64	76,2%	67,0%	83,8%
Расщелина губы и неба	57	67,9%	58,0%	76,6%
Расщелина неба частичная	7	8,3%	4,2%	14,9%

Возраст пациентов составил от 3 дней до 9 лет на момент операции. Распределение пациентов по возрасту представлено в таблице 2.

Таблица 2 – Распределение пациентов по возрасту

Возраст	Количество пациентов		95%-ные доверительные границы	
	Абсолютное число	%	от	до
от 29 дней до 1 года	38	45,2%	35,5%	55,3%
от 1 до 3 лет	30	35,7%	26,6%	45,7%
от 3 до 7 лет	12	14,3%	8,5%	22,2%
от 7 до 11 лет	1	1,2%	0,3%	4,3%

Пациенты для исследования подбирались без ограничений по полу и возрасту, по весу, по типу родов и вскармливанию, и сопутствующей патологии. Всего приняли участие в исследовании 84 пациента из них девочек 35 (41,7% ДИ: 32,1% - 51,7%), мальчиков 49(58,3% ДИ: 48,3% - 67,9%), то есть преобладание количества мальчиков статистически недостоверно. Из 84 пациентов расщелина губы была у 64 пациентов, расщелина неба была у 75 пациентов в том числе односторонняя у 34, двусторонняя у 35, и частичная расщелина губы у 7. Расщелина губы и неба наблюдалась у 57 (68%) пациентов из 84. Расщелина губы, у 8 пациентов (7%). Распределение пациентов представлено в таблице 3.



Таблица 3 – Распределение пациентов

Параметры	Количество пациентов		95%-ные доверительные границы	
	Абсолютное число	%	от	до
Муж	49	58,3%	48,3%	67,9%
Жен	35	41,7%	32,1%	51,7%
Расщелина губы	8	9,5%	5,0%	16,4%
Расщелина неба	75	89,3%	82,1%	94,1%
Расщелина неба односторонняя	23	27,4%	19,2%	36,9%
Расщелина неба двусторонняя	35	41,7%	32,1%	51,7%
Расщелина неба частичная	7	8,3%	4,2%	14,9%
Расщелина губы и неба	57	67,9%	58,0%	76,6%
Роды				
Преждевременные	31	36,9%	27,7%	46,9%
В срок	53	63,1%	53,1%	72,3%
Кесарево	8	9,5%	5,0%	16,4%
Всего пациентов	84			

В исследовании приняли участие дети, родившиеся в срок - 53 (63%) и преждевременно - 31 (27%) в том числе кесарево сечение 8(10%). Распределение по вариантам родов, представлено в таблице 3.

Всем пациентам было проведено оперативное вмешательство – хейлопластика, уранопластика в зависимости от установленного диагноза. Уранопластика была проведена в 47 случаях, а хейлопластика в 37 случаях. Также повторное взятие образца материала для исследования, было проведено у пациентов, госпитализированных для проведения уранопластики после первичной хейлопластики. Оперативное вмешательство проводилось в отделении общей хирургии Научного центра здоровья детей, г. Москва.

Уранопластика по Мамедову была сделана 47 детям (56,0% ДИ: 45,9% - 65,7%), Хейлопластика, модифицированный метод: Миллард – Мамедов – Макленнан – 37 (44,0% ДИ: 34,3% - 54,1%), то есть доли обоих вариантов

операции от ½ достоверно не отличаются. Различия по полу, весу при рождении, возрасту, течению беременности и родам не имело статистически значимых отличий ( $p > 0,05$ )

## 2.2. Иммуноферментный анализ ММП2, ММП3, ТИМП2, TGFβ2.

Для проведения иммуноферментного анализа необходимо было получить информированное согласие родителей, так как нам необходимо было проводить биопсию мягких тканей. Для проведения иммуноферментного анализа необходимо было провести биопсию мягких тканей у всех 84 пациентов. У каждого пациента с расщелиной губы и неба биопсия была проведена дважды. Первая биопсия была проведена в области патологии (Рисунки 2,3,4,5 отмечено знаком плюс), вторая биопсия была проведена вне зоны патологии (Рисунки 2,3,4,5 отмечено знаком минус).

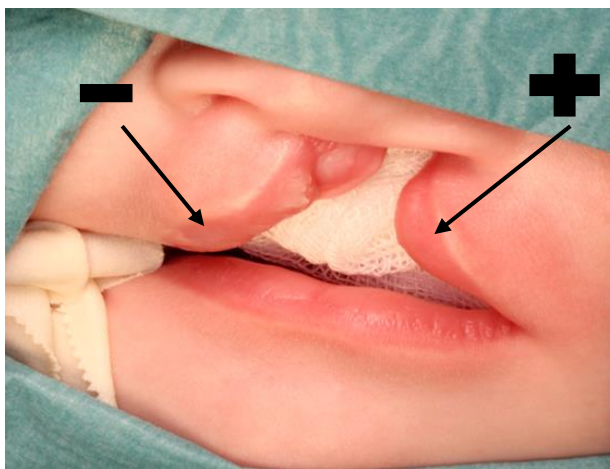


Рисунок 2 – Зоны биопсии при расщелине губы. Знак плюс – очаг патологии, знак минус – вне очага патологии.

Вторая биопсия была проведена вне зоны патологии в связи с тем, что ткань в этой области не изменена патологическим состоянием, и структура ее не нарушена, одновременно с этим вторая биопсия являлась контролем в проводимом иммуноферментном анализе. Размер мягких тканей, полученных в

ходе биопсии составлял приблизительно 2 на 2 миллиметра или размером в спичечную головку.

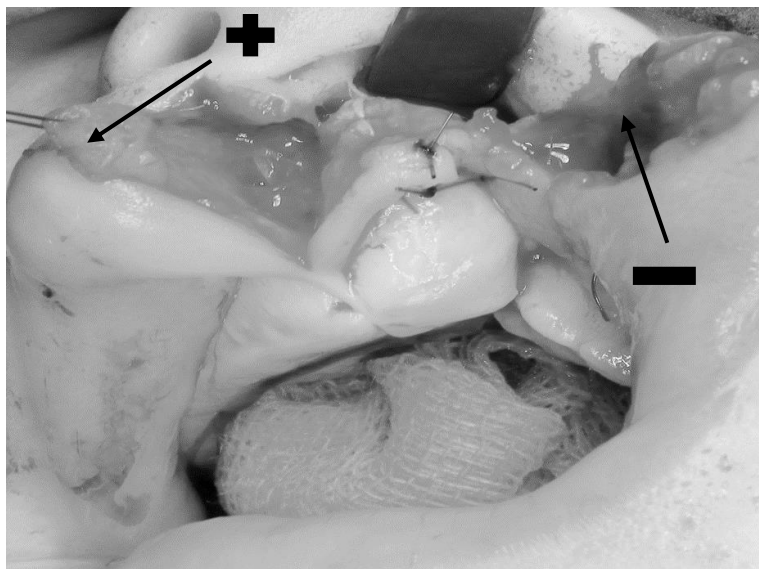


Рисунок 3 – Зоны биопсии при расщелине губы, во время оперативного вмешательства - хейлопластика. Знак плюс – очаг патологии, знак минус – вне очага патологии.

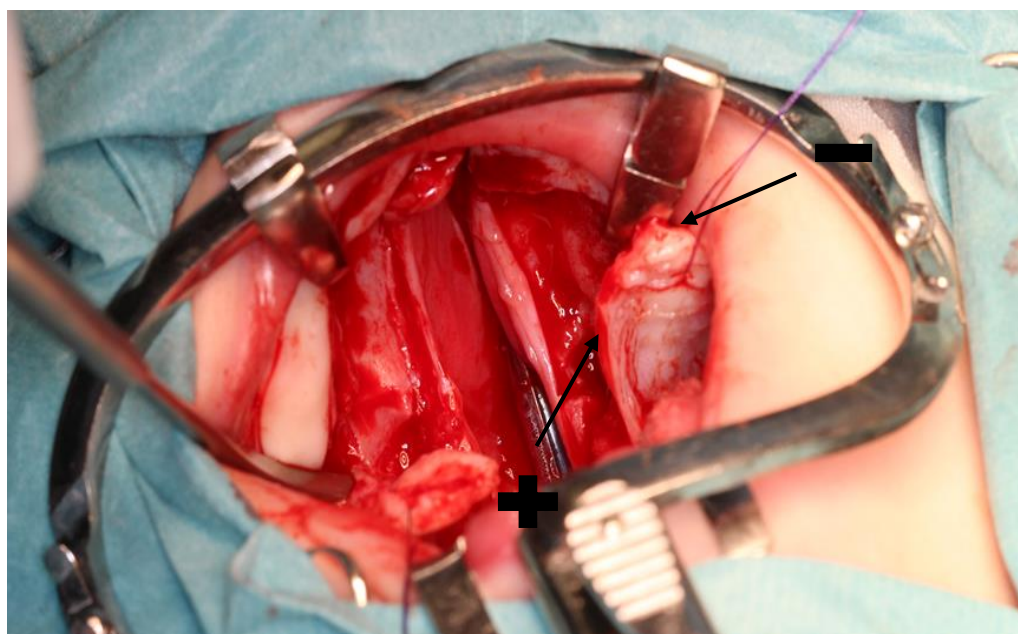


Рисунок 4 – Зоны биопсии во время оперативного вмешательства при уранопластике. Знак плюс – очаг патологии, знак минус – вне очага патологии.

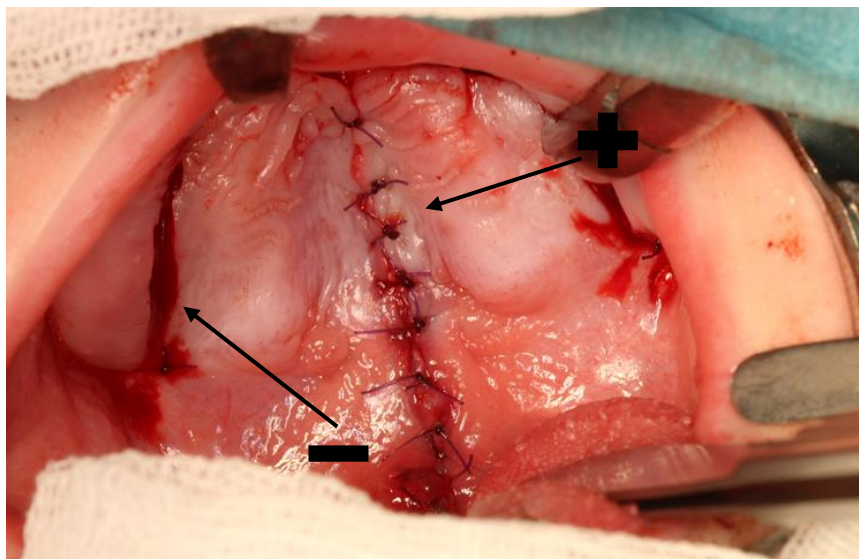


Рисунок 5 – Зоны биопсии после окончания оперативного вмешательства. Знак плюс – очаг патологии, знак минус – вне очага патологии.

Образцы мягких тканей, полученные в ходе биопсии, помещались в полипропиленовые пробирки (Рисунок 6) с 1мл физиологического раствора во время операции и сразу же помещались в холодильник и хранились при температуре 2-8°. Каждую пробирку маркировали знаком плюс или минус, где плюс означал образец из зоны патологии, а минус образец, взятый вне зоны патологии. Так же на пробирке подписывались фамилией и клиническим диагнозом пациента.



Рисунок 6 – Хранение материала биопсии мягких тканей.

Холодильник располагался в лаборатории патологической физиологии научного центра здоровья детей. Из материала полученного в ходе биопсии получали супернатант (Рисунок 7) в кратчайшие сроки. Супернатант хранился при температуре  $-80^{\circ}$ . Срок хранения материала составлял от трех лет до трех месяцев. Из истории болезни, у пациентов, которые принимали участие в исследовании, была выписана информация приемного отделения, информация о оперативном вмешательстве, информация первичного обследования, анамнез жизни, анамнез заболевания, данные при рождении. Полученная информация систематизировалась в таблице.

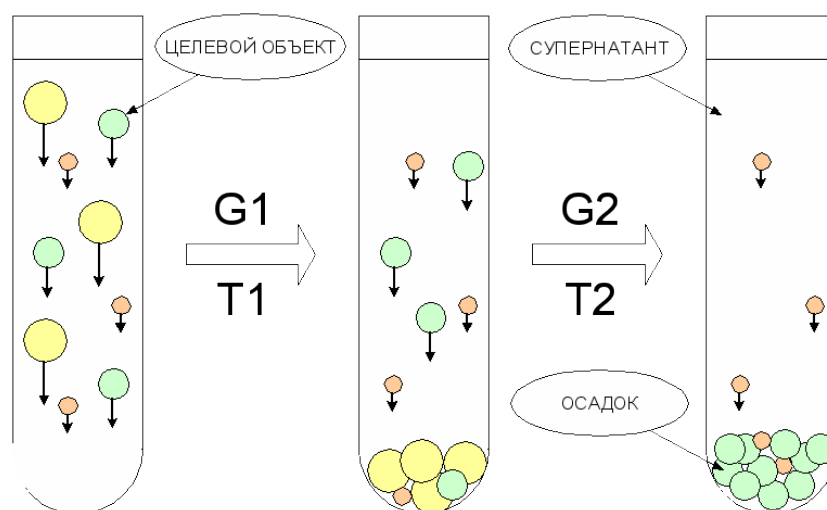


Рисунок 7 – Определение супернатанта.

Для исследования необходимо было приготовление супернатанта из полученных, в ходе биопсии мягких тканей. Супернатант необходимо приготовить в кратчайшие сроки после оперативного вмешательства. Приготовление супернатанта проводилось в течении 1-3 дней с момента оперативного вмешательства. Такой подход способствовал получению более достоверных результатов. После получения супернатанта в нем определено количество белка на 1 мл объема (приложение 1)



Рисунок 8 – Частотные распределения по величине белка из зоны патологии.

Для дальнейшего исследования штатив с образцами отправлен в Центр крови Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова. в переносном холодильнике



Рисунок 9 – Частотные распределения по величине белка из зоны без патологии

Для иммуноферментного анализа использованы реактивы ведущих мировых производителей такие как: HumanTIMP-2 QuantikineELISAKit - RnDSYSTEMS, HumanMMP-2 QuantikineELISAKit - RnDSYSTEMS, Bio-PlexProTGF- $\beta$  Panel, 3-PlexBio-RadLaboratories, AESKULISAMMP3, (Рисунок 10). Принцип метода заключался в следующем и был аналогичным для MMP3, MMP2, TIMP2, TGF $\beta$ 2.



Рисунок 10 – Набор для иммуноферментного анализа.

Антитела специфичные к ММП3, ММП2, ТИМП2, TGFβ2 сорбированы в ячейках планшета. ММП3, ММП2, ТИМП2, TGFβ2 образцов, стандартов и контрольных образцов связывается с антителами в ячейках планшета. ММП3, ММП2, ТИМП2, TGFβ2 образцов, стандартов и контрольных образцов связывается с антителами в ячейках планшета. Добавляемый конъюгат биотинмоноклональные анти-ММП3, ММП2, ТИМП2, TGFβ2 антитела связывают ММП3, ММП2, ТИМП2, TGFβ2, захваченный первыми антителами. После инкубации и промывки планшета из ячеек удаляется не связавшийся биотиновый конъюгат, и в ячейке добавляется конъюгат стрептавидин-пероксидаза, связывающий биотин, конъюгированный с ММП3, ММП2, ТИМП2, TGFβ2.



Рисунок 11 – Аппарат для промывки планшета

Промывка осуществляется аппаратом фирмы BIO-RAD. После инкубации и промывки (Рисунок 11) из ячеек удаляется не связавшийся стрептавидиновый конъюгат, ячейки добавляется субстратный раствор, который взаимодействует с

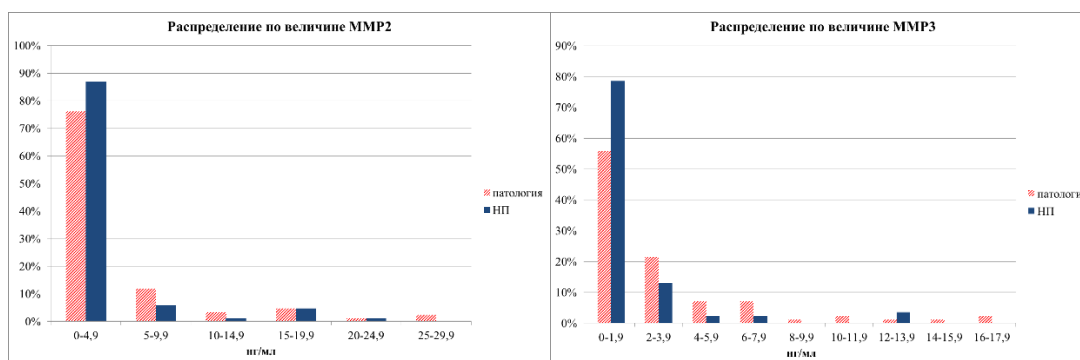


Рисунок 12 – График частотного распределения по величине ММП2 и ММП3

ферментным комплексом с образованием окрашенного раствора. Реакция останавливается добавлением кислоты. Интенсивность окраски, измеренная на длине волны 450 нм, прямо пропорциональна концентрации ММП3, ММП2, ТИМП2, TGFβ2, присутствующего в образцах. Концентрация ММП3, ММП2, ТИМП2, TGFβ2 в образцах определяется по стандартной кривой, построенной по 6 приготовленным разведениям стандарта.

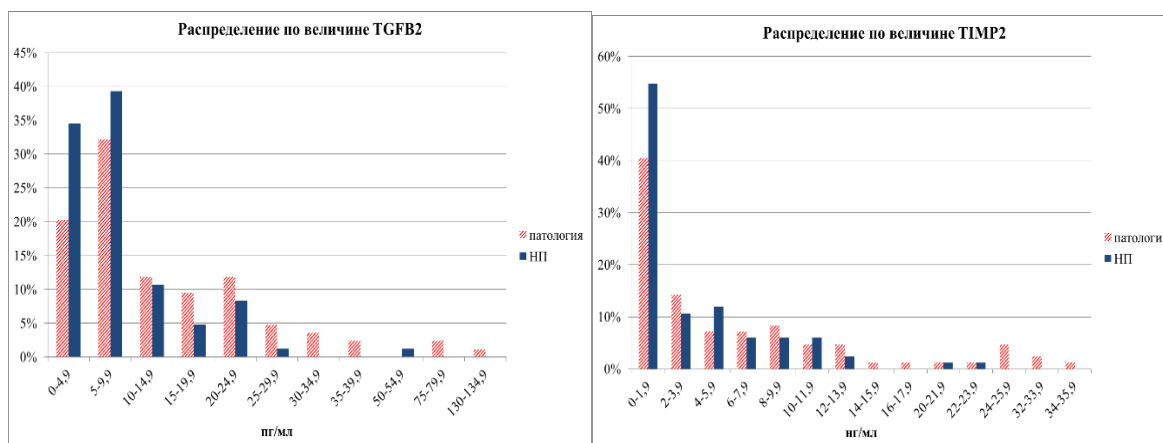


Рисунок 13 – Графики частотного распределения по величине ТИМП2 и TGFβ2.

Постройка кривой осуществлялась программным обеспечением, входящим в комплект к спектрофотометру фирмы BIO-RAD (Рисунок 14).





Рисунок 14 – Спектрофотометр.

Полученные результаты представлены в приложении 2. На рисунках 8,9,12 и 13 представлено распределение полученных результатов в ходе иммуноферментного анализа ММП2, ММП3, ТИМП2, TGF $\beta$ 2, а также содержание белка в образцах.

### **2.3 Статистическая обработка полученных результатов.**

Статистический анализ фактических данных проводился с использованием программы IBM SPSS Statistics 21.0. Доверительные границы для частоты рассчитывались на основе биномиального распределения. Достоверность различия частот определялась при помощи критерия «хи-квадрат», для таблиц 2 на 2 – в точном решении Фишера. Для числовых показателей рассчитывали среднее арифметическое  $M$ , среднеквадратичное отклонение  $\sigma$ , статистическую погрешность среднего  $m$ , медиану  $Me$ , а также минимум, максимум и квартили. Достоверность различия среднего между группами определяли при помощи дисперсионного анализа, связь между числовыми показателями искали при помощи корреляции Пирсона. Для большей показательности для ряда биохимических показателей наряду с их исходными значениями использовали логарифм значений.

Ввиду не компактности распределения ряда показателей также использовали методы непараметрической статистики» критерии Колмогорова-Смирнова и Манн-Уитни и коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Различия считали статистически достоверными (статистически значимыми) при  $p < 0,05$ .

## **ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

### **3.1. Общая характеристика пациентов с расщелиной губы и неба**

Клиническое обследование и сбор материала для иммуноферментного анализа на содержание ММП2, ММП3, ТИМП2, TGFβ2 осуществлялся в Научном Центре Здоровья Детей, г. Москвы, у пациентов, поступивших с 2013 до 2016 года.

Для оценки вида, типа и формы расщелины губы и неба, у пациентов при проведении первичной хейлопластики и уранопластики, нами использована в клинике классификация Ад. Мамедова (1998).

В исследовании приняли участие с согласия родителей или представителей пациенты с расщелиной губы, расщелина губы и неба односторонняя, расщелина губы и неба двусторонняя, расщелина неба частичная.

Возраст пациентов составил от 3 дней до 9 лет на момент операции. Распределение пациентов по возрасту представлено в таблице 2.

Пациенты для исследования подбирались без ограничений по полу и возрасту, по весу, по типу родов и вскармливанию, и сопутствующей патологии. Всего приняли участие в исследовании 84 пациента из них девочек 35 (41,7% ДИ: 32,1% - 51,7%), мальчиков 49(58,3% ДИ: 48,3% - 67,9%), то есть преобладание количества мальчиков статистически недостоверно. Из 84 пациентов расщелина губы была у 64 пациентов, расщелина неба была у 75 пациентов в том числе односторонняя у 34, двусторонняя у 35, и частичная расщелина губы у 7. Расщелина губы и неба наблюдалась у 57 (68%) пациентов из 84. Расщелина губы, у 8 пациентов (7%). Распределение пациентов представлено в таблице 3.

