

III рівнях (амбулаторна допомога): Наказ МОЗ України від 22 листопада 2000 р., № 305 // *Стоматолог.* — 2001. — № 1–2 (33–34). — С. 11–12.

6. *Бирюков В. С., Журавель В. В.* Медико-технологические стандарты 3-го поколения: концептуально-методологический подход в свете требований международных стандартов качества ISO 9000 // *Сучасний стан та перспективи розвитку соціальної медицини та організації охорони здоров'я: напрямки та шляхи реформування системи охорони здоров'я (до 80-річчя кафедри соціальної медицини, управління та економіки охорони здоров'я): Матеріали міжнар. наук.-практ. конф. 18-19.09., м. Одеса, 2003 р.* — Одеса: ОДМУ, 2003. — С. 209–216.

7. *Стандарти акредитації лікувально-профілактичних закладів Ук-*

*раїни.* — К.: МОЗ України, 1998. — 100 с.

8. *Косенко К. М., Бахуринський Ю. М., Пашківська Л. А.* Впровадження медико-економічного стандарту в практику стоматології // *Вісник стоматології.* — 1999. — № 2. — С. 43

9. *ДСТУ ISO 9001–2001.* Державний стандарт України системи управління якістю. Вимоги / *Quality management systems. Requirements* // *Чинний від 2001–10–01.* — К.: Стандарти, 2001. — 24 с.

10. *Лехан В. М.* Система охорони здоров'я в Україні: підсумки, проблеми, перспективи. — К.: Сфера, 2002. — 28 с.

11. *Чорномаз В. Ц.* Обґрунтування моделі реструктуризації діяльності та механізмів державного уп-

равління системою первинної медико-санітарної допомоги населенню міста // *Актуальні проблеми державного управління: Зб. наук. пр.* — Одеса: ОРІДУ НАДУ, 2004. — № 2 (18). — С. 151–165.

12. *Журавель В. И. Куроедов Л., Журавель В. В.* Договорное медицинское страхование как альтернативная система медицинской помощи гражданам // *Ліки України.* — 2000. — № 9. — С. 9–12.

13. *Шейман И. М.* Реформа управления и финансирования здравоохранения. — М.: Центр, 1998. — 336 с.

14. *Разработка и использование новых методов оплаты амбулаторно-поликлинической помощи / А. И. Закиров, Л. Е. Исакова, Р. М. Зелькович и др.* — Кемерово: Програма ЗдравРеформ, 1996. — 125 с.

УДК 616.315-007.254-055.7-036.22

**Ф. Каринчи<sup>1</sup>, Н. Олейник<sup>2</sup>, Ф. Педзетти<sup>3</sup>, М. Мартинелли<sup>4</sup>,  
А. Авантаджиато<sup>1</sup>, П. Каринчи<sup>3</sup>, Э. Падула<sup>5</sup>, У. Бачильеро<sup>5</sup>, Ф. Гомбос<sup>6</sup>,  
Г. Лейно<sup>6</sup>, Р. Рулло<sup>6</sup>, Р. Чензи<sup>7</sup>, Ф. Карлс<sup>8</sup>, Л. Скаполи<sup>4</sup>**

## **ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ФОРМИРОВАНИЯ ВРОЖДЕННЫХ РАСЩЕЛИН ВЕРХНЕЙ ГУБЫ И НЕБА: ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **Сообщение 2**

<sup>1</sup>Кафедра челюстно-лицевой хирургии, школа медицины университета г. Феррара (Феррара, Италия); <sup>2</sup>Кафедра челюстно-лицевой хирургии Одесского государственного медицинского университета (Одесса, Украина); <sup>3</sup>Центр молекулярной генетики, Фонд CARISBO, Институт гистологии и общей эмбриологии, школа медицины университета г. Болонья (Болонья, Италия); <sup>4</sup>Департамент морфологии и эмбриологии, секция гистологии и эмбриологии, Центр биотехнологии университета г. Феррара (Феррара, Италия); <sup>5</sup>Отдел челюстно-лицевой хирургии, Гражданский госпиталь (г. Виченца, Италия); <sup>6</sup>Дентальная клиника, Второй университет г. Неаполя, (Неаполь, Италия); <sup>7</sup>Кафедра челюстно-лицевой хирургии, Гражданский госпиталь г. Ровиго (Ровиго, Италия); <sup>8</sup>Кафедра челюстно-лицевой хирургии, Госпиталь Джона Редклифа (Оксфорд, Великобритания)

