Poziom wybranych metaloproteinaz oraz ich inhibitorów w ślinie osób z rozszczepem szczęki

OREST SZCZYGIELSKI
ANDRZEJ PRZYLIPIAK
ALICJA KARWOWSKA
ADAM KURIANIUK

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Poziom wybranych metaloproteinaz oraz ich inhibitorów w ślinie osób z rozszczepem szczęki

Orest Szczygielski

Andrzej Przylipiak

Alicja Karwowska

Adam Kurianiuk

Białystok, 2025

Recenzenci

Dr hab. n. med. Małgorzata Knaś

prof. Państwowej Wyższej Szkoły Informatyki i Przedsiębiorczości w Łomży

dr hab. n. o zdr. Ewa Kleszczewska

prof. Państwowej Uczelni Zawodowej w Suwałkach

Autorzy monografii

Orest Szczygielski

Andrzej Przylipiak

Alicja Karwowska

Adam Kurianiuk

Zakład Higieny, Epidemiologii i Zaburzeń Metabolicznych

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Nr ISBN: 978-83-978350-2-3

Wydawnictwo: Uniwersytet Medyczny w Białymstoku 2025

SPIS TREŚCI

1. WSTĘP.....6

1.1. Etiopatogeneza wad rozszczepowych.....6

1.2. Rodzaje, występowanie i etiologia wad rozszczepowych.....9

1.3. Ślina - charakterystyka ogólna.....14

1.4. Ślina jako materiał diagnostyczny.....19

1.5. Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej – charakterystyka i podział.....21

1.5.1. Budowa strukturalna MMPs.....24

1.5.2. Regulacja aktywności metaloproteinaz.....25

1.5.3. Tkankowe inhibitory metaloproteinaz.....26

1.5.4. Znaczenie metaloproteinaz.....28

1.5.5. MMP-3 i MMP-9.....31

1.5.6. MMP-3 i MMP-9 w chorobach twarzoczaszki.....33

2. CEL PRACY.....36

3. MATERIAŁY I METODY.....37

3.1. Materiał do badań.....37

3.1.1. Grupa badana oraz grupa kontrolna.....37

3.1.2. Pobieranie i przechowywanie materiału 37

3.2. Metody badań.....38

3.2.1. Aparatura.....40

3.2.2. Wskaźniki diagnostyczne.....40

3.3. Analiza statystyczna.....41

4. WYNIKI 43

4.1. Ocena stężenia MMP-3, MMP-9 i TIMP-3 u pacjentów z rozszczepami wargi i/lub podniebienia oraz u osób zdrowych.....43

4.2. Ocena występowania MMP3, MMP i TIMP3 w rozszczepie wargi i szczęki.....46

5. DYSKUSJA.....54

6. WNIOSKI.....60

7. PIŚMIENNICTWO 61
8. STRESZCZENIE 74
9. STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM 76
10. SPIS RYCIN 78
11. SPIS TABEL 80

WYKAZ UŻYWANYCH SKRÓTÓW

CLP – rozszczep wargi i/lub podniebienia (cleft lip and/or palate)

MMPs – metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (matrix metalloproteinases)

TIMPs – tkankowe inhibitory metaloproteinaz (tissue inhibitors of matrix metalloproteinases)

FGF – fibroblastyczny czynnik wzrostu

TGF-β – transformujący czynnik wzrostu beta

EUROCAT – Europejski Rejestr Wad Wrodzonych

PPWR – Polski Rejestr Wrodzonych Wad Rozwojowych

PRPs – białka bogate w prolinę

ECM – macierz zewnątrzkomórkowa

GPI – glikozylofosfatydyloinozytol

VEGF – naczyniowy czynnik wzrostu (vascular-endothelial growth factor)

TNF-α – czynnik martwicy nowotworu α (tumor necrosis factor α)

EGF – naskórkowy czynnik wzrostu (epidermal growth factor)

IL-1 – interleukina 1

ADAMs – enzymy zawierające
domenę dezintegryny i metaloproteinazy (disintegrin and metaloproteinases domain)

ELISA – metoda immunoenzymatyczna

ROC – krzywa ROC (Receiver Operating Characterstics)

SE – czułość diagnostyczna

SP – swoistość diagnostyczna

NPV – wartość predykcyjna wyniku ujemnego

PPV – wartość predykcyjna wyniku dodatniego

AUC – pole pod krzywą ROC (area under curve)

SD – odchylenie standardowe

p – poziom istotności

1. WSTĘP

1.1. Etiopatogeneza wad rozszczepowych.

Rozszczepy wargi i/lub podniebienia (CLP – cleft lip and/or palate) to jedne z najczęściej występujących wad wrodzonych u dzieci. Patologia ta wywołuje bardzo istotne konsekwencje medyczne, psychologiczne, socjologiczne i ekonomiczne (1).

Rozszczepy wargi powstają jako następstwo zaburzeń embriogenezy między 4. a 7. tygodniem ciąży i są wynikiem penetracji tkanki mezodermalnej pod pokrywę ektodermalną otaczającą pierwotną jamę ustną. Rozszczepy podniebienia powstają między 7. a 12. tygodniem ciąży poprzez połączenie wyrostków podniebiennych ze sobą oraz przegrodą nosa i kością przysieczną (2).

Uważa się, że wady rozszczepowe mają złożoną etiologię, na którą składają się zarówno czynniki środowiskowe jak i predyspozycje genetyczne. Wada powstaje wówczas, gdy wśród genów kontrolujących rozwój wargi i podniebienia, dochodzi do przewagi genów nieprawidłowych nad prawidłowymi oraz do przekroczenia wartości progowej (3). Istotne przyczyny to zmiany w obrębie morfologii chromosomów, genetyczna wrażliwość na czynniki teratogenne oraz udział określonych genów w złożonych mechanizmach genowych (3, 4).

Czynniki genetyczne (polimorfizm i mutacja genów, aberracje chromosomów i uwarunkowania rodzinne) stanowią około 20 % wszystkich czynników mających wpływ na powstawanie rozszczepu podniebienia. Na podstawie badań naukowych stwierdzono, iż bezpośrednio za wystąpienie rozszczepów odpowiada region chromosomalny 9q21. W kolejnych doniesieniach badawczych wskazano na istotną korelację między regionem 9q22.3-34.1 a pojawieniem się wady rozszczepowej. Analiza wyników badań amerykańskich naukowców wykazała, iż w tym regionie znajdują się geny odpowiedzialne za rozszczep wargi i podniebienia. Ocenie poddano również geny z rodziny WNT (WNT3, WNT3A, WNT5A, WNT8A, WNT9B, WNT11), które mają wpływ na rozwój wargi i środkowego piętra twarzy (5, 6). Doniesienia literaturowe wielu innych autorów wskazują, iż mutacje w obrębie takich czynników genetycznych jak np. BX22, FOXE1, PVRL1, MSX1,

FLNA, FGFR1, TFAP2A, są odpowiedzialne za powstawanie rozszczepów wargi i podniebienia, ponieważ zaburzają one rozwój struktur jamy ustnej (7-9). Rozszczepy podniebienia mogą powstawać również w wyniku synergistycznego oddziaływania zmutowanych genów TGF alfa, MSX1, BCL3, RARA i w chromosomach 6p23 - 24 i 4 (1, 10-13).

Wystąpienie rozszczepów wargi i/lub podniebienia powiązano z modyfikacją genów w obrębie czynników wzrostu i ich receptorów, m.in. dotyczy to genów kodujących fibroblastyczny czynnik wzrostu 8 (FGF8), a także jego receptor (FGFR1) (14). Na pojawienie się rozszczepów wpływa również defekt genu kodującego transformujący czynnik wzrostu beta (TGF-β) (15). Doniesienia naukowe innych badaczy wykazały, iż mutacje w obrębie czynników transkrypcyjnych także mogą wpływać na wystąpienie rozszczepów. Dotyczy to m.in. takich czynników transkrypcyjnych jak MSX1 (16), TBX22 (9) oraz IRF6 (17). Ponadto w badaniach genetycznych przeprowadzonych przez Dixona i wsp. (4) wykazano, iż rozszczepy wargi i/lub podniebienia występowały częściej u bliźniąt monozygotycznych (36%) niż u bliźniąt heterozygotycznych (4,7%).

Również polimorfizm genów TPH2, SLC6A4 oraz SERPINA6 są czynnikami, które zwiększają prawdopodobieństwo urodzenia dziecka z rozszczepem twarzoczaszki w badanej grupie kobiet populacji polskiej. Dotyczy to ciężarnej kobiety zagrożonej stresem psychologiczmym lub też zaburzonym statusem hormonalnym. Oprócz wymienionych genów najważniejszymi genami predysponującymi do powstaniu chorób rozszczepowych twarzy są IRF6, VAX1, ABCA4, BMP4, FGFR2, FOXE1, MAFB, MSX1, MYH9 oraz chromosomowe loci 8q24 i 17q22. Szacuje się, że wariant nukleotydowy genu IRF6 jest odpowiedzialny za około 12 - 18 % wszystkich obserwowanych rozszczepów twarzy (17-21).

Czynniki środowiskowe, oceniane na około 10 % przyczyn rozszczepów podniebienia, dotyczą wpływów teratogennych i mutagennych na komórki płciowe ojca i/lub matki przed zapłodnieniem lub bezpośrednio na zarodek. Czynniki środowiskowe mogą mieć pochodzenie biologiczne, fizyczne lub chemiczne. Wśród toksycznych działań

środowiskowych wyróżnia się niekorzystne działanie fenytoiny, kwasu retinoidowego, metotreksatu, alkoholu, tytoniu, wirusów, chorób metabolicznych i hormonalnych oraz promieni rentgenowskich (4).

Wśród czynników środowiskowych ważną rolę odgrywa wiek rodziców. Wykazano, iż wyższe ryzyko urodzenia dziecka z rozszczepem podniebienia występuje w przypadku, gdy ojciec (ryzyko zwiększone o 58%) lub matka (ryzyko zwiększone o 28%) znajdują się w wieku powyżej 40 lat, natomiast ryzyko wystąpienia rozszczepu wargi i/lub podniebienia jest 56% wyższe (22). Dlatego w przypadku rodzinnego występowania rozszczepów w obrębie twarzoczaszki u wszystkich pacjentów zaleca się korzystanie z poradni genetycznej (23). Do innych czynników środowiskowych, mających wpływ na rozwój rozszczepów twarzoczaszki zalicza się palenie papierosów, picie alkoholu i spożywanie leków przez ciężarną kobietę. Na podstawie doniesień literaturowych wykazano, iż palenie papierosów może mieć niekorzystny wpływ na modyfikację genów, zmieniając w ten sposób ścieżki metaboliczne płodu i tym samym prowadząc do rozwoju wad rozszczepowych twarzoczaszki (24). Duńscy naukowcy w swoich badaniach klinicznych badali wpływ palenia i obecności alleli TGFA. Wykazano, iż ta interakcja nieznacznie zwiększa ryzyko rozwoju rozszczepu wargi i/lub podniebienia (25). Dodatkowo podejrzewa się, iż spożywanie alkoholu przez matkę we wczesnym okresie ciąży zwiększa ryzyko rozszczepów twarzoczaszki. W badaniach przeprowadzonych w Norwegii naukowcy badali związek między spożywaniem alkoholu przez matkę a ryzykiem wystąpienia wad rozszczepowych. Zwiększone ryzyko rozwoju tej wady było widoczne u matek spożywających alkohol oraz niosących haplotyp ADH1C (związany ze zmniejszonym metabolizmem alkoholu) (26). Ponadto spożywanie przez ciężarną dużych dawek alkoholu we wczesnym okresie ciąży również zwiększa ryzyko wystąpienia wad rozszczepowych (27).

Istotną rolę w zapobieganiu rozszczepom wargi i/lub podniebienia odgrywa dieta matki, zwłaszcza suplementacja kwasu foliowego podczas ciąży. W badaniach wykazano, iż przyjmowanie kwasu foliowego może zmniejszać ryzyko rozwoju rozszczepów twarzoczaszki (28). Dodatkowo stwierdzono, iż antagoniści kwasu foliowego zwiększają

ryzyko wystąpienia tych wad wrodzonych. Kobiety stosujące inhibitor reduktazy dihydrofolianowej w okresie, kiedy ma to wpływ na rozwój zarodka, były bardziej narażone na urodzenie dziecka z wadą rozszczepową. Zaobserwowano, iż suplementacja kwasu foliowego może zapobiegać tym wadom, ze względu na to, iż powoduje to słabsze powiązanie między inhibitorami reduktazy dihydrofolianowej a rozszczepami twarzoczaszki (29).

Jak większość wad rozwojowych jednego narządu, rozszczep wargi i/lub podniebienia jest uwarunkowany wieloczynnikowo. Często dochodzi do wzajemnego oddziaływania czynników genetycznych i środowiskowych, co oznacza że genotyp ma wpływ na występowanie podatności na działanie czynników zewnętrznych, tzw. interakcja gen/środowisko. Badania naukowców wykazały synergistyczne działanie pomiędzy paleniem papierosów a występowaniem polimorfizmu w obrębie genu TGFA. Obecność mutacji w tym genie, połączona z paleniem papierosów przez matkę dziecka, będącego nosicielem tego allelu, zwiększa ryzyko powstania rozszczepów (30).

Wady izolowane i zespołowe rozszczepu twarzoczaszki u płodu zwiększają ryzyko przedwczesnego odklejenia łożyska, przedwczesnego pęknięcia błon płodowych, rzucawki płodowej oraz konieczności indukcji porodu lub wykonania cięcia cesarskiego.

1.2. Rodzaje, występowanie i epidemiologia wad rozszczepowych

Wady wrodzone twarzoczaszki pod postacią rozszczepów wargi i/lub podniebienia u dzieci stanowią 14 – 17 % wszystkich nieprawidłowości rozwojowych. Wady rozszczepowe zostały podzielone na rozszczep podniebienia pierwotnego i wtórnego, ze względu na różny mechanizm ich powstawania (embriologiczny i patofizjologiczny). Podniebienie pierwotne obejmuje: wargę, wyrostek zębodołowy szczęki, a także część podniebienia twardego położoną od przodu w stosunku do otworu przysiecznego. Podniebienie wtórne składa się z podniebienia miękkiego oraz tkanek położonych od tyłu od otworu przysiecznego w obrębie podniebienia twardego (8, 31).

W 1922 r. Davis i Ritchie sklasyfikowali wady rozwojowe na trzy grupy w zależności od ich położenia w stosunku do wyrostka zębodołowego:

- Grupa I: rozszczepy przed wyrostkiem zębodołowym, jednostronne, środkowe lub obustronne.
- Grupa II: rozszczepy obejmujące tylko podniebienie miękkie, podniebienie miękkie i twarde lub rozszczep podśluzówkowy.
- Grupa III: rozszczepy w wyrostku zębodołowym, jednostronne, obustronne lub środkowe (32).

Kilka lat później Veau i wsp. wyodrębnili cztery grupy, natomiast w 1942 r. Fogh-Anderson przedstawił klasyfikację wad rozszczepowych w oparciu o kryteria morfologiczne. Na podstawie wieloletnich badań Fogh-Anderson przedstawił dwie grupy rozszczepów: I – rozszczepy wargi i/lub podniebienia, II – rozszczepy podniebienia wtórnego (33). Omawiane podziały nie uwzględniały jednak stopnia nasilenia wady rozszczepowej i nie charakteryzowały się dużą użytecznością kliniczną.

Obecnie najczęściej wykorzystuje się dwa podziały: klasyfikację embriologiczną według Kernahana i Starka opracowaną w 1958 r. oraz klasyfikację anatomiczną opracowaną przez Bardacha i Perczyńską–Partykę w 1963 r. (31). W podziale embriologicznym otwór przysieczny stanowi granicę pomiędzy podniebieniem pierwotnym a wtórnym. Zostały w nim wyróżnione 3 grupy:

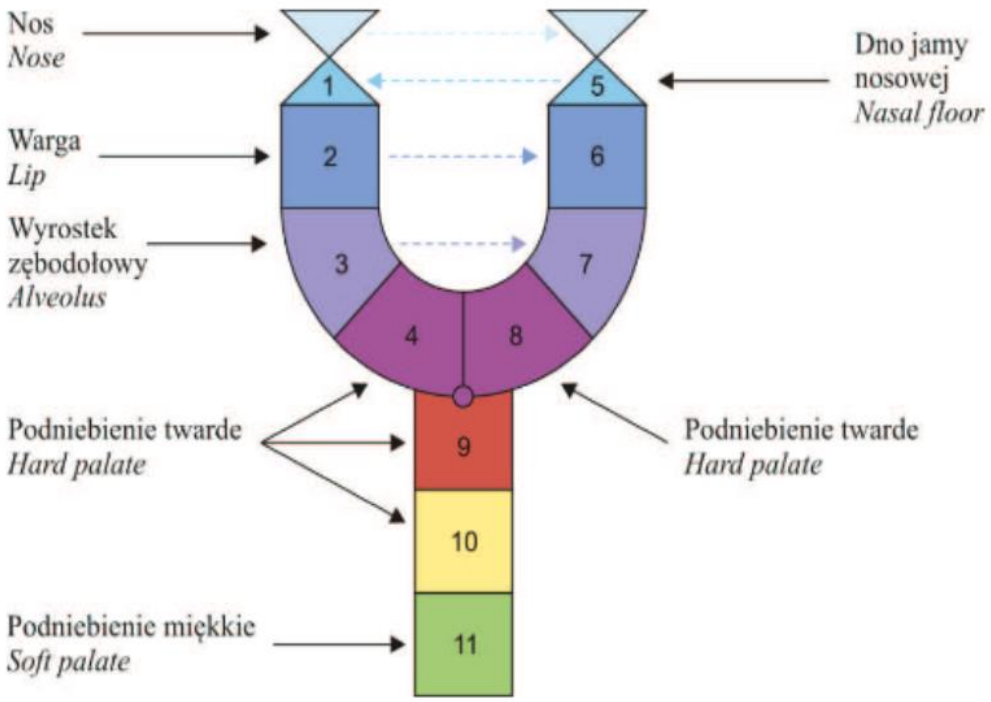
- I – rozszczepy podniebienia pierwotnego, obejmujące wargę i wyrostek zębodołowy (A - lewostronny, B - prawostronny, C - środkowy, D - obustronny, 1 - całkowity, 2 - częściowy),
- II – rozszczepy podniebienia wtórnego (1 - całkowity, 2 - częściowy, 3 – podśluzówkowy),

- III – rozszczepy podniebienia pierwotnego i wtórnego obejmujące wargę, wyrostek zębodołowy i podniebienie (A - lewostronny, B - prawostronny, C - środkowy, D - obustronny 1 - całkowity, 2 - częściowy) (31).