В исследовании приняли участие дети, родившиеся в срок - 53 (63%) и преждевременно - 31 (27%) в том числе кесарево сечение 8(10%). Всем пациентам было проведено оперативное вмешательство – хейлопластика, уранопластика в зависимости от установленного диагноза. Уранопластика была проведена в 47 случаях, а хейлопластика в 37 случаях. Так же повторное взятие образца материала для исследования, было проведено у пациентов, госпитализированных для проведения уранопластики после первичной хейлопластики. Оперативное

вмешательство проводилось в операционной Научного центра здоровья детей, г. Москва.

Уранопластика по Мамедову была сделана 47 детям (56,0% ДИ: 45,9% - 65,7%), Хейлопластика, модифицированный метод: Миллард – Мамедов – Макленнан – 37 (44,0% ДИ: 34,3% - 54,1%), то есть доли обоих вариантов операции от ½ достоверно не отличаются. Различия по полу, весу при рождении, возрасту, течению беременности и родам не имело статистически значимых отличий ( $p > 0,05$ )

### **3.2. Иммуноферментный анализ матриксных металлопротеиназ 2 типа в мягких тканях при различных типах расщелины губы и неба.**

Приоритетным направлением изучения патогенеза расщелины губы и неба является поиск оптимального протокола лечения пациентов, который позволит пройти скорейшую реабилитацию и вернуться к полноценной жизни. Одним из основных факторов влияющих на восстановление структур лица и макроорганизма является выбор момента для проведения оперативного вмешательства.

Так же на скорость и качество реабилитации влияет тяжесть общего состояния при расщелине губы и неба. Расщелина губы и неба – это заболевание, ассоциированное с нарушениями в соединительной ткани, следовательно, изучение клеточных элементов соединительной ткани и их активности позволит нам сделать определенные выводы.

ММП2 участвует в процессе ремоделирования соединительной ткани, регулируют апоптоз, оказывают влияние на скорость заживления и рубцевания. Следовательно, в эмбриональном периоде данные клеточные элементы при повышенной активности оказывают пагубное влияние на развитие структур губы и неба. ММП2 играет важную роль во многих нормальных физиологических процессах, таких как эмбриональное развитие, морфогенез, репродукция и тканевое ремоделирование. Они также участвуют во многих патологических процессах, таких как воспаление и заживление ран, артрит, рак и сердечно-

сосудистые заболевания. ММП-2 (желатиназа А) широко экспрессируется во время развития, и её уровень повышается в местах повреждения тканей.

Для выявления уровня ММП2 нами было проведена биопсия мягких тканей из зоны расщелины и биопсия мягких тканей из максимально удаленного участка от очага патологии, в пределах операционного поля. Биопсия проводилась во время хирургического вмешательства. Содержание ММП2 в биопсии мягких тканей, оценено у 84 пациентов с расщелиной губы и неба или расщелиной губы.

Таблица 4 – Статистические параметры биохимических показателей ММП2 из зоны с патологии и из зоны вне зоны патологии (НП – нет патологии).

Показатель (N=84)	Белок (мг/мл)	ММП2 нг/мл	Белок (мг/мл)НП	ММП2 нг/млНП
М	0,14	3,93	0,15	2,32
m	0,06	0,67	0,06	0,47
σ	0,56	6,13	0,53	4,35
Асимм.	8,82	2,35	8,71	2,78
Экссесс	79,45	4,93	78,1	7,12
Мин	0,03	0,07	0,03	0,02
Макс	5,16	26,83	4,82	20,17
Процентиль 25%	0,05	0,45	0,04	0,3
Ме	0,06	1,57	0,07	0,59
Процентиль 75%	0,08	4,29	0,1	2,05

В таблице 4 отображены статистические параметры ММП2 для зоны патологии и параметры, полученные из мягких тканей, полученных из зоны вне очага патологии. Количество наблюдений 84 (n=84). Из таблицы следует, что полученные данные имеют широкий диапазон величин. Следует отметить, что в образцах с патологией по сравнению с контролем мы видим увеличение всех биохимических показателей по медиане.

ММП2 из зоны расщелины имеет значения от 0,07 до 26,83 нг/мл, где среднее значение равно 1,57 нг/мл, 75% значений меньше или равно 4,29 нг/мл, 25% равно или ниже 0,45 нг/мл. Содержание ММП2 в зоне патологии колебалось от 0,074 нг/мл до 26,829 нг/мл. ММП2 из зоны без патологии имеет значения от 0,02 до 20,17 нг/мл, где среднее значение равно 0,59 нг/мл, 75% значений меньше или равно 2,05 нг/мл, 25% равно или ниже 0,30 нг/мл.

Установлено, что при РГН количество ММП2 в мягких тканях, отличается в зоне патологии от количества в зоне без патологии. Наблюдается достоверный рост по всем рассматриваемым ферментам, от небольшого увеличения до увеличения в несколько раз. Широкий разброс объясняется различным состоянием соединительной ткани при разных видах патологии, тяжестью общего состояния при различных типах РГН, травматичностью и количеством белка в образце.

Пациенты, принимающие участие в исследовании различались по полу, возрасту, весу на момент оперативного вмешательства, весу при рождении, типу родов, росту, типу проведенной операции, росту при рождении. По всем перечисленным показателям с помощью коэффициентов Манн-Уитни и Колмогорова-Смирнова достоверной связи с ММП2 в мягких тканях нет.

Таблица 5 – Ранговые коэффициенты корреляции значения белка и ММП2 с другими биохимическими показателями в очаге патологии.

Показатель	Белок (мг/мл)			ММП2 нг/мл		
	Коэффициент корреляции	Знач. (2-х сторонняя)	N	Коэффициент корреляции	Знач. (2-х сторонняя)	N
TGF-В2 пг/мл	0,238	0,029	84	<b>0,309</b>	0,004	84
ММП3 нг/мл	0,182	0,097	84	<b>0,495</b>	<0,001	84
ТИМП2 нг/мл	-0,169	0,125	84	0,093	0,402	84

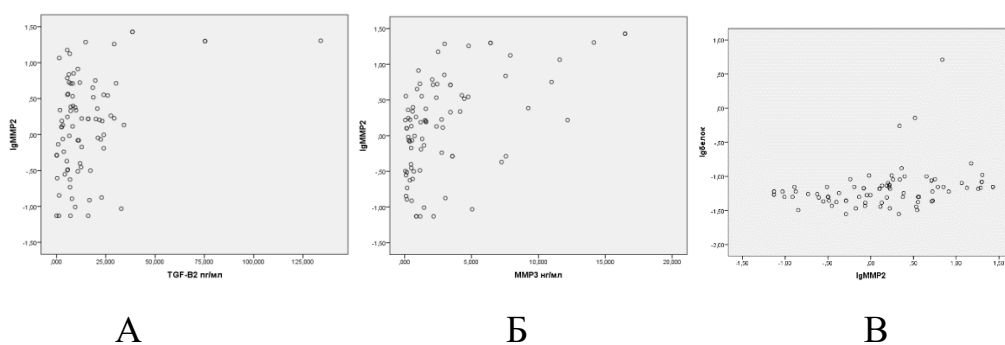


Рисунок 15 – (А) Совместное распределение десятичного логарифма концентрации ММП2 в зоне патологии и концентрация TGFβ2 в зоне патологии. Совместное распределение десятичного логарифма концентрации белка в зоне патологии и концентрация логарифма ММП2 в зоне патологии (В) и совместное распределение десятичного логарифма концентрации ММП2 в зоне патологии и концентрация ММП3 в зоне патологии (Б).

Как видно из таблицы 5 и рисунка 15 установлена слабая корреляция между ММП2 и TGFβ2 в зоне патологии. TGFβ2 коррелирует с ММП2 с коэффициентом 0,309. ММП3 с ММП2 коррелирует с коэффициентом 0,495, ММП2 коррелирует с содержанием белка с коэффициентом 0,405 (Рисунок 16а) (Рисунок 16б).

Таблица 6 – Ранговые коэффициенты корреляции ММП2 с другими биохимическими показателями вне очага патологии.

		Белок (мг/мл)	TGF- β2 пг/мл	ММП2 нг/мл	ММП3 нг/мл	ТИМП2 нг/мл
ММП2 нг/мл	Коэффициент корреляции	0,405	0,309	1	0,495	0,093
	Знач. (2-х сторонняя)	<0,001	0,004	.	<0,001	0,402
	N	84	84	84	84	84

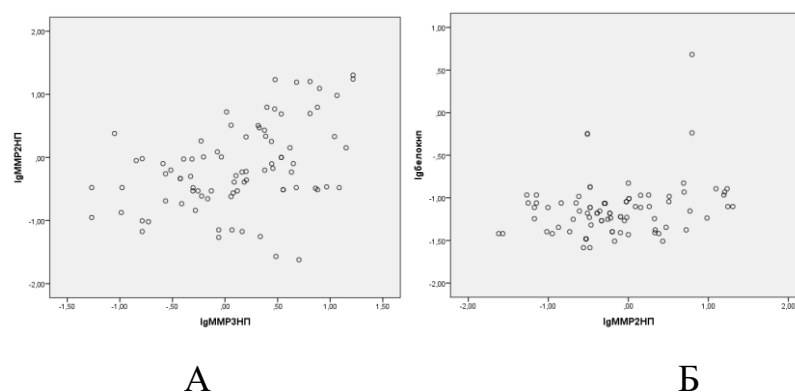


Рисунок 16 – (А) Совместное распределение десятичного логарифма концентрации, ММП2 вне зоны патологии и концентрация ММП3 вне зоны патологии. (Б) Совместное распределение десятичного логарифма концентрации, белка вне зоны патологии и концентрация ММП2 вне зоны патологии.

Как видно из таблицы 6 и рисунков 16 (А, Б), установлена слабая корреляция между рядом параметров вне очага патологии. Статистически не значимо. ММП3 с ММП2 коррелирует с коэффициентом 0,313 ММП2 коррелирует с содержанием белка с коэффициентом 0,258 (Рисунок 15).

Таблица 7 – Ранговые коэффициенты корреляции между ММП2 в очаге и вне очага патологии

Показатель	Коэффициент корреляции	p	N
Белок	0,177	0,107	84
ММП2	0,904	<0,001	84

Из таблицы 7 следует, что для ММП2 образцах биопсии (n=84), установлена сильная, достоверная связь между показателями ( $p < 0,001$ ), кроме содержания белка, для ММП2 коэффициент корреляции равен 0,904 ( $p < 0,001$ ) (Рисунок 17).

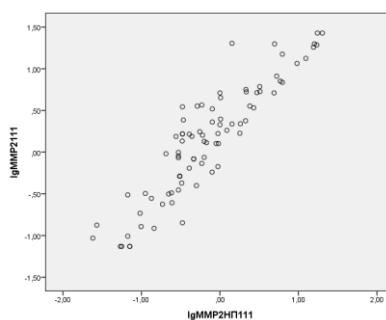


Рисунок 17 – Совместное распределение десятичного логарифма концентрации ММП2 вне зоны патологии и десятичного логарифма концентрации ММП2 в зоне патологии.

Таблица 8– Медианы биохимических показателей при различных типах патологии (НП – нет патологии).

	ММП2 нг/мл	ММП2 нг/млНП
Двусторонняя расщелина (n35)	5,09	2,64
Односторонняя (n=34)	3,95	2,6
Расщелина губы (n=8)	1,01	0,9
Частичная расщелина неба (n=7)	1,4	0,97

Таким образом, показатели ММП2 (Таблица 8) в мягких тканях из области расщелины в мягких тканях вне очага поражения достоверно отличались. Наивысший показатель уровня ММП2 зафиксирован в мягких тканях, полученных из зоны расщелины при двусторонней расщелине губы и неба. При других типах патологии показатели так же заметно были выше чем в образцах вне расщелины. Максимальным значением медианы ММП2 в мягких тканях из зоны расщелины составлял 3,578 нг/мл, против 2,401 нг/мл из мягких тканей полученных из зоны без патологии. При частичной расщелине неба медиана содержание ММП2 в мягких тканях составляло 1,4 нг/мл, что было незначительно больше чем при расщелине губы, но меньше чем при односторонней и двусторонней расщелине губы и неба (Рисунок 18).



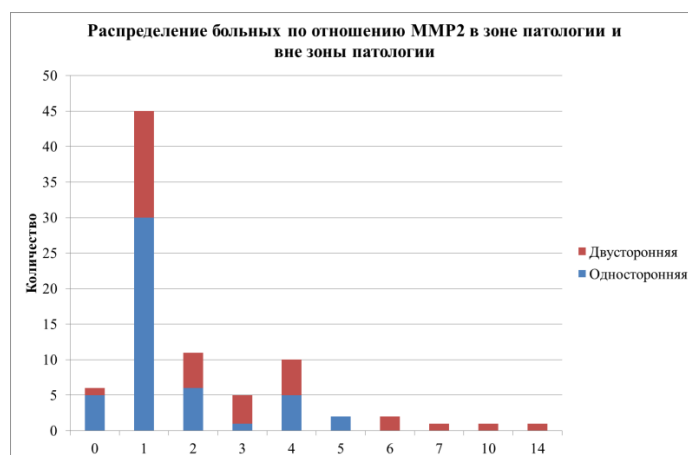


Рисунок 18 – Распределение пациентов по отношению MMP2 в зоне патологии и вне зоны патологии.

Максимальное значение медианы для MMP2 было в зоне патологии при двусторонней расщелине губы и неба у 35 пациентов 5,088 нг/мл. Отношение MMP2 из зоны патологии к MMP2 вне зоны патологии - различие достоверное по критерию Манн Уитни  $p=0,010$ . Абсолютным же значением при двусторонней расщелине губы и неба было 26,829 нг/мл, которому соответствовало значение 20,17нг/мл из зоны вне очага патологии (Рисунки 18,19).

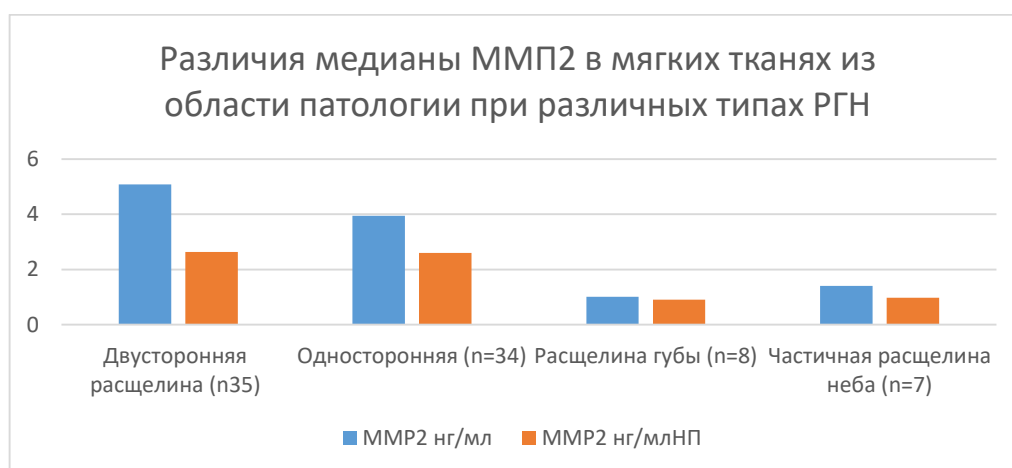


Рисунок – 19. Медианы содержания MMP2 в мягких тканях при различных типах патологии РГН (НП – нет патологии).

Кроме максимальных значений MMP2 при двусторонней расщелине губы и неба, оценили так же содержание данных параметров для других типов рассматриваемой патологии.

У 34 пациентов с односторонней расщелиной губы и неба медиана количества ММП2 в зоне патологии составляла 3,95 нг/мл. Для 7 пациентов с частичной расщелиной неба данный параметр был равен 1,4нг/мл. У 8 детей с расщелиной губы 1,01нг/мл. Медиана значения ММП2 при односторонней расщелине губы и неба вне очага патологии составляла 2,6нг/мл. Для частичной расщелины неба же составляла 0,97 нг/мл. При расщелине губы данный параметр составлял 0,9нг/мл.

Таким образом по результатам проведенного иммуноферментного анализа ММ2 в мягких тканях при различных типах РГН мы сделали следующие выводы:

- Экспрессия ММП2 достоверно повышалась при всех типах РГН в мягких тканях, взятых из зоны патологии по сравнению с мягкими тканями, взятыми из зоны вне очага патологии ( $p < 0,001$ ).
- Наибольшей экспрессия ММП2 была при двусторонней расщелине губы и неба, наименьшей при частичной расщелине губы, при которой показатели ММП2 в мягких тканях в зоне патологии лишь незначительно увеличивались (Рисунок 18).

### **3.3. Иммуноферментный анализ матриксных металлопротеиназ 3 типа в мягких тканях при различных типах расщелины губы и неба.**

ММП3 преимущественно экспрессируется клетками соединительной ткани и играет важную роль в изменении структуры внеклеточного матрикса (ЭЦМ). ММП-3 может деградировать многие компоненты ЕСМ, такие как протеогликаны, фибронектин, ламинин и другие коллагены. Из-за такого большого диапазона субстратов и способности активировать другие ферменты деградации (матрикса), в том числе другие матриксные металлопротеиназы, ММП-3 играет ключевую роль в физиологических и патологических процессах ремоделирования ткани.

ММП-3 секретируется в неактивной форме (про-ММП-3, 52 кДа) и активируется ограниченным протеолизом эндопептидазами. Активная ММП-3 (45 кДа и 35 кДа) может быть ингибирована в результате связывания с тканевыми ингибиторами матриксных металлопротеиназ (ТИМП) или  $\alpha 2$ -макроглобулином.

Регуляция активности ММП-3 необходима для предотвращения разрушения ЭЦМ и сохранения физиологического равновесия процессов тканевого ремоделирования. Соответственно, у пациентов с различными патологическими состояниями уровень ММП-3 повышен.

Для выявления уровня ММПЗ, нами была проведена биопсия мягких тканей из зоны расщелины губы или неба, а также из зоны, прилегающей непосредственно к расщелине губы или расщелине неба, для сравнительного анализа содержания биохимических показателей.

В биопсии всех прооперированных детей наблюдалось разное по степени выраженности содержания ММПЗ. А так же в супернатанте содержалось разное количество белка. Расчеты содержания ММПЗ, велись с учетом отношения количества биохимических показателей к количеству белка. Соответствующие расчеты были проведены и для материала полученного в ходе биопсии из зоны с патологией для сравнения с зоной без патологии.

Таблица 9 – Ранговые коэффициенты корреляции ММПЗ вне очага патологии (НП – нет патологии).

Показатель (N=84)	Белок (мг/мл)	ММПЗ нг/мл	Белок (мг/мл)НП	ММПЗ нг/млНП
М	0,14	2,91	0,15	1,57
m	0,06	0,4	0,06	0,28
σ	0,56	3,7	0,53	2,56
Асимм.	8,82	2,08	8,71	3,25
Экссесс	79,45	4,22	78,1	11,33
Мин	0,03	0,05	0,03	0,02
Макс	5,16	16,48	4,82	13,38
Процен-тиль 25%	0,05	0,5	0,04	0,21
Ме	0,06	1,45	0,07	0,72

Процентиль 75%	0,08	3,53	0,1	1,78
----------------	------	------	-----	------

Содержание ММПЗ, в биопсии мягких тканей оценено у 84 пациентов с расщелиной губы и неба или расщелиной губы.

В таблице 9 отображены статистические параметры ММПЗ и белка. Количество наблюдений 84 (n=84). Из таблицы следует, что полученные данные имеют широкий диапазон величин. Следует отметить, что в образцах с патологией по сравнению с контролем мы видим увеличение ММПЗ по медиане.

ММПЗ из зоны расщелины имеет значения от 0,05 до 16,48 нг/мл, где среднее значение равно 1,45 нг/мл, 75% значений меньше или равно 3,53 нг/мл, 25% равно или ниже 0,50 нг/мл. ММПЗ из зоны без патологии имеет значения от 0,02 до 13,38 нг/мл, где среднее значение равно 0,72 нг/мл, 75% значений меньше или равно 1,78 нг/мл, 25% равно или ниже 0,21 нг/мл.

Установлено, что при РГН количество ММПЗ, отличаются в зоне патологии от количества в зоне без патологии. Содержание ММПЗ в зоне патологии колебалось от 0,054 нг/мл до 16,479 нг/мл. Пациенты, принимающие участие в исследовании различались по полу, возрасту, весу, весу при рождении, типа родов, росту, типу проведенной операции, росту при рождении по всем перечисленным показателям с помощью критериев Манн-Уитни и Колмогорова-Смирнова достоверной связи с ММП в мягких тканях нет.

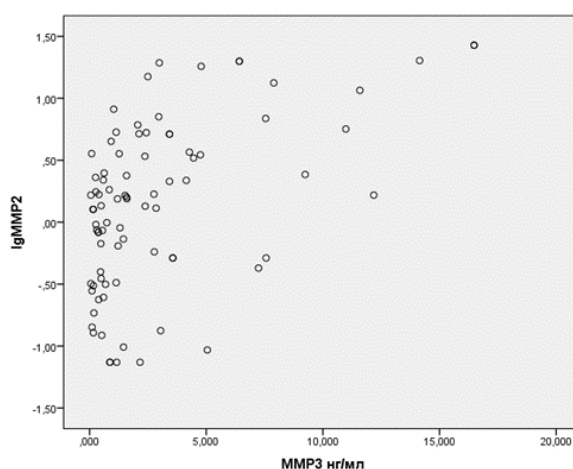


Рисунок 20 – Совместное распределение десятичного логарифма концентрации ММП2 в зоне патологии и концентрация ММПЗ в зоне патологии.

Таблица 10 – Таблица ранговых коэффициентов корреляции ММПЗ в очаге патологии.