### **МОДЕЛИ ИССЛЕДОВАНИЯ НА ЖИВОТНЫХ**

Исследования на крысах были предложены для изучения влияния различных препаратов на развитие эмбриональной патологии и намного

позже стали использоваться для получения информации о генах и биохимических процессах. Анализ результатов исследования на животных затруднен тем, что несиндромная расщелина губы у мышей является генетически поли-

морфной и отличается от врожденной расщелины неба [1].

### **Стероиды**

Расщелина губы и расщелина неба индуцируются в потомстве мышей, которым в период беременности вводят



кортикостероиды. Процент варьирует в связи с породой мышей, дозой препарата и стадией беременности, на которой применяется препарат.

Diewert и Pratt (1981) установили влияние кортизона на объем внеклеточного матрикса и количество клеток небных отростков у A/J мышей [2]. Развитие небных отростков отставало и только у половины животных достигало горизонтальной позиции во всех отделах неба. Melnick и соавторы изучили морфогенез губы и тератогенные эффекты в условиях применения триамцинолона гексациетонида на восьмой день гестации [3]. Частота расщелины губы в изучаемой группе A/J мышей была в 3 раза выше, чем в контрольной. У пораженного A/J эмбриона отмечалось уменьшение размеров латеральных носовых отростков. Далее, Gasser и соавторы исследовали семейства мышей для выяснения восприимчивости к кортизониндуцированной расщелине неба и установили роль генов, связанных с локусом H-2 на хромосоме 17 [4]. Позже те же исследователи выделили участок хромосомы, несущий так называемый ген восприимчивости к орофациальным расщелинам-1 (the cleft palate susceptibility-1 gene, Cps-1) [5]. Juriloff и Mah отметили основной для развития ВРГН ген на мышинной хромосоме 11 в участке, имеющем соответствие с человеческой 17q21 до 24 [6].

Jaskoll и соавторы проанализировали влияние, связанное с развитием четырех глюкокортикоидчувствительных генов (TGFβ1, TGFβ2, TGFβ3 и эпидермального фактора роста) в развивающемся небе мыши при введении глюкокортикоидов или без него [7]. Глюкокортикоиды замедляют снижение регуляции небной TGFβ2 транскриптазы, которая, как известно, блокирует быструю пролиферацию кле-

ток. Авторы выдвинули гипотезу, что TGFβ2 — медиатор глюкокортикоидного эффекта.

### **Ретиноевая кислота**

Ретиноевая кислота (РК) необходима для различных биологических процессов и нормального эмбрионального развития, но является тератогенной в высоких концентрациях. У грызунов один из главных пороков, вызванных РК, — расщелина неба.

Разнообразное воздействие ретиноидов на развитие подопытных животных обусловлено тремя различными формами РК рецепторов (РКР). Damt и соавторы показали, что РКР $\alpha$ , РКР $\beta$  и РКР $\gamma$  могут быть конвертированы в отрицательные транскрипционные регуляторы, которые блокируют неуправляемый тип функционирования РКР [8]. У трансгенных мышей мутировавший РКР может индуцировать расщелину неба у потомства. Naitoh и соавторы исследовали нормальную экспрессию РКР $\alpha$ , РКР $\beta$  и т-РНК РКР $\gamma$  во вторичном небе зародышей мышей. Было также изучено воздействие всех транс- и 13-цис изомеров ретиноевой кислоты на экспрессию т-РНК рецепторов РК [9]. Прием беременными мышами ретиноевой кислоты вызывал расщелину неба у 94 % эмбрионов и повышал у последних количество РКР $\beta$  в небе. Данные исследования показали, что индукция РКР $\beta$  т-РНК в небе эмбриона коррелирует с содержанием в ткани транс-РК, что предполагает возможное участие РКР $\beta$  в механизмах формирования РК-индуцированной расщелины.