W latach 1971-1973 klasyfikacja ta została zmodyfikowana przez Kernahana, gdzie rozszczep przedstawiono w postaci graficznej jako dużą literę Y. Podniebienie wtórne stanowiło podstawę litery Y, natomiast obszar pomiędzy ramionami litery odpowiadał podniebieniu pierwotnemu (Rycina 1) (34).

Podział anatomiczny opracowany przez Bardacha i Perczyńską-Partykę uwzględnia lokalizację i zasięg rozszczepów. Linię podziału stanowi otwór przysieczny, oddzielający podniebienie pierwotne od podniebienia wtórnego. Klasyfikacja obejmuje pięć grup rozszczepów:

- grupa I: rozszczepy wargi (1 – podskórno-podśluzówkowy, 2 – częściowy, 3 – całkowity, a - jednostronny prawy lub lewy, b - środkowy, c - obustronny),
- grupa II: rozszczepy wargi i wyrostka zębodołowego (1 – podskórno-podśluzówkowy, 2 – częściowy, 3 – całkowity, a - jednostronny prawy lub lewy, b - środkowy, c - obustronny),
- grupa III: rozszczepy podniebienia (1 – podśluzówkowy, 2 – częściowy podniebienia miękkiego, 3 – całkowity podniebienia miękkiego, 4 – całkowity podniebienia miękkiego i częściowy podniebienia twardego,5 – całkowity podniebienia miękkiego i twardego),
- grupa IV: rozszczepy wargi, wyrostka zębodołowego i podniebienia (1 – jednostronny prawy lub lewy, 2 – obustronny),
- grupa V: rozszczepy kombinowane (35).



Rycina 1. Klasyfikacja rozszczepów wargi i podniebienia według Kernahana. Zmodyfikowano na podstawie (34).

Rejestracją wad wrodzonych w Europie zajmuje się utworzony w 1979 r. EUROCAT (Europejski Rejestr Wad Wrodzonych), natomiast w Polsce Polski Rejestr Wrodzonych Wad Rozwojowych (PPWR), który od 2001 r. został włączony w sieć EUROCAT (36).

Na podstawie PRWWR wykazano, iż częstość występowania rozszczepu wargi i/lub podniebienia na terenie Polski objętym tym rejestrem wynosiła 14,9 żywych urodzeń i była większa od średniej dla krajów EUROCAT (14,6/10 0000 żywych urodzeń). W Tabeli 1 przedstawiono częstość występowania rozszczepów wargi i/lub podniebienia na terenie województw objętych Polskim Rejestrem Wrodzonych Wad Rozwojowych w latach 2005-2006 (36).

Szacuje się, że na całym świecie wada rozszczepowa w obrębie twarzoczaszki dotyka jednego na 600-1000 żywo urodzonych dzieci (37, 38). Średnia częstość występowania

wszelkich form rozszczepów twarzy na świecie określono na około 1,7/1000 żywych urodzeń. Według EUROCAT wskaźnik częstości występowania rozszczepów twarzoczaszki wynosi 1,5/1000 żywo urodzonych dzieci. Polska jest wymieniana wśród krajów z najczęstszym występowaniem tych wad wrodzonych. Wskaźnik występowania rozszczepu podniebienia w populacji polskiej stanowi od 0,42/1000 do 0,84/1000 żywo urodzonych dzieci, a dane z lat 2005–2006 Polskiego Rejestru Wad Wrodzonych podają 0,63/1000 rozszczepów podniebienia wtórnego u żywo urodzonych dzieci. Inne badania epidemiologiczne w Polsce oceniają częstość występowania wad rozszczepowych średnio na 1,67 przypadka na 1000 żywych urodzeń (36).

Wady te mogą występować w postaci izolowanej jak i zespołowo. Odnotowano ponad 350 zespołów, w których występują rozszczepy twarzoczaszki. Mogą one być wynikiem aberracji chromosomalnych (np. trisomia 13 chromosomu - zespół Pataua) lub mutacja pojedynczych genów (np. zespół van der Woude z genem IRF6 z lokalizacją genu 1g41; zespół CLPED - ektodermalna dysplazja z genem PVRL1 z lokalizacją genu 11g23; zespół Opitz sprężony z chromosomem X z genem MID1 z lokalizacją genu Xp22.3, inne zespoły z genami: PTCH1, MSX1 i odpowiednią lokalizacją genu) (39-41).

Z badań epidemiologicznych wynika również, że 60-80% wszystkich dzieci z rozszczepami wargi i podniebienia jest płci męskiej, natomiast izolowany rozszczep podniebienia występuje nieco częściej u dziewcząt. Związane jest to prawdopodobnie z tym, że unoszenie i łączenie wyrostków podniebiennych u embrionów żeńskich następuje kilka dni później niż u embrionów męskich, co powoduje większe ryzyko wystąpienia zaburzeń rozwojowych u embrionów żeńskich (1, 38).

Tabela 1. Częstość występowania rozszczepów wargi i/lub podniebienia na terenie województw objętych Polskim Rejestrem Wrodzonych Wad Rozwojowych w latach 2005-2006 (na 10 000 urodzeń) (36).

Województwo	L. dzieci z wadami	Częstość
Dolnośląskie	101	19,2
Kujawsko-pomorskie	66	15,8
Lubelskie	72	16,7
Lubuskie	43	21,0
Łódzkie	65	14,1
Mazowieckie	123	11,9
Opolskie	24	14,1
Podkarpackie	53	12,9
Pomorskie	48	10,0
Śląskie	146	17,5
Warmińsko-mazurskie	38	12,7
Wielkopolskie	112	15,5
Zachodniopomorskie	52	15,9

1.3. Ślina – charakterystyka ogólna

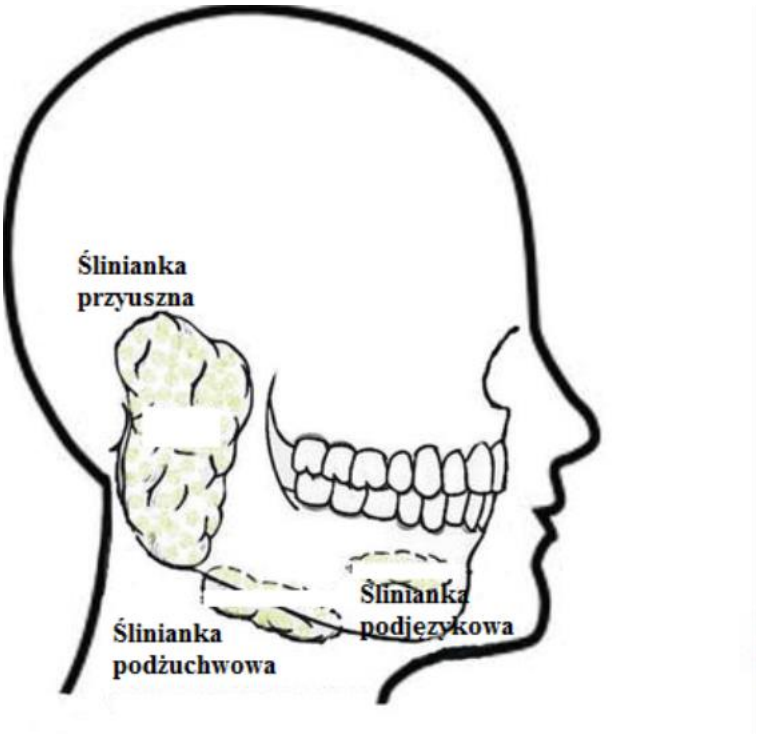
Ślina człowieka jest wydzielana przez ślinianki przyuszne, podjęzykowe i podżuchwowe oraz gruczoły ślinowe rozsiane w błonie śluzowej warg, podniebienia, języka, policzków. W jej skład wchodzą liczne substancje, takie jak enzymy, substancje śluzowe,

składniki przeciwbakteryjne itp. Ślina jest płynem mieszanym, ponieważ składa się ze śliny wydzielanej zarówno przez duże, jak i mniejsze gruczoły ślinowe, które są zarówno surowicze jak i śluzowe (42, 43). Duże gruczoły ślinowe w 90% wydzielają ślinę i zalicza się do nich ślinianki przyuszne, podżuchwowe i podjęzykowe. Pozostała część śliny jest wytwarzana przez mniejsze gruczoły ślinowe (44).

Występują dwa rodzaje śliny: stymulowana i niestymulowana. Ślina niestymulowana (spoczynkowa) jest śliną podstawową, wydzielaną w 65% przez ślinianki przyuszne i podjęzykowe do jamy ustnej. Jest produkowana przez komórki surowicze gruczołów ślinowych w postaci płynnej, wodnistej i przejrzystej wydzieliny. W wyniku żucia lub poruszania językiem, ustami dochodzi do mieszania się śliny, pochodzącej z różnych gruczołów. Przedstawione rodzaje śliny różnią się wartościami pH: ślina niestymulowana wykazuje wartość pH w zakresie 6,5-6,9, natomiast ślina stymulowana 7,0-7,5 (42, 43).

W powstawaniu śliny rozróżnia się II etapy:

- I etap (ślina pierwotna) - wydzielina, która produkowana jest na poziomie zakończeń przewodów pęcherzykowych, jest podobna pod względem zawartości jonów Na+, K+, Cl- i całkowitej osmolalności do płynu pozakomórkowego i zawiera większość składników organicznych śliny ostatecznej. W miarę przepływu śliny przez przewody wstawkowe dochodzi do aktywnego wchłaniania kationów Na+, Ca+, anionów Cl- jak i biernego wydzielania anionów HCO3- i kationów K+ do światła przewodów co powoduje wytwarzania się gradientu osmotycznego, powodującego bierny transport wody.
- II etap (ślina ostateczna) - wskutek złożonych biochemicznych efektów jonów Na, K, Cl w przewodach gruczołowych ich resorbcja odbywa się szybciej niż ich wydzielanie, co powoduje spowolnienie przenikania wody i prowadzi do powstawania śliny hipotonicznej. Przy nadprodukcji śliny skład śliny ostatecznej zbliża się do składu śliny pierwotnej (Rycina 2) (44, 45).

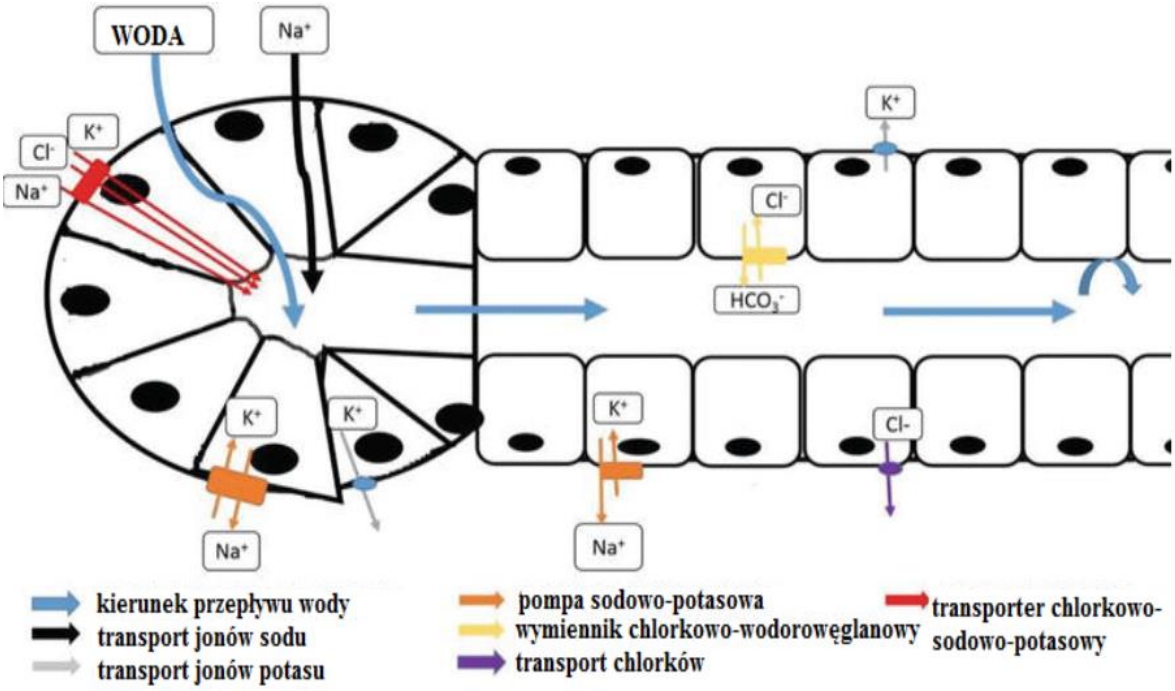


Rycina 2. Lokalizacja anatomiczna dużych i małych gruczołów ślinowych (kolor fioletowy) (45).

Duże gruczoły ślinowe mogą wydzielać ślinę surowiczą albo mieszaną. Ślina pochodząca ze ślinianek przyusznych i językowych (ok. 26% objętości całkowitej) produkowana jest przez komórki surowicze. Wydzielina z ślinianek podniebiennych i nasady

języka to 69% (śluzowa), a pozostałe 5% - to ślina z ślinianek podżuchwowych, podjęzykowych, wargowych i policzkowych (mieszana surowiczo - śluzowa) (46). Wydzielanie śliny jest procesem ciągłym:

- przy braku stymulacji zewnętrznej jest to tzw. ślina spoczynkowa i jej ilość waha się w granicach 0,3 - 0,5 ml / min;
- intensywne pobudzanie chemiczno - mechaniczne (np. przy posiłku) zwiększa ilość wydzieliny do 1,5 - 2,3 ml / min;
- podczas 8-godzinnego snu wydzielanie jest najmniejsze i wynosi do 0,05 ml / min;
- fizjologiczne wydzielanie śliny u dorosłych waha się w zakresie 0,5-1 litra na dobę, u dzieci – w zależności od płci i wieku (u dziewczynek więcej) (47).



Rycina 3. Proces powstawania śliny (45).

Ślina składa się w 99 % z wody, natomiast pozostałą objętość (1%) stanowią białka, elektrolity oraz składniki organiczne i nieorganiczne, które warunkują jej właściwości. pH śliny wynosi ok. 6,6. Składniki organiczne śliny to białka

(immunoglobuliny, cystatyny, amylaza, białka systemu peroksydazy ślinowej, lizozym, histatyny, w tym metaloproteinazy), niebiałkowe substancje azotowe (mocznik, kwas moczowy, aminokwasy, kreatynina), lipidy oraz hormony. Wśród składników nieorganicznych wyróżnia się kationy Na^{+}, K^{+}, Ca^{2+}, Mg^{2+} oraz aniony Cl-, $HCO3^{2-}$, $HPO4^{3-}$ (47).

Wśród białek istotne znaczenie mają immunoglobuliny klasy A, M i G, natomiast w największej ilości występują przeciwciała IgA, które uczestniczą w procesie fagocytozy paciorkowców przez leukocyty (48). Innym ważnym białkiem ślinowym jest mucyna, która w połączeniu z węglowodanami bierze udział w usuwaniu drobnoustrojów z jamy ustnej (49). Kolejnym białkiem są histatyny, syntetyzowane przez komórki ślinianek podżuchwowych i przyusznych, które wykazują właściwości bakteriobójcze i bakteriostatyczne wobec *Streptococcus mutans* oraz grzybów (m.in. *Candida, Aspergillus*) (50, 51). Oprócz przedstawionych białek w ślinie występują także cystatyny, wykazujące działanie ochronne oraz hamujące w stosunku do proteaz bakteryjnych (52). Innymi składnikami charakterystycznymi wyłącznie dla śliny, z wyjątkiem histatyn, są stateryny, białka bogate w prolinę (PRPs). Są produkowane przez ślinianki przyuszne i podżuchwowe oraz wykazują one wysokie powinowactwo do hydroksyapatytu tworzącego szkliwo nazębne. Główną ich funkcją jest ochrona i naprawa szkliwa, a także udział w procesie remineralizacji (47, 52).

Ślina pełni najważniejsze funkcje w zachowaniu homeostazy jamy ustnej m.in. ochronną, buforową, obronną, odżywczą, trawienną i wydzielniczą (53).