Параметр		Белок (мг/мл)	TGF-В2 пг/мл	ММП2 нг/мл	ТИМП2 нг/мл
ММПЗ нг/мл	Коэффициент корреляции	0,182	0,191	<b>0,495</b>	0,147
	Знач. (2-х сторонняя)	0,097	0,082	<0,001	0,184
	N	84	84	84	84

Как видно из таблицы 10 и рисунка 20, установлена слабая корреляция показателей содержания ММП2 и ММПЗ в мягких тканях из зоны с расщелиной. ММПЗ с ММП2 коррелирует с коэффициентом 0,495 (Рисунок 20) Статистически не значимо.

Таблица 11 – Ранговые коэффициенты корреляции ММПЗ в мягких тканях вне очага патологии (НП – нет патологии).

Показатель		Белок (мг/мл) НП	TGF-В2 пг/мл НП	ММП2 нг/мл НП	ММПЗ нг/мл НП	ТИМП2 нг/мл НП
ММПЗ нг/мл НП	Коэффициент корреляции	0,334	-0,039	<b>0,313</b>	1	-0,021
	Знач. (2-х сторонняя)	0,002	0,724	0,004	.	0,848
	N	84	84	84	84	84

Как видно из таблицы 11, установлена слабая корреляция между показателем ММП2 и ММПЗ, ММПЗ и белком в мягких тканях вне очага

патологии. Содержание ММПЗ в мягких тканях коррелирует с содержанием белка с коэффициентом 0,334 (Рисунок 21).

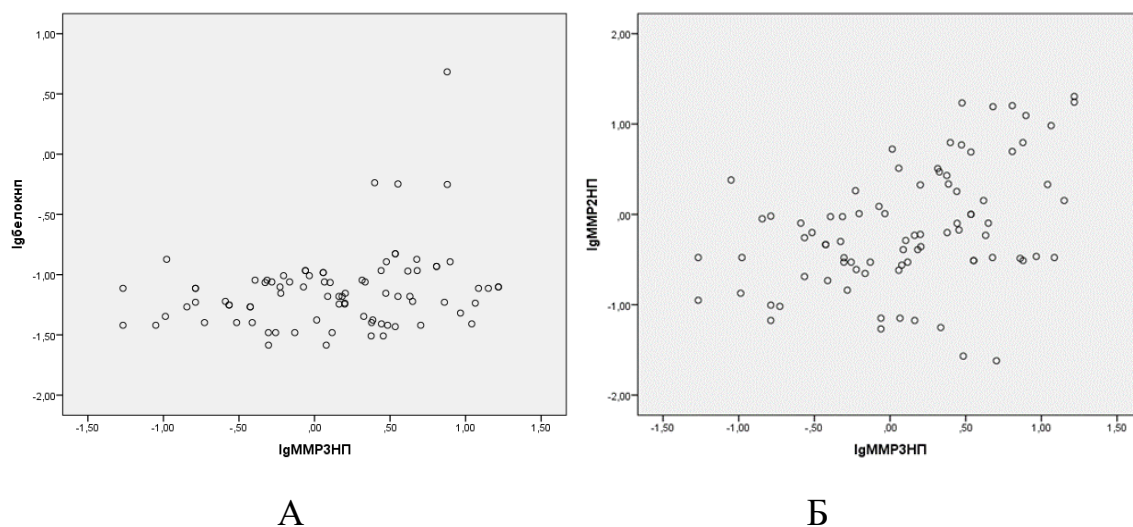


Рисунок 21 – (А) Совместное распределение десятичного логарифма концентрации, белка вне зоны патологии и концентрация ММПЗ вне зоны патологии. (Б) Совместное распределение десятичного логарифма концентрации, ММП2 вне зоны патологии и концентрация ММПЗ вне зоны патологии.

Таблица 12 – Таблица ранговых коэффициентов корреляции между показателем ММП 3 в очаге и вне очага патологии.

Показатель	Коэффициент корреляции	p	N
ММПЗ	0,626	<0,001	84

Из таблицы 12, следует, что для всех исследуемых образцах биопсии (n=84) установленная сильная, достоверная связь между показателями ММПЗ ( $p < 0,001$ ), для ММПЗ коэффициент корреляции равен 0,626 ( $p < 0,001$ ). Таким образом, показатели ММПЗ в мягких тканях из области расщелины и мягкими тканями вне очага поражения достоверно отличались (Рисунок 22).

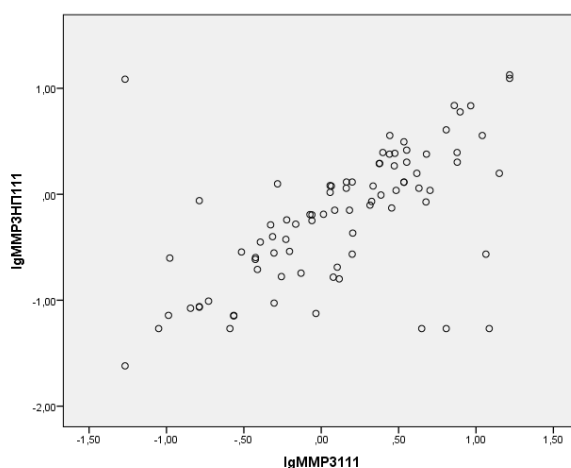


Рисунок 22 – Совместное распределение десятичного логарифма концентрации ММПЗ вне зоны патологии и ММПЗ в зоне патологии

Таблица 13 – Медианы ММПЗ в мягких тканях при различных типах патологии (НП – нет патологии).

	ММПЗ нг/мл	ММПЗ нг/млНП
Двусторонняя расщелина (n=35)	3,37	1,66
Односторонняя (n=34)	3	1,54
Расщелина губы (n=8)	2	1,88
Частичная расщелина неба (n=7)	1,49	0,87

Из таблицы 13, следует достоверное увеличение концентрации, ММПЗ, по медианам в мягких тканях при двухсторонней расщелине губы и неба, что является наивысшим показателем среди других видов патологии.

При частичной расщелине неба медиана содержания ММПЗ в мягких тканях в области патологии равнялось 1,49 нг/мл, что было меньше чем при расщелине губы, односторонней и двусторонней расщелине губы и неба. Максимальным содержание ММПЗ в мягких тканях при частичной расщелине неба из зоны патологии составляло 4,146 нг/мл, а из зоны без патологии составляло 1,576 нг/мл (рисунок 23).

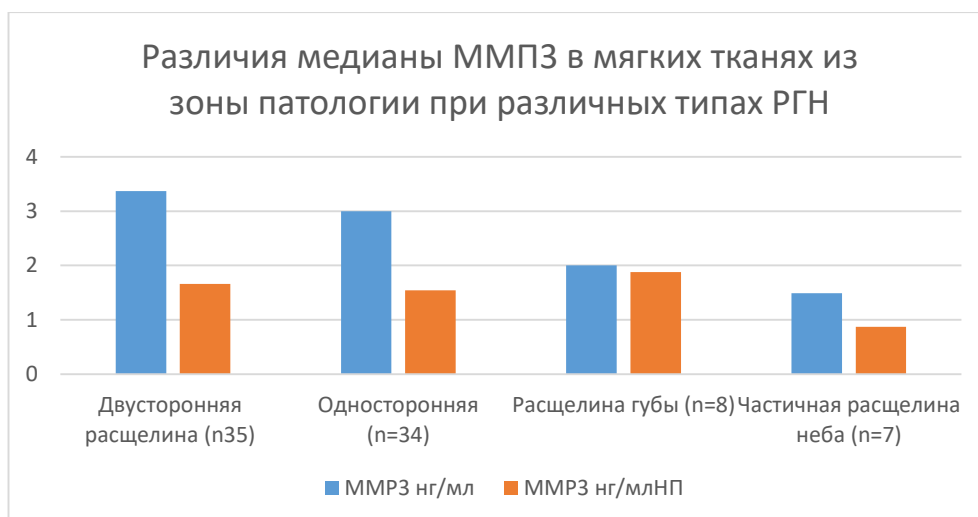


Рисунок 23 – Медианы ММПЗ при различных типах расщелины губы и неба (НП – нет патологии).

Максимальное значение медианы для ММПЗ было в зоне патологии при двусторонней расщелине губы и неба у 35 пациентов 3,373нг/мл. Отношение содержания ММПЗ в мягких тканях из зоны патологии к мягким тканям вне зоны патологии, различия достоверное по критерию Манн Уитни  $p=0,001$ . Абсолютным значением ММПЗ в мягких тканях при двусторонней расщелине губы и неба составляло 16,479 нг/мл, которому соответствовало значение 13,376 нг/мл из зоны вне очага патологии.

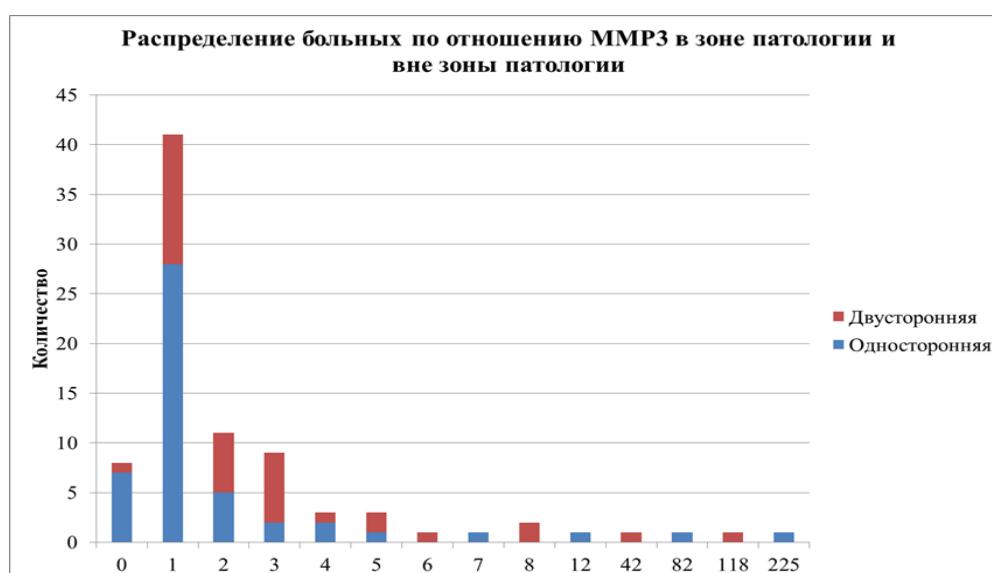


Рисунок 24 – Распределение пациентов по отношению ММПЗ в зоне патологии и вне зоны патологии.



Из рисунков 24 следует, что у пациентов с двусторонней расщелиной величина отношений в среднем больше чем при односторонней. Максимальное значение медианы для ММПЗ было в зоне патологии при двусторонней расщелине губы и неба у 35 пациентов 3,373 нг/мл. Отношение содержания ММПЗ в мягких тканях из зоны патологии к мягким тканям вне зоны патологии различия достоверное по критерию Манн Уитни  $p=0,001$ . Абсолютным значением ММПЗ в мягких тканях при двусторонней расщелине губы и неба составляло 16,479 нг/мл, которому соответствовало значение 13,376 нг/мл из зоны вне очага патологии. Кроме максимальных значений TGF $\beta$ 2 при двусторонней расщелине губы и неба, оценили так же содержание данных параметров для других типов рассматриваемой патологии.

У 34 пациентов с односторонней расщелиной губы и неба медиана количества ММПЗ в зоне патологии составляла 3 нг/мл. Когда для 7 пациентов с частичной расщелиной губы и неба данный параметр был равен 1,49 нг/мл. Для 8 детей с расщелиной губы 2 нг/мл. Медиана значения ММПЗ при односторонней расщелине губы и неба вне очага патологии составляла 2,6 нг/мл. Для частичной расщелины неба же составляла 0,87 нг/мл. При расщелине губы данный параметр составлял 1,88 нг/мл. Минимальные же значения, ММПЗ, наблюдались у 7 детей с частичной расщелиной губы без вовлечения в патологический процесс неба, тем не менее полученные результаты также были выше чем в зоне без патологии.

ММПЗ равнялось 2,002 нг/мл, а у 34 детей с односторонней расщелиной равнялось 2,995 нг/мл, когда в области вне патологического процесса показатель равнялся при расщелине губы 1,879 нг/мл, а при односторонней расщелине губы и неба 1,538 нг/мл.

Таким образом по результатам проведенного иммуноферментного анализа ММЗ в мягких тканях при различных типах РГН мы сделали следующие выводы:

- Экспрессия ММПЗ достоверно повышалась при всех типах РГН в мягких тканях, взятых из зоны патологии по сравнению с мягкими тканями, взятыми из зоны вне очага патологии.

- Наибольшей экспрессия ММП3 была при двусторонней расщелине губы и неба, наименьшей при частичной расщелине губы, при которой показатели ММП2 в мягких тканях в зоне патологии лишь незначительно увеличивались.

### **3.4. Имуноферментный анализ тканевого ингибитора матричных металлопротеиназ 2 типа в мягких тканях при различных типах расщелины губы и неба.**

Тканевые ингибиторы матричных металлопротеиназ играют важную роль во многих нормальных физиологических процессах, таких как эмбриональное развитие, морфогенез, репродукция и ремоделирование тканей. Они также участвуют во многих патологических процессах, таких как артрит, злокачественный рост, заживление ран, сердечно-сосудистые заболевания. Тогда как количество вновь синтезируемых ММП регулируется в основном на уровне транскрипции, протеолитическая активность существующих ММП контролируется путем активации проферментов или зимогенов и ингибированием активных ферментов эндогенными ингибиторами, такими как  $\alpha$ 2-макроглобулин и тканевые ингибиторы металлопротеиназ (ТИМП). Среди четырех известных членов семейства ТИМП, ТИМП-2 обладает свойствами, присущими всем ТИМП

Для выявления уровня ТИМП2, нами была проведена биопсия мягких тканей из зоны расщелины губы или неба, а также из зоны, прилегающей непосредственно к расщелине губы или расщелине неба, для сравнительного анализа содержания биохимических показателей.

В биопсии всех прооперированных детей наблюдалось разное по степени выраженности содержание ТИМП2. А так же в супернатанте содержалось разное количество белка. Расчеты содержания ТИМП2 велись с учетом отношения количества биохимических показателей к количеству белка. Соответствующие расчеты были проведены и для материала полученного в ходе биопсии из зоны с патологией для сравнения с зоной без патологии.

Содержание ТИМП2, в биопсии мягких тканях оценено у 84 пациентов с расщелиной губы и неба или расщелиной губы (Таблица 14).

Таблица 14 – Статистические параметры ТИМП2 в мягких тканях из зоны расщелины и в мягких тканях вне зоны расщелины (НП – нет патологии).

Параметр (N=84)	Белок (мг/мл)	ТИМП2 нг/мл	Белок (мг/мл)НП	ТИМП2 нг/млНП
М	0,14	6,6	0,15	3,6
m	0,06	0,92	0,06	0,52
σ	0,56	8,42	0,53	4,74
Асимм.	8,82	1,76	8,71	1,98
Экцесс	79,45	2,58	78,1	4,8
Мин	0,03	0,04	0,03	0,02
Макс	5,16	34,25	4,82	23,75
Процентиль 25%	0,05	0,45	0,04	0,36
Ме	0,06	3,29	0,07	1,38
Процентиль 75%	0,08	8,75	0,1	5,91

ТИМП2 из зоны расщелины имеет значения от 0,04 до 34,25 нг/мл, где среднее значение равно 3,29 нг/мл, 75% значений меньше или равно 8,75 нг/мл, 25% равно или ниже 0,45 нг/мл.

ТИМП2 из зоны без патологии имеет значения от 0,02 до 23,75 нг/мл, где среднее значение равно 1,38 нг/мл, 75% значений меньше или равно 5,91 нг/мл, 25% равно или ниже 0,36 нг/мл.

Установлено, что при РГН количество ТИМП2 отличаются в зоне патологии от количества в зоне без патологии. Наблюдается достоверное увеличение. Корреляции между содержанием в мягких тканях ТИМ в очаге патологии выявлено не было, так же не было выявлено корреляции и в мягких тканях вне очага патологии.

Пациенты, принимающие участие в исследовании различались по полу, возрасту, весу, весу при рождении, типу родов, росту, типу проведенной

операции, росту при рождении, по всем перечисленным показателям с помощью критериев Манн-Уитни и Колмогорова-Смирнова достоверной связи с ТИМП2 в мягких тканях нет.

Таблица 15 – Таблица ранговых коэффициента корреляции ТИМП2 между показателем в очаге и вне очага патологии.

Показатель	Коэффициент корреляции	p	N
ТИМП2	0,898	<0,001	84

Из таблицы 15, следует, что для ТИМП2 в образцах биопсии мягких тканей (n=84) установленная сильная, достоверная связь между биохимическими показателями ( $p < 0,001$ ), для ТИМП2 коэффициент корреляции равен 0,898 ( $p < 0,001$ ). Таким образом установлено достоверное различие показателей ТИМП2 в мягких тканях из зоны расщелины с очагом вне патологии (Рисунок 25).

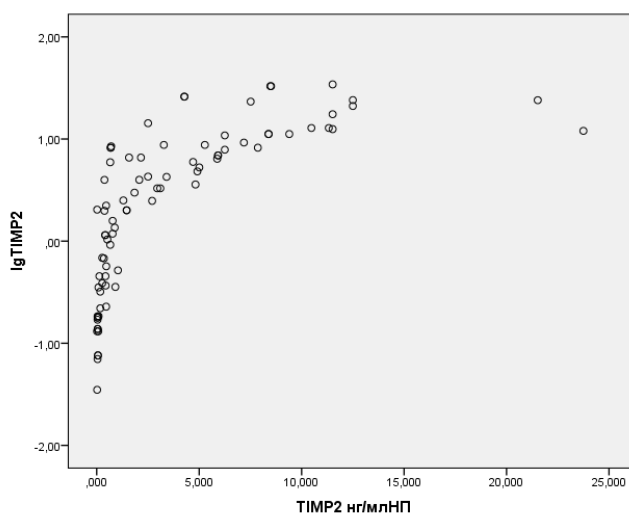


Рисунок 25 – Совместное распределение концентрации ТИМП2 вне зоны патологии и десятичного логарифма ТИМП2 в зоне патологии

Таблица 16 – Медианы содержания ТИМП2 при различных типах патологии.

	ТИМП2 нг/мл	ТИМП2 нг/млНП
Двусторонняя расщелина (n35)	8,098	3,94
Односторонняя (n=34)	5,475	3,02
Расщелина губы (n=8)	7,021	5,61
Частичная расщелина неба (n=7)	4,041	2,38

При сравнительном анализе значений медиан биохимических показателей в зоне патологии и вне зоны патологии все значения были выше в зоне патологии.

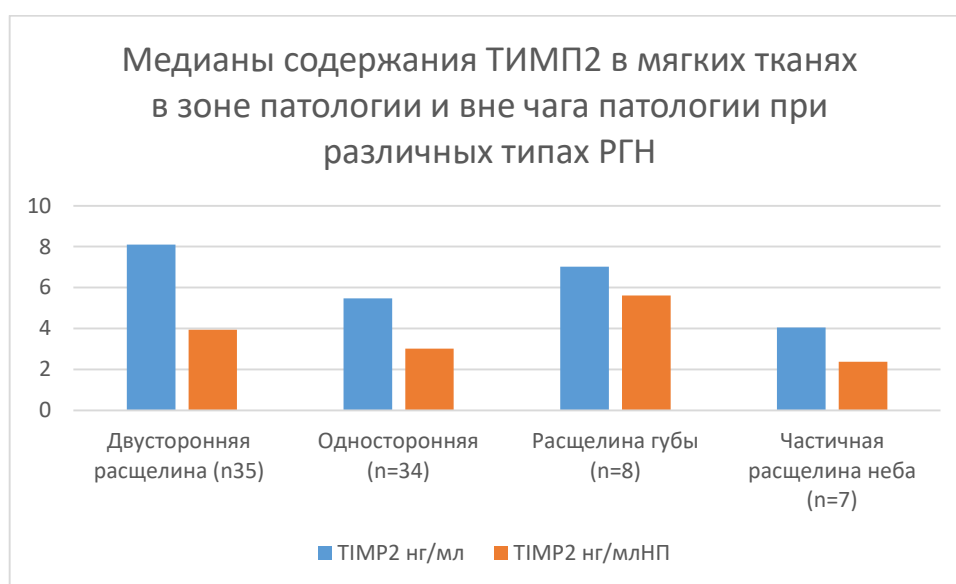


Рисунок 26 – Медианы содержания ТИМП2 при различных типах РГН (НП – нет патологии).

Из таблицы 16, следует достоверное увеличение концентрации ТИМП2 по медианам в мягких тканях при двухсторонней расщелине губы и неба, что является наивысшим показателем среди других видов патологии.

Показатель медианы содержания ТИМП2 составлял 4,041 нг/мл, что было меньше чем при расщелине губы, расщелине губы и неба односторонней и двусторонней. Максимальное содержание ТИМП2 в мягких тканях из зоны расщелины составляло 2,48 нг/мл, которому соответствовало содержание 2,703 нг/мл в мягких тканях из зоны без патологии (рисунок 26).

Максимальное значение для ТИМП2 было в зоне патологии при двусторонней расщелине губы и неба у 35 пациентов 8,098 нг/мл. Однако отношение ТИМП2 в мягких тканях из зоны патологии к ТИМП2 из мягких тканей вне зоны патологии не было достоверным. Абсолютное значение ТИМП2 при двусторонней расщелине губы и неба составляло 32,912 у двоих пациентов, которым соответствовали значения 8,474 нг/мл и 8,508 нг/мл соответственно. Увеличение при патологии было в 1,5-2,0 раза чем в образцах без патологии. При этом следует отметить, что показатели вне зоны патологии при всех рассматриваемых видах расщелины примерно равны. Кроме максимальных значениях ТИМП2 при двусторонней расщелине губы и неба, оценили так же содержание данных параметров для других типов рассматриваемой патологии. У 34 пациентов с односторонней расщелиной губы и неба медиана количества ТИМП2 в зоне патологии составляла 5,475 нг/мл. Когда для 7 пациентов с частичной расщелиной неба данный параметр был равен 4,041 нг/мл. Для 8 детей с расщелиной губы 7,021 нг/мл. Медиана значения ТИМП2, при односторонней расщелине губы и неба вне очага патологии, составляла 3,02 нг/мл. При частичной расщелиной неба же составляла 2,38 нг/мл. А при расщелине губы данный параметр составлял 5,61 нг/мл. Так у 8 детей с расщелиной губы значение медианы ТИМП2 равнялось 7,021 нг/мл, а у 34 детей с односторонней расщелиной равнялось 5,475 нг/мл, когда в области вне патологического процесса показатель равнялся при расщелине губы 5,609 нг/мл, а при односторонней расщелине губы и неба 3,018 нг/мл.