Degitz и соавторы изучили роль нарушений уровня TGFβ при РК-индуцированных расщелинах неба [10]. Прием ретиноевой кислоты вызвал уменьшение интра- и экстрацеллюлярных форм TGFβ1-протеина, тогда как структуры локализации и уровня TGFβ2- и

TGFβ3-протеинов затронуты не были. Кроме того, изменения в TGFβ изоформах отмечались перед изменениями в строении мезенхимы и, возможно, были медиаторами эффектов РК на развитие мезенхимы.

Nugent и соавторы свидетельствуют, что тератогенные эффекты ретиноевой кислоты и ее роль в формировании расщелины неба могут быть опосредованы X-рецепторами ретиноевой кислоты  $\alpha$  (РХР $\alpha$ ) [11]. Так, применение тератогенных доз РК у мышей с генетически детерминированным отсутствием РХР $\alpha$  приводило к формированию расщелины в значительно меньшем количестве случаев по сравнению с обычными животными.

### **Трансформирующий фактор роста $\alpha$ (TGF $\alpha$ ) и трансформирующий фактор роста $\beta$ (TGF $\beta$ )**

Роль TGF $\alpha$  и TGF $\beta$  исследовалась в течение нескольких лет. Brunet и соавторы маркировали распределение рецепторов эпидермального фактора роста в развивающемся небе мыши [12]. Данные рецепторы были обнаружены во всем небном эпителии, но так как происходило формирование шва и последующее его рассасывание, по среднему краю эпителия наблюдалось снижение регуляции. Механизм снижения регуляции был исследован при помощи TGF $\alpha$  и TGF $\beta$ . Все три TGF $\beta$  изоформы ускоряли синтез неба, определяя возможности уровня регулирования палатогенеза. D'Angelo и соавторы исследовали способность TGFβ1 к синтезу коллагена в клетках мезенхимы эмбрионального неба крысы *in vitro* и показали, что регуляторная функция TGFβ1 при синтезе и деградации коллагена действительно существует [13]. Kaartinen и соавторы вывели мышей-мутантов без TGFβ3 [14]. В течение 20 ч после рождения гомозиготные



TGF $\beta$ 3-/- мыши, наделенные уникальными и стойкими фенотипическими особенностями, которые включают и нарушения палатогенеза, умирают. В отличие от других трансгенных мышей-мутантов с расщелиной неба, у TGF $\beta$ 3-/- мышей отмечены другие сопутствующие пороки развития челюстно-лицевой области. Последние исследования Тауа и соавторов показали, что, возможно, TGF $\beta$ 3 регулирует патогенез, стимулируя филоподий на внешней мембране клеток небного эпителия перед слиянием небных выступов [15].

### **Антиконвульсанты**

Известно, что применение антиконвульсантов связано с повышенным риском развития врожденных пороков [16]. Так, Hansen и соавторы исследовали механизм тератогенного действия фенитоина [17]. В ходе эксперимента была обнаружена положительная корреляция вероятности развития расщелины неба и пониженного уровня фолатов в плазме крови беременных мышей, на которых в период гестации воздействовали фенитоином. Поскольку активность метилентетрагидрофолатредуктазы (МТГФР) в тканях печени беременных мышей была снижена, но не изменена в клетках эмбриона, авторы сделали вывод, что фенитоин влияет на метаболизм фолатов в организме матери. В следующем исследовании эти ученые обнаружили взаимосвязь между уровнем фенитоина в плазме и кортикостероном [18]. Было высказано предположение, что высокий уровень кортикостерона в плазме, после применения фенитоина у A/J мышей на протяжении органогенеза, может быть одним из факторов развития ВРГН.