Funkcja ochronna jest związana z płynną konsystencją śliny i obecnością glikoprotein. Tworzy ona warstwę chroniącą powierzchnie zębów i błon śluzowych przed czynnikami biologicznymi, mechanicznymi i chemicznymi, a także ułatwia gojenie ran. Ponadto zwilża tkanki umożliwiając artykulację, trawienie i połykanie. Współuczestniczy także w percepcji bodźców smakowych, temperatury i dotyku (46, 53).

Rola obronna śliny polega na zmniejszeniu adhezji bakterii do błon śluzowych i zębów. Możliwe jest to dzięki obecności nieswoistych czynników obronnych - enzymów i

substancji bakteriobójczych - lizozymu, mucyny, peroksydazy ślinowej. Ponadto w ślinie obecne są swoiste czynniki odpornościowe - immunoglobuliny klasy A, G i M (46).

Funkcja buforowa związana jest z utrzymaniem równowagi kwasowo- zasadowej poprzez neutralizacje kwasów organicznych, co w przypadku niewystarczającej zdolności buforowej śliny względem kwasów może prowadzić np. do próchnicy. Jony wodorowęglanowe obecne w ślinie utrzymują prawidłowe pH, zachowując tym samym równowagę kwasowo-zasadową. W przypadku zmiany pH na kwaśne, dochodzi do wiązania jonów wodorowych przez jony HCO_3^- lub amoniak (53).

Związki mineralne obecne w ślinie (jony wapnia, fosforanowe, magnezowe, fluorkowe) odpowiadają za funkcję odżywczą śliny. Uczestniczą one w procesie remineralizacji szkliwa. Ślina jest roztworem nasyconym jonami wapniowymi i fosforanowymi w stosunku do hydroksyapatytów szkliwa przy pH równym 5,5. Przy spadku pH poniżej wartości 5,5 dochodzi do utraty związków mineralnych i powstawania ubytków (48).

Funkcja trawienna związana jest z obecnością enzymów ślinowych (amylaza, lipaza). Amylaza metabolizuje skrobię do maltozy, natomiast lipaza rozkłada część tłuszczów. Ostatnia – funkcja wydalnicza – związana jest z usuwaniem z jamy ustnej różnych związków m.in. jony metali ciężkich, leków i mocznika (49).

Przepływ śliny, a tym samym stężenie jej składników, regulowany jest przez nerwy układu sympatycznego i parasympatycznego.

1.4. Ślina jako materiał diagnostyczny

Obecnie ślina jest coraz częściej wykorzystywana w badaniach laboratoryjnych i klinicznych, jako materiał alternatywny dla krwi. Możliwość jej zastosowania w ocenie stanu zdrowia niesie wiele korzystnych aspektów. Dostępność śliny i nieinwazyjny sposób jej pobrania to ważne zalety tej wydzieliny jako materiału diagnostycznego. Dodatkowo jej pobieranie nie wymaga stosowania specjalistycznego sprzętu oraz udziału wykwalifikowanego personelu medycznego. Ponadto jest to niedrogi i łatwy do uzyskania

materiał. Nieinwazyjny i bezbolesny sposób jej pobierania nie wywołuje stresu u pacjenta, a ponadto jest szczególnie ważne w przypadku małych dzieci oraz osób, u których pobieranie krwi jest niemożliwe (np. pacjenci chorzy na hemofilię). Dodatkowo zastosowanie śliny jako materiału diagnostycznego redukuje ryzyko zakażenia wirusem HIV oraz WZW osób personelu medycznego. W diagnostyce wykorzystuje się najczęściej ślinę mieszaną, ponieważ zawiera ona składniki surowicy i może być wykorzystywana zamiast surowicy do oznaczenia związków, których stężenie w ślinie odzwierciedla ich stężenie w organizmie (dotyczy to tylko takich związków, które przechodzą do śliny w wyniku dyfuzji). Od początku XX wieku ślina wykorzystywana jest do oznaczenia hormonów steroidowych (kortyzol, testosteron, estradiol), leków (benzodiazepiny), w toksykologii do oznaczenia litu, kadmu, galu, do stwierdzenia lub wykluczenia nietrzeźwości kierowców, obecność narkotyków (kokaina). W niektórych chorobach nowotworowych w ślinie są obecne specyficzne markery komórek nowotworowych (np. w raku jajnika marker CA 125 w ślinie wykazuje większą specyficzność niż w surowicy), przeciwciała, czynniki zapalne. Oznaczenia śliny stosowane są także w wykryciu bakterii *Helicobacter pylori*, wirusowych zapaleń wątroby, wirusa *HIV* (54, 55).

Badania nad wykorzystaniem śliny nakierowane są na poszukiwanie rozmaitych markerów, które mogłyby być czynnikami prognostycznymi w etiologii chorób ogólnych jak i w poszczególnych jednostkach nosologicznych. Badanie śliny może służyć też jako monitoring zachodzących procesów stresu oksydacyjnego (55, 56, 57) skuteczności prowadzenia leczenia czy określać podatność jednostki na daną chorobę. Ponadto, wiadomym jest o tym, że ślina zawiera wiele elementów pochodzących z układu odpowiedzi immunologicznej (58).

Jama ustna jest integralną częścią organizmu ludzkiego. Prowadzi to do tego, że wszelkie ogólne stany chorobowe będą wpływały na stan zdrowia jamy ustnej, jak i również tam się objawiały.

1.5. Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej – charakterystyka i podział.

Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (matryksyny) należą do grupy białek z rodziny endoproteaz, które wykazują zdolność do degradacji i destabilizacji składników macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) oraz błony podstawnej (59). MMP tworzą przestrzeń pozwalającą na migrację komórek (m.in. układu odpornościowego), poprzez trawienie białek ECM, a także zmieniają aktywność białek sygnałowych, takich jak czynniki wzrostu, chemokiny i cytokiny (59). Przebudowa ECM zachodząca przy udziale MMP towarzyszy wielu procesom fizjologicznym, takim jak embriogeneza, angiogeneza, gojenie się ran, apoptoza, właściwa migracja komórek, rozwój kości, szkliwa zębów i układu nerwowego (59). Stwierdzono, że MMP są produkowane i wydzielane w postaci nieaktywnych zymogenów do przestrzeni pozakomórkowych lub pozostają zakotwiczone w błonach komórkowych. W zależności od budowy i specyficzności substratowej zostały one podzielone na 5 grup, co przedstawiono w Tabeli 1 (60). Pierwszą grupę stanowią kolagenazy, których główna funkcja związana jest z degradacją kolagenu typu I, II, III, VII, VIII, IX, proteoglikanów, fibrynonektyny. Zalicza się do nich MMP-1 i MMP-8. Druga grupa to żelatynazy (MMP-2, MMP-9), degradujące kolagen typu IV w błonach podstawnych oraz kolagen typu V, VII, żelatynę, lamininę i fibronektynę. Dodatkowo działają one synergistycznie z kolagenazami. Następną grupę stanowią stromielizyny (MMP-3, MMP-10, MMP-11), które trawią białka macierzy zewnątrzkomórkowej: lamininę, fibronektynę, proteoglikany oraz kolagen typu IV. MMP-7 i MMP-26 należą do grupy matrylizyn, które degradują kolagen typu I i IV, żelatynę, lamininę, elastynę, fibronektynę i proteoglikany. Do piątej grupy zalicza się metaloproteinazy typu błonowego (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24, MMP-25), które utrzymują się w strukturze błony komórkowej dzięki obecności C-końcowej domeny transbłonowej. Wykazują one zdolność do degradacji m.in. kolagenu typu I, II, III, żelatyny, lamininy oraz fibronektyny (61, 62).

Tabela 2. Podział metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (61).

Grupa	MMPs	Substraty
Kolagenazy	MMP-1 MMP-8 MMP-13	Kolagen I, II, III, V, VII, VIII, X, agrekan, żelatyna
Żelatynazy	MMP-2 MMP-9	Żelatyna, kolagen I, IV, V, VII, X
Stromielinazy	MMP-3 MMP-10 MMP-11 MMP-18	Kolagen I, IV, V, żelatyna, fibronektyna, elastyna, laminina, agrekan
Matrylizyny	MMP-7	Fibronektyna, laminina, kolagen IV, fibrynogen, żelatyna
Błonowe MMPs	MMP-14 MMP-15 MMP-16 MMP-17 MMP-24 MMP-25	Żelatyna, fibronektyna, laminina, fibryna
Inne	MMP-12 MMP-19 MMP-20 MMP-21 MMP-23 MMP-27 MMP-28	Elastyna, fibronektyna, kolagen IV, agrekan, fibrylina, żelatyna, kazeina

Kolejnym, obecnie funkcjonującym podziałem metaloproteinaz jest podział ze względu na specyfikę substratową. Zgodnie z tym podziałem wyróżnia się 8 grup metaloproteinaz, 5 wydzielniczych i 3 związane z błonami komórkowymi (Tabela 2) (63).

Tabela 3. Podział metaloproteinaz na podstawie specyfiki substratowej (63).

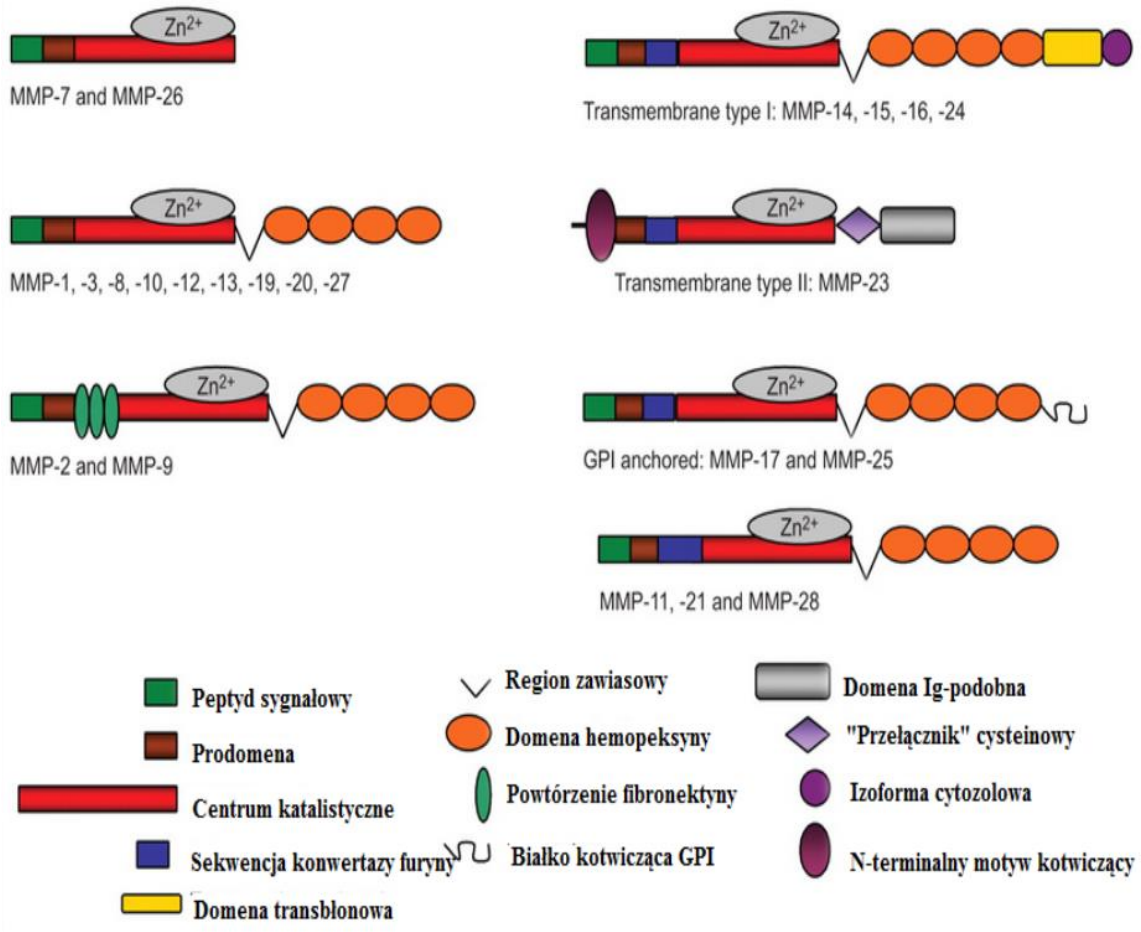
Klasyfikacja MMP wg podziału na podst. specyfiki substratowej	Nowy podział MMPs uwzgl. ich budowę	Charakterystyczne cechy budowy
Matrylizyny	Typ 1 wydzielniczy	Budowa podstawowa: prodomena, domena aktywna
Kolagenazy	Typ 2 wydzielniczy	+ domena podobna do hemopeksyny
Stromielizyny	Typ 3 wydzielniczy	+ domena podobna do hemopeksyny i domena wiążąca furynę
MMP-21 Żelatynaza A	Typ 4 wydzielniczy	+ domena podobna do hemopeksyny, domena wiążąca furynę + domena podobna do fibronektyny
Żelatynaza B	Typ 5 wydzielniczy	+ domeny podobne do fibronektyny i domena podobna do kolagenu typu V
MT-MMP MMP-błonowe Typ I	Typ 1 błonowy	+ domena podobna do hemopektyny i domena wiążąca furynę, domena transbłonowa, domena kotwicząca w błonie komórkowej
MT-MMP TypII(Ig)	Typ 2 błonowy	+ domena wiążąca furynę, szereg cysteinowy i domena podobna do immunoglobuliny (Ig)
MT-MMP Typ GPI	Typ 3 błonowy	+ domena podobna do hemopeksyny i domena wiążąca furynę, glikozylofosfatydyloinozytol (GPI)

1.5.1. Budowa strukturalna MMPs.

Metaloproteinazy należą do enzymów o budowie wielodomenowej i zawierają w swojej budowie: peptyd sygnałowy, prodomenę i domenę katalityczną, w której centrum aktywnym znajduje się jon cynku Zn^{2+}. Oprócz tych dwóch domen występuje dodatkowo domena hemopeksyny i elastyczny łącznik, który odpowiada za jej połączenie z domeną katalityczną (59).

Domena katalityczna odpowiada za aktywność proteolityczną metaloproteinaz i jest zbudowana z pięciu struktur β oraz trzech helis α. Zawiera jeden katalityczny i jeden strukturalny jon cynku oraz od jednego do czterech jonów wapnia Ca^{2+}. W miejscu aktywnym znajduje się konserwatywny motyw, w którym jon cynku koordynowany jest przez trzy histydyny (61).

Prodomena zawiera ok. 80 aminokwasów i utrzymuje enzym w postaci nieaktywnej (zymogen, proMMP) dzięki obecności propeptydu. W jej budowie wyróżnia się cysteinowy motyw, który wiąże się z jonem cynku, niezbędnym do aktywacji białka. Połączenie te pozwala na utrzymanie enzymu w formie zymogenu. Na końcu łańcucha karboksylowego znajduje się domena hemopeksyny, która wykazuje podobieństwo sekwencji do hemopeksyny – białka wiążącego i transportującego hem. MMP-7, MMP-23 i MMP-26 są pozbawione tej domeny, natomiast MMP-12 traci ją bezpośrednio po aktywacji (64). Ważną funkcją domeny hemopeksyny jest m.in. zdolność do rozpoznawania substratu, a także wiązania tkankowego inhibitora metaloproteinaz (TIMP – ang. *tissue inhibitor of metalloproteinase*) przez MMP-9. Oprócz tego w podrodzinie kolagenaz pełni istotną rolę w procesie trawienia struktury kolagenu. Domena hemaopeksyny jest połączona z domeną katalityczną poprzez elastyczny łącznik, który utrzymuje stabilną strukturę cząsteczki MMPs, a także bierze udział w degradacji niektórych substratów metaloproteinaz m.in. kolagenu. Odpowiada on również za specyficzność substratową enzymu. Struktura domen metaloproteinaz została przedstawiona na Rycinie 4 (65).



Rycina 4. Struktura domen MMPs (65).

1.5.2. Regulacja aktywności metaloproteinaz

Aktywność metaloproteinaz w warunkach fizjologicznych jest regulowana na kilku etapach, może odbywać się na poziomie transkrypcji genów, aktywacji proenzymów, inaktywacji przez tkankowe inhibitory metaloproteinaz oraz przez ich kompartmentalizację (62).

Na podstawie badań naukowych wykazano, że regulacja aktywności MMPs na poziomie transkrypcji genów jest kontrolowana przez różne czynniki.

Uwalnianie metaloproteinaz jest stymulowane m.in. przez śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF – vascular-endothelial growth factor), czynnik martwicy nowotworu α (TNF-α – tumor necrosis factor α), naskórkowy czynnik wzrostu (EGF – epidermal growth factor), interleukinę 1 (IL-1), natomiast inhibitorami są transformujący czynnik wzrostu beta (TGF-β – *transforming growth factor-beta*) oraz hormony steroidowe (66).