Из выше сказанного следует, что наибольший показатель ТИМП2 наблюдается в мягких тканях у пациентов с двусторонней расщелиной губы и неба, а минимальный при частичной расщелине неба.

Таким образом, по результатам проведенного иммуноферментного анализа ТИМП2 в мягких тканях при различных типах РГН, мы сделали следующие выводы:

- Экспрессия ТИМП2, достоверно повышалась при всех типах РГН в мягких тканях, взятых из зоны патологии по сравнению с мягкими тканями, взятыми из зоны вне очага патологии ( $p < 0,001$ ).
- Наибольшей экспрессия ТИМП2 была при двусторонней расщелине губы и неба, наименьшей при частичной расщелине губы.

### **3.4. Иммуноферментный анализ тканевого фактора роста бета 2 в мягких тканях при различных типах расщелины губы и неба.**

TGF- $\beta$ 2 - мощнейший цитокин, который модулирует эмбриональное развитие, формирование кости, развитие молочных желез, заживление ран, гемопоэз, последовательность клеточного цикла и синтез экстрацеллюлярного матрикса.

Для выявления уровня TGF $\beta$ 2, нами была проведена биопсия мягких тканей из зоны расщелины губы или неба, а также из зоны, прилегающей непосредственно к расщелине губы или расщелине неба, для сравнительного анализа содержания биохимических показателей.

В биопсии всех прооперированных детей наблюдалось разное по степени выраженности содержания TGF $\beta$ 2. А так же в супернатанте содержалось разное количество белка. Расчеты содержания TGF $\beta$ 2 велись с учетом отношения количества TGF $\beta$ 2 к количеству белка. Соответствующие расчеты были проведены и для материала полученного в ходе биопсии из зоны с патологией для сравнения с зоной без патологии.

Содержание TGF $\beta$ 2 в биопсии мягких тканях оценено у 84 пациентов с расщелиной губы и неба или расщелиной губы.

Таблица 17 – Статистические параметры биохимических показателей (НП – нет патологии).

Параметр (N=84)	Белок (мг/мл)	TGF-β2 пг/мл	Белок (мг/мл)НП	TGF-β2 пг/млНП
М	0,14	15,22	0,15	8,55
m	0,06	2,06	0,06	0,89
σ	0,56	18,89	0,53	8,17
Асимм.	8,82	3,86	8,71	2,71
Экцесс	79,45	19,97	78,1	11,67
Мин	0,03	0,1	0,03	0,06
Макс	5,16	133,97	4,82	54,78
Процентиль 25%	0,05	5,58	0,04	4,24
Ме	0,06	9,54	0,07	6,25
Процентиль 75%	0,08	20,57	0,1	11,11

В таблице 17, отображены статистические параметры TGFβ2 в мягких тканях, у пациентов с РГН. Количество наблюдений 84 (n=84). Из таблицы следует, что полученные данные имеют широкий диапазон величин. Следует отметить, что в образцах с патологией по сравнению с контролем, мы видим увеличение всех биохимических показателей по медиане. Также 1,5-2 раза мы видим увеличение по процентилю равному или выше 75% всего исследованного материала.

TGFβ2 из зоны расщелины имеет значения от 0,10 до 133,97 пг/мл, где среднее значение равно 9,54 пг/мл, 75% значений меньше или равно 20,57 пг/мл, 25% равно или ниже 5,58 пг/мл. TGFβ2 из зоны без патологии имеет значения от 0,06 до 54,78 пг/мл, где среднее значение равно 6,25 пг/мл, 75% значений меньше или равно 11,11 пг/мл, 25% равно или ниже 4,24 пг/мл. Установлено, что при РГН количество TGFβ2 отличаются в зоне патологии от количества в зоне без патологии. Наблюдается достоверный рост по всем рассматриваемым ферментам,



от небольшого увеличения до увеличения в несколько раз. Широкий разброс объясняется различным состоянием соединительной ткани при разных видах патологии, тяжестью общего состояния при различных типах РГН, травматичностью и количеством белка в образце.

Пациенты, принимающие участие в исследовании различались по полу, возрасту, весу, весу при рождении, типу родов, росту, типу проведенной операции, росту при рождении по всем перечисленным показателям, с помощью критериев Манн-Уитни и Колмогорова-Смирнова, достоверной связи с TGF $\beta$ 2 в мягких тканях нет. Установлена слабая корреляция уровня TGF $\beta$ 2 в очаге патологии с MMP2, TIMP2 и белком в очаге патологии. TGF $\beta$ 2 коррелирует с MMP2 с коэффициентом 0,309 (Рисунок 26). Содержание в мягких тканях в очаге патологии TGF $\beta$ 2 с TIMP2 с коэффициентом 0,219. (Рисунок 28). Корреляции TGF $\beta$ 2 с другими биохимическими показателями вне зоны патологии выявлено не было.

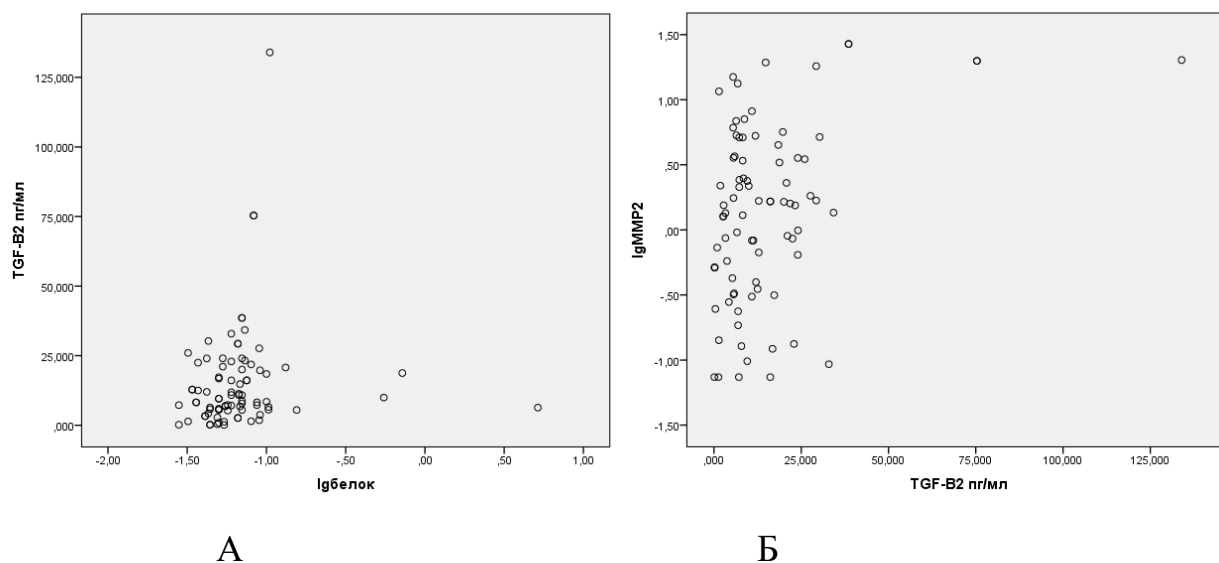


Рисунок 27 – (А) Совместное распределение десятичного логарифма концентрации белка и концентрация TGF $\beta$ 2 в зоне патологии. (Б) Совместное распределение десятичного логарифма концентрации TGF- $\beta$ 2 и концентрация логарифма MMP2 в зоне патологии.

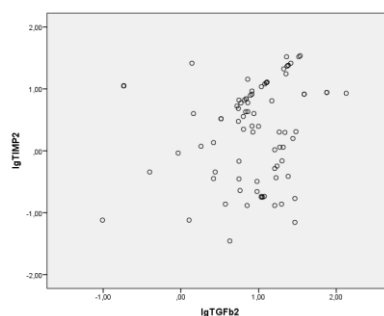


Рисунок 28 – Совместное распределения десятичного логарифма концентрации TGFβ2 и концентрация логарифма ТИМП2 в зоне патологии

Таблица 18 – Ранговые коэффициенты корреляции между показателем в очаге и вне очага патологии

Показатель	Коэффициент корреляции	p	N
TGFβ2	0,813	<0,001	84

Из таблицы 18 следует, что для всех исследуемых образцов биопсии (n=84) установлена сильная, достоверная связь между содержанием TGFβ2 в мягких тканях области патологии и содержанием вне зоны патологии ( $p < 0,001$ ), для TGFβ2 коэффициент корреляции равен 0,813 ( $p < 0,001$ ). Таким образом, установлена достоверная связь между количеством секретируемого TGFβ2 в зоне патологии с количеством из зоны без патологии (рисунок 29).

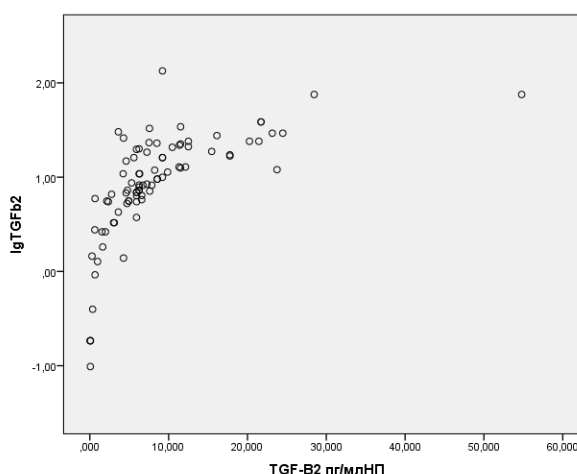


Рисунок 29 – Совместное распределение концентрации TGFβ2 вне зоны патологии и десятичного логарифма TGFβ2 в зоне патологии.

При сравнительном анализе значений медиан биохимических показателей в зоне патологии и вне зоны патологии все значения были выше в зоне патологии.

Таблица 19 – Медианы содержания TGFβ2 в мягких тканях в зоне патологии при различных типах патологии (НП – нет патологии).

	TGF-β2 пг/мл	TGF-β2 пг/млНП
Двусторонняя расщелина (n=35)	20,12	9,42
Односторонняя (n=34)	13,69	8,13
Расщелина губы (n=8)	4,625	6,53
Частичная расщелина неба (n=7)	8,084	6,16

Из таблицы 19, следует достоверное увеличение концентрации TGFβ2 по медианам в мягких тканях при двухсторонней расщелине губы и неба, что является наивысшим показателем среди других видах патологии.

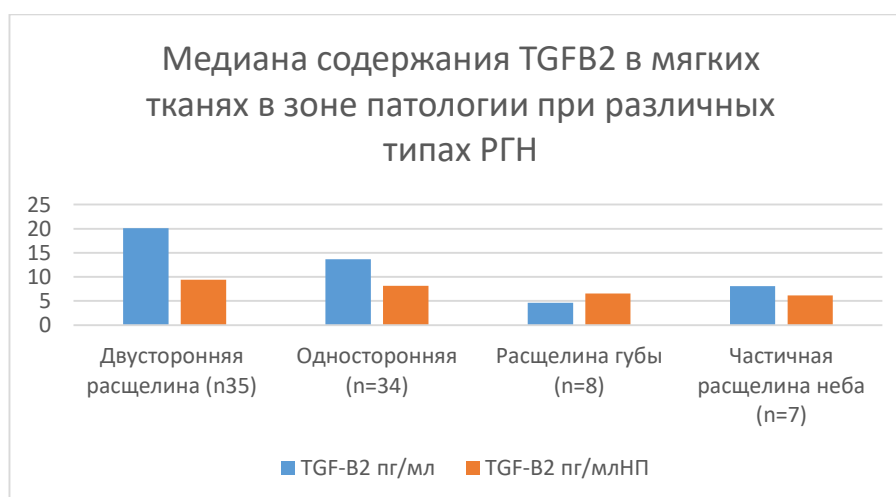


Рисунок 30 – Медианы содержания TGFβ2 в зоне патологии при различных типах расщелины губы и неба (НП – нет патологии).

При частичной же расщелине, медиана содержания в мягких тканях TGFβ2 в зоне патологии составляла 8,084 пг/мл, что было больше чем при расщелине

губы, но меньше чем при расщелине односторонней и двусторонней. Следует отметить, что содержание TGFβ2 в мягких тканях без патологии при расщелине губы, было выше, чем содержание TGFβ2 в зоне патологии (рисунок 29).

Максимальными значениями TGFβ2 для частичной расщелины неба были 24,053 пг/мл в мягких тканях из зоны патологии, против 12,5 пг/мл в мягких тканях, из зоны без патологии. У 34 пациентов с односторонней расщелиной губы и неба медиана количества TGFβ2 в зоне патологии составляла 13,69 пг/мл.

Максимальное значение TGFβ2 получено в зоне патологии при двусторонней расщелине губы и неба у 35 пациентов 20,118 пг/мл. Отношение TGFβ2 из зоны патологии к TGFβ2 из зоны без патологии различие достоверное по критерию Манн-Уитни,  $p=0,027$ . Абсолютное значение TGFβ2 при двусторонней расщелине губы и неба составляло 133,967 пг/мл, которому соответствовало значение 9,211 пг/мл из зоны без патологии (Рисунок 31).

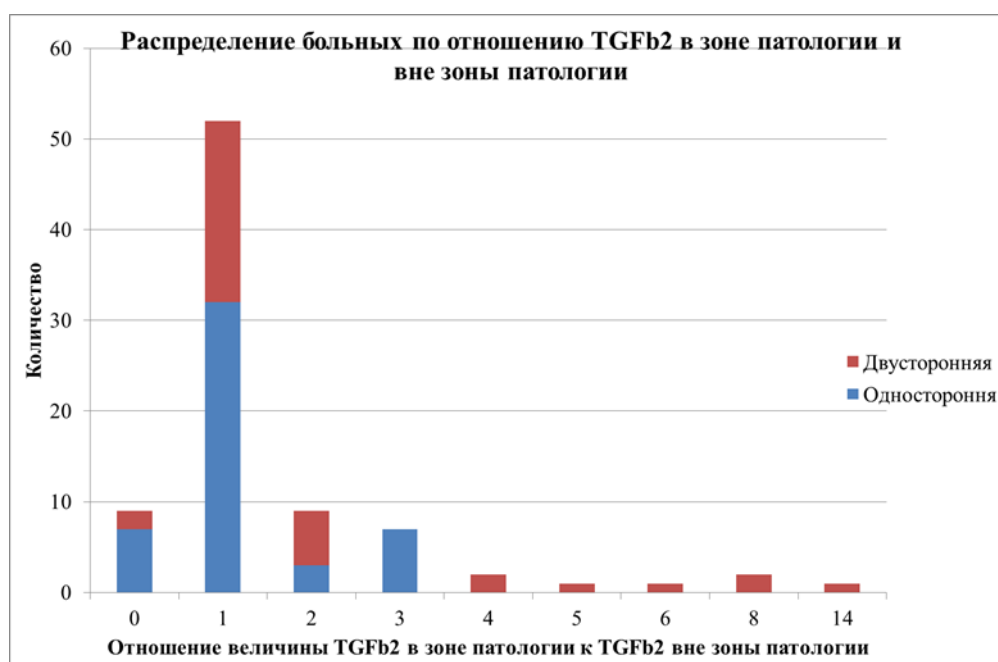


Рисунок 31 – Распределение пациентов по отношению TGFβ2 в зоне патологии и вне зоны патологии.

Увеличение при патологии составляет более чем в 2 раза. При этом следует отметить, что показатели вне зоны патологии при всех рассматриваемых видах расщелины примерно равны.

Кроме максимальных значений TGF $\beta$ 2 при двусторонней расщелине губы и неба, оценили так же содержание данных параметров для других типов рассматриваемой патологии.

У 34 пациентов с односторонней расщелиной губы и неба медиана количества TGF $\beta$ 2 в зоне патологии составляла - 13,69 пг/мл. Для 7 пациентов с частичной расщелиной неба, данный параметр был равен - 8,084 пг/мл. У 8 детей с расщелиной губы значение медианы TGF $\beta$ 2 составляло 4,625 пг/мл. Медиана значения TGF $\beta$ 2 при односторонней расщелине губы и неба вне очага патологии составляла 9,42 пг/мл. При частичной расщелине неба составляло 6,616 пг/мл. При расщелине губы данный параметр составлял 6,53 пг/мл. Таким образом по результатам иммуноферментного анализа TGF $\beta$ 2 в мягких тканях, при различных типах РГН, мы сделали следующие выводы:

- Экспрессия TGF $\beta$ 2, достоверно, повышалась при всех типах РГН, кроме частичной расщелины неба, в мягких тканях, взятых из зоны патологии по сравнению с мягкими тканями, взятыми из зоны вне очага патологии ( $p = 0,027$ ).
- Наибольшей экспрессия TGF $\beta$ 2 была при двусторонней расщелине губы и неба, наименьшей при частичной расщелине неба. Напротив, уменьшение экспрессии TGF $\beta$ 2 наблюдалось при частичной расщелине губы.

## **ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.**

Среди пороков развития челюстно-лицевой области расщелина губы и неба РГН является одной из самых распространенных. Среди врожденных аномалий РГН составляет порядка 65% [29,31].

В Российской Федерации среди врожденных патологий ЧЛЮ, РГН занимает 3-5 место. В среднем в России рождается 1 ребенок с РГН на 600-1000 новорожденных. По результатам исследований в настоящее время наблюдается рост распространенности РГН [123, 70, 29].

Сведения научной литературы о частоте и распространенности РГН переменны. Результаты зачастую зависят от методов регистрации расщелины, географического положения, детской смертности, уровня медицинской помощи в отдельно взятом регионе. Сведения о распространенности необходимы для оценки качества профилактики, анализа факторов, приводящих к увеличению распространенности и планирования оказания помощи [105].

Несмотря на то, что к настоящему методу накоплен большой научный и клинический опыт по лечению детей с расщелиной губы и неба, послеоперационная реабилитация не всегда соответствует ожиданиям. Современные хирургические методики не всегда позволяют добиться наилучшего восстановления, это могут быть шрамы или дефекта речи. Одной из актуальных проблем лечения пациентов с расщелиной губы и неба является различный подход к хирургическому вмешательству, которое не позволяет полноценно восстановить структуру мягких тканей лица и неба. Тем самым модернизация подхода к хирургическому лечению остается актуальной.

Расщелина верхней губы и неба, как правило, является полигенным мультифакторным заболеванием, которое может встречаться как изолированный порок развития, так и быть одним из симптомов врожденных синдромов, что требует анализа предрасполагающих факторов. Врожденные пороки у детей во

многим связаны с мутациями, которые, по мнению специалистов, не имеют четкой социальной детерминации [12,114]

Наша работа направлена на изучение состояния соединительной ткани в области расщелины губы и неба. ММП2, ММП3, ТИМП2, TGF $\beta$ 2 оказывают непосредственное влияние на многочисленные процессы, протекающие в соединительной ткани мягких тканей, такие как: ремоделирование, апоптоз, ангиогенез, заживление и рубцевание. Так же ММП2, ММП3, ТИМП2, TGF $\beta$ 2 - являются маркерами воспаления, активируясь во время воспалительной реакции, которая имеет место быть в зоне патологии при РГН, оказывают пагубное действие на состояние мягких тканей и на качество заживления.

Следует отметить, что диагностическая ценность определения только одного из вышеперечисленных параметров в биопсии мягких тканей при расщелине губы и неба недостаточна ввиду того, что ММП2, ММП3, ТИМП2, TGF $\beta$ 2 находятся в тесном взаимодействии.

Таким образом, наше исследование подтвердило связь между ММП2, ММП3, ТИМП2, TGF $\beta$ 2 в мягких тканях при расщелине губы и неба.

Следует отметить, что роль ММП в процессе воспаления, также, как и их диагностическое значение при различных патогенетических вариантах воспаления до конца не изучены, данные литературы носят противоречивый характер и в основном представлены экспериментальным материалом. Исследования последних десятилетий указывают, что увеличение активности ММП, с учетом их функциональных особенностей, связано с процессами деструкции и реорганизации соединительной ткани, происходящими при воспалительных процессах различного генеза.

Пороки развития средней анатомических образований средней зоны лиц сопровождают детей с РГН [57,115]. Дети с расщелиной верхней губы и неба достоверно чаще болеют катаром дыхательных путей, бронхитом, пневмонией [77,83].

Негативное воздействие на психическое состояние ребенка с РГН оказывают психологические расстройства, которые формируются у ребёнка из-за наличия чувства собственной неполноценности [22].

Клиническую симптоматику при подобном дефекте отягощают функциональные расстройства, вызванные сопутствующими врожденными пороками развития. Обусловлено это тем, что влияние причинных факторов, вызывающих формирование расщелины верхней губы и неба, не ограничивается, воздействием только на ткани челюстно-лицевой области и в ряде случаев распространяется на другие развивающиеся структуры плода. Результатом такого воздействия является развитие у него не только расщелины губы и неба, но и нарушение формирования других высокодифференцированных тканевых образований [22].

Расщелина губы и неба сопровождается другими пороками развития у 13,1-15,5% пациентов. При этом чаще всего определяется аплазия ушных раковин и атрезия наружных слуховых проходов, глухонмота. Множественные врожденные пороки развития составляют характерную особенность пациентов с расщелиной верхней губы и неба. По этой причине расщелина верхней губы и неба представляет один из основных симптомов большинства симптомокомплексов [24,54,118].

Изменение активности ММП (как увеличение, так и снижение) сопутствуют многим заболеваниям человека (опухоли, фиброзирующие заболевания сердца, легких печени, почек, артрит, язвенная болезнь желудка и т.д.) [199].