Известно, что ГАМК также влияет на развитие расщелин. Тоссо и соавторы показали (1987), что применение диазе-

пама способствует увеличению частоты появления расщелины неба у мышей [19]. Впоследствии Culiati и соавторы отметили, что нарушение последовательной структуры участка гена, отвечающего за развитие расщелины неба (ср1), в мышинной хромосоме 7 в 95 % случаев — причина образования сквозной, рецессивной расщелины — неонатально летального порока у этих животных [20]. Авторы предположили, что субъединица  $\beta$ 3 участка гена (ГАМК $\beta$ 3) ГАМК-рецептора и есть ср1. С целью проверки данной гипотезы, Culiati и соавторы провели эксперимент по исправлению фенотипа с помощью введения трансгенного ГАМК $\beta$ 3 в дефектную мышиную гомозиготу. Результаты данных исследований подтверждают, что ГАМК $\beta$ 3 и является ср1 [21]. Позже Notanics и соавторы наблюдали мышей, имеющих  $\beta$ 3 ген, инактивировав ген ГАМК-рецепторов типа А [22]. Большинство из  $\beta$ 3 дефицитных мышей умерли в неонатальном периоде; причем у некоторых из них были обнаружены расщелины неба.

Напомним, что ГАМК синтезируется в фермент путем декарбоксилирования глутаминовой кислоты при участии соответствующего фермента. Condie и соавторы разрушали последовательную структуру одного из двух генов, кодирующих образование у мышей фермента декарбоксилазы глутаминовой кислоты, что сопровождалось возникновением дефектов в формировании неба [23]. Значительное сходство фенотипа при мутациях, обусловленных дефектом рецепторов и лиганда, убедительно доказывает важную роль ГАМК в процессе нормального развития неба.

В настоящее время известны, как минимум, 2 изоформы декарбоксилазы глутаминовой кислоты (ГАД65 и ГАД67) — ключевого фермента син-

теза ГАМК. Asada и соавторы методами генной инженерии получили ГКД67-/- мыши [24]. Выявлено, что все особи с данным генотипом имели резко сниженное содержание ГАМК в головном мозге (до 7–20 % от нормы) и были не жизнеспособны вследствие тяжелых расщелин неба.

### **Эндотелин**

Появление метода «обстрела» генов из генной пушки дало возможность идентифицировать несколько дополнительных генов, принимающих участие в формировании расщелины. А именно, было показано, что некоторые доминантно отрицательные мыши имели орофациальные расщелины как часть фенотипа. Представляет интерес тот факт, что эндотелин-1 (endothelin-1 (EDN1)) — один из возможных генов, который выявлен на хромосоме в области расположения ОФР-1 на 6р23, — влияет на отклонение развития черепно-лицевой области, включая расщелину неба [25]. Более того, мыши с дефицитом эндотелинконвертирующего фермента 1, или эндотелин-А рецепторов, имели практически идентичные отклонения, как в случае с недостаточностью EDN1 [26; 27].

### **Прочие генетические факторы**

Открыты и другие гены, которые иногда приводят к появлению расщелин. Msx1 гомеобоксген выявлен на разных участках эпителиально-мезенхимального взаимодействия в течение эмбриогенеза позвоночных. Чтобы определить фенотипические последствия его дефицита, Satokata и соавторы вывели мышей с дефицитом функций Msx1 [28]. У всех Msx1-гомозиготных особей возникает расщелина вторичного неба, наблюдаются недоразвитие нижней и верхней челюстей и наруше-



ния закладки и развития зубов. У этих мышей выявлены также нарушения в развитии носовых, лобных, парietальных костей и молоточка в среднем ухе.

В ходе трансгенной мутации у грызунов обнаружилось изменение в фенотипе строения черепа и сцепленная с полом расщелина неба. Laverty и соавторы клонировали разделенный геномный X-сцепленный локус и сообщили об обнаружении гена mCASK, который является эффекторным элементом трансдукции [29].