W obrębie komórki metaloproteinazy są syntetyzowane w formie nieaktywnych proenzymów (proMMP), a następnie wydzielane do przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Aktywacja MMPs zachodzi w wyniku odcięcia prodomeny podczas translacji i odsłonięcia miejsca aktywnego enzymu, w wyniku czego dochodzi do całkowitej zmiany konformacji cząsteczki. Proteolityczna aktywacja enzymu odbywa się dzięki działaniu proteaz serynowych, plazminy, elastazy, aktywatora plazminogenu lub innych MMP (MMP-1, -2, -8, -9). Może także zachodzić pod wpływem różnych substancji chemicznych, niskiego pH lub podwyższonej temperatury. Aktywacja może odbywać się wewnątrzkomórkowo w aparacie Golgiego lub poza komórką. Większość MMPs jest aktywowana poza komórką, ale istnieje grupa enzymów aktywowanych wewnątrzkomórkowo, są to: MMP-11, MMP-23, MMP-28 oraz wszystkie metaloproteinazy błonowe. Działanie proteaz serynowych powoduje aktywację wewnątrzkomórkową MMPs, które są następnie wydzielane lub związane z błoną komórkową w formie aktywnej (67, 68).

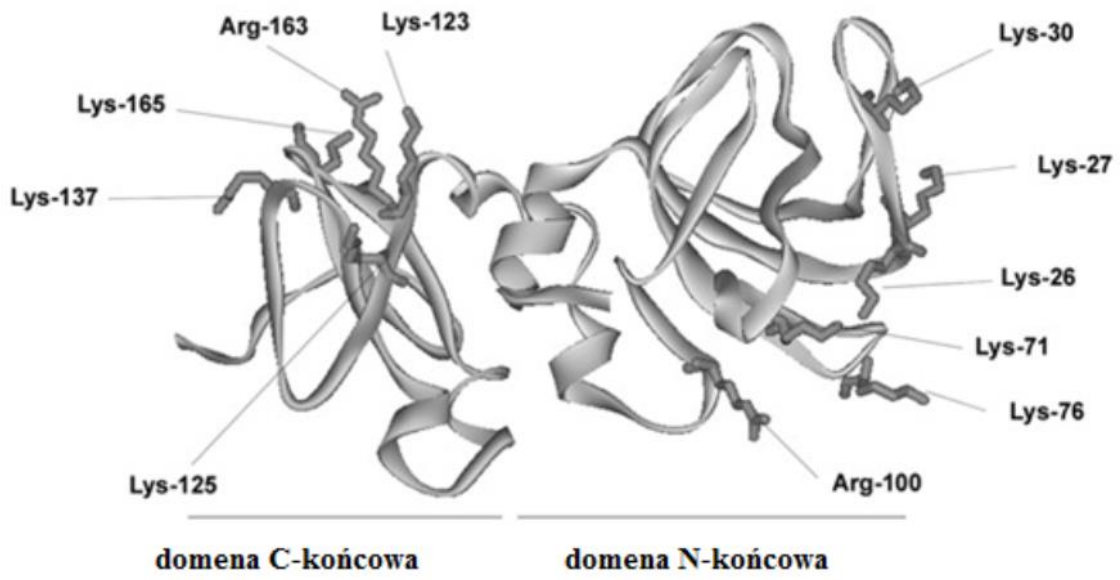
Hamowanie aktywności MMPs zachodzi przy udziale różnych czynników, z których najpowszechniejszymi są tkankowe inhibitory metaloproteinaz. Obecnie u kręgowców odkryto 4 rodzaje TIMPs, oznaczone jako TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 oraz TIMP-4 (69).

1.5.3. Tkankowe inhibitory metaloproteinaz

Udowodniono, iż równowaga pomiędzy produkcją aktywnych enzymów a ich hamowaniem, jest ważnym elementem, pozwalającym uniknąć niekontrolowanej degradacji ECM, stanu zapalnego, a także nasilonego wzrostu i migracji komórek, prowadzących do rozwoju objawów chorobowych. Dwoma głównymi inhibitorami MMPs, znajdującymi się w płynach ustrojowych oraz tkankach są α2-makroglobulina oraz TIMPs. Każda cząsteczka TIMPs składa się z ok. 190 aminokwasów, zbudowanych z dwóch różnych

domen: większej N-końcowej, zawierającej sześć reszt cysteinowych, które umożliwiają wiązanie z domeną katalityczną MMPs oraz mniejszej domeny C-końcowej, łączącej inhibitor z domeną hemopeksyny metaloproteinaz. Konformacja każdej domeny jest stabilizowana przez 3 wiązania di siarczkowe (70). TIMP-1, -2 i -4 występują w formie rozpuszczalnej i są wykrywane w surowicy krwi, natomiast TIMP-3 jest nierozpuszczalny i pozostaje związany z macierzą zewnątrzkomórkową. Główną rolą tkankowych inhibitorów jest utrzymanie równowagi między syntezą a degradacją składników macierzy zewnątrzkomórkowej, zapobiegając nadmiernemu niszczeniu ECM (71).

W badaniach wykazano, iż TIMP-2, TIMP-3 lub TIMP-4 mogą oddziaływać z pro-MMP2, natomiast TIMP-1 lub TIMP-3 z pro-MMP-9 (59). TIMP-3 wykazuje zdolność do hamowania aktywności wszystkich członków rodziny MMP, ale także grupy białek, zawierających domenę dezintegryny i metaloproteinazy (ADAMs – ang. *disintegrin and metaloproteinases domain*). Ponadto TIMP-3 posiada wyjątkową funkcję wiązania się ściśle z ECM swoją domeną N- i C-końcową w celu promowania hamowania MMP, w przeciwieństwie do pozostałych inhibitorów, które są rozpuszczalnymi wolnymi cząsteczkami (72). Na podstawie badań przeprowadzonych na myszach wykazano, iż TIMP-3 wydaje się być bardziej istotnym inhibitorem *in vivo* niż TIMP-1 i TIMP-2, ponieważ utrata aktywności TIMP-3 u myszy jest związana z powiększeniem pęcherzyków płucnych i nasiloną apoptozą w komórkach nabłonkowych przewodu gruczołu sutkowego. Natomiast utrata TIMP-1 lub TIMP-2 u myszy nie powoduje żadnych nieprawidłowości (73). Struktura przestrzenna TIMP-3 została przedstawiona na Rycinie 5, gdzie widoczne są względne pozycje jedenastu reszt aminokwasowych, podczas gdy sześć reszt N-końcowych jest ułożonych w liniowe pasmo, natomiast reszty C-końcowe tworzą koncentryczny okrąg na górze domeny.



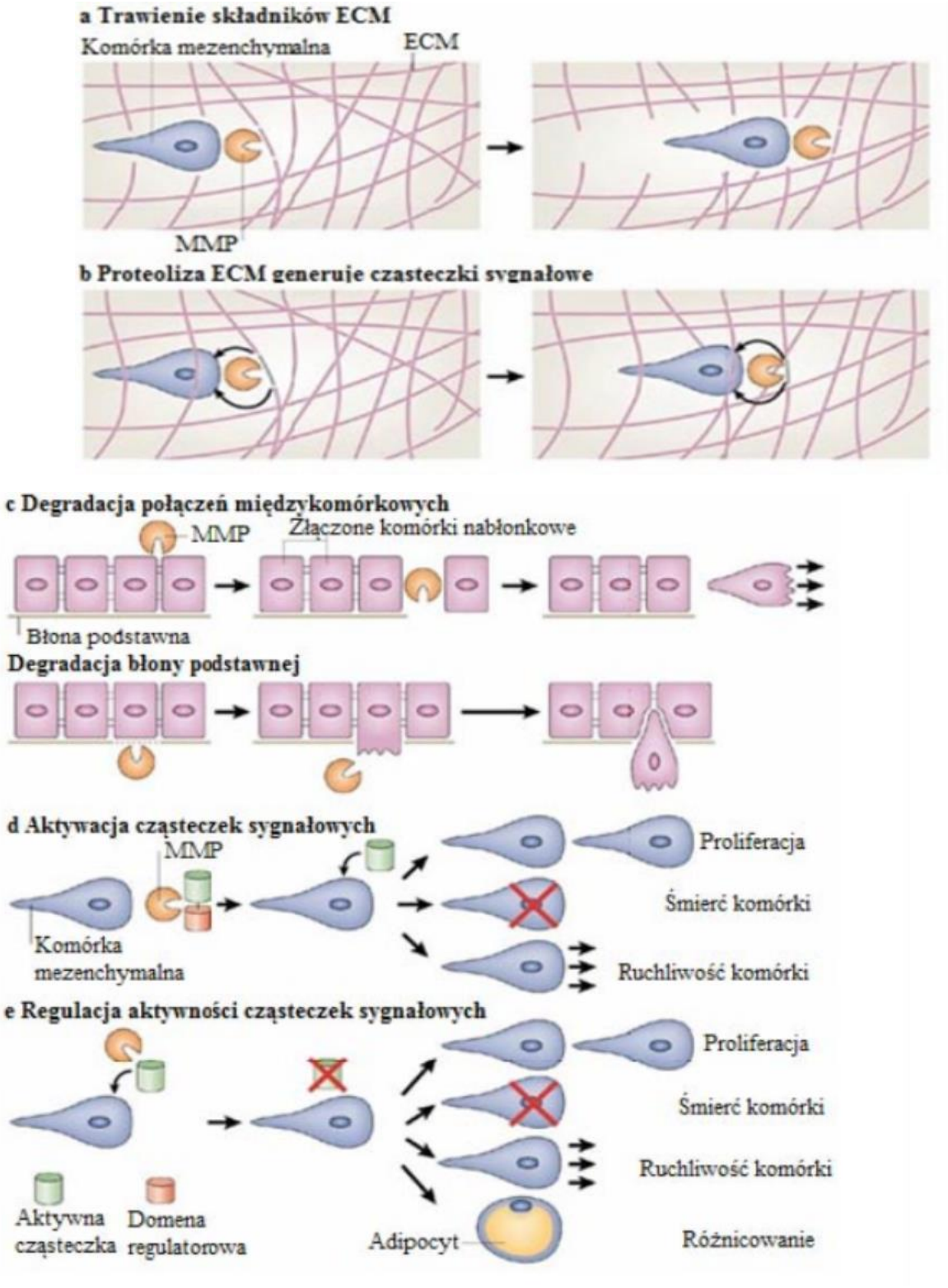
Rycina 5. Struktura przestrzenna TIMP-3 przedstawiająca względne pozycje jedenastu reszt aminokwasowych (72).

1.5.4. Znaczenie metaloproteinaz

Metaloproteinazy są wydzielane przez komórki nabłonkowe, fibroblasty, miocyty, komórki śródbłonka, keratynocyty, osteoblasty, płytki krwi, komórki nacieku zapalnego (m.in. monocyty, leukocyty) oraz komórki nowotworowe. Uważa się, iż główną funkcją MMPs jest zdolność niszczenia składników macierzy zewnątrzkomórkowej, m.in. kolagenu, lamininy, fibronektyny, proteoglikanów, umożliwiając tym samym migrację komórek, zarówno w warunkach fizjologicznych jak i patologicznych (74). Degradowane składniki ECM są ligandami receptorów adhezyjnych, a także integryn, dzięki którym możliwe jest przekazywanie sygnałów do wnętrza komórki. W związku z tym białka macierzy poprzez aktywność metaloproteinaz wykazują zdolność regulacji wielu procesów komórkowych m.in. proliferacji, migracji, adhezji oraz różnicowania się komórek. Metaloproteinazy poprzez degradację składników ECM umożliwiają również

uwalnianie aktywnych biologicznie cząsteczek, takich jak czynniki wzrostu (np. TGF-β, który reguluje ekspresję genu kodującego MMPs) i cytokiny. Przykładem może być również aktywacja insulinopodobnego czynnika wzrostu IGF-1 przez MMP, który uczestniczy w proliferacji i różnicowaniu się komórek. Oprócz degradacji macierzy zewnątrzkomórkowej MMP niszczą także liczne receptory, znajdujące się na powierzchni komórek. W warunkach fizjologicznych MMPs biorą udział procesie angiogenezy, embriogenezy oraz przebudowy tkanek, jako wynik niszczenia ECM (75). Rola MMPs w procesach biologicznych została przedstawiona na Rycinie 6.

Ponadto MMPs (głównie MMP-2 i MMP-9) degradują główny składnik błony podstawnej, którym jest kolagen typu IV. Degradacja tego białka powoduje szereg procesów patologicznych, takich jak migracja leukocytów w przebiegu stanów zapalnych oraz komórek biorących udział w procesie morfogenezy. Jest to możliwe dzięki niszczeniu fizycznej bariery, jaką jest błona podstawna, uniemożliwiająca migrację komórek. Dodatkowo, ta funkcja MMPs odpowiada za proces wzrostu nowotworu oraz tworzenie przerzutów (76).



Rycina 6. Rola metaloproteinaz w procesach biologicznych organizmu (77).

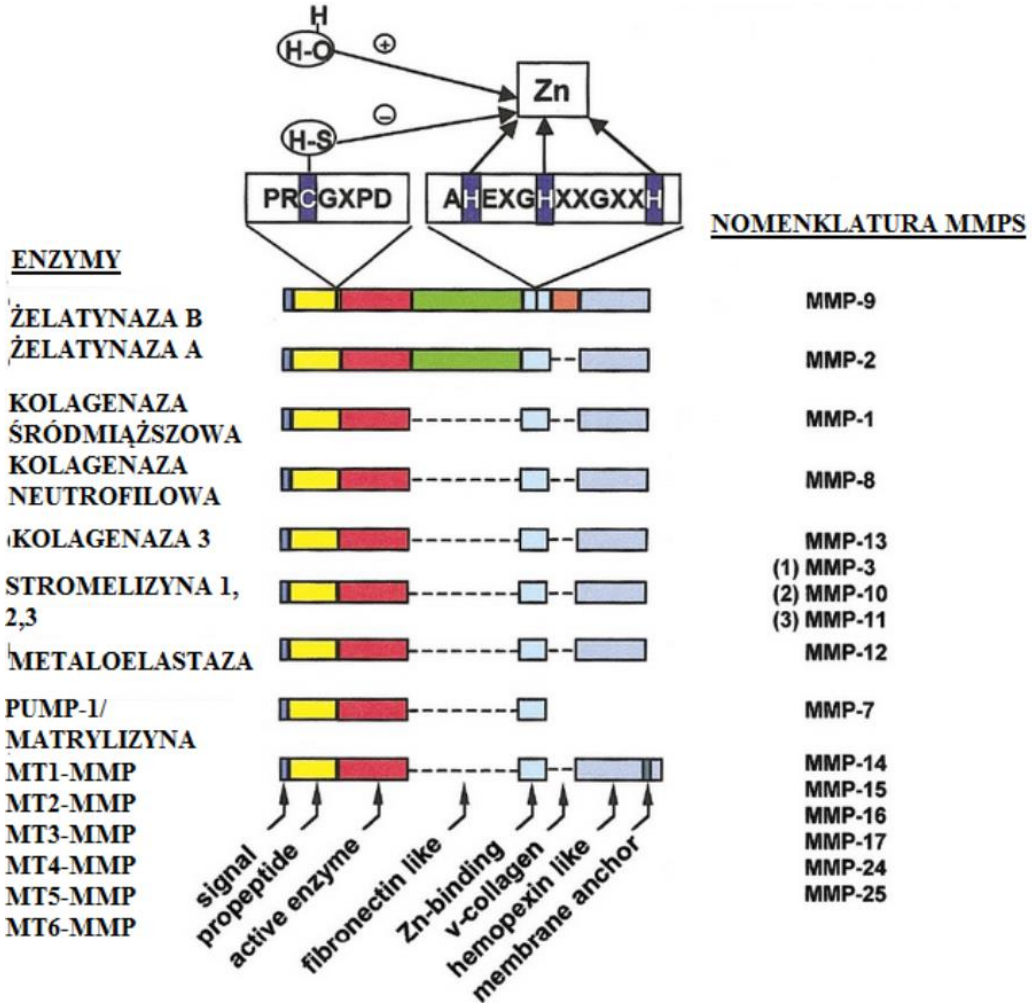
1.5.5. MMP-3 i MMP-9

MMP-3, określana jako stromelizyna-1, wykazuje zdolność do degradacji fibronektyny, żelatyny, proteoglikanów, kolagenu typu III, IV, V, IX, X, lamininy i innych składników ECM. Jest wydzielana przez fibroblasty, makrofagi i kardiomiocyty, a także może uwalniać cząsteczki powierzchniowe komórek, np. E-kadherynę, L-selektynę i TNF-α. MMP-3 współdziała z innymi MMPs, takimi jak MMP-1, -8, -9 i -13. Stromelizyna-1 ma podobne właściwości enzymatyczne do stromelizyny-2 i wykazuje 78% identyczności pod względem sekwencji aminokwasowych, natomiast optymalne pH działania MMP-3 wynosi 5,5-6,0 (74, 78).

Metaloproteinaza 9 należy do grupy żelatynaz i określana jest jako żelatynaza B. Stanowi ona istotną grupę metaloproteinaz, charakteryzującą się skomplikowaną budową i ważną funkcją w organizmie. Żelatynazę B wydzielają komórki śródbłonka, komórki satelitarne, neutrofile, makrofagi i monocyty. MMP-9 jest syntetyzowana w wewnątrzkomórkowych ziarnistościach neutrofili, natomiast jej aktywacja podlega indukcji pod wpływem bodźców egzogennych, takich jak cytokiny, czynniki wzrostu czy interakcje między komórką a macierzą (64). Mechanizmy hamowania aktywności żelatynaz są stosunkowo specyficzne: TIMP-1 tworzy kompleks z aktywną formą MMP-9, natomiast TIMP-2 oddziałuje z pro-MMP-2 (79).