В развитии неба ММ2, ММП3 играют важную роль. Возрастание ММП-2 обнаружил Brown et al. (2002) с помощью иммуноферментного анализа на протяжении формирования неба у мышей [139].

Во время эмбрионального развития ММП и их ингибиторы широко экспрессируются. Эти протеиназы ответственные за обновление внеклеточной матрицы и могут быть вовлечены в процесс образования расщелины неба. Фермент ММП2, так же известный как желатиназа А, достоверно известно, что



способствует развитию неба у мышей, аномальное функционирование которого может привести к пороку развития, такому как расщелина верхней губы и неба [195].

Были проведены ряд исследований о нарушениях в структуре генетического кода матриксных металлопротеиназ. Полиморфизм в ММП3 (rs522616) и ТИМП2 (rs8179096) показал значительную ассоциацию с различными видами расщелины (все расщелины, расщелина губы/неба, и расщелина неба). ( $P \leq 0.002$ ). Анализ взаимодействия ген-ген предполагает, что ММП3 и ТИМП2 может интерактивно способствовать развитию фенотипа с расщелиной неба [186].

Далее изучили функциональное значение этих полиморфизмов. Был обнаружен специфический ДНК-белковый комплекс для ММП3 rs522616 А, данная аллель сама по себе показала большую активность промотора, чем G аллели. Тем не менее, влияние rs522616 в конечном счете регулируется на фоне rs3025058 аллелью. Для ТИМП2 rs8179096, аллель Т показала 2,5-кратное увеличение активности промотора по сравнению с аллелью С, в то время как обе С и Т аллели были найдены связывающие ядерный фактор каппа В. Результаты обеспечивают новые доказательства, что полиморфизм промотора в ММП3 и ТИМП2 функциональны и могут повлиять на транскрипцию гена с возможным воздействием на черепно-лицевое развитие, ведущей к развитию расщелины верхней губы и неба [205].

Нами была определена взаимосвязь между ММП3 в мягких тканях в зоне патологии с мягкими тканями из очага без патологии. Мы установили достоверное увеличение экспрессии ММП3, в зоне патологии по сравнению с зоной без патологии. Следует добавить, что уровень ММП3 был наивысшим при двусторонней расщелине губы и неба.

В наше исследование включены 84 пациента с разными типами расщелины губы и неба такими как, расщелина губы, расщелина губы и неба односторонняя, расщелина неба частичная, расщелина губы и неба двусторонняя. Для иммуноферментного анализа пациенты были разделены на 4 группы в зависимости от нозологии.

С двусторонней расщелиной губы и неба нами обследовано 35 пациентов, с односторонней расщелиной губы и неба обследовано 34 пациента, с частичной расщелиной неба 7 пациентов и с частичной расщелиной губы обследовано 8 пациентов.

По возрасту и полу пациенты различались – мальчиков было 49 (58,3%), девочек 35(42,7%), а возраст составлял от 3 дней до 9 лет. Уранопластика была проведена у 47 пациентов 56%, а хейлопластика была проведена у 37 пациентов 44%.

Всем пациентам во время хирургического вмешательства была проведена биопсия мягких тканей, окружающих зону патологии и мягких тканей максимально отдаленных от зоны патологии в пределах операционного поля. Контролем послужила биопсия мягких тканей, взятая из зоны максимально удаленной от зоны патологии. Повышение или снижение оценивалось при сравнительном анализе данных полученных в результате иммуноферментного анализа в обоих случаях при всех рассматриваемых видах патологии.

Все пациенты были обследованы и прооперированы нами в «Научном Центре Здоровья Детей» РАМН.

Содержание ММП2, ММП3, ТИМП2, TGFβ2 определяли современными высокочувствительными иммуноферментными методами с помощью реактивов ведущих зарубежных и отечественных фирм (см. главу 2 «Материалы и методы»).

Полученные результаты анализировали с помощью однофакторного и многофакторного метода. Согласно нашим данным повышение уровня ММП2, ММП3, ТИМП2, TGFβ2 с одинаковой частотой встречалось при всех типах рассматриваемой нозологии, причем среднее значение были достоверно выше в группе с двусторонней расщелиной губы и неба и составили ММ2 5,09 нг/мл, ММП3 3,37 нг/мл, ТИМП2 8,098 нг/мл, TGFβ2 20,12 пг/мл. Высокий уровень ММП2, ММП3, ТИМП2, TGFβ2 встречался так же при расщелине губы частичной, расщелине неба частичной и расщелине неба односторонней. Для односторонней ММП3 3 нг/мл, ТИМП2 5,475 нг/мл, ММП2 3,95 нг/мл, TGF-β2 13,69 пг/мл. Для частичной расщелины неба ММП3 1,49 нг/мл, ТИМП2 4,041

нг/мл, ММП2 1,4 нг/мл TGF-B2 8,084 пг/мл. Для частичной расщелины губы ММП3 2 нг/мл, ТИМП2 7,021 нг/мл, ММП2 1,01 нг/мл, TGF-B2 4,625 пг/мл.

Установлено, что показатели содержания ММП2, ММП3, ТИМП2, TGFβ2 в образце патологии не связаны друг с другом, соответственно данные показатели не связаны и в мягких тканях получены из зоны вне очага патологии.

Установлена достоверная корреляция между отношением ММП2, ММП3, ТИМП2, TGFβ2 в мягких тканях из очага патологии к отношению в мягких тканях вне очага патологии.

Нами было установлено, что нет достоверной связи между полом, возрастом, весом при рождении, весом на момент операции, родами, характером оперативного вмешательства.

Клетки соединительной ткани, содержащие ТИМП-2 были обнаружены в большем количестве в собственной пластинке слизистой оболочке полости рта - это доказывает снижение уровня местного апоптоза у пациентов с ВРН. Заметная экспрессия ММП-2 в пораженной расщелиной мягкой ткани показывает на возможное увеличение ремоделирования ткани [245].

В исследовании мы также подтвердили повышенную экспрессию ТИМП 2 в мягких тканях из зоны расщелины по сравнению с мягкими тканями вне зоны патологии, при том мы определили, что максимальный выброс ТИМП 2 отмечается у пациентов с двусторонней расщелиной губы неба. Кроме того, мы определили кратное увеличение выброса ММП2.

В своем исследовании Vlaha K1, Borsky J и соавт. (2013) изучили изменение уровня ММП9 и ТИМП1 в тканях, взятых во время операции, проведенной в возрасте 1 недели и 2-4 месяцев. Значительного изменения уровня ММП9 не было обнаружено, напротив уровень ТИМП1 был значительно выше в тканях, взятых во время операции, проведенной в возрасте 1 недели чем в возрасте 2-4 месяцев.

В исследовании Nikopencius T, Kempa I. (2011) получены результаты, доказывающие причастность TGF1 в возникновении расщелине верхней губы и/или неба поддерживаемые ТИМП2 и WNT9B, как принципиально новый провоцирующий расщелине верхней губы и/или неба. Так же была

воспроизведена в клинических исследованиях значительная связь между вариантами в или близко к FOXE1 и расщелине верхней губы и/или неба.

Результаты исследования Gagliano N1, Carinci F. et al. (2010) показали, что при расщелине губы/ неба фенотип фибробластов характеризуется тенденцией к интерстициальному отложению коллагена из-за посттрансляционных модификаций, таких как снижение деградации коллагена матриксными металлопротеиназами и увеличение поперечно-связанного коллагена [161].

В физиологических условиях семейство металлопротеиназ синтезируется как пре-белки, и секретируются как проферменты в очень незначительных количествах [149].

Синтез и секреция ММП находится под контролем таких факторов, как интегрины действующие на поверхности клетки, цитокины TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 и ряда химических соединений, таких как форболовы эфиры, липополисахариды (LPS), колхицин, простогладин E. Однако в основном они секретируются под действием провоспалительных цитокинов, а главными источниками их продукции считаются активированные макрофаги, нейтрофилы, фибробласты [188].

TGF $\beta$ 2 – это мультифункциональный цитокин, впервые идентифицированный при выделении из тромбоцитов. Свое название TGF- $\beta$  получил благодаря способности стимулировать рост клеток и вызывать их трансформацию *in vitro*. TGF- $\beta$  является важным регулятором клеточной пролиферации, дифференцировки, апоптоза, иммунного ответа, ремоделирования ЭЦМ [138].

В исследовании мы определили достоверное повышение уровня TGF $\beta$ 2 наряду с повышением с ММП2, ММП3, ТИМП2. Уровень TGF $\beta$ 2 определялся наиболее высоким, у пациентов с двусторонней расщелиной губы и неба, так же уровень TGF $\beta$ 2 был повышен при расщелине губы, расщелине губы и неба односторонней и срединной.

Выделение данных ферментов позволило нам предположить, что экспрессия связана с патологическими процессами, протекающими в зоне расщелины такими как воспаление. Наше предположение подтверждается

данными Li J., Scwimmbeck P.L. et al. (2002) в которых указано, что секреция ММП находится под контролем цитокинов, активированные макрофаги нейтрофилы и фибробласты.

ММП9 Baliver et al. 2001 обнаружил выборочное выделение ММП-9 в зоны оксификации по срединной линии развивающейся верхней челюсти [133].

Тканевой ингибитор матриксных металлопротеиназ (ТИМП) – способен активировать матриксные металлопротеиназы, активность клеточного роста и ангиогенез. ТИМП может так же содействовать активности клеточного роста и регулировать клеточный апоптоз. ТИМП-2 принимает участие в активации про-ММП-2 и стимулирует пролиферацию пульпы зуба, фибробластов – таких как клетки, фибробласты десны, а также эпителиальных клеток. Кроме того, ТИМП-1 и ТИМП-2 так же обладают замедляющим апоптоз действием [60].

Letra и соавт. (2012) обнаружили связь между геном ТИМП-2 и расщелиной губы и неба [205].

ТИМП многофункциональные протеины, физиологические ингибиторы ММП, широко распространенные в тканях организма. Тканевое ремоделирование важный процесс, происходящий на протяжении эмбриогенеза. Баланс между активацией ММП и ТИМП контролирует степень ремоделирования экстрацеллюлярного матрикса [205].

В исследовании было доказано, что изменения в ММП3 может способствовать развитию несиндромальной расщелины губы и/или неба и далее поддерживает участие ТИМП2 как гена влияющего на развитие расщелины губы и /или неба. Полиморфизм в ММП3 (rs522616) и ТИМП2 (rs8179096) показал существенную связь со всеми типами расщелины (все расщелины, расщелина губы / неба, и нёба) ( $P \leq 0.002$ ). Дополнительный семейный набор данных из США был использован для подтверждения выводов ассоциации ( $P < 0,05$ ). Анализ взаимодействия ген-ген предполагает, что ММП3 и ТИМП2 может интерактивно способствовать фенотипу расщелины [186].

При исследовании групп больных определили максимальное увеличение экспрессии ММПЗ в зоне расщелины при двусторонней расщелине губы и неба. Минимальным же значение было для частичной расщелины неба.

Апоптоз широко наблюдается в материале из области расщелины. Возможно, данный задержанный апоптоз, который связан с сверх обильной секрецией ММП2 или TGF $\beta$ , потому что активированные рецепторы TGF $\beta$  вызвали изменения в ремоделировании внеклеточного матрикса через ММП2 [167].

Механизм формирования врожденных пороков развития получает объяснение с позиции мультифакторной теории дисплазии соединительной ткани. На возможность нарушения процесса формирования тканевых структур челюстно-лицевой области в результате дисплазии соединительной ткани указывают В.П. Козлова (1994), А.Ф. Сулимов с соавт (2004), А. В.Клеменов (2005), R. Grahame (1990), R. Pyeritz (1993)

У пациентов с расщелиной верхней губы и неба по сравнению с детьми, не имеющими щелинного дефекта на лице, отмечается достоверно более высокая частота внешних проявлений дисплазии соединительной ткани локализуются на голове (41%), туловище (32%), и конечностях (27%).

Внешними признаками дисплазии соединительной ткани у детей с расщелиной верхней губы и неба явились короткая уздечка губы и языка (92,4%), тонкие ломкие волосы (40,5%), гипертелоризм глаз (33,5%), миопия (36,7%), эпикант (21,5%), короткая уздечка губ и языка (92,2%), удлиненное узкое лицо (55,9%), низкий индекс массы тела (53%), деформации позвоночника (52,0%), девиация мизинца кисти (47,1%), гипермобильность суставов (45,1%), сандалевидная щель (43,1%), гипертелоризм глаз (42,2%). Данные по внешним признакам дисплазии соединительной ткани у детей с расщелиной губы и неба свидетельствуют о том, что с детей с данной патологией соединительная ткань всего макроорганизма подвержена патологическому влиянию (Баландина, 2011).

Нами установлено, что у детей с двусторонней расщелиной губы и неба наиболее неблагоприятных прогноз для состояния соединительной ткани чем при

частичной расщелине неба, расщелине губы или расщелине губы и неба односторонней, что может привести к различным заболеваниям в будущем.

Котова Е.Н. (2005) в морфологической структуре тканей верхней губы, сердца и мочеточников наблюдала признаки дезорганизации соединительной ткани с образованием очагов массивного фиброза и разрастанием коллагеновых волокон.

Разрастание очагов фиброза при РГН свидетельствует о том, что при данной патологии у детей нарушаются процессы ремоделирования соединительной ткани. В нашем исследовании мы определили, что факторы, влияющие на соединительную ткань достоверно повышены. При том что, максимальное увеличение наблюдалось при двусторонней расщелине губы и неба. Нарушение процесса ремоделирования соединительной ткани приводит к необратимым изменениям в структуре тканей, что приводит к нарушению послеоперационного заживления.

Нарушение экспрессии ММП в эмбриональном периоде приводит к развитию РГН, высокое содержание которых после рождения поддерживается неполноценным строением структур губы и неба, что приводит к неправильному функционированию и вызывает местные и общие патологические процессы. Результаты нашего исследования показали различия между содержанием матриксных металлопротеиназ их ингибиторов и активаторов в мягких тканях из зоны расщелины с содержанием в мягких тканях из области вне очага поражения. Соответственно оперативное вмешательство позволяет восстановить утраченное физиологическое состояние полости рта, носа, а также губы.

При постановке диагноза расщелина губы и неба в родильном доме и после консультации с челюстно-лицевым хирургом сроки оперативного вмешательства различаются в широком диапазоне, одни клиницисты рекомендуют проводить оперативное вмешательство в возрасте 3-6 месяцев другие в более поздние сроки. Вопрос о сроках операции на твердом и мягком небе различными авторами решается по-разному.

А.А. Лимберг (1975) полагает, что при расщелине мягкого неба и частичной расщелине твердого неба операция допустима в возрасте 5-7 лет, а при полных – в 10-12 лет, так как считает, что ранние операции на небе вызывают в дальнейшем недоразвитие и деформацию верхней челюсти [64,65].

Ю.И. Бернадский (1985) считает, что при частичной расщелине неба операция возможна в возрасте 2-3 лет. При наличии расщелины части твердого неба и всего мягкого неба операцию следует проводить в возрасте 3-4 лет, осуществляя после этого логопедическое обучение под наблюдением ортодонта. При полной РГН операцию следует проводить в возрасте 7-8 лет [8,9,10,11].

J. Bardach с соавт. (1984) оперировал детей сначала в возрасте 6 лет, а затем в возрасте от 1 года до 2 лет. Этому способствовали три обстоятельства. Совершенствование ортодонтической помощи в пред- и послеоперационные периоды. 2. Благоприятная оценка исходного состояния детей педиатрами и заинтересованность логопедов в ранних операциях. 3. Отсутствие послеоперационных зубочелюстных деформаций при ранних операциях у детей с частичной расщелиной неба [134].

До 40-50х гг. XX в. большинство специалистов соглашались с тем, что ураностафилопластика должна быть проведена в период становления речи. В последующие годы, в связи с наблюдавшимися после ураностафилопластики деформации верхней челюсти сроки лечения расщелин неба были перенесены.

Учитывая, что рост верхней челюсти, может влиять и отсутствие равновесия в тяге мышц и что речь лучше развивается у детей, оперированных в возрасте до 2х лет, авторы считают, что при всех формах несращения неба операцию целесообразно выполнять именно в этом возрасте.

Имеющиеся расхождения во взглядах на сроки выполнения операции, в последнее время определяется четкая тенденция – хирургическое лечение расщелины неба целесообразно проводить в более ранние сроки.

Возросшее качество хирургического лечения расщелины неба на фоне уменьшения травматичности вмешательства, а также совершенствование



анестезиологического пособия позволили рекомендовать выполненные ураностафилопластики в возрасте до 1 года, в зависимости от формы расщелины [72]. Однако при этом ставится задача дальнейшего снижения возрастного ценза с целью наиболее эффективного восстановления анатомии и утраченных функций, социальной реабилитации. (Рогинский В.В., 1999, Блохина С.И., Васильев А.Г. и др 1999, Мамедов Ад.А., 2016) [133]. Наше исследование ММП2, ММП3, ТИМП2, TGF $\beta$ 2 в мягких тканях в зоне расщелины, позволяют нам рекомендовать проведение оперативного вмешательства в периоде новорожденности.

Оперативное вмешательство при РГН состоит из нескольких этапов лечения. Каждый этап лечения является очень травматичным и сложным в техническом исполнении. Следовательно, мы рекомендуем проводить первое хирургическое вмешательство как можно раньше, в частности это наиболее актуально для двусторонней расщелины губы и неба при которой, мы наблюдаем максимальную активность матриксных металлопротеиназ 2 и 3, тканевого ингибитора матриксных металлопротеиназ 2 и трансформирующего фактора роста бета 2. При остальных типах рассматриваемой нами патологии также имеет место проведение раннего первичного оперативного вмешательства (до 1 года) на верхней губе.

## ВЫВОДЫ

1. На основании данных о экспрессии матриксной металлопротеиназы 2,3 (ММП2,3), тканевого ингибитора матриксной металлопротеиназы 2 (ТИМП2), тканевого фактора роста бета 2 (TGF $\beta$ 2), полученных из мягких тканей зоны патологии, для снижения вероятности дальнейших осложнений со стороны регенерации мягких тканей рекомендовано проведение первичной хейлопластики в периоде новорожденности.
2. Отмечалось повышенная экспрессия ММП2, 3, ТИМП2, TGF $\beta$ 2 ( $p < 0,001$ ) в мягких тканях из зоны патологии
3. Установлена взаимосвязь изучаемых биохимических показателей с разными типами РГН. Наибольшая экспрессия в мягких тканях в зоне патологии ММП2,3, ТИМП2, TGF $\beta$ 2 отмечалась при двусторонней расщелине губы и неба, наименьшая при частичной расщелине губы. Разница в экспрессии объясняется степенью нарушения соединительной ткани.
4. Уровень экспрессии ММП2, 3, ТИМП2, TGF $\beta$ 2 повышался в зоне патологии по сравнению с тканями вне очага патологии ( $p < 0,001$ ). Наибольшее увеличение по сравнению с зоной вне патологии наблюдалось при двусторонней расщелине губы и неба, наименьшее при частичной расщелине губы.
5. Повышение уровня экспрессии ММП2,3, ТИМП2, TGF $\beta$ 2 в зоне патологии по сравнению с зоной вне патологии свидетельствует о патологическом состоянии соединительной ткани, что доказывает необходимость раннего хирургического вмешательства. Раннее хирургическое вмешательство положительно повлияет на регенерацию послеоперационных тканей.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При двусторонней и односторонней полной расщелине губы и неба рекомендовано проводить первичную хейлопластику в периоде новорожденности это связано с максимальной активностью матриксных металлопротеиназ 2,3, ТИМП2, TGF $\beta$ 2.
2. При расщелине губы проводить хейлопластику в периоде новорожденности в сроки до 29 дней. В связи с изменением уровня ММП2, ММП3, ТИМП2, TGF $\beta$ 2 в мягких тканях при данном виде патологии. Оперативное вмешательство в возрасте до 29 дней позволит привести в норму концентрацию ММП2, ММП3, ТИМП2, TGF $\beta$ 2, а также предотвратить патологическое влияние на мягкие ткани повышенного уровня данных проферментов, что улучшит качество заживления и послеоперационную реабилитацию.
3. Необходимо проводить сравнительный иммуноферментный анализ при проведении операции направленной на коррекцию верхней губы и неба.
4. При расщелине губы и неба у детей первичную операцию на губе необходимо проводить в периоде новорожденности (до 29 дней), проведение уранопластики рекомендовано проводить в возрасте до одного года.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

ММП – матриксная металлопротеиназа

ТИМП – Тканевой ингибитор матриксных металлопротеиназ

РГН – расщелина губы и неба

ВРГН – врожденная расщелина губы и неба

TGF $\beta$  – трансформирующий фактор роста бета

ЭЦМ – экстрацеллюлярный матрикс

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

LPS – липополисахариды

СДСТ – Синдром дисплазии соединительной ткани

НП – нет патологии

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агеева Л.В. Программа реабилитации детей с врожденной расщелиной губы и неба в Московском центре детской челюстно-лицевой хирургии / Врожденная и наследственная патология головы, шеи и лица у детей: актуальные вопросы комплексного лечения. М.: МГМС, 2002. С.11-17.
2. Алферова Е.А., Гарькавец С.А., Лоухина О.В., Дермалова Б.М. Современный взгляд на лечение врождённых расщелин лица / Врожденная и наследственная патология головы и, лица и шеи у детей: Актуальные вопросы комплексного лечения. М.: МГМС, 2009. С. 20-21.
3. Амануллаев Р.А. Частота рождаемости детей с врожденной расщелиной верхней губы и неба крупных регионах Узбекистана/ Материалы 2 научно-практической конференции: Врождённая патология головы, шеи и лица у детей: Актуальные вопросы комплексного лечения. М.: МГМСУ, 2006. С.14-15.
4. Анурова А.Е., Елизарова В.М., Щеголева В.Д. Клинические параллели стоматологического здоровья ребенка с расщелиной губы и неба и его матери / Врожденная и наследственная патология головы, лица и шеи у детей: Актуальные вопросы наследственная патология головы, лица и шеи у детей: Актуальные вопросы комплексного лечения. М.: МГМСУ, 2009. С.84-85.
5. Баландина Е.А. Факторы риска возникновения врожденной расщелины губы и неба у детей, проживающих на территории города Перми и Пермской области: автореф. ...канд.мед.наук / Пермь, 2001. 24с.
6. Баландина А.В. Клиническая характеристика проявлений дисплазии соединительной ткани у пациентов с врожденной расщелиной верхней губы и неба: дисс. ...канд.мед.наук / Ставрополь., 2011. С.99-10.
7. Басаргина М.А. Значение матриксных металлопротеиназ в формировании и течении бронхолегочной дисплазии у недоношенных детей: дисс. ...канд.мед.наук / М., 2009. С. 90-105.