Zhao и соавторы сообщили, что Lhx8, недавно идентифицированный LIM гомеобоксен, выражен в мезенхиме палатинальных структур мыши в период их развития [30]. Авторы вывели грызунов с отсутствием Lhx8 гена. У Lhx8-гомозиготных эмбрионов, двусторонние первичные палатинальные выступы формировались и поднимались нормально, но часто были не в состоянии соединиться должным образом, что приводило к расщелине вторичного неба. Поскольку развитие других структур черепно-лицевой области было нормальным, порочное формирование неба у трансгенных Lhx8 мышей было, наиболее вероятно, вызвано характерным первичным дефектом в мезенхиме небных выступов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Juriloff D. M., Harris M. J., Brown C. J. Unravelling the complex genetics of cleft lip in the mouse model // *Mamm Genome*. — 2001. — Vol. 12, N 6. — P. 426-435.
2. Diewert V. M., Pratt R. M. Cortisone-induced cleft palate in A/J mice: failure of palatal shelf contact // *Teratology*. — 1981. — Vol. 24, N 2. — P. 149-162.
3. Melnick M., Jaskoll T., Slavkin H. C. Corticosteroid-induced cleft lip in mice: a teratologic, topographic, and histologic investigation // *Am. J. Med. Genet.* — 1981. — Vol. 10, N 4. — P. 333-350.
4. Genes in mice that affect susceptibility to cortisone-induced cleft palate are closely linked to Ir genes on chromosomes 2 and 17 / D. L. Gasser, L. Mele, D. D. Lees, A. S. Goldman // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1981. — Vol. 78, N 5. — P. 3147-3150.
5. Restriction fragment length polymorphisms, glucocorticoid receptors, and phenytoin-induced cleft palate in congenic strains of mice with steroid susceptibility differences / D. L. Gasser, A. Goldner-Sauve, M. Katsumata, A. S. Goldman // *J. Craniofac. Genet. Dev. Biol.* — 1991. — Vol. 11, N 4. — P. 366-371.
6. Juriloff D. M., Mah D. G. The major locus for multifactorial nonsyndromic cleft lip maps to mouse chromosome 11 // *Mamm. Genome*. — 1995. — Vol. 6, N 2. — P. 63-69.
7. Developmental expression and CORT-regulation of TGF-beta and EGF receptor mRNA during mouse palatal morphogenesis: correlation between CORT-induced cleft palate and TGF-beta 2 mRNA expression / T. Jaskoll, H. A. Choy, H. Chen, M. Melnick // *Teratology*. — 1996. — Vol. 54, N 1. — P. 34-44.
8. Functional inhibition of retinoic acid response by dominant negative retinoic acid receptor mutants / K. Damm, R. A. Heyman, K. Umehano, R. M. Evans // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1993. — Vol. 90, N 7. — P. 2989-2993.
9. Altered expression of retinoic acid (RA) receptor mRNAs in the fetal mouse secondary palate by all-trans and 13-cis RAs: implications for RA-induced teratogenesis / H. Naitoh, C. Mori, Y. Nishimura, K. Shiota // *J. Craniofac. Genet. Dev. Biol.* — 1998. — Vol. 18, N 4. — P. 202-210.
10. Role of TGF-beta in RA-induced cleft palate in CD-1 mice / S. J. Degitz, D. Morris, G. L. Foley, B. M. Francis // *Teratology*. — 1998. — Vol. 58, N 5. — P. 197-204.
11. The role of RXR-alpha in retinoic acid-induced cleft palate as assessed with the RXR-alpha knockout mouse / P. Nugent, H. M. Sucov, M. M. Pisano, R. M. Greene // *Int. J. Dev. Biol.* — 1999. — Vol. 43, N 6. — P. 567-570.
12. Brunet C. L., Sharpe P. M., Ferguson M. W. The distribution of epidermal growth factor binding sites in the developing mouse palate // *Int. J. Dev. Biol.* — 1993. — Vol. 37, N 3. — P. 451-458.
13. TGF beta 1 regulation of collagen metabolism by embryonic palate mesenchymal cells / M. D'Angelo, J. M. Chen, K. Ugen, R. M. Greene // *J. Exp. Zool.* — 1994. — Vol. 270, N 2. — P. 189-201.
14. Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF-beta 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction / V. Kaartinen, J. W. Voncken, C. Shuler et al. // *Nat. Genet.* — 1995. — Vol. 11, N 4. — P. 415-421.
15. Taya Y., O'Kane S., Ferguson M. W. Pathogenesis of cleft palate in TGF-beta3 knockout mice // *Development*. — 1999. — Vol. 126, N 17. — P. 3869-3879.
16. Durner M., Greenberg D. A., Delgado-Escueta A. V. Is there a genetic relationship between epilepsy and birth defects? // *Neurology*. — 1992. — Vol. 42, N 4. — Suppl 5. — P. 63-67.
17. Alterations in maternal plasma corticosterone levels following treatment with phenytoin / D. K. Hansen, R. R. Holson, P. A. Sullivan, T. F. Grafton // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* — 1988. — Vol. 96, N 1. — P. 24-32.
18. Hansen D. K., Billings R. E. Phenytoin teratogenicity and effects on embryonic and maternal folate metabolism // *Teratology*. — 1985. — Vol. 31, N 3. — P. 363-371.
19. Tocco D. R., Renskers K., Zimmerman E. F. Diazepam-induced cleft palate in the mouse and lack of correlation with the H-2 locus // *Teratology*. — 1987. — Vol. 35, N 3. — P. 439-445.
20. Concordance between isolated cleft palate in mice and alterations within a region including the gene encoding the beta 3 subunit of the type A gamma-aminobutyric acid receptor / C. T. Culiati, L. Stubbs, R. D. Nicholls et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1993. — Vol. 90, N 11. — P. 5105-5109.
21. Deficiency of the beta 3 subunit of the type A gamma-aminobutyric acid receptor causes cleft palate in mice / C. T. Culiati, L. J. Stubbs, R. P. Woychik et al. // *Nat. Genet.* — 1995. — Vol. 11, N 3. — P. 344-346.
22. Mice devoid of gamma-aminobutyrate type A receptor beta3 subunit have epilepsy, cleft palate, and hypersensitive behavior / G. E. Homanics, T. M. DeLorey, L. L. Firestone et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1997. — Vol. 94, N 8. — P. 4143-4148.
23. Cleft palate in mice with a targeted mutation in the gamma-aminobutyric acid-producing enzyme