MMP-9, podobnie jak inne MMPs, posiada w swojej budowie peptyd sygnałowy, który umożliwia przejście cząsteczki do środowiska pozakomórkowego oraz prodomenę (składa się z 80-90 reszt aminokwasowych), utrzymującą enzym w formie zymogenu. Geny kodujące enzym składają się z 13 egzonów. Centralny rdzeń, wspólny dla wszystkich MMPs, jest miejscem aktywnym i częścią wiążącą cynk, w której trzy histydyny tworzą wiązanie z jonem metalu. Odmienność w budowie MMP-9, w porównaniu z pozostałymi MMPs, związana jest z obecnością domeny podobnej do kolagenu typu IV wraz z zestawem aminokwasów seryna/prolina/treonina. Kolejnym elementem składowym żelatynazy B jest domena podobna do fibronektyny, która umożliwia wiązanie enzymu z jego substratami (głównie żelatyną). Domena podobna do kolagenu łączy się

poprzez elastyczny łącznik z domeną podobną do hemopeksyny, która pozwala na interakcje między naturalnymi inhibitorami TIMPs a MMP-9 (80). Główną funkcją MMP-9 jest degradacja kolagenu typu IV, składnika błony podstawnej. W większości typów komórek, z wyjątkiem neutrofili, MMP-2 jest wytwarzana konstytutywnie, natomiast MMP-9 jest indukowana przez wielu agonistów. W związku z tym stosunek żelatynazy A do żelatynazy B wykorzystuje się jako marker w przebiegu stanów zapalnych (81). Porównanie budowy MMP-3 i MMP-9 z pozostałymi członkami rodziny MMPs zostało przedstawione na Rycinie 7.

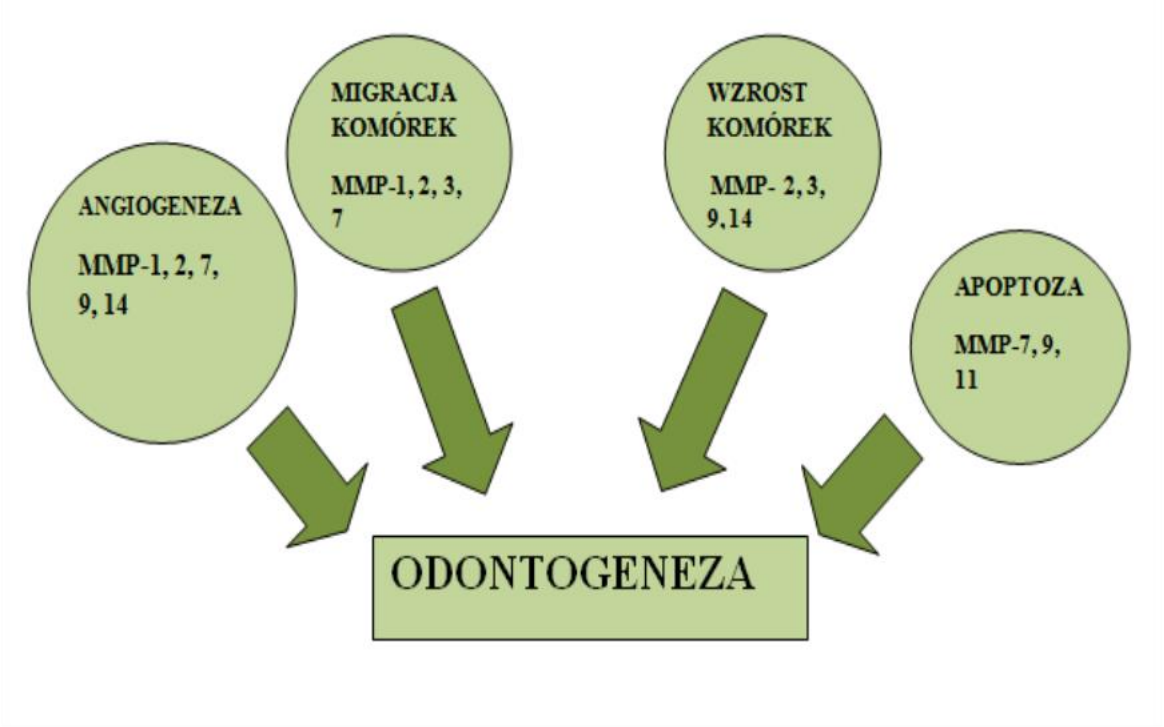


Rycina 7. Porównanie budowy MMPs. Budowa strukturalna MMP-3 i MMP-9 (81).

1.5.6. MMP-3 i MMP-9 w chorobach twarzoczaszki

Macierz zewnątrzkomórkowa zębiny składa się głównie z włókien kolagenowych typu I (90%), włókien kolagenowych typu III i IV (1-3%), natomiast pozostałą część stanowią białka niekolagenowe. Włókna kolagenowe i niekolagenowe są syntetyzowane przez odontoblasty (82, 83). MMPs biorą udział w przebudowie macierzy podczas dentinogenezy (proces powstawania zębiny). MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9, MMP-14 i MMP-20 należą do głównych MMPs zidentyfikowanych w miazdze zęba, odontoblastach i zębinie (84-89). Możliwą rolą MMP w dojrzałych odontoblastach może być – 1) fizjologiczne tworzenie zębiny i mineralizacja w nienaruszonych i zdrowych zębach, 2) degradacja macierzy podczas uszkodzenia zębów, 3) rola w dentinogenezie i 4) rola w zapaleniu miazgi (90).

Metaloproteinazy są wydzielane w formie nieaktywnych proenzymów, które przekształcane są w cząsteczki aktywne, a następnie powodują degradację składników macierzy. Istnieją dowody na udział MMPs w procesie odontogenezy (Rycina 8). Sugeruje się, że MMP-1, MMP-2, MMP-3 i MMP-9 uczestniczą we wczesnej morfogenezie zębów. MMP-9 uczestniczy w resorpcji kości i degradacji błony podstawnej nabłonka szkliwa podczas rozwoju zęba, oraz macierzy zewnątrzkomórkowej, co jest związane z erupcją zębów (91). Zwiększona aktywność MMPs występuje w przebiegu różnych chorób jamy ustnej, m.in.: zapaleniu dziąseł lub przyzębia, próchnicy, a także rozszczepach jamy ustnej (np. rozszczepach wargi i/lub podniebienia) (92, 93).



Rycina 8. Udział metaloproteinaz w procesie odontogenezy.

Wydaje się, że rozszczepy jamy ustnej są spowodowane przez wiele czynników genetycznych i środowiskowych podczas procesu tworzenia podniebienia. Wiele czynników środowiskowych, które powodują zmiany w obrębie specyficznych białek sygnałowych, mogą indukować rozwój CLP (2). Metaloproteinazy są odpowiedzialne za przebudowę macierzy zewnątrzkomórkowej i uczestniczą w zmianach składników błony podstawnej podczas fuzji wargi i podniebienia, natomiast ich zaburzona równowaga może prowadzić do rozwoju rozszczepu wargi i/lub podniebienia (94). Badania pokazują, iż przebudowa tkanek przy udziale MMPs odgrywa ważną rolę w późnych stadiach formowania wargi i podniebienia. MMPs, razem z ich endogennymi inhibitorami TIMPs, są rzadko wykrywane w zdrowych tkankach. Ich ekspresja wzrasta w czasie fizjologicznego lub patologicznego remodelingu tkanek przy udziale cząsteczek sygnałowych, które są zdolne do zmiany ekspresji genów. W związku z tym, zmiany w składzie macierzy pozakomórkowej, które aktywują migrację i różnicowanie komórek, interakcje między komórkami i resorpcję tkanek towarzyszą procesowi morfogenezy w przebiegu rozszczepów wargi i/lub

podniebienia (95). W badaniach opartych na poszukiwaniu genów aktywnych w czasie tworzenia struktur twarzoczaszki, szczególną uwagę zwraca się na geny kodujące składniki ECM. Zarówno dotyczy to czynników wzrostu, ich receptorów, czynników transkrypcyjnych, białek strukturalnych oraz enzymów, wpływających na ich aktywność, czyli MMPs i ich tkankowych inhibitorów (18, 96, 97). Analizy wykazały, iż MMP-2 i MMP-3 odgrywają istotną rolę w rozwoju podniebienia (98). Dodatkowo, w przypadku zakłócenia równowagi między MMPs a TIMPs może wystąpić CLP (96, 99, 100). Różnice w ekspresji genów kodujących MMP-2, MMP-3 i TIMP-2 mogą być zaangażowane w rozwój rozszczepów wargi i/lub podniebienia (101).

2. CEL PRACY

Rozszczepy wargi i/lub podniebienia należą do ważnej grupy wad rozwojowych części twarzowej czaszki.

Celem pracy jest oznaczenie stężenia metaloproteinazy -3 i -9 oraz tkankowego inhibitora metaloproteinaz (TIMP-3) w ślinie dzieci dotkniętych rozszczepem wargi i / lub szczęki.

Cele szczegółowe pracy:

1. Ocena stężenia metaloproteazy -3 i -9 i ich inhibitora TIMP-3 w ślinie dzieci z rozszczepami twarzoczaszki w porównaniu ze stężeniem tych MMPs i inhibitora u pacjentów zoperowanych z powodu wady rozszczepowej jak i u dzieci bez wady rozszczepowej.
2. Ocena współwystępowania MMP-3, MMP-9 i TIMP-3 z rozszczepem twarzoczaszki określona poprzez wyliczenie czułości i swoistości diagnostycznej, dodatniej i ujemnej wartości predykcyjnej (PPV, NPV) oraz mocy diagnostycznej testu, poprzez analizę pola powierzchni pod krzywą ROC (AUC).

3. MATERIAŁY I METODY.

3.1. Materiał do badań

3.1.1. Grupa badana oraz grupa kontrolna

Osoby badane podzielono na trzy grupy: I grupa – pacjenci z rozpoznanym rozszczepem twarzoczaszki przed operacją, II grupa – pacjenci z rozszczepem po operacji rekonstrukcyjnej; III grupa – grupa kontrolna. Średni wiek badanych wynosił 8,5 roku (zakres: 0,9 - 20 lat). Pierwszą grupę stanowiło 40 pacjentów z rozszczepem twarzoczaszki leczonych w Klinice Leczenia Wad Twarzoczaszki Formmed (Babice Nowe koło Warszawy, kierownik prof. dr hab. n. med. Zofia Dudkiewicz). Do drugiej grupy zakwalifikowano 40 pacjentów którzy przeszli z sukcesem operację z powodu rozszczepu wargi i / lub podniebienia. Grupa kontrolna składała się z 40 osób bez rozszczepu twarzoczaszki.

3.1.2. Pobieranie i przechowywanie materiału

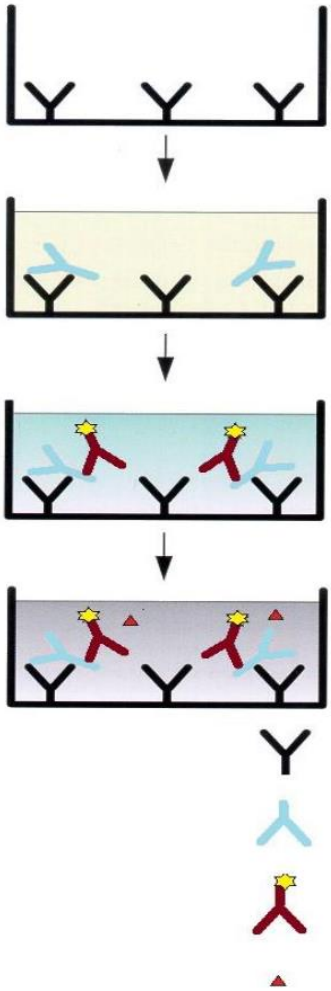
W grupie badanej (grupa I) ślina była pobierana bezpośrednio w dniu pierwotnej operacji po założeniu rurki intubacyjnej i rozwieracza czy szpatułki (jeżeli był tylko rozszczep wargi) i przed podaniem premedykacji w postaci atropiny lub rzadziej (rozszczep wargi) po podaniu atropiny. Zawsze w tych przypadkach pobieranie śliny było wykonane przed sanacją jamy ustnej środkami antyseptycznymi (tzw. myciem pola operacyjnego). W grupie II (po operacji rozszczepu twarzoczaszki) dzieci, które wymagały następnych etapów leczenia operacyjnego (np. przeszczep kości do wyrostka zębodołowego, korekta nosa i / lub wargi), procedura zbiórki śliny była analogiczna jak w grupie I (pobierano na bloku operacyjnym) lub uzyskiwano ją w gabinecie ortodonty u zoperowanych już pacjentów, co najmniej godzinę po jedzeniu i po poprzednim czyszczeniu zębów, płukaniu jamy ustnej wodą destylowaną przez pewien czas (minimum 10s) w celu usunięcia resztek pokarmowych (dotyczy to dzieci starszych).

W grupie kontrolnej ślinę pobierano przy badaniu profilaktycznym, okresowej kontroli higienicznej jamy ustnej, itp.

Od każdego badanego pobierano 1,5 mL porcje śliny. Zaraz po pobraniu, próbki były wirowane przez 20 minut w temperaturze 4°C przy 3000xg. Supernatant porcjowano na próbki 50 µL, zamrażano i przechowywano w -80°C aż do oznaczenia.

3.2. Metody badań

Oznaczenia badanych metaloproteinaz (MMP-3, MMP-9) oraz inhibitora TIMP-3, przeprowadzono w ślinie wykorzystując metodę immunoenzymatyczną (ELISA) oraz odczynniki firmy R&D Systems. Zasada tej metody opiera się na przyłączeniu badanego antygenu między dwie warstwy przeciwciał (tzw. metoda „kanapkowa"). Mikropłytki, stosowane w tym teście, opłaszczone są przeciwciałami monoklonalnymi, specyficznymi dla antygenu obecnego w próbce (MMP-3, MMP-9 lub TIMP-3). W pierwszym etapie do studzienek pipetowane są standardy o określonych stężeniach oraz badane próbki (w dubletach). Obecne w badanych próbkach białko (MMP-3, MMP-9 lub TIMP-3), w czasie inkubacji, wiąże się z przeciwciałami, znajdującymi się na mikropłytce. W kolejnym etapie dodawany jest koniugat (przeciwciało poliklonalne znakowane peroksydazą chrzanową), który w czasie drugiej inkubacji wiąże się specyficznie z antygenem. W wyniku tego połączenia powstaje kompleks: przeciwciało – badany antygen – przeciwciało z enzymem, natomiast niezwiązane przeciwciała zostają wypłukane. Następnie dodaje się substrat, którym jest nadtlenek wodoru oraz tetrametylobenzydyna. Działanie peroksydazy chrzanowej powoduje przekształcenie substratu w barwny produkt. Ostatnim etapem jest dodanie roztworu stopującego (kwas siarkowy), który zatrzymuje reakcję. Intensywność zabarwienia powstającego produktu mierzy się kolorymetrycznie i jest ona wprost proporcjonalna do ilości związanego antygenu. Na Rycinie 9 przedstawiono schemat metody ELISA, zastosowany do oznaczenia badanych metaloproteinaz i tkankowego inhibitora.



1) Opłaszczenie przeciwciałami studzienki na płytkach ELISA

2) Inkubacja badanego osocza

3) Inkubacja z przeciwciałami sprzężonymi z enzymem (koniugat)

4) Inkubacja z odpowiednim substratem powodująca reakcję barwną

Rycina 9. Schemat metody ELISA do oznaczania badanych parametrów (opracowanie własne).

3.2.1. Aparatura

Do oznaczania MMP-3, MMP-9 i TIMP-3 testem ELISA wykorzystano automatyczny czytnik płytek FL 600 firmy BIO-TEK i odczynniki firmy R&D Systems.

3.2.2. Wskaźniki diagnostyczne

Przydatność diagnostyczną określono w oparciu o parametry matematyczno-diagnostycznej analizy wyników badań takie jak: czułość i swoistość diagnostyczna, dodatnia i ujemna wartość predykcyjna oraz moc diagnostyczna testu z użyciem krzywej ROC (Receiver Operating Characterstics).

- **Czułość diagnostyczna** - jest to stosunek wyników prawdziwie dodatnich (wynik dodatni u osób z potwierdzoną chorobą) do sumy wyników prawdziwie dodatnich oraz fałszywie ujemnych (wszystkie wyniki wśród osób chorych). Czułość jest miarą zdolności danego testu do rozpoznania choroby i wyznacza się w oparciu o wzór:

  Czułość (%) = (PD/(PD+FU)) x 100%

  PD - liczba wyników prawdziwie dodatnich

  FU - liczba wyników fałszywie ujemnych

- **Swoistość diagnostyczna** - jest to stosunek wyników prawdziwie ujemnych (wynik ujemny wśród osób prawdziwie zdrowych) do sumy wyników prawdziwie ujemnych oraz fałszywie dodatnich (wszystkie wyniki u osób zdrowych). Wskaźnik ten określa zdolność testu do wykluczenia choroby oraz prawidłowe zaklasyfikowanie osób do grupy zdrowych:

  Swoistość (%) = (PU/(PU+FD)) x 100%

  PU - liczba wyników prawdziwie ujemnych

  FD - liczba wyników fałszywie dodatnich

- **Dodatnia wartość predykcyjna** - określa prawdopodobieństwo rozpoznania choroby na podstawie dodatniego wyniku badania i wyznacza się w oparciu o wzór:

  Dodatnia wartość predykcyjna (PV) (%) = (PD/(PD+FD)) x 100%

- **Ujemna wartość predykcyjna** - określa prawdopodobieństwo wykluczenia choroby na podstawie ujemnego wyniku badania i wyznacza się w oparciu o wzór:

  Ujemna wartość predykcyjna (NPV) (%) = (PU/(PU+FU)) x 100%

- **Ocena mocy diagnostycznej**

Ocenę wzajemnej zależności czułości od swoistości diagnostycznej dokonano za pomocą funkcji ROC (Receiver Operating Characteristics) i pola pod krzywą ROC (AUC – *area under curve*) w oparciu o program statystyczny Graphroc. AUC przyjmuje wartości w przedziale od 0 do 1 i przedstawia zdolność testu do rozgraniczenia wyników prawidłowych i nieprawidłowych. Testy wykazujące wysoką mocą diagnostyczną - krzywa ROC opisana jest linią asymptotycznie zbliżającą się do 100% wartości czułości, przy niewielkiej utracie swoistości. Im większe jest pole pod krzywą ROC – AUC, tym wyższa jest moc diagnostyczna badania.