8. Бернадский Ю.И., Кисилев В.А. О возможности пересечения сосудисто-нервных пучков на твердом небе при уранопластике // Стоматология. 1958, № 4. С. 43-48.
9. Бернадский Ю.И., Полесья Г.В., Макареня Г.В. Медицинская реабилитация детей с несращением неба. Киев, 1978. 135 с.
10. Бернадский Ю.И., Харьков Л.В. Методы щадящей ураностафилопластики: Метод. Реком. Киев, 1985. С. 173 – 200.
11. Бернадский Ю.И. Травматология и восстановительная хирургия челюстно-лицевой области. Киев, 1985. С. 173-200..
12. Блохина С.И., Козлова В.П. Некоторые вопросы медико-социальной реабилитации ребенка с недостатками физического и психосоматического развития и его семья. Очерки медико-социальной реабилитации семей, имеющих детей с проблемами здоровья. Екатеринбург, 1995. С. 20-29.
13. Богданова Т.Г. Диагностика познавательной сферы ребенка /Т.Г. Богданова, Т.В. Корнилова. М., 1994. 200с.
14. Богомилский М.Р. Этиология, патогенез, клиника и диагностика фиброзной дисплазии ЛОР - органов у детей // Вестн. оториноларингологии. 2004. №4. С. 60-63.
15. Богомилский М.Р. Проблемы дифференциальной диагностики и лечения фиброзной дисплазии ЛОР – органов у детей / М.Р. Богомилский // Вестн. Оториноларингологии. – 2005. - № 1. – С. 57 – 61.
16. Булахова С. А. Регистр и факторы риска для диагностики и прогнозирования врожденных пороков развития у новорожденных: автореф. Дис. ... канд. Мед. Наук./ С.А. Булахова – Иваново, 1985. – 1985. – 22с.
17. Булычева И.В. Экспрессия матриксных металлопротеиназ 1, 2, 9 и их ингибиторов 1-го типа в хрящобразующих опухолях костей / И.В. Булычева [и др.] // Бюл. Экспериментальной биологии и медицины. 2010. Т.149, №3. –С. 317-321.

18. Вадачкория З.О. Характеристика сердечно-сосудистой системы детей с врожденными расщелинами верхней губы и неба / З.О. Вадачкория, Г.С. Чакхунашвили // Актуал. Вопр. Соц. Пед. И мед. реабилитации детей: материалы науч. – практ. Семинара – Екатеринбург, 1995. – С. 104-105.
19. Варфоломеева Л.Г. Региональные особенности реабилитации детей с врожденной расщелиной губы и неба / Л.Г. Варфоломеева, Ад.А.Мамедов, А.В.Алимский, А.А. Хадарцев // Врожденная и наследственная патология головы, шеи и лица у детей: актуальные вопросы комплексного лечения. – М: МГМСУ, 2002. – С. 36-38.
20. Варфоломеева Л.Г. Организация специализированной помощи детям с врожденной челюстно-лицевой патологией в Тульском регионе с учетом экологической обстановки/ Л.Г. Варфоломеева, О.И.Кудрявцева, Ю.И.Цкипури, Ад.А.Мамедов// Материалы 2 научно-практической конференции: Врожденная и наследственная патология головы, шеи и лица у детей: актуальные вопросы комплексного лечения. МГМСУ, 2006 С.28-35.
21. Вархушев Я.М., Ермаков Г.И., Шараев П.Н. Оценка метаболизма основного вещества соединительной ткани при хронической обструктивной болезни легких. Терапевтический архив. 2006; 78(3): 13-16.
22. Водолацкий М.П. Клинико - эмбриологические параллели врожденных пороков развития лица / М.П. Водолацкий, В.М. Водолацкий. - Ставрополь, 2004. -80с.
23. Водолацкий М.П. Этиология врожденной патологии челюстно-лицевой области в Ставропольском крае / М.П. Водолацкий, Б.Г. Бабанина // 3 общерос. научн.-практ. конф. детских стоматологов : тез.докл., - Волгоград, 2000. – С. 57.
24. Гайдамака Н.В. Значимость матриксных металлопротеиназ и их ингибиторы в норме, онкологии и онкогематологии / Н.В. Гайдамака [и др.]// Терапевтический архив. 2009. - №7. – С. 91-96.

25. Герштейн Е.С. Матриксные металлопротеиназы 2, 7, 9 и тканевой ингибитор металлопротеиназ 1-го типа в опухолях и сыворотке крови пациентов новообразованиями яичников / Е.С. Герштейн [и др.] // бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2010. – Т. 149, № 5. – С. 562 – 565.
26. Глотов А.В. Терминология, определённая с позиции клиники. Классификация врожденной дисплазии соединительной ткани/ А.В. Глотов// Врожденная дисплазия соединительной ткани: тез. симпозиума. Омск, 1990. С.3-5.
27. Гончарова Н. С. Ремоделирование миокарда у пациентов с клапанной патологией сердца роль матриксных металлопротеиназ и системы гемостаза: Дисс. ...канд.мед.наук. – М.: 2008. – С.83-84.
28. Григорьев Е.В. Диагностическая и прогностическая значимость биохимических маркеров острого повреждения легких / Е.В. Григорьев [и др.] // Общая реаниматология. 2006. – Т. II, №4. – С. 41-44.
29. Гунько В.И. Достижения и проблемы медицинской реабилитации пациентов с врожденными и приобретёнными зубочелюстными деформациями / В.И. Гунько// Стоматология детского возраста и профилактика, 2003. - № 1 – 2. – С. 28-30.
30. Гуцан А.Е. Врожденные расщелины верхней губы и неба. Актуальные аспекты проблемы – Кишинев, 1980. – 142 с..
31. Давлешин Н.А. Организация комплексной реабилитации детей с врожденными расщелинами верхней губы. Материалы Всероссийской научно-практической конференции «актуальные вопросы стоматологии». – Уфа, 2009. С. 213-214.
32. Давыдов Б.Н. Патогенез деформации хрящевых и костных структур лица при врождённых пороках, их коррекция на этапах комплексного лечения / Б.Н. Давыдов // Врожденная и наследственная патология головы, лица и шеи у детей: материалы науч. – практ. Конф. – М., 2006. – С. 68-70.



33. Дельви́г А.А. Изучение биохимических дефектов при наследственных болезнях соединительной ткани / А.А. Дельви́г // Воер. мед. химии. - 1986. №2. - С.2-14.
34. Деми́кова Н.С. Челюстно лицевые микро-аномалии, как факторы риска при расщелинах губы и неба: автореф. Дис. ... канд мед наук / Н.С. Деми́кова. - М., 1982. - 134 с.
35. Долгополова Г.В., Бимбас Н.В., Долгополова Н.В. Раннее ортопедическое лечение детей с врожденной расщелиной верхней губы и неба. Ортодент-инфо 2002; 1: 15-22.
36. Дорсеви́ч А.Е. Особенности гистологического строения слизистой оболочки полости рта у детей с синдромом дисплазии соединительной ткани сердца / А.Е. Дорсеви́ч, О.Л. Мишутина // Пародонтология. - 2002. - № 1-2. - С.64-66.
37. Задонская Ю.Н. Иммуногистохимическое исследование матриксных металлопротеиназ и их тканевого ингибитора в гиперплазированном эндометрии женщин пременопаузального возраста / Ю.Н. Задонская [и др.] // Акушерство и гинекология. - 2009. - №5. - С.41-44.
38. Зильбер А.П. Этюды критической медицины. - М.: МЕД-пресс-информ, 2006. - 568 с.
39. Кадурина Т.Н. Поражение сердечно-сосудистой системы у детей с различными вариантами наследственных болезней соединительной ткани. Вести аритмологии. 2000; 18: 87
40. Кадурина Т.И. Возможности метаболической коррекции различных наследственных заболеваний / Т.И. Кадурина // Мед. Генетика. - 2005. - №5. - С.197-198.
41. Калюш А.В. К вопросу о профилактике врожденной челюстно-лицевой патологии / А.В. Калюш, С. И. Блохина // Дет. стоматология. 1990. №2. С.32-37.
42. Карпищенко А.И. Медицинские лабораторные технологии. Том 2. Санкт-Петербург «Интермедика», 1999г, с.653.

43. Касарес П.Л. Врожденные расщелины губы и неба, популяционная частота в г. Москве / П.Л. Касарес, А.Н. Прытков // Генетика. – 1982. - № 5. – С. 844-847.
44. Касаткина А.Л. Клинико-эпидемиологическая характеристика врожденных пороков развития челюстно-лицевой области на территории Волгограда и Волгоградской области: Дис. ...канд. мед. наук / А.Л.Касаткина. – Волгоград, 2000. - 139 с.
45. Катасонова Е.С. Обоснование применения новых технологий на ранних этапах комплексного лечения детей с врожденной двусторонней расщелиной верхней губы и неба: Автореф. Дис. ...канд. Мед. наук. Алматы 2010; 20.
46. Клеменев А.В. Внекардиальные проявления недифференцированной дисплазии соединительной ткани / А.В. Клеменев // Клин. Медицина. – 2003. - №10. – С. 3-7. 71
47. Клишо Е.В., Кондакова И.В., Чойнзонов Е.Л. и др. Прогностическая значимость протеаз у пациентов плоскоклеточными карциномами головы и шеи. БЮЛЛЕТЕНЬ СО РАМН 2005; 2(116): 82-91.
48. Кобахидзе К.А. Эпидемиология врожденной расщелины верхней губы и неба и антропометрическая характеристика роста и развития верхней челюсти: Автореф. ...канд. мед. наук. – Тбилиси, 1996. – 34 с.
49. Козлов В.А., Знаменский В.И., Руюежова В.И. и др. Опыт организации диспансерного наблюдения и комплексного лечения детей с врожденными расщелинами верхней губы и неба. Стоматология 1978; 57: 2. – С. - 80-82.
50. Козлов В.А. Пути совершенствования организации оперативной помощи детям с врожденными расщелинами верхней губы и неба/ Козлов В.А., Знаменский В.И.// Современные принципы восстановительной хирургии лица и шеи в реабилитации пациентов с врожденной и приобретенной патологией: сб.научн. тр.-М.; 1984. -С.4-7.

- 51.Козлова В.П. Диагностика нарушений слуха при врождённых деформациях ушных раковин у детей с челюстно-лицевой патологией / В.П. Козлова // Семья в системе реабилитации: сб. науч. Тр. – Екатеринбург, 1994. С 82-83.
- 52.Козлова С.И. Наследственные синдромы и медико-генетическое консультирование / С.И.Козлова, Н.С. Демикова, Е.Н. Семанова. - М.:-1996.-416с.
- 53.Колесникова Т.Н. Экологические факторы риска врожденных пороков развития лица / Т.Н. Колесников // Актуальные вопросы реабилитации детей с врожденными пороками развития черепно-лицевой области. Чита, 1993. -С. 24-26.
- 54.Коноплястая С.Ю. К проблеме коррекции речевого развития в системе комплексной реабилитации детей с врожденными расщелинами губы и неба в Украине/ С.Ю. Коноплястая // Врожденная и наследственная патология головы, лица и шеи у детей: материалы научн. – практ. Конф. Стоматологов. М., 2006. С. 105-106.
- 55.Корнетов Н.А. Глоссарий стандартизованного описания регионарных морфологических дисплазий для клинического исследования в психиатрии и неврологии/ Н.А. Корнетов. -Томск,1996. -53с.
- 56.Косырева Т.М. Опыт работы Самарского областного центра реабилитации детей и подростков с врожденной и приобретенной патологией челюстно-лицевой области / Т.М. Косырева, В.Г. Ковалев, А.Н. Карпов, Л.Г. Юматова, А.С. Серегин // Врожденная и наследственная патология головы, шеи и лица у детей: актуальные вопросы комплексного лечения. – М: МГМСУ, 2002. – С.140-143.
- 57.Котова Е.Н. Взаимосвязь структурных изменений и течения фиброзной дисплазии ЛОР – органов у детей / Е.Н. Котова // Дет. Больница – 2005. - №3. – С. 30-33.
- 58.Котовская Е.С. Фенотипические и морфологические изменения соединительной ткани и атеросклеротическое поражение коронарных

- артерий / Е.С. Котовская, С.Г. Раденская-Лоновок, В.В. Гемонов // Вестн. РАМН. – 1994. №6. – С. 52-56.
- 59.Котомин Б.В. Распространенность стоматологической патологии у детей с синдромом дисплазии соединительной ткани сердца / Б.В. Котомин, А.С. Утюж, О.Л. Мишутина // Дет. Стоматология. – 2000. - №1-2. С. 109-111.
- 60.Куликов А.М. Дисплазия соединительной ткани у подростков и их распознавание / А.М. Куликов, В.П. Медведев // Семейный врач.-№4. - 2000.-С.37-51.
- 61.Кушлинский Н.Е., Караогланова Т. Б., Соловых Е. А., Герштейн Е. С., Трошин А. А., Янушевич О.О. Матриксные металлопротеиназы и их тканевые ингибиторы в ротовой жидкости пациентов хроническим генерализованным пародонтитом с различными конструкционными материалами реставрации зубов и зубных рядов. //Вопросы биологической медицинской и фармацевтической химии. - 2012.-№10.-С. 47-51.
- 62.Лавриков В.Г. Особенности логопедической помощи детям с врожденными расщелинами верхней губы и неба на ранних этапах развития / В.Г. Лавриков, Т.Г. Мишина, О.А. Гаврилова // Врожденная и наследственная патология головы, лица и шеи у детей: материалы науч. – практ. Конф. – М., 2006. – С. 109-109.
- 63.Леонов А.Г., Кожарский Г.В., Кузнецова Н.Л. Частота и распространенность врожденной расщелины верхней губы и неба в Свердловской области за период с 1987 по 2007 г.г. // Врожденная и наследственная патология головы, лица и шеи у детей: актуальные вопросы комплексного лечения. – М.: МГМСУ, 2009. – С. 198 – 200.
- 64.Ли О.А. Клиническое значение определения матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов в ткани почки и моче при хроническом гломерулонефрите: Дисс. ...канд.мед.наук. - М.: 2011.- С. 98-99.
- 65.Лимберг А.А. Врожденные не заращения губы и неба. – Л., 1968.

66. Лимберг А.А., Дубов М.Д. Роль отечественных авторов в разработке вопросов лечения врожденных расщелин лица и неба // *Стоматология*. – 1975, № 5. – С. 41.
67. Максимова С.М. Состояние сердечно-сосудистой системы и ее адаптационные возможности с врожденными расщелинами губы и неба: дис. ...канд. мед. наук / С.М. Максимова. – Донецк, 1982. – 197 с.
68. Мальцева В.Н. Неоднозначность роли нейтрофила в генезе опухоли / В.Н. Мальцева, В.Г. Сафронова // *Цитология*. – 2009. – Т.51, №6. – С. 467 – 474.
69. Мамедов Ад.А. Врожденная расщелина неба и пути ее устранения / Ад.А. Мамедов. Екатеринбург, 1998. 309 с.
70. Мамедов Ад. А. Комплексная программа реабилитации детей с врожденными пороками и аномалиями развития, черепно-челюстно-лицевой области / Ад.А. Мамедов, А.Н. Герасимов, О.А. Манирова // Профилактика и лечения стоматологических заболеваний у детей: материалы респ. Конф. Стоматологов. – Уфа, 2006. – С. 68-69.
71. Мамедов Ад.А., Нелюбина О.В., Абиев М.А. Деятельность благотворительного фонда «Врожденная расщелина верхней губы и неба в России. // Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные вопросы стоматологии». – Уфа, 2009. – С.228-230.
72. Мамедов Ад.А. Междисциплинарный подход в лечении детей с расщелиной, губы и неба в современных условиях развития здравоохранения России, Материалы V Всероссийской научно-практической конференции Врожденная и наследственная патология головы, лица и шеи у детей: актуальные вопросы комплексного лечения. 24-25 ноября 2016, Москва. – С. 185-192.
73. Мартынов А.И. Возможные механизмы регургитации у пациентов с идиопатическим пролапсом атривентрикулярных клапанов / А.И.

- Мартынов, О.Б. Степура, О.Д. Остроумова// Кардиология. – 1995. - №9. – С.56-57.
- 74.Мартынов А.И. Маркеры дисплазии соединительной ткани у пациентов с идиопатическим пролапсом атриовентрикулярных клапанов и аномально расположенным хордами / А.И. Мартынов, О.Б. Степура, О.Д. Остроумова// Тер. архив. 1996.-№2.-С.40-42.
- 75.Меньшикова Л.И. Малые аномалии развития сердца в генезе кардиоваскулярной патологии у детей / Л.И. Меньшикова, О.В. Сурова, В.И. Макарова // Рос. Вестник перинатологии и педиатрии. 2000. №2. – С. 24-26.
- 76.Мещерякова Н.В. Нарушение слуховой функции у детей с недифференцированной дисплазией соединительной ткани / Н.В. Мещерякова, В.М. Моренко, Т.Ю. Морозова // Новые медицинские технологии в отоларингологии: материалы науч. – практ. коф. – Ставрополь, 2007. С. 67-71.
- 77.Мещерякова Н.В. Комплексная оценка нарушений слуха у детей с синдромом дисплазии соединительной ткани / Н.В. Мещерякова, Р.С. Кияшкин, А.А. Кузовкина // Вестн. Оториноларингологии. – 2009.- №5. – С.111-112.
78. Мишутина О.Л. Стоматологический статус у детей с синдромом дисплазии соединительной ткани сердца: автореф. дис. ... канд. Мед. наук. - Смоленск, 2002. – 19с.
- 79.Митропанова М.Н. Состояние иммунитета у детей с врожденными пороками лица / Врожденная и наследственная патология головы, лица и шеи у детей: материалы науч. – практ. конф. М., 2006. С. 122-124.
- 80.Неудахин Е.В. Педиатрические аспекты ведения детей с челюстно-лицевой патологией в предоперационном и послеоперационном периодах / Е.В. Неудахин, А.Г. Притько, Г.М. Балакирева // Передовые технологии медицины на стыке веков: сб. научн. Тр. – М., 2000. – С.123-125.

81. Николаева И.В. Социально-гигиенические аспекты и распространенность расщелин губы и неба, и организация медицинской помощи в условиях крупного города: Дис. ...канд.мед. наук. – М.: 1997. – 44 с.
82. Оранский И.Е. Функциональное состояние сердечно-сосудистой системы у детей с челюстно-лицевой патологией / И.Е. Оранский, М.А. Алексина // Семья в системе реабилитации : сб. научн. Тр. – Екатеринбург, 1994. – С. 106-108.
83. Останин А.В. Современный протокол лечения детей с врожденной расщелиной верхней губы и неба в условиях диспансерного наблюдения на примере Владимирской области / А.В. Останин // Врожденная и наследственная патология головы, лица и шеи у детей: актуал. Вопр. Комплексного лечения – М., 2006. – С. 136-137.
84. Потеряева О.Н. Матриксные металлопротеиназы: строение, регуляция, роль в развитии патологических состояний (обзор литературы) // Медицина и образование в Сибири. 2010. №5. – С. 7-17.
85. Потеряева О.Н. Анализ активности матриксных металлопротеиназ и  $\alpha_1$  – протеазного ингибитора в сыворотке крови пациентов сахарным диабетом 2 –го типа / О.Н. Потеряева, Г.С. Русских, Л.Е. Панин // Бюл. Экспериментальной биологии и медицины – 2011. – Т.152, № 11. С. 509 – 510.
86. Прокоп Д.Дж. Наследственные болезни соединительной ткани / Д.Дж. Прокоп // Внутренние болезни/ Под ред. Е. Браунвальда. -М.:1996.-С.295-311.
87. Рейснер Е. А. Роль матриксных металлопротеиназ в развитии гиперпластических процессов эндометрия у женщин в перименопаузе: Дисс. ...канд.мед.наук. – М.: 2010. – С. 80-81.
88. Ролик Н.Л. Особенности клинической картины, вегетативного и эмоционально-личностного статуса у пациентов с синдромом дисплазии соединительной ткани сердца: автореф. дис. ...канд. мед. наук. - М.: 1995.24 с.