glutamic acid decarboxylase 67 / B. G. Condie, G. Bain, D. I. Gottlieb, M. R. Capecchi // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1997. — Vol. 94, N 21. — P. 11451-11455.

24. *Cleft* palate and decreased brain gamma-aminobutyric acid in mice lacking the 67-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase / H. Asada, Y. Kawamura, K. Maruyama et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1997. — Vol. 94, N 12. — P. 6496-6499.

25. *Elevated* blood pressure and craniofacial abnormalities in mice deficient in endothelin-1 / Y. Kurihara,

H. Kurihara, H. Suzuki et al. // Nature. — 1994. — Vol. 368, N 6473. — P. 703-710.

26. *Dual* genetic pathways of endothelin-mediated intercellular signaling revealed by targeted disruption of endothelin converting enzyme-1 gene / H. Yanagisawa, M. Yanagisawa, R. P. Kapur et al. // Development. — 1998. — Vol. 125, N 5. — P. 825-836.

27. *Cranial* and cardiac neural crest defects in endothelin-A receptor-deficient mice / D. E. Clouthier, K. Hosoda, J. A. Richardson et al. // Development. — 1998. — Vol. 125, N 5. — P. 813-824.

28. *Satokata I., Maas R.* Msx1 deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development // Nat. Genet. — 1994. — Vol. 6, N 4. — P. 348-356.

29. *Laverty H. G., Wilson J. B.* Murine CASK is disrupted in a sex-linked cleft palate mouse mutant // Genomics. — 1998. — Vol. 53, N 1. — P. 29-41.

30. *Isolated* cleft palate in mice with a targeted mutation of the LIM homeobox gene *lhx8* / Y. Zhao, Y. J. Guo, A. C. Tomac et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1999. — Vol. 96, N 26. — P. 15002-15006.

*Передплачуйте  
і читайте*

## ОДЕСЬКИЙ МЕДИЧНИЙ ЖУРНАЛ

Передплата приймається у будь-якому передплатному пункті

У випусках журналу:

- ◆ Теорія і експеримент
- ◆ Клінічна практика
- ◆ Профілактика, реабілітація, валеологія
- ◆ Нові технології
- ◆ Огляди, рецензії, дискусії



Ціна передплати на півріччя (три номери):

- для підприємств та організацій — 60 грн;
- для індивідуальних передплатників — 30 грн.

Передплатні індекси:

- для підприємств та організацій — 48717;
- для індивідуальних передплатників — 48405.