Wartości AUC w zakresie od 0,9-1,0 odzwierciedla test bardzo dobry, 0,8-0.9 – dobry, 0,7-0,8 – satysfakcjonujący, 0,6-0,7 – średni, a wartości w zakresie 0,5-0,6 jako test niedostateczny diagnostycznie.

3.3. Analiza statystyczna

Analiza statystyczna otrzymanych wyników została przeprowadzona przy pomocy programu STATISTICA 10.0. Wstępna analiza wyników badań (test chi-kwadrat) wykazała, że rozkład stężeń badanych parametrów nie był zgodny z rozkładem normalnym. W związku z tym do analizy statystycznej różnic pomiędzy pacjentami z rozszczepami wargi i/lub podniebienia a grupą kontrolną zastosowano nieparametryczny test U-Manna-Whitneya. W przypadku uzyskania wyniku istotnego statystycznie na poziomie 5% wykonano porównania pomiędzy każdymi dwiema grupami. W tym celu zastosowano

nieparametryczny test Wilcoxona. Wyniki uznano za istotne statystycznie na poziomie istotności $p<0.05$.

4. WYNIKI

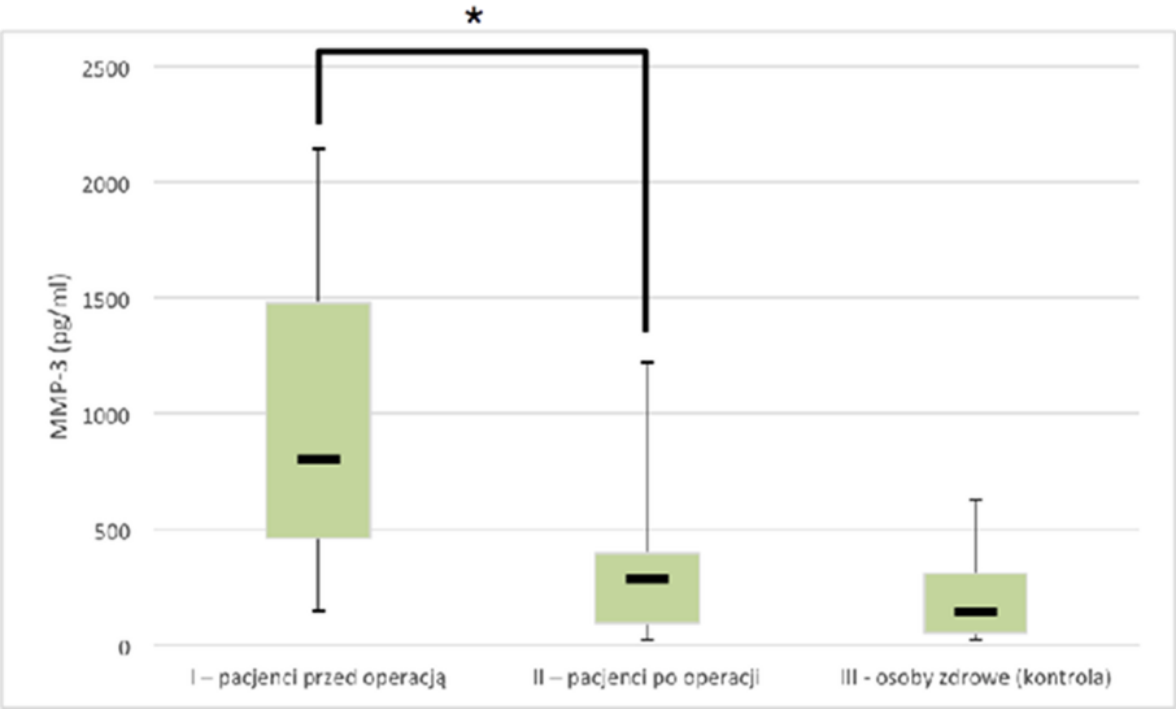
4.1. Ocena stężenia MMP-3, MMP-9 i TIMP-3 u pacjentów z rozszczepami wargi i/lub podniebienia oraz u osób zdrowych.

Uzyskane wyniki stężeń badanej metaloproteinazy-3, -9 oraz tkankowego inhibitora TIMP-3 u pacjentów z rozszczepami wargi i/lub podniebienia oraz w grupie osób zdrowych zostały przedstawione w Tabeli 4.

Tabela 4. Stężenie MMP-3, MMP-9 i TIMP-3 u pacjentów z rozszczepami wargi i/lub podniebienia i u osób zdrowych.

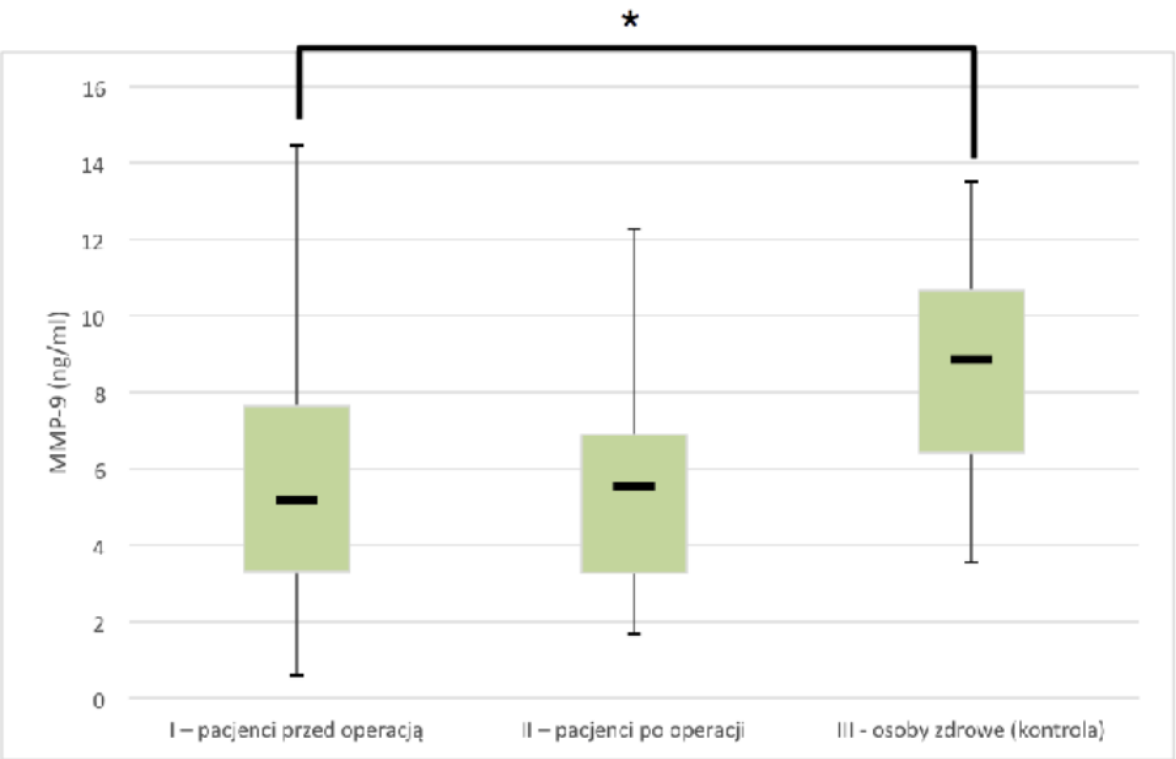
Badany parametr		Pacjenci z rozszczepem jeszcze nie operowani (n=40)	Pacjenci z rozszczepem już po operacji (n=40)	Osoby zdrowe (kontrola) (n=40)
MMP-3 pg/ml	Mediana	802,2	287,8	145,5
	Średnia arytm.	929,8	310,3	177,6
	SD	591,6	246,6	135,6
	Zakres	147,7-2143,0	24,0-1221,2	24,0-627,8
MMP-9 ng/ml	Mediana	5,17	5,55	8,85
	Średnia arytm.	5,66	5,62	8,68
	SD	3,35	2,56	2,62
	Zakres	0,61-14,47	1,67-12,27	3,55-13,50
TIMP-3 ng/ml	Mediana	3,32	4,24	4,34
	Średnia arytm.	3,35	4,70	4,32
	SD	1,66	2,45	1,52
	Zakres	0,76-8,16	1,55-11,31	1,59-7,85

Analiza wskazuje że u osób które cierpiały na rozszczep, i są już po operacji, wartość MMP-3 spada o blisko 2/3 w stosunku do wartości u osób które jeszcze nie przeszły operacji (znamienność statystyczna $p < 0,001$). Ponadto u osób zdrowych, które nigdy nie cierpiały na rozszczep, wartości MMP-3 są bardzo zbliżone do poziomu obserwowanego u chorych leczonych. (Rycina 10).



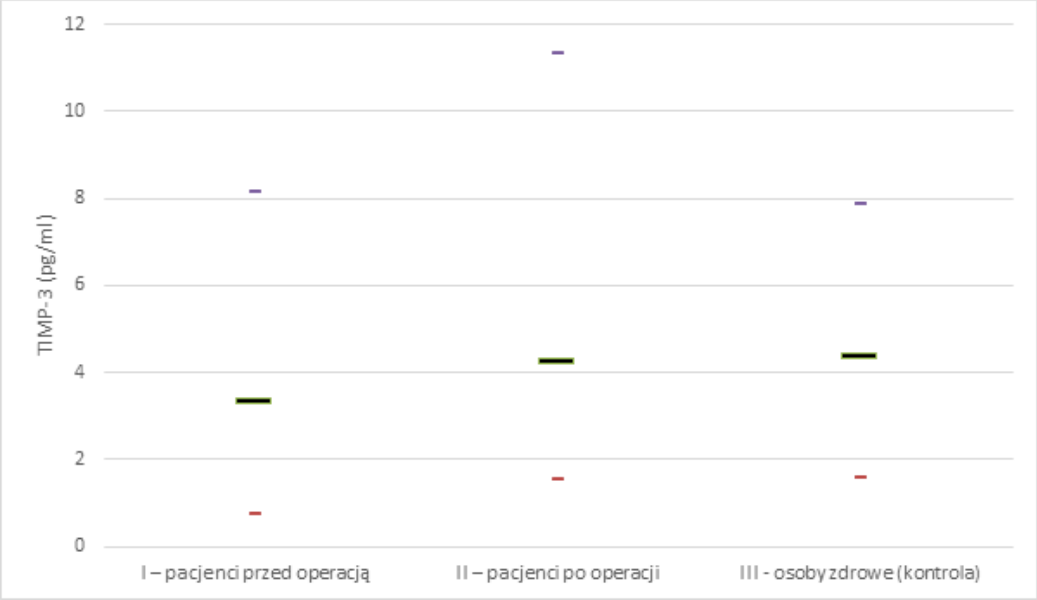
Rycina 10. Analiza stężenia metaloproteinazy-3 u pacjentów przed i po operacji oraz w grupie kontrolnej. * *p*<0,001

Wartości MMP-9 u osób chorych na rozszczepienie wargi szczęki/podniebienia, którzy jeszcze nie byli operowani są prawie takie same jak u pacjentów u których wykonana została operacja naprawcza (brak znamienności statystycznej pomiędzy grupami). Ponadto uwagę zwraca fakt, że osoby zdrowe, które nigdy nie cierpiały z powodu rozszczepienia mają wartości o około 30-40% wyższe od osób z rozszczepami (znamienność statystyczna *p*< 0,001). Także tutaj dotyczy to zarówno mediany jak i średniej arytmetycznej. (Rycina 11).



Rycina 11. Analiza stężenia metaloproteinazy-9 u pacjentów przed i po operacji oraz w grupie kontrolnej. * *p*<0,001

Jeszcze inaczej przedstawia się sytuacja w przypadku TIMP-3. Pacjenci którzy byli operowani mają poziom TIMP-3 nieznacznie wyższy w stosunku do poziomu obserwowanego u osób z rozszczepem które jeszcze nie przeszły operacji (brak znamienności statystycznej). Najciekawsze jest że poziom TIMP-3 u pacjentów po operacji jest taki sam jak u osób zdrowych które nigdy nie miały rozszczepu. Tym niemniej zmiany jakie zachodzą nie są znamienne statystycznie i dlatego nie są znamienne dla schorzenia i terapii.



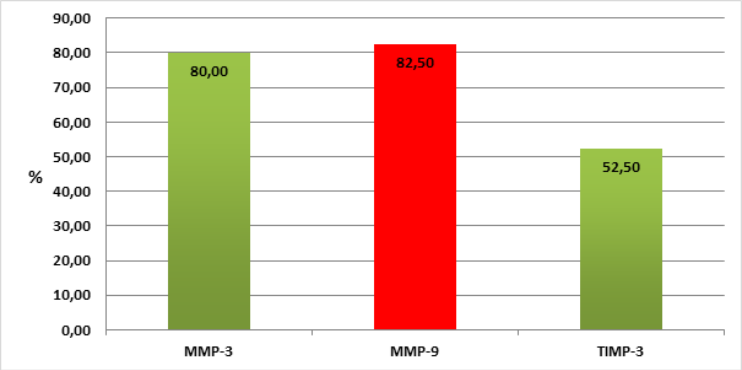
Rycina 12. Analiza stężenia tkankowego inhibitora metaloproteinazy-3 u pacjentów przed i po operacji oraz w grupie kontrolnej.

4.2. Ocena występowania MMP3, MMP i TIMP3 w rozszczepie wargi i szczęki

Ocena współwystępowania MMP-3, MMP-9 i TIMP-3 z rozszczepem została określona poprzez wyliczenie czułości i swoistości diagnostycznej, dodatniej i ujemnej wartości predykcyjnej (PPV, NPV) oraz mocy diagnostycznej testu, poprzez analizę pola powierzchni pod krzywą ROC (AUC).

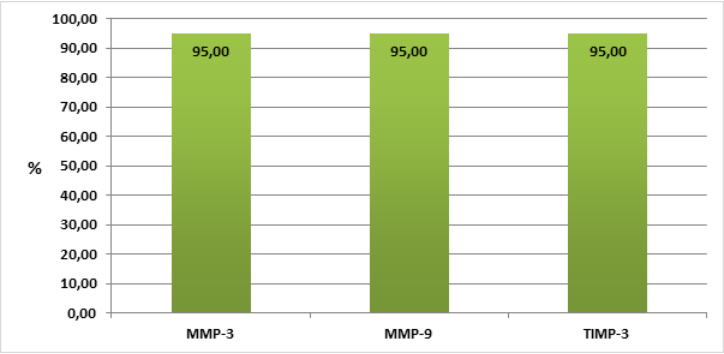
Cut off (punkt odcięcia) oceniono w oparciu o wartość indeksu Youdena. *Cut off* wyniósł w przypadku MMP-3 – 365,96 pg/ml; MMP-9 – 8,23 ng/ml i TIMP-3 – 3,45 ng/ml.

Czułość diagnostyczna, określająca współistnienie choroby na podstawie dodatniego wyniku badania w grupie chorych z rozszczepem wargi i/lub podniebienia, była najwyższa w przypadku MMP-9 (82,50%), nieznacznie wyższa od MMP-3 (80,00%). Najniższą wartość SE wykazano w przypadku TIMP-3 (52,50%) (Rycina 13).



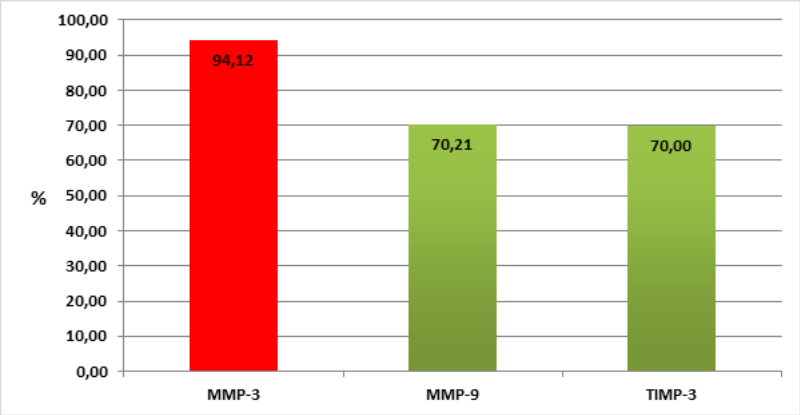
Rycina 13. Czułość diagnostyczna w grupie chorych z rozszczepem wargi i/lub podniebienia.