- 89.Рубежова И.С., Котов Г.А., Жданов П.П. Ранее комплексное лечение врожденных аномалий развития лица как фактор профилактики тяжелых деформаций челюстно-лицевой области/ и др. // Профилактика стоматологических заболеваний: Тез. Докл. V Всерос. Съезда стоматологов. – М., 1988. – С. 171-172.
- 90.Рыбко В.А. Активность протеиназ внеклеточного матрикса в экспериментальной модели опухолевой прогрессии / В.А. Рыбко [ и др.] // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. – 2008. –Т.19, № 4. – С. 16-21.
- 91.Саркисов Д.С., Алексеев А.А., Глущенко Е.В. и др. Теоритические и практические аспекты использования культивированных фибробластов при восстановлении целостности кожных покровов. Вестник Российской академии медицинских наук. 1996;6:6-11.
- 92.Свиридов Н.Н. Проблемы, связанные с комплексным лечением детей с врожденной патологией челюстно-лицевой области по Саратовскому региону / Н.Н. Свиридов // Врожденная и наследственная патология головы, лица и шеи детей: материалы научн. – практ. Конфю – М., 2006. – С. 145.
- 93.Сигидин Я.А. Диффузные болезни соединительной ткани / Я.А. Сигидин, Н.Г. Гусова, М.М. Иванова. – М., 1994. – 543 с.
- 94.Симановская Е.Ю. Организация специализированной помощи новорожденным с пороками развития лица / Е.Ю. Симановская, Т.В. Шарова// Новое в терапевт., дет. и хирургической стоматологии.-1987.- С.133-134.
- 95.Симановская Е.Ю. Комплексный метод лечения детей раннего возраста по поводу врожденной расщелины губы и неба как средство их медико-социальной и психолого-педагогической реабилитации / Е.Ю. Симановская, А.П. Щеглова, Н.И. Захарова // Стоматология и здоровье ребенка: сб. науч. Тр. – М., 1996. – С. 109.
- 96.Смирнов И.Е, Харитоновна А.Ю., Кучеренко А. Г., Шавров А.А. Цитокины и матриксные металлопротеиназы при патологии верхних отделов



- пищеварительного тракта у детей.//Российский педиатрический журнал.- 2012.- №2.- С. 4-8.
97. Смоленский В.С. Фенотипические особенности пациентов с синдромом преждевременного возбуждения желудочков /В.С. Смоленский, И.Г. Фомина, Л.В. Логунова и др. / Терапевт. арх.1988. -№12.- С.26-28.
98. Снарская Е. С., Молочков В. А., Франк Г. А., Завалишина Л. Э. Матриксные металлопротеиназы и их тканевые ингибиторы при базальноклеточном и метатипическом раке кожи //Архив патологии. - 2005. - Т.67, №3 .-С. 17-18.
99. Соловьева Н.И. «Матриксные металлопротеиназы: регуляция активности и роль в процессе онкогенеза.» Вопросы медицинской химии 2000; №5.
100. Сулимов А.Ф. Дисплазия соединительной ткани в стоматологии и челюстно-лицевой хирургии / А.Ф. Сулимов, Р.К. Савченко, Э.Ш. Григорович.-М.:2004.-134с.
101. Сумарков А.В. Клиническая кардиология: рук. для врачей/ А.В. Сумарков, В.С. Моисеев. -М.,1986. -367 с
102. Супиев Т.К. Медико-социальная реабилитация детей с врожденными пороками развития лица и челюстей /Т.К.Супиев, Г.М. Негаметзянов, И.В.Котова // Здравоохранение Казахстана.-1989.-№10.-С.12-15.
103. Супиев Т.К., Мамедов Ад.А., Негаметзян Н.Г. Врожденная расщелина верхней губы и неба. Алматы: КазНМУ 2013; С. - 496.
104. Сутулов В.В. Оказание специализированной помощи детям с врожденной расщелиной губы и неба в современных условиях развития здравоохранения (на примере Липецкой обл.): Автореф. ...канд. мед. наук. М., 2006.- 23 с.
105. Токарев П. В., Егорова А.Б., Маяков О.А. Эпидемиологический анализ заболеваемости у детей с врожденными пороками развития челюстно-

- лицевой области на территории Республике Татарстан // Врожденная и наследственная патология головы, лица и шеи у детей: актуальные вопросы комплексного лечения. – М.: МГМСУ, 2009. – С. 282-285.
106. Туманов В.П., Глущенко Е.В., Морозов С.С. и др. Использование культивированных фибробластов при лечении ожоговых ран. Бюлл. экспер. Биол. и мед. 1990;4: 400-402.
107. Турна А. А. Активность матриксных металлопротеиназ при различных патогенетических вариантах воспаления: Дисс. Док.мед.наук. – М.: 2010. – С.225-227.
108. Тутуева Т.А. Специализированная медико-генетическая служба и профилактика врожденных расщелин лица в системе комплексной реабилитации детей с врожденной челюстно-лицевой патологией и их семей/ Е.Ю. Тутуева Ю.А. Шоничева, А.Ю. Суркин // Врожденная и наследственная патология головы, шеи и лица у детей: актуальные вопросы комплексного лечения. – М: МГМСУ, 2002. – С. 235-237.
109. Фоменко И.В., Филимонова Е.В., Дмитриенко С.В., Касаткина А.Л. Эффективность лечения детей с врожденной односторонней расщелиной верхней губы и неба в условиях Волгоградского областного центра диспансеризации // Врожденная и наследственная патология головы, лица и шеи у детей: актуальные вопросы комплексного лечения. – М.: МГМСУ, 2009. – С. 313-315.
110. Фомин В.В. Клинические особенности и диагностика пролапса митрального клапана / В.В. Фомин, С.В. Моисеев, И.А. Саркисова // Клин. Медицина. – 2001. №9. – С. 65-69.
111. Фомина В.С. Роль системы матриксных металлопротеиназ в патогенезе профессиональных заболеваний органов дыхания: Дисс. ...канд.мед.наук. – М.: 2010. – С.110.
112. Харьков Л.В. Хирургическое лечения врожденных не сращений твердого и мягкого неба / Л.В. Харьков, Ю. А. Юсубов // Стоматология. – 1991. №2. – С. 51-53.

113. Харьков Л.В. Хирургическое лечение врожденных несращений неба / Л.В. Харьков. – Киев, 1992.С. 6– 21с.
114. Хлобыстова Т.В. Этиопатогенетические аспекты классификации врожденных расщелин челюстно-лицевой области/ Т.В. Хлобыстова // Материалы 2 научно-практической конференции: Врожденная и наследственная патология головы, шеи и лица у детей: актуальные вопросы комплексного лечения. – М: МГМСУ, 2006. – С. 174-175.
115. Цыплакова М.С. Наш опыт ранней медико-социальной реабилитации детей с врожденной расщелиной верхней губы и неба / М.С. Цыплакова, Ю.В. Степанова, Е.А. Пономарева // Врожденная и наследственная патология головы, лица и шеи у детей: материалы научн – практ. Конф. – М., 2006. – С. 176-178.
116. Череп,О.Е. Некоторые аспекты тканевой дифференцировки и ее регуляции в морфогенезе органов ротовой полости человека / О.Е. Череп, В.В. Гемонов// Рос. морфологические ведомости. -1997.-№2.-С.65-68.
117. Чуйкин С.В. Изучение взаимосвязи между внешне средовыми, генетическими факторами и риском возникновения врожденной расщелины верхней губы и неба / С.В. Чуйкин, Ю.В. Андрианова, Д.И. Шайхутдинова // Профилактика и лечение стоматологических заболеваний у детей: материалы респ. конф. стоматологов. Уфа, 2006. – С. 64-65.
118. Чуйкин С.В. Распространенность сопутствующих заболеваний у детей с врожденной расщелиной губы и неба / С.В. Чуйкин, Ю.В. Андрианова, Т.В. Снеткова// Профилактика и лечение стоматологических заболеваний у детей: материалы респ. конф. стоматологов. Уфа, 2006. - С.160-161.
119. Чуйкин С.В. Экологические факторы в этиологии, патогенезе и реабилитации врожденной расщелиной губы и неба у детей в республике Башкортостан / С.В. Чуйкин, Ю.В. Андрианова, Н.А. Давлетшин // Материалы 2 научной- практической конференции: Врожденная и

- наследственная патология головы и шеи лица у детей: актуальные вопросы комплексного лечения. – М: МГМСУ, 2006. - С. 303-305.
120. Чуйкин С.В., Л.С. Персин, Н.А. Давлешин. Врожденная расщелина верхней губы и неба. – Москва, 2008. – С 41-46.
121. Чуйкин С.В., Андриянова Ю.В., Колесник А.А., Большакова Н., Рахмангулов Р.Р. Особенности соматического статуса у детей с врожденной расщелиной верхней губы и неба, проживающих в республике Башкортостан// Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные вопросы стоматологии». – Уфа, 2009. – С. 224-225.
122. Шиловских С.Ю. Логопедическая ритмика при работе с детьми, имеющими врожденную расщелину губы и неба / С.Ю. Шиловских // Вопр. Стоматологии: сб. научн. Тр. – Пермь, 1997. С.55.
123. Юлдашев И.М., Танылиев У.А., Керимкулов З.А., Юлдашева Д.Т. Частота рождения детей с врожденной патологией верхней губы и неба на севере Кыргызской республики. // Врожденная и наследственная патология головы, лица и шеи у детей: актуальные вопросы комплексного лечения. – М.: МГМСУ, 2009. – С. 356-357.
124. Юрьева Л.И. Профилактика основных стоматологических заболеваний у детей с врожденной челюстно-лицевой патологией в системе семейной диспансеризации : автореф. ...дис. канд.мед. наук, / Екатеринбург, 2002. – 19 с.
125. Яковлев В.М., Глотов А.В., Нечаева Г.И. Клинико-иммунологический анализ клинических вариантов дисплазии соединительной ткани. Терапевтический Архив 1994; 5: 9-13.
126. Яковлев В.М. Восстановительное лечение при дисплазии соединительной ткани / В.М. Яковлев, Г.С. Дубилей – Омск, 1996. – 120с.
127. Яковлев В.М. Иммунопатологические синдромы при наследственной дисплазии соединительной ткани / В.М. Яковлев, А.В. Глотов, А.В. Ягода. – Ставрополь, 2005. – 234с.

128. Яровая Г.А. Биорегулирующие функции и патогенетическая роль протеолизаю Распространение, классификация и основы механизма действия протеиназ. *Лабораторная медицина*. 2001; 4:75-80.
129. Ярыгина Е.С. Новосибирск Клинико-диагностическое значение активности матриксных металлопротеиназ и лизосомальных ферментов при артритах у детей: Дисс. ...канд.мед.наук. – М.: 2005. - С.88 -112.
130. Abramson S.R., Conner G.E., Nagase H. et al. Characterization of rat uterine matrilysin and its cDNA: Relationship to human pump-1 and activation of procollagenases. *J. Biol. Chem.* 1995; 270(27):16016-16022.
131. Antoszewski B. Epidemiology of and palate in Lodz, Poland, in the yeas 1981 – 1995 / B. Antoszewski, J. Kruk-Jeromin // *Acta. Chir. Plast.* – 1997. – Vol. 39, №4. P. 109-112.
132. Atkinson J. J, Holmbeck K, Yamada S, et al. Membrane-type 1 matrix metalloprotienase is required for normal alveolar development/ *Dev Dyn.* 2005 Apr; 232(4): 1079-90.
133. Baliver L, Lazaryev A, Groffen J, Heisterkamp N, Decler Y, Kaartinen V. 2001. TGFβ3-induced palatogenesis requires matrix metalloproteinases. *Mol Biol* 12: 1457-1466.
134. Bardach J, Bakowska J., MeDermott-Murray J., Mooney M.P., Dusdierkec L.B. L sure changes following lip repair in infants with unilateral clefts of the lip // *Piast. Reconstr. Surg.* – 1984. –Vol. 74, №4. – P. 76-79.
135. Barlow J. Mitral valve billowing and prolapse – an overview J. Barlow // *Aust. N.Z. Med.* 1992. Vol. 22; Suppl. 5. P. 541-549.
136. Blaha K, Borsky J, Kasparova M et al. Concentrations of MMP-9 and TIMP-1 in lip tissue and their impact on cleft lip surgery healing. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2013; 157(4):363-6.
137. Bode W., Gomis-Ruth F.X., Stocker W. Astacins, serralyns, snake vebom and matrix metalloproteinases enxhibit identical zinc-binding enviroments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the ‘metzincins’. *FEBS Lett/* 1993; 331:134-140.

138. Border W, Transforming growth factor- $\beta$  in tissue fibrosis / W. Border, N. Noble // *N Eng J Med*. 1994. Vol. 331, №19. – P. 1286-1292.
139. Brown N. L, Yarram SJ, Mansell JP, Sandy JR. Matrix metalloproteinases have a role in palatogenesis. *J Dent Res* 2002; 81:826-30.
140. Candelario – Jalila E. Diverse roles of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in neuroinflammation and cerebral ischemia / E. Candelario-Jalila, Y. Yanga, G.A. Rosenberga // *Neuroscience*. – 2009. – Vol. 158, №3. – P. 983 – 994.
141. Cao J. Biology and chemistry of matrix metalloproteinases (MMPs) / J. Cao, S. Zucur // [http:// www. Abcam.com/index.html?Pageconfig=resjurs&rid = 11034/](http://www.Abcam.com/index.html?Pageconfig=resjurs&rid=11034/)
142. Carinci F., Rullo,R., Laino G., Festa V., Mazzarella N., Morano D., Gombos F. Orofacial cleft in Southern Italy. AD: Department of Maxillofacial Surgery, University of Ferrara, Ferrara, Italy. [crc@unife.it](mailto:crc@unife.it) *Minerva-Stomatol*. 2003 Oct; 52(10): 427-31, 432-3)
143. Catania J.M., Chen G., Parrish A.R. Role of matrix metalloproteinases in renal pathophysiologies. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 292: 905-911.
144. Chakrabarti S. Regulation of matrix metalloproteinase-9 release from IL-8- stimulated human neutrophils / S. Chakrabarti, K.D. Patel // *J. Leukoc. Biol*. – 2005. – Vol. 78. – P. 279-288.
145. Chen W, Fu X, Ge S, Sun T, Sheng Z. Differential expression of matrix metalloproteinases and tissue-derived inhibitors of metalloproteinase in fetal and adult skins. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39(5):997-1005.
146. Chevirier C., Bahuau M., Perret C., Iovannisci D/M/ Genetic susceptibilities in the association between maternal exposure to tobacco smoke and risk of nonsyndromic oral cleft. // *Am. J. Med. Genet.*, 2008. – Sep. 146A (18): - P. 2396-2406.
147. Cornel M. Some epidemiological data on oral clefts in the northern Netherlands / M/ Cornel, J. Spreen, I. Meijer // *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery*. 1992. Vol 20, №4. – P. 147-152) (Coussens L.M., Werb Z.

- Matrix metalloproteinases and the development of cancer. *Chem. Biol.* 1996; 3(11): 895-904.
148. Cox T.C. Taking it to the max: The genetic and developmental mechanisms coordinating midfacial morphogenesis and dysmorphology / T.C. Cox // *Clin. Genet.* – Vol. 65. – P. 163-176.
149. Creemers E.J.M., Cleutjens J.P.M., Smits J.F.M. et al. Matrix Metalloproteinase Inhibition after Myocardial Infarction. *Circulat. Res.* 2001; 89:201-210.
150. Czeizel A.E. Orofacial clefts in Hungary. Epidemiological and genetic data, primary prevention / A.E. Czeizel, J. Hirschberg / *Folia Phoniatr Logop.* – 1997. – Vol. 49, №3-4. – P. 111-116.
151. Dasty J., Walczak-Drzewiecka A., Wyczolkowska J. et al. Murine mast cells exposed to mercuric chloride release granule-associated N-acetyl-beta-D-hexosaminidase and secrete IL-4 and TNF-alpha. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1999; 103(6):1108-14.
152. Davey A. Matrix metalloproteinases in acute lung injury: mediators of injury and drivers of repair / A. Davey, D.F. McAuley, C.M. O’Kane // *Eur. Respir. J.* 2011. Vol. 38, №4. – P. 959-970.
153. Davies M.J. Reactive oxygen species, metalloproteinases, and plaque stability. *Circulation.* 1998; 97: 2382-2383
154. Devereux R. Mitral valve prolapse: causes, clinical manifestation, and management / R. Devereux, R. Kramer – Fox, P. Kliffeld // *Int. J. cardiol.* 1989. Vol. 111. – P. 305-317.
155. Di Lullo G.A., Sweeney S.M., Körkkö J. et al. Mapping the Ligand-binding Sites and Disease-associated Mutations on the Most Abundant Protein in the Human, Type I Collagen. *J. Biol. Chem.* 2002; 277(6): 4223-4231.
156. Dursy E. Zur Entwicklungsgeschichte des Ropfes des Menschen and der höheren Wirbelthiere. – Tübingen: Laluppschern. – 1869.
157. Exposito J.Y., Cluzel., Garone R. et al. Evolution of collagens. *Anat. Rec.* 2002; 268(3): 302-316.

158. Fakova F.A. Reticulin fibres in the tunica albuginea and peritubular tissue of seminiferous tubules of adult male Wistar rats. *ActaHist. Chem.* 2002; 104(3): 279-83.
159. FitzPatrick D. Facial clefts in the west of Scotland in the period 1980 – 1984: epidemiology and genetic diagnoses / D. FitzPatrick, P. Raine, J. Boorman // *Journal of Medical Genetics.* 1994. Vol. 31, №2. – P. 126-129.
160. Fleischman A.: *Sber. Phys. – med. – Gez.* Erlangen, 1937. – Bd 69. – S. 315.
161. Gagliano N, Carinci F, Moscheni C. et al. New insights in collagen turnover in orofacial cleft patients. *Cleft Palate Craniofac J.* 2010; 47(4):393-9.
162. Gawronska-Kozak B. Scarless skin wound healing in FOXN1 deficient (nude) mice is associated with distinctive matrix metalloproteinase expression. *Matrix Biol* 2011; 30(4):290-300.
163. Glesby M. Association of mitral valve prolapse and systemic abnormalities of connective tissue. A phenotypic continuum / M. Glesby, R. Pyentz // *J. Am. Med. Ass.* 1989. Vol. 262. P. 523-528.
164. Gomes D.E., Alonso D.F., Yoshiji H., Thorgeirsson U.P. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 1997; 74(2): 111-122.
165. Gonzalez B.S., Lopez M.L., Rico M.A., Garduno F. Oral clefts: a retrospectives study of prevalence and predisposal factors in the State of Mexico.// *J. Oral. Sci.*, 2008.-Jun.- 50(2): - P. 123-129)
166. Grahame R. The hypermobility syndrome / R. Grahame // *Annals of the Rheumatic diseases.* – 1990. Vol. 49. – P. 199-200.
167. Greene RM, Pisano MM. Perspectives on growth factors and orofacial development. *Curr Pharm Des* 2004; 10:2701-17.
168. Grenbulen L.M. The incidence of cleft lip and cleft palate in Nigeria/ L.M. Grenbulen// *Cleft Palate Sur.* – 1982.-Vol. 19, № 3. – P. 201 – 205.
169. Habel A. Management of cleft lip and palate / A. Habel, D. Sell, M.Mars // *Dis. Child.* 1996. Vol. 74, №4. – P. 360-366.



170. Hidalgo M., Eckhardt G.S. Development of Matrix Metalloproteinase Inhibitors in Cancer Therapy. *J. Nation. Cancer Inst.* 2001; 93(3): 178-193 (Close D.. Matrix metalloproteinase inhibitors in rheumatic diseases. *Ann. Neum. Dis* 2001; 60(3): 11162-11167.
171. Hiller O. Matrix metalloproteinases collagenase-2, macrophage elastase, collagenase-3 and membrane type 1-matrix metalloproteinase impair clotting by degradation of fibrinogen and factor XII // *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275. P. 8-13.
172. His W. Die Entwicklung der Menschlichen und Thierischer Physiognomen. // *Arch. Anat. Entwicklungsgesch* S. – 1892. – P. 384.
173. Hosokawa R, Nonaka K, Morifuji M, Shum L, Orishi M. TGF- $\beta$ 3 decreases type I collagen and scarring after labioplasty. *Journal of Dental Research* 2003; 82:7.
174. Hwang B.F., Jaakkola J.J. Ozone and other air pollutants and the risk of oral clefts. // *Environ Health Perspect.* 2008 Oct. – 116(10): - P. 1411-1415.
175. Iozzo R.V., *Proteoglycans : structure, biology and molecular interactions.* New-York. Marcel Dekker Inc. 2000; 442.
176. Iskandrian A. Exercise left ventricular performance in patients with mitral valve prolapse / A. Iskandrian // *Herz.* – 1988. - №13. – P. 243-348.
177. Jocelyn L.J. Cognition, communication and hearing in young children with cleft lip and palate and in control children: a longitudinal study / L.J. Jocelyn, M.A. Penko, H.L. Rode // *Pediatrics.* – 1996 – Vol. 97, №4. – P. 529-534.
178. Kaski J.C., Zouridakis E.G. Inflammation, infection and acute coronary plaque events. *Eur. Heart. J.* 2001; 3(I):10-15.
179. Kelly, T. Teratogenicity and anticonvulsant drug. The association of clefting and epilepsy / T. Kelly, P P. Edwards Klein, M. Rein // *Ann. Y. Med. Genet.* – 1984. – Vol. 19, № 8. – P. 451-458.
180. Kleiner D.E., Stetler-Stevenson W.G. Matrix metalloproteinases and metastasis. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1999; 43: 42-51.

181. Kourtzelis I. Complement anaphylatoxin C5a contributes to hemodialysis-associated thrombosis / I. Kourtzelis [et al.] // *Blood*. 2010. Vol. 116. P. 631-639.
182. Kozeli V, Epidemiology of orofacial cleft in Slovenia, 1973-1993: comparison of the incidence in six European countries / V.Kozeli // *J Craniomaxillofac Surg*. 1996. – Vol. 24, №6 – P. 378-382.
183. Kropf J, JO Schurek, A Wollner, and AM Gressner. Immunological measurement of transforming growth factor-beta I (TGF- $\beta$ 1) in blood; assay development and comparison. *Clinical Chemistry* 1997;43(10):1965-1974.
184. Lench I. The geographical distribution of neural tube defects and oral cleft/I.Lench//*Br.Med. Bull.*-1984-Vol.40, №4.-P.390-395.
185. Lenz O., Elliot S.J. Stetler-Stevenson W.G. Matrix metalloproteinases in renal development and disease. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 574-581.
186. Letra A, Silva RM, Motta LG, Blanton SH, Hecht JT, Granjeirol JM, et al. Association of MMP3 and TIMP2 promoter polymorphisms with nonsyndromic oral clefts. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2012; 94:540-48.
187. Levy D. Prevalence and clinical features of mitral valve prolapse / D. Levy, D. Savage // *Am. Heart J.* – 1987. – Vol 113. – P. 1281-1290.
188. Li J., Scwimmbeck P.L., Tschöpe C. et al Collagen degradation in a murine myocarditis model: relevance of matrix metalloproteinase in association with inflammatory induction. *Cardiovasc. Res.* 2002; 56(2): 235-247.
189. Li Z., Ren A., Liu J., Zhang L., Ye R., Li S., Li Z. High prevalence of orofacial clefts in Shanxi Province in northern China, 2004-2004.// *Am. J. Med. Genet.* – 2008/ - Oct. - 146A (20): - P. 2673-2643.
190. Loffredo L. Cleft lip and palate: case-control study / L. Loffredo, J. de Souza, J. Yunes // *Revista de Saude Publica*. 1994. Vol. 28, №3, P. 213-217.
191. Lohmander – Agerskov A. Longitudinal study of speech in 15 children with cleft lip and palate treated by late repair of the palate / A. Lohmander –

- Agerskov, E. Soderpalm, H. Friede, J.A. Lilija // *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Hand. Surg* – 1995. – Vol. 29. – N1. – P. 21-31.
192. Lui M.L., Reilly M.P., Cassanto P. et al. Cholesterol enrichment of human monocyte/macrophages induces surface exposure of phosphatidylserine and the release of biologically-active tissue factor-positive microvesicles. *Arterios. Throm. Vascul. Biol.* 2007; 27(2): 430-435.
193. Lynch H. Genetic counseling in cleft lip and cleft palate / H. Lynch, W. Kimberlink // *Plast. Reconstr. Surg.* – 1981. – Vol. 11. – P. 800-815.
194. Marlin-Neto J. Funcao ventricular no prolapse de valve mitral: efeitos do bloqueto beta-adrenergico com e sem atividade simpatomimetica intrinseca / J. Marlin – Neto, L. matter – Junior, B. Macice // *Arg. Bra. Cardiol.* 1989. Vol. 52. P. 247-252.
195. Meng L, Bian Z, Torensma R, Von den Hoff JW. Biological Mechanisms in Palatogenesis and Cleft Palate. *J Dent Res* 2009; 88:22–33.
196. Milan M. 766 cases of oral cleft in Italy. Data from Emilia Romagna (IMER) and northern Italy (NEI) registers / M. Milan, G. Astolfi, S. Volpato// *European Journal of Epidemiology.* – 1994. – Vol. 10, N 3. – P. 317 – 324.
197. Milerad J. Associated malformations in infant with cleft lip and palate: a prospective, population-based study / J. Milerad // *pediatrics.* – 1997. – Vol. 100, №2. – P. 180-186.)
198. Murphy G., Willenbrock F., Crabbe T. et al. Regulation of matrix metalloproteinase activity. *Ann. NY Acad. Sci.* 1994; 732: 31-41.
199. Murphy G. Nagase H. Progress in matrix metalloproteinase research. *Molecular Aspects of Medicine.* 2008; 29: 290-308.
200. Nagase H. Matrix metalloproteinases in Zinc Metalloproteinases in Health and Disease (Hooper N.M., Taylor & Francis, London, UK, 1996; 153-204.
201. Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol. Chem.* 1997; 378(3-4): 151-160.

202. Nagase H., Woessner J.F. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 1999; 274(31):21491-21494) Nagase H., Woessner J.F. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 1999; 274(31):21491-21494.
203. Negi P. Arrhythmias and conduction defects in patients with mitral valve prolapse: a study based on ambulatory monitoring and electrophysiology studies / P. Negi, U. Kaul, V. Dev // *J. Ass Physicians (India)*. – 1992. – Vol. 20. – P. 367 – 370.
204. Nevin N. Cleft lip and palate hypertelorism, brachycephaly, flat facial profile, and congenital heart disease in three brothers / N. Nevin // *Am. J. Med Genet.* 1997. Vol. 73, №4. P. 412 – 415.
205. Nikopensius T, Kempa I, Ambrozaitytė L et al. Variation in FGF1, FOXE1, and TIMP2 genes is associated with nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2011; 91(4):218-25.
206. Oliver R. Neonatal feeding of infants born with cleft lip and/or palate: parental perception of their experience in south Wales / R. Oliver, G. Jones // *Cleft Palate-Craniofacial Journal*. – 1997. – Vol. 34 № 6. – P. 526-532.
207. Orgel J.P., Irving T.C., Miller A. et al. Microfibrillar structure of type I collagen in situ. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2006. 103(24):9001-5.
208. Pei D., Weiss S.J. Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. *Nature* 1995; 375(6528): 244-247.
209. Pino M, Galleguillos C, Torres M, Sovino H, Fuentes A, Boric MA, Johnson MC. Associations between MMP1 and MMP9 activities and ICAM1 cleavage induced by tumor necrosis factor in eutopic endometria of women with endometriosis / M/ Pino [et al.] // *Reproduction*/ 2009/ - Vol. 138, №5. P.837- 847.
210. Puljiz I., Markotić A., Cvetko Krajinović L., Gužvinec M, Polašek O., Kuzman I. Mycoplasma pneumonia in adult community-acquired pneumonia increases matrix metalloproteinase-9 serum level and induces its gene expression in peripheral blood mononuclear cells / Ivan Puljiz, Alemka

- Markotić, Lidija Cvetko, Marija Gužvinec, Ozren Polašek, Ilija Kuzman // *Med Sci Monit.* – 2012 – Vol. 18, №8. P. – 500-505.
211. Qiu Z., Strickland D.K., Hyman B.T. et al. Alpha2-macroglobulin enhances the clearance of endogenous soluble beta-amyloid peptide via low-density lipoprotein receptor-related protein in cortical neurons. *J. Neurochem.* 1999; 73(4), 1393-1398.
212. Qu C.J., Rieppo J., Hyttinen M.M. et al. Human articular cartilage proteoglycans are not under sulfated in osteoarthritis. *Connect. Tiss. Res.* 2007; 48(1):27-33.
213. Ramnath N. Matrix metalloproteinases inhibitors. / Ramnath, N., Creaven, P.J. // *Curr Oncol.* – 2004. - №6. – P. 96-102.
214. Ridker P.M., Buring J.E., Cook N.R. et al. C-reactive protein, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular events: an 8-year follow-up of 14,719 initially healthy American women. *Circulation* 2003; 107(3):391-397.
215. Roodman G.D., Van der Laan W.H., Tak P.P. et al. Human matrix metalloproteinase-13 mediates cartilage proteoglycan degradation and is expressed at the invasive front of the synovium in rheumatoid arthritis. *Rheumatol.* 2001; 40(1):55-61.
216. Saha Samir Kumar, Ghosh Pamela, Konar Aditya, Bhattacharya Samir, Sankar Roy Sib. Differential Expression of Procollagen Lysine 2-Oxoglutarate 5-Deoxygenase and Matrix Metalloproteinase Isoforms in Hypothyroid Rat Ovary and Disintegration of Extracellular Matrix / Samir Kumar Saha [et al.] // *Endocrinology.* – 2005. – Vol.146, №7. – P. 2963 – 2975.
217. Sanford LP, Ormsby I, Gittenberger-de Groot AC, Sariola H, Friedman R, Boivin GP, Cardell EL, Doetschman T. TGF- $\beta$ 2 knockout mice have multiple developmental defects that are nonoverlapping with other TGF $\beta$  knockout phenotypes. *Development* 1997 Jul; 124(13):2659-70.
218. Sato, H., Takino T., Okada Y. et al. A matrix metalloproteinase expressed on surface of invasive tumor cells. *Nature.* 1994. 370(6484): 61-5.

219. Schonweiler B., Schonweiler R., Schmelzeisen R. Language development in children in children with cleft palate / B. Schonweiler, R. Schonweiler, R. Schmelzeisen // *Folia Phoniatr. Logop.* – 1996. №48. – P. 92-97.
220. Shapiro S.D, Senior R.M. Matrix metalloproteinases. Matrix degradation and more// *Am J. Respir. Cell Mol. Biol.*- №20.-1999.-P.1102-1999.
221. Smahel Z. Facial growth and development during puberty in unilateral cleft lip palate: a longitudinal study / Z. Smahel, Z. Mullerova // *J. Craniofac. Genet. Dev. Biol.* – 1994. Vol. 14. №1. P. 57-68.
222. Smane L, Pilmane M, Akota I. Apoptosis and MMP-2, TIMP-2 expression in cleft lip and palate. *Stomatologija*. 2013; 15(4):129-34.
223. Sogimoto S. Potential differences between primipara and multipara in the incidence of cleft lip and palate in mice (letter) / S. Sogimoto, N. Natsume, S. Miura // *Plast. Recosts. Surg.* – 1998. – Vol. 82, № 3. – P. 558-560.
224. Somiari S.B. Circulating MMP2 – 2 and MMP – 9 in breast cancer – potencial role in classification of patients into low risk, high risk, benign disease and breast cancer categories / S.B. Somiari [et al.] // *Int. J. Cancer.* – 2006. – Vol. 119, №6. – P. 1403-1411.
225. Sounni Nor Eddine, Paye Alexandra, Host Lorin, Noël Agnès. MT-MMPs as regulator of vessel stability associated with angiogenesis / 96. Nor Eddine Sounni, Alexandra Paye,Lorin Host, Agnès Noël // *Frontiers in Pharmacology.* – 2011. – Vol.2. – article 111.
226. Stefanidakis M., Koivunen E. Cell-surface association between matrix metalloproteinases and integrins: role of complex in leukocyte migration and cancer progression. *Blood*. 2006; 108(5): 1441-1450.
227. Stewart M.G. Introduction to Cleft Lip and Palate, Baylos of Medcine in Huston, Texas. - 1991.
228. Taher, A.A . Cleft lip and palate in Tehran / A.A. Taher // *Cleft Palate Craniofac. J.* – 1992. – Vl. 29, №1. – P. 15-16.
229. Tatum S. Perspectives on Palatoplasty Facial Plastic Surgery / S Tatum, C. Senders. 1993. Vol. 9, 1993, № 3. P. 225-231.

230. Ushiki T. Collagen Fibres, recicular fibres and elastic fibres. A comprehensive understanding from a morphological viewpoint. Arch. Histol Cytol. 2002; 65(2): 109-126.
231. Van Den Steen, P.E. Gelatinize B/MMPI9 and neutrophilcollagenase/MMPI8 process the chemokines human GCP-2/ CXCL6, ENA-78/CXCL5 and mouse GCP-2/LIX and modelate their physiological activities / P.E. Van Den Steen [et al.] // Eur. J. Biochem. – 2002. – Vol. 270. P. 3739-3749
232. Van Wart H.E., Birkedal-Hansen H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990; 84(14): 5578-5582.
233. Verstappen J. Von den Hoff JW. Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPIs: their biological functions and involvement in oral disease. J Dent Res 2006;85:1074-84.
234. Vise R., Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases structure, function and biochemistry. Cire Res 2003; 92: 827-839.
235. Wang T, Yamashita K, Iwata K, Hayakawa T. Both tissue inhibitors of metalloproteinases – 1 (TIMPI-1) and TIMPI-2 activate Ras but though different pathways. Biochem Biophys Res Commun 2002; 296:201-05.
236. Wassenaar A., Verschoor T., Kievits F. et al. CD40 engagement modulates the production of matrix metalloproteinases by gingival fibroblasts. Clin. Exp. Immunol. 1999; 115(1), P. 161-167.
237. Werb Z, Chin JR. Extracellular matrix remodeling during morphogenesis. Ann N Y Acad Sci 1998;857: P. 110-8
238. Westermarck J. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion./ Westermarck J., Kähäri V.M.// FASEB J., 1999. Vol. 13, №8. P. 781-792.

239. Westling L. Temporomandibular joint dysfunction and systemic joint laxity / L. Westling, S. Holm, I. Wallentine // Oral. Surg. Med. Oral. Pathol. 1992. Vol. 74. P. 709 –718.
240. Whitehill T. Electropalatographic and perceptual analysis of the speech of Cantonese children with cleft palate / T. Whitehill, S. Stokes, B. Hardcastle // European Journal of Disorders of Communication. 1995. Vol. 30, №2. P. 193 – 202.
241. Woessner J.F. Jr. Role of matrix proteases in processing enamel proteins. Connect Tissue Res. 1998; 39(1-2):P. 69-73.
242. Xue M., March L., Sambrook P.N., Jackson C.J. Differential Regulation of matrix metalloproteinase 2 and matrix metalloproteinase 9 by Activated Protein C Relevance to inflammation in Rheumatoid Arthritis /Xue M., March L., Sambrook P.N., Jackson C.J. // Arthritis Rheumatism. 2007. Vol. 56, №9. P. 2864-2874.
243. Zuccherro T.M. Interferon Regulatory Factor 6 (IRF6) Gene Variants and the Risk of Isolated Cleft Lip or Palate / T.M. Zuccero // New England Journal of Medicine. Vol. 351. P. 769-780.)
244. Zucher S. Selective matrix metalloproteinase (MMP) inhibitors in cancer therapy: Ready for prime time? / S. Zucker, J. Cao // Cancer. Biol. Ther. 2009. Vol.8, №24. P. 2371-2373.



## Приложения

### Приложение 1 – Концентрация белка в супернатанте в образцах полученных в ходе биопсии

Номер образца	Белок (мг/мл)	Белок (мг/мл)НП
1	0,07	0,09
2	0,105	0,077
3	5,155	4,819
4	0,075	0,077
5	0,07	0,079
6	0,08	0,058
7	0,043	0,045
8	0,057	0,048
9	0,036	0,031
10	0,05	0,066
11	0,103	0,056
12	0,042	0,086
13	0,032	0,134
14	0,06	0,038
15	0,037	0,033
16	0,07	0,077
17	0,07	0,07
18	0,083	0,117
19	0,155	0,579
20	0,08	0,058
21	0,06	0,042
22	0,055	0,04
23	0,053	0,033
24	0,06	0,038
25	0,028	0,037
26	0,037	0,033
27	0,05	0,087
28	0,1	0,098
29	0,07	0,066
30	0,066	0,108
31	0,067	0,054
32	0,103	0,056
33	0,066	0,108
34	0,049	0,07
35	0,055	0,04
36	0,066	0,054
37	0,068	0,128
38	0,1	0,098
39	0,087	0,149
40	0,067	0,054
41	0,044	0,566
42	0,041	0,04
43	0,028	0,56

44	0,034	0,09
45	0,066	0,059
46	0,05	0,057
47	0,068	0,128
48	0,087	0,149
49	0,72	0,06
50	0,075	0,077
51	0,07	0,079
52	0,06	0,108
53	0,091	0,039
54	0,044	0,066
55	0,132	0,06
56	0,073	0,026
57	0,05	0,038
58	0,054	0,087
59	0,043	0,045
60	0,05	0,066
61	0,034	0,09
62	0,073	0,026
63	0,07	0,077
64	0,083	0,117
65	0,09	0,079
66	0,07	0,066
67	0,06	0,042
68	0,044	0,104
69	0,06	0,108
70	0,053	0,033
71	0,55	0,107
72	0,05	0,057
73	0,05	0,038
74	0,049	0,07
75	0,044	0,104
76	0,054	0,087
77	0,091	0,039
78	0,09	0,079
79	0,057	0,059
80	0,036	0,031
81	0,042	0,086
82	0,041	0,04
83	0,032	0,134
84	0,05	0,087

Приложение 2 – Результаты иммуноферментного анализа ММП2, ММП3, ТИМП2, TGFβ2 в образцах с патологией и в образцах вне зоны патологии.

Номер образца	TGF-β2 пг/мл	ММП2 нг/мл	ММП3 нг/мл	ТИМП2 нг/мл	TGF-β2 пг/млНП	ММП2 нг/млНП	ММП3 нг/млНП	ТИМП2 нг/млНП
1	5,489	6,096	2,065	2,985	2,345	3,211	0,789	1,844
2	133,967	20,174	14,146	8,48	9,211	1,423	1,576	0,703
3	6,357	6,872	7,548	3,585	5,928	6,235	2,477	4,819
4	16,118	1,654	0,054	0,518	9,211	0,333	12,18	1,038
5	38,564	26,829	16,479	8,208	21,711	20,17	13,376	0,679
6	1,453	11,594	11,585	3,981	0,273	9,6	0,272	0,377
7	30,263	5,167	2,118	2,035	3,618	2,956	0,856	0,019
8	7,263	2,426	9,241	5,963	4,786	0,342	6,843	4,702
9	8,224	1,297	2,851	9,224	6,724	0,673	0,742	7,183
10	5,921	3,674	4,278	5,921	0,658	0,586	1,141	0,658
11	6,579	0,957	0,272	6,579	2,765	0,205	0,072	1,579
12	24,013	3,568	1,269	24,013	21,447	0,514	0,205	21,523
13	25,987	3,496	4,751	25,987	4,276	0,333	0,846	4,276
14	32,912	0,093	5,046	32,912	7,564	0,024	1,087	8,474
15	22,5	0,857	0,553	17,5	11,513	0,296	0,167	11,513
16	10,855	0,307	0,163	10,855	6,25	0,067	0,087	6,25
17	8,705	7,096	2,965	3,985	5,302	5,874	1,854	2,075
18	75,329	19,896	6,418	8,753	28,463	4,964	0,054	3,277
19	5,486	14,957	2,5	4,819	5,928	6,235	2,477	4,911
20	21,853	1,594	1,585	1,981	11,376	0,6	0,272	0,377
21	10,868	8,167	1,034	0,184	4,224	5,277	0,647	0,043
22	6,908	0,237	0,387	6,908	5,921	0,185	0,195	5,921
23	21,053	0,9	1,307	21,053	12,5	0,296	0,159	12,5
24	22,912	0,133	3,046	32,912	8,508	0,027	1,087	8,508
25	7,237	2,133	3,424	4,284	6,25	1	1,3	2,504
26	12,5	0,351	0,495	12,5	11,513	0,296	0,279	11,513
27	17,257	0,315	0,684	0,567	17,763	0,222	0,522	0,467
28	8,434	2,493	0,624	2,006	7,237	1,019	0,289	1,459
29	24,013	0,643	1,222	0,387	20,25	0,407	0,707	0,268
30	29,276	1,683	2,759	0,07	23,142	1,794	2,391	0,042
31	11,316	0,829	0,375	0,178	9,868	0,463	0,243	0,045
32	5,579	1,757	0,272	6,579	2,158	0,552	0,071	2,158
33	29,276	18,111	4,783	0,17	24,479	15,564	2,391	0,042
34	2,764	1,547	1,598	0,454	0,627	0,439	0,43	0,128
35	6,908	0,185	0,187	6,908	5,921	0,096	0,098	5,921
36	2,632	1,269	0,143	0,356	1,974	0,894	0,084	0,91
37	6,803	13,316	7,895	4,256	4,605	12,421	5,989	3,407
38	18,434	4,493	0,924	2,006	7,237	1,019	0,075	1,459
39	8,237	5,133	3,424	2,504	6,25	4,897	3,124	1,3
40	10,868	0,829	0,376	0,178	6,316	0,463	0,253	0,045
41	0,184	0,514	3,566	11,184	0,056	0,308	2,009	8,385
42	3,289	1,347	2,384	3,289	3,012	0,629	1,956	2,954
43	0,184	0,514	7,566	11,184	0,056	0,308	2,009	8,385
44	12,829	0,671	0,485	12,829	12,134	0,943	0,398	10,476
45	2,632	1,269	0,163	1,356	1,544	0,956	0,086	0,879
46	9,539	0,098	1,454	0,22	8,553	0,067	1,304	0,172
47	14,803	19,316	2,989	6,407	4,605	17,13	2,435	5,879
48	7,237	5,133	3,424	14,284	6,25	1	1,3	2,504
49	18,75	3,296	4,457	1,146	15,461	0,8	0,054	0,416
50	16,118	1,654	12,18	1,038	9,211	0,333	0,054	0,518
51	38,564	26,829	16,479	8,208	21,711	17,453	12,395	0,679
52	16,118	0,074	0,87	0,131	5,592	0,071	0,564	0,016
53	19,737	5,651	10,984	0,138	5,921	2,142	3,587	0,045
54	0,184	0,514	3,566	11,184	0,056	0,308	2,609	9,396

55	20,75	2,296	0,257	1,146	10,461	0,8	0,054	0,416
56	23,25	1,541	1,196	23,25	7,513	0,275	0,165	7,513
57	5,592	0,319	0,054	0,352	4,934	0,112	0,024	0,083
58	0,098	0,074	1,163	0,076	0,065	0,071	1,196	0,058
59	4,263	0,279	0,103	0,035	3,618	0,134	0,072	0,019
60	0,921	0,731	1,451	0,921	0,658	0,586	1,141	0,658
61	12,829	1,671	0,404	12,829	11,326	0,943	0,354	11,326
62	34,25	1,358	0,496	34,25	11,513	0,331	0,094	11,513
63	7,855	0,128	0,163	7,855	6,25	0,099	0,87	6,25
64	75,329	19,896	6,418	8,753	54,784	15,964	4,054	5,277
65	27,632	1,827	0,845	1,582	16,118	1,225	0,643	0,776
66	20,013	1,643	1,522	0,687	6,25	0,407	0,707	0,268
67	11,868	5,277	2,431	0,184	8,224	2,167	0,983	0,091
68	6,395	5,325	1,141	2,228	6,579	3,241	1,043	0,46
69	7,118	0,074	0,87	0,131	7,592	0,054	0,64	0,076
70	24,053	0,991	0,74	24,053	12,5	0,296	0,18	12,5
71	9,967	2,174	4,146	2,48	9,211	1,423	1,576	2,703
72	9,539	2,376	1,584	0,32	8,553	2,12	1,304	0,172
73	5,592	3,578	0,089	0,678	4,934	2,401	0,054	0,352
74	0,397	0,247	0,598	0,454	0,354	0,245	0,573	0,428
75	5,768	0,325	1,141	0,228	6,579	0,241	1,207	0,46
76	1,274	0,074	2,163	0,076	0,984	0,056	1,196	0,058
77	3,737	0,576	2,774	0,138	5,921	0,795	3,587	0,045
78	1,818	2,188	0,591	1,182	1,632	1,827	0,375	0,776
79	5,263	0,426	7,241	5,263	4,718	0,326	6,879	5,006
80	8,224	3,404	2,371	8,224	7,862	2,693	1,948	7,862
81	12,013	0,397	0,471	12,013	23,749	0,501	0,514	23,749
82	3,289	0,865	0,305	3,289	3,101	0,629	0,285	3,101
83	1,387	0,142	0,105	25,987	4,276	0,333	0,25	4,276
84	16,763	0,122	0,522	0,367	17,763	0,145	1,254	0,439