Swoistość oceny, dotycząca zdolności wykluczenia choroby na podstawie ujemnego wyniku badania w grupie chorych z rozszczepem wargi i/lub podniebienia, przyjęła wysokie wartości w przypadku wszystkich badanych parametrów (95%) (Rycina 14).



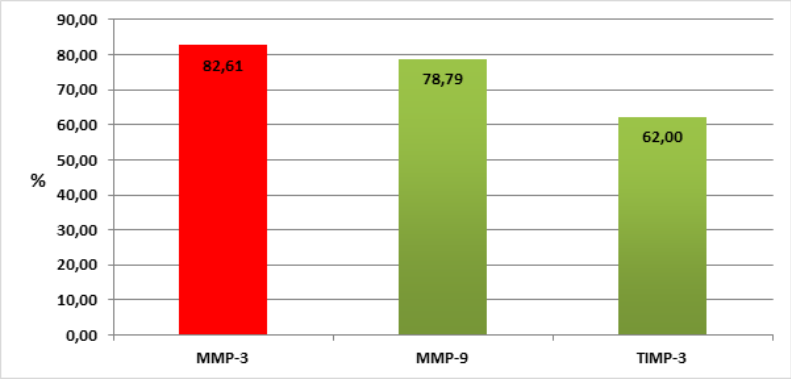
Rycina 14. Swoistość diagnostyczna w grupie chorych z rozszczepem wargi i/lub podniebienia.

Wartość predykcyjna wyniku dodatniego (PPV), określająca prawdopodobieństwo współistnienia choroby na podstawie dodatniego wyniku badania w grupie chorych z rozszczepem wargi i/lub podniebienia, była najwyższa w przypadku MMP-3 (94,12%) i była dodatkowo wyższa od MMP-9 (70,21%) i TIMP-3 (70,00%) (Rycina 15).



Rycina 15. Wartość predykcyjna wyniku dodatniego w grupie chorych z rozszczepem wargi i/lub podniebienia.

Wartość predykcyjna wyniku ujemnego (NPV), określająca prawdopodobieństwo wykluczenia choroby na podstawie ujemnego wyniku badania w grupie chorych z rozszczepem wargi i/lub podniebienia, osiągnęła najwyższą wartość dla MMP-3 (82,61%), wyższą niż w przypadku MMP-9 (78,79%) i TIMP-3 (62,00%) (Rycina 16).



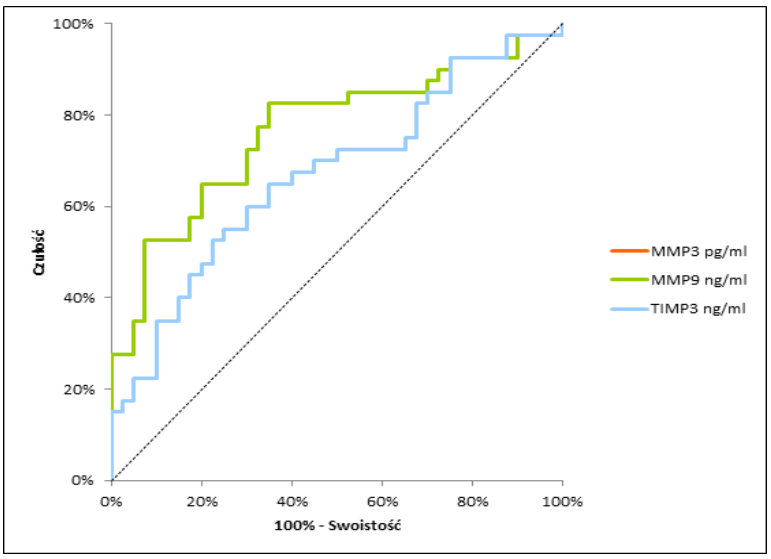
Rycina 16. Wartość predykcyjna wyniku ujemnego w grupie chorych z rozszczepem wargi i/lub podniebienia.

W Tabeli 5 przedstawiono wartości z analizy funkcji ROC, dotyczące badanych parametrów (MMP-3, MMP-9 i TIMP-3) w grupie chorych z rozszczepem wargi i/lub podniebienia.

Najwyższą wartość AUC w wykazano w przypadku MMP-3 (0,9294) i były to wartości wyższe od MMP-9 (0,7656) i TIMP-3 (0,6700) (Rycina 17). Dodatkowo zaobserwowano, że AUC wszystkich badanych parametrów (MMP-3, MMP-9 i TIMP-3) było znamiennie statystycznie większe od AUC=0,5, (odpowiednio p<0,0001; p<0,0001; p=0,0053).

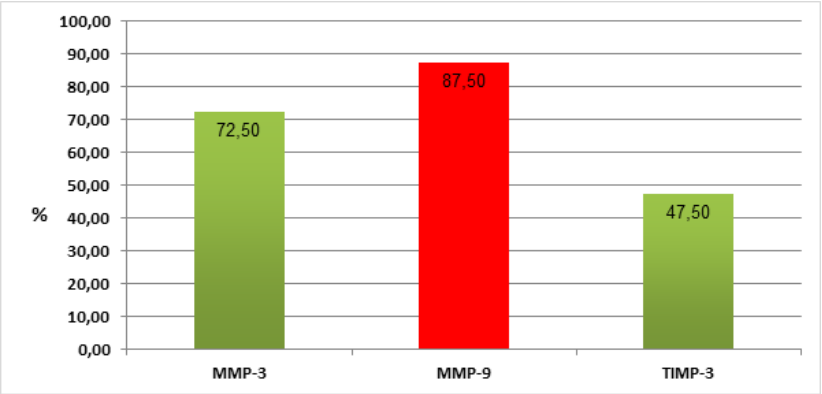
Tabela 5. Analiza pola pod krzywą ROC (AUC) MMP-3, MMP-9 i TIMP-3 w grupie chorych z rozszczepem wargi i/lub podniebienia.

Badany parametr	AUC	SE	95% C.I.(AUC)	p (AUC=0,5)
MMP-3	0,9294	0,0266	(0,877-0,982)	**<0,0001**
MMP-9	0,7656	0,0545	(0,659-0,873)	**<0,0001**
TIMP-3	0,6700	0,0609	(0,551-0,789)	**0,0053**



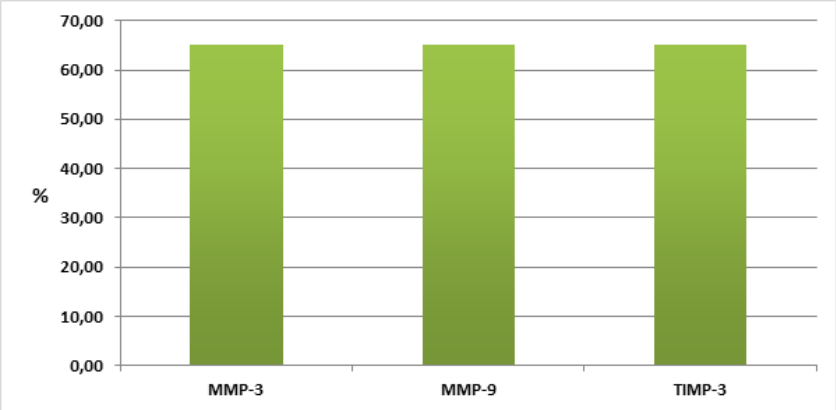
Rycina 17. Analiza krzywych ROC MMP-3, MMP-9 i TIMP-3 w grupie chorych z rozszczepem wargi i/lub podniebienia.

Czułość oceny w grupie chorych po przeprowadzonym zabiegu operacyjnym osiągnęła najwyższą wartość w przypadku MMP-9 (87,50%), wyższą niż dla MMP-3 (72,50%) i TIMP-3 (47,50%) (Rycina 18).



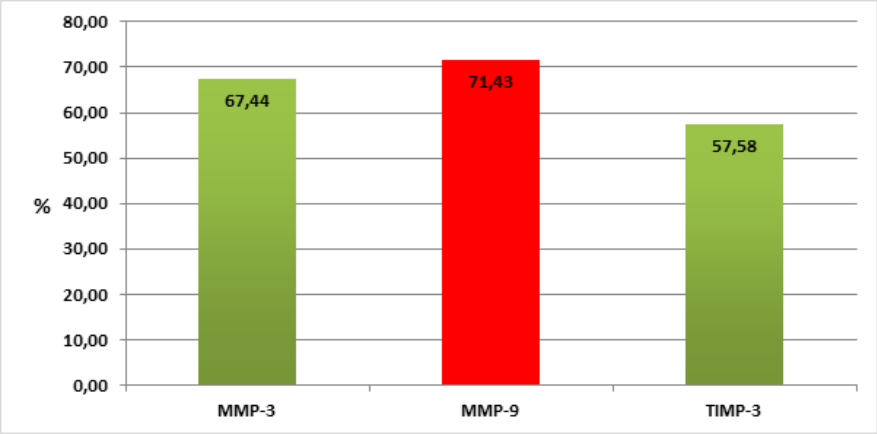
Rycina 18. Czułość diagnostyczna w grupie chorych z rozszczepem wargi i/lub podniebienia po zabiegu operacyjnym.

Swoistość oceny badanych parametrów (MMP-3, MMP-9 i TIMP-3) w grupie pacjentów po operacji osiągnęła takie same wartości, równe 65% (Rycina 19).

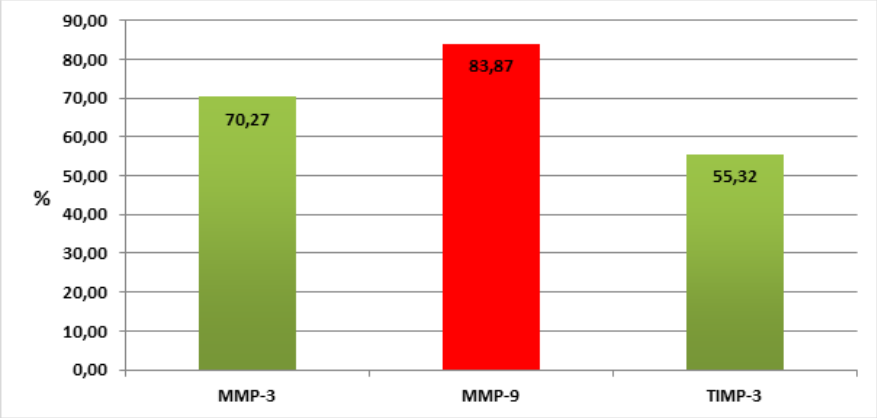


Rycina 19. Swoistość diagnostyczna w grupie chorych z rozszczepem wargi i/lub podniebienia po zabiegu operacyjnym.

Oceniając wartość predykcyjną wyniku dodatniego w grupie pacjentów po zabiegu operacyjnym stwierdzono, iż była ona najwyższa w przypadku MMP-9 (71,43%). Pozostałe parametry osiągnęły wartości równe 67,44% (MMP-3) i 57,58% (TIMP-3). Wartość predykcyjna wyniku ujemnego również była najwyższa dla MMP-9 (83,87%), natomiast dla MMP-3 i TIMP-3 wyniosła odpowiednio 70,27% i 55,32% (Rycina 20 i 21).



Rycina 20. Wartość predykcyjna wyniku dodatniego w grupie chorych z rozszczepem wargi i/lub podniebienia po zabiegu operacyjnym.



Rycina 21. Wartość predykcyjna wyniku ujemnego w grupie chorych z rozszczepem wargi i/lub podniebienia po zabiegu operacyjnym.

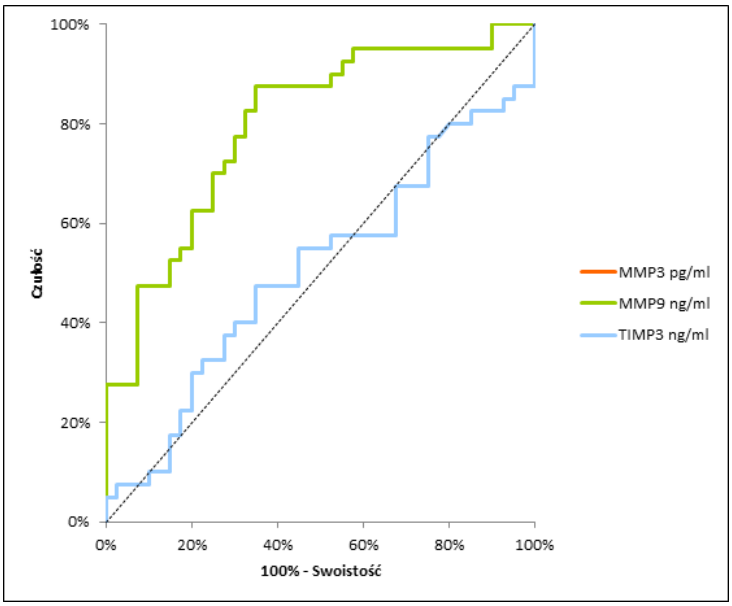
Wartości analizy funkcji ROC, odnośnie badanych parametrów w grupie chorych po zabiegu operacyjnym przedstawiono w Tabeli 6.

Najwyższą wartość AUC w grupie badanej po przeprowadzonym zabiegu otrzymano w przypadku MMP-9 (0,7975) i były to wartości wyższe od MMP-3 (0,6753) i TIMP-3 (0,5066) (Rycina 22).

Wykazano ponadto, iż wartość AUC tylko dla MMP-9, identycznie jak MMP-3, była znamiennie statystycznie większa od AUC=0,5, tj. granicy przydatności diagnostycznej testu (odpowiednio: p<0,0001; p=0,0040).

Tabela 6. Analiza pola pod krzywą ROC (AUC) MMP-3, MMP-9 i TIMP-3 w grupie chorych z rozszczepem wargi i/lub podniebienia po zabiegu operacyjnym.

Badany parametr	AUC	SE	95% C.I.(AUC)	p (AUC=0,5)
MMP-3	0,6753	0,0609	(0,556-0,795)	**0,0040**
MMP-9	0,7975	0,0500	(0,699-0,896)	**<0,0001**
TIMP-3	0,5066	0,0661	(0,377-0,636)	0,9209



Rycina 22. Analiza krzywych ROC MMP-3, MMP-9 i TIMP-3 w grupie chorych z rozszczepem wargi i/lub podniebienia po zabiegu operacyjnym.

5. DYSKUSJA

Rozszczepy wargi i/lub podniebienia pojawiają się najczęściej na skutek zaburzeń embriogenezy między 4. – 7. oraz 5. – 12. tygodniem ciąży. Są one najczęstszą wadą wrodzoną w obrębie twarzoczaszki, dotykającą około 1 na 700 żywych urodzeń na całym świecie w ciągu roku. Zostały one podzielone na rozszczep wargi, z rozszczepem podniebienia lub bez rozszczepu i wyłącznie rozszczep podniebienia. Częstość występowania tej choroby różni się w zależności od pochodzenia, Azjaci są populacją najczęściej dotkniętą tym schorzeniem (1 na 500 żywych urodzeń), następnie jest rasa kaukaska (1 na 1000 żywych urodzeń, natomiast populacje afrykańskie wykazują najniższe wskaźniki zachorowalności (1 na 2 500 żywych urodzeń). Występowanie CLP różni się także w zależności od płci, przy czym CLP występuje częściej u mężczyzn niż u kobiet, natomiast CP częściej u kobiet (102-105). Przeprowadzone liczne badania kliniczne wskazują, iż powstawanie rozszczepów podniebienia pierwotnego i wtórnego jest uwarunkowane genetycznie, jednak mimo identyfikacji tych genów, ich etiologia nie jest do końca poznana. Dotychczasowe badania genetyczne pozwoliły na zidentyfikowanie kilku genów, które mogą odgrywać znaczącą rolę w przypadku rozszczepów jamy ustnej (106). Spośród nich szczególne znaczenie zwraca się na MSX1, IRF6, FOXE1, MAFB, WNT3, WNT9B, CRISPLD2, FGFR1, FGF8, BMP4 i region chromosomu 8q24. Ponadto sugerowano również istotną rolę w przypadku innych genów np. TGF-β3, TGF-α, MMP-3, VAX1, ABCA4, AXIN2 (4, 107).

Większość rozszczepów (ponad 60%) jest wywołana działaniem wielu czynników i dziedziczona w sposób wielogenowy (13). W tym typie dziedziczenia cecha może ujawnić się w przypadku występowania określonej puli genów lub w momencie zadziałania odpowiedniego czynnika środowiskowego. Do tych czynników zalicza się m.in. używki, niektóre leki oraz choroby matki pojawiające się w początkowym okresie ciąży (niedożywienie, choroby metaboliczne, infekcje wirusowe górnych dróg oddechowych, stany chorobowe z towarzyszącą podwyższoną temperaturą ciała, zatrucia) (4).

U ludzi proces morfogenezy połączenia warg i podniebienia jest ściśle regulowany m.in. poprzez współpracę różnych cząsteczek sygnałowych. Połączenie górnej wargi sprzyja

tworzeniu się podniebienia, dlatego nieprawidłowości zachodzące na tym etapie mogą wtórnie wpływać na połączenie podniebienia (108). Dodatkowo stwierdza się, iż rozszczepy jamy ustnej są wywołane przez wiele czynników genetycznych i środowiskowych. Istnieją różne czynniki środowiskowe, które powodują zmiany w specyficznych białkach sygnałowych i tym samym indukują rozszczep wargi i/lub podniebienia. MMPs i TIMPs są szeroko wyrażane podczas rozwoju embrionalnego. Te enzymy proteolityczne, odpowiedzialne za niszczenie macierzy zewnątrzkomórkowej mogą uczestniczyć w procesie rozszczepu wargi i/lub podniebienia (2, 109). Kontrolowana przebudowa macierzy jest więc ważnym etapem morfogenezy czaszkowo-twarzowej. Badania przeprowadzone na modelu zwierzęcym wskazują, iż MMPs i TIMPs są potencjalnymi kandydatami na markery w rozszczepach wargi i/lub podniebienia. W przypadku zakłócenia równowagi między MMPs a TIMPs dochodzi do rozwoju wad wrodzonych, takich jak np. CLP (110). Przedstawione białka, mimo iż mają istotny udział w morfogenezie struktur czaszkowo-twarzowych, nie były szeroko badane w próbkach śliny uzyskanych od pacjentów.

Dlatego też, celem niniejszej pracy doktorskiej była ocena stężenia MMP-3 i MMP-9 oraz ich inhibitora TIMP-3 w ślinie dzieci z rozszczepami twarzoczaszki w porównaniu ze stężeniem tych MMPs i inhibitora u pacjentów po zabiegu operacyjnym z powodu wady rozszczepowej, jak i u dzieci bez wady rozszczepowej. Przydatność diagnostyczną badanych parametrów określono na podstawie wyliczenia wskaźników diagnostycznych, takich jak: czułość diagnostyczna, swoistość diagnostyczna, a także wartości predykcyjne wyniku dodatniego i ujemnego (PPV, NPV). Dodatkowo oceniono moc diagnostyczną badań w oparciu o analizę pola pod krzywą ROC (AUC).

Badane parametry (MMP-3, MMP-9, TIMP-3) zostały oznaczone za pomocą metody immunoenzymatycznej ELISA, która jest powszechnie stosowana i charakteryzuje się wysoką czułością i swoistością.

Grupę badaną podzielono na dwie podgrupy, gdzie pierwszą z nich stanowiło 40 pacjentów z rozpoznanym rozszczepem twarzoczaszki, natomiast drugą – pacjenci po przeprowadzonym zabiegu operacyjnym z powodu rozszczepu wargi i/lub podniebienia lub

po zakończonym leczeniu chirurgicznym. Uzyskane wyniki badań porównano z wynikami w grupie kontrolnej tj. u pacjentów bez rozszczepu twarzoczaszki (40 pacjentów).

Na podstawie uzyskanych wyników wykazano że pacjenci z rozszczepem wargi i/lub podniebienia (nieoperowani) mieli wyższe stężenia MMP-3 u w porównaniu z grupą kontrolną. Ponadto stwierdzono że wartości stężeń MMP-9 i TIMP-3 u pacjentów jeszcze nie operowanych były niższe niż w grupach kontrolnych. Nie istnieją porównawcze prace badawcze oceniające stężenia MMPs i ich inhibitorów w próbkach śliny od pacjentów z rozszczepami wargi i/lub podniebienia. W ostatnich latach szczególnie interesujące wydaje się wykorzystanie śliny w diagnostyce laboratoryjnej. Zaletą tego materiału biologicznego jest jego łatwe i nieinwazyjne pobieranie. Wiele związków chemicznych, hormonów a także toksyn można zidentyfikować w ślinie. Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej również mogą być wykrywane w tym materiale biologicznym. Jednak dostępne dane literaturowe analizują ekspresję lub odmiany polimorficznych promotorów genów kodujących MMPs w przebiegu CLP. U ludzi odnotowano znaczące powiązania między polimorfizmami w genach MMPs i TIMPs a rozszczepami wargi i/lub podniebienia (111-113). W badaniach przeprowadzonych przez Letra i wsp. (101) zaobserwowano związek między polimorfizmem promotora genu kodującego MMP-3 a występowaniem rozszczepu wargi i podniebienia, natomiast nie wykazano istotnego związku z polimorfizmem promotora MMP-1. Ponadto stwierdzono, iż polimorfizmy genów MMPs mogą być dobrymi kandydatami jako czynniki genetyczne w przebudowie ECM w przebiegu rozszczepu wargi i podniebienia. Dodatkowo polimorfizm promotorów genów MMPs, które mają istotne znaczenie w rozwoju twarzoczaszki może pozwolić na wyjaśnienie etiopatogenezy wad rozszczepowych, jednak wymaga to przeprowadzenia dokładniejszych badań (101). W późniejszych badaniach tych naukowców oceniono 45 polimorfizmów obejmujących biologicznie istotne geny MMPs i TIMPs pod względem ich związku z CLP. Wykazano istotne statystycznie powiązanie dla wariantów MMP-3 (rs3025058, rs522616) i TIMP-2 (rs8179096) w przebiegu CLP (112). Ponadto badacze sugerują, iż TIMP-4 i MMP-9 są głównymi białkami regulatorowymi przebudowującymi ECM wyrażanymi w tkankach błony śluzowej jamy ustnej dotkniętych CLP. Wykazano, iż w próbach tkanek od pacjentów z

dwustronnym CLP było mniej komórek z dodatnią ekspresją TIMP-4 i MMP-9, a także całkowita liczba komórek z dodatnią ekspresją tych białek wykazała znaczący spadek u pacjentów z dwustronnym CLP w porównaniu z jednostronnym CLP (114). Krivicka i wsp. (115) również ocenili ekspresję MMP-9 w próbkach tkanek pobranych od pacjentów z rozszczepem wargi i podniebienia. Zaobserwowali, iż badany materiał charakteryzuje się bardziej wyraźną ekspresją MMP-9 i TIMP-2, co może świadczyć o zaangażowaniu tych białek w proces przebudowy tkanki w przebiegu CLP. Dodatkowo, ekspresja MMP-9 nieznacznie dominowała i została również stwierdzona w komórkach nabłonkowych. W badaniach immunohistochemicznych wykazano, iż MMP-9 także ulega ekspresji w czasie rozwoju podniebienia (116). W badaniach innych naukowców oceniono również ekspresję innych MMPs, które mogą wykazywać znaczenie w przebiegu CLP. Smane-Filipova i wsp. (114) ocenili ekspresję wybranych MMPs i TIMPs u dzieci z rozszczepem wargi i podniebienia. Badanie ekspresji tych białek w próbkach tkanek uzyskanych od pacjentów z CLP może przyczynić się do zrozumienia etiopatogenezy tej choroby. Wyniki tych badań wskazują, iż zwiększona ekspresja MMP-2 i TIMP-2 w tkankach błony śluzowej jamy ustnej pacjentów z CLP wskazuje na udział tych czynników w regulacji migracji komórek podczas remodelingu ECM, niezależnie od różnych rodzajów rozszczepów. Dodatkowo podwyższoną ekspresję MMP-2 stwierdzono w komórkach nabłonkowych pacjentów z jednostronnym CLP. Omówione wyniki mogą wskazywać na istotny udział szlaku MMP-2/TIMP-2 w przebudowie ECM, bezpośrednio związanym z CLP (114).

W przeprowadzonych badaniach oceniając stężenia wszystkich badanych parametrów stwierdzono, iż zmniejszały się one po przeprowadzeniu operacji, jednak różnica istotna statystycznie dotyczyła MMP-3 i TIMP-3. Ponadto stwierdzono, iż stężenia MMP-3 były wyższe u pacjentów poddanych zabiegowi operacyjnemu w porównaniu z kontrolą, natomiast stężenia MMP-9 były niższe. Gonçalves i wsp. (117) w swoich badaniach ocenili zmiany wartości MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9, MMP-12 i MMP-13 przed i po leczeniu stanów chorobowych przyzębia. Wykazali wyższe poziomy MMPs u osób z aktywną chorobą zapalną przyzębia, a także spadek tych wartości

po zastosowaniu leczenia. Uzyskane wyniki badań wskazują na rzetelność i skuteczność oznaczeń MMPs w ślinie oraz zdolność do kontrolowania procesu leczenia. Dodatkowo złośliwe choroby jamy ustnej również charakteryzują się podwyższonym poziomem MMPs (118, 119). Shpitzer i wsp. (120) zaobserwowali wyższe stężenie MMP-9 w ślinie pacjentów z rakiem języka w porównaniu z osobami zdrowymi. Popat i wsp. (121) ocenili również stężenia innych MMPs i TIMPs u pacjentów z chorobami przyzębia. Wykazali znacznie podwyższone wartości MMP-1 i obniżone wartości TIMP-1 w grupie osób z zapaleniem przyzębia. Ponadto zaobserwowali, iż po wyzdrowieniu pacjenta nastąpił spadek stężenia MMP-1 oraz wzrost stężenia TIMP-1 do wartości, które wcześniej zostały przedstawione w grupie kontrolnej.

Nie są dostępne inne dane literaturowe oceniające korelacje między badanymi parametrami u pacjentów z CLP. Dodatkowo w przeprowadzonych badaniach dokonano oceny przydatności diagnostycznej MMP-3, MMP-9 i TIMP-3 w grupach badanych. W przypadku czułości diagnostycznej, zarówno u pacjentów przed jak i po przeprowadzonym zabiegu operacyjnym, najwyższe wartości uzyskano dla MMP-9. Natomiast oceniając swoistość diagnostyczną wykazano, iż wszystkie badane parametry charakteryzowały się takimi samymi wartościami. Otrzymane wyniki można porównać z doniesieniami naukowymi w innych chorobach w obrębie twarzoczaszki. Shpitzer i wsp. (120) w swoich badaniach u pacjentów z rakiem języka wykazali wysokie wartości czułości w przypadku MMP-9 (100%), natomiast swoistość osiągnęła wartość równą 79%. Ponadto w niniejszej rozprawie doktorskiej otrzymane wyniki analizy pola pod krzywą ROC (AUC) wykazały najwyższe wartości dla MMP-3 w przypadku pacjentów z rozszczepem wargi i/lub podniebienia. Natomiast w grupie osób po przeprowadzonym zabiegu operacyjnym, wartości te były najwyższe dla MMP-9. Stott-Miller i wsp. (122) przeprowadzili badania na grupie pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym jamy ustnej i zaobserwowali, iż MMP-3 również wykazała wysokie wartości AUC. Dodatkowo stwierdzono, iż wartości ekspresji tkankowej w przypadku MMP-3 dobrze korelowały ze stężeniami tego białka w ślinie pacjentów z nowotworem jamy ustnej.

Podsumowując całą rozprawę doktorską należy podkreślić, iż przeprowadzone badania dotyczące MMP-3 i MMP-9 u pacjentów z rozszczepem wargi i/lub podniebienia, sugerują że enzymy te mogą odgrywać rolę w patogenezie tego schorzenia.

6. WNIOSKI

1. Leczenie chirurgiczne przywracające poprawne stosunki anatomiczne powoduje że wartości MMP-3 osiągają taki sam poziom jak u osób zdrowych. Ten fakt dowodzi że MMP-3 bierze w udział patogenezie rozszczepów wargi i/lub podniebienia.

2. Wyniki tej pracy wskazują także na związek pomiędzy stężeniem MMP-9 i rozszczepem wargi i/lub szczęki i podniebienia, sugerując że może odgrywać rolę w patologii tego schorzenia.

3. TIMP-3 nie wykazuje odchyleń od poziomu obecnego u osób zdrowych i nie ulega zmianie po leczeniu chirurgicznym, tym samym wydaje się nie brać udziału w patologii rozszczepów.

7. PIŚMIENNICTWO

1. Olasoji HO, Ukiri OE, Yahaya A. Incidence and aetiology of oral clefts: a review. Afr J Med Med Sci. 2005;34(1):1-7.

2. Murray JC, Schutte BC. Cleft palate: players, pathways, and pursuits. J Clin Invest. 2004;113(12):1676-8.

3. Jugessur A, Farlie PG, Kilpatrick N. The genetics of isolated orofacial clefts: from genotypes to subphenotypes. Oral Dis. 2009;15(7):437-53.

4. Dixon MJ, Marazita ML, Beaty TH, Murray JC. Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences. Nat Rev Genet. 2011;12(3):167-78.

5. Letra A, Menezes R, Govil M, Fonseca RF, McHenry T, Granjeiro JM, et al. Follow-up association studies of chromosome region 9q and nonsyndromic cleft lip/palate. Am J Med Genet A. 2010;152A(7):1701-10.

6. Menezes R, Letra A, Kim AH, Küchler EC, Day A, Tannure PN, et al. Studies with Wnt genes and nonsyndromic cleft lip and palate. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol. 2010;88(11):995-1000.

7. Kantaputra PN, Paramee M, Kaewkhampa A, Hoshino A, Lees M, McEntagart M, et al. Cleft lip with cleft palate, ankyloglossia, and hypodontia are associated with TBX22 mutations. J Dent Res. 2011;90(4):450-5.

8. Mostowska A, Hozyasz KK, Wojcicki P, Biedziak B, Paradowska P, Jagodzinski PP. Association between genetic variants of reported candidate genes or regions and risk of cleft lip with or without cleft palate in the polish population. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol. 2010;88(7):538-45.

9. Fuchs A, Inthal A, Herrmann D, Cheng S, Nakatomi M, Peters H, et al. Regulation of Tbx22 during facial and palatal development. Dev Dyn. 2010;239(11):2860-74.

10. Kot M, Kruk-Jeromin J. [Familial cleft lip with or without coexisting cleft palate]. Pol Merkur Lekarski. 2003;15(86):158-60.

11. Shaw GM, Yang W, Perloff S, Shaw NM, Carmichael SL, Zhu H, et al. Thymidylate synthase polymorphisms and risks of human orofacial clefts. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol. 2013;97(2):95-100.

12. Shields ED, Bixler D, Fogh-Andersen P. Cleft palate: a genetic and epidemiologic investigation. Clin Genet. 1981;20(1):13-24.

13. Stanier P, Moore GE. Genetics of cleft lip and palate: syndromic genes contribute to the incidence of non-syndromic clefts. Hum Mol Genet. 2004;13 Spec No 1:R73-81.

14. Riley BM, Murray JC. Sequence evaluation of FGF and FGFR gene conserved non-coding elements in non-syndromic cleft lip and palate cases. Am J Med Genet A. 2007;143A(24):3228-34.

15. Wurdak H, Ittner LM, Lang KS, Leveen P, Suter U, Fischer JA, et al. Inactivation of TGFbeta signaling in neural crest stem cells leads to multiple defects reminiscent of DiGeorge syndrome. Genes Dev. 2005;19(5):530-5.

16. van den Boogaard MJ, Dorland M, Beemer FA, van Amstel HK. MSX1 mutation is associated with orofacial clefting and tooth agenesis in humans. Nat Genet. 2000;24(4):342-3.

17. Zucchero TM, Cooper ME, Maher BS, Daack-Hirsch S, Nepomuceno B, Ribeiro L, et al. Interferon regulatory factor 6 (IRF6) gene variants and the risk of isolated cleft lip or palate. N Engl J Med. 2004;351(8):769-80.

18. Bender PL. Genetics of cleft lip and palate. J Pediatr Nurs. 2000;15(4):242-9.

19. Mostowska A, Hozyasz KK, Wojcicka K, Lianeri M, Jagodzinski PP. Polymorphisms of stress-related genes and the risk of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol. 2011;91(11):948-55.

20. Bezerra JF, Silva HPVD, Bortolin RH, Luchessi AD, Ururahy MAG, Loureiro MB, et al. IRF6 polymorphisms in Brazilian patients with non-syndromic cleft lip with or without palate. Braz J Otorhinolaryngol. 2019.

21. Parada-Sanchez MT, Chu EY, Cox LL, Undurty SS, Standley JM, Murray JC, et al. Disrupted IRF6-NME1/2 Complexes as a Cause of Cleft Lip/Palate. J Dent Res. 2017;96(11):1330-8.

22. Herkrath AP, Herkrath FJ, Rebelo MA, Vettore MV. Parental age as a risk factor for non-syndromic oral clefts: a meta-analysis. J Dent. 2012;40(1):3-14.

23. Mossey PA, Shaw WC, Munger RG, Murray JC, Murthy J, Little J. Global oral health inequalities: challenges in the prevention and management of orofacial clefts and potential solutions. Adv Dent Res. 2011;23(2):247-58.

24. Shi M, Christensen K, Weinberg CR, Romitti P, Bathum L, Lozada A, et al. Orofacial cleft risk is increased with maternal smoking and specific detoxification-gene variants. Am J Hum Genet. 2007;80(1):76-90.

25. Christensen K, Olsen J, Nørgaard-Pedersen B, Basso O, Støvring H, Milhollin-Johnson L, et al. Oral clefts, transforming growth factor alpha gene variants, and maternal smoking: a population-based case-control study in Denmark, 1991-1994. Am J Epidemiol. 1999;149(3):248-55.

26. Boyles AL, DeRoo LA, Lie RT, Taylor JA, Jugessur A, Murray JC, et al. Maternal alcohol consumption, alcohol metabolism genes, and the risk of oral clefts: a population-based case-control study in Norway, 1996-2001. Am J Epidemiol. 2010;172(8):924-31.

27. DeRoo LA, Wilcox AJ, Drevon CA, Lie RT. First-trimester maternal alcohol consumption and the risk of infant oral clefts in Norway: a population-based case-control study. Am J Epidemiol. 2008;168(6):638-46.

28. Werler MM, Hayes C, Louik C, Shapiro S, Mitchell AA. Multivitamin supplementation and risk of birth defects. Am J Epidemiol. 1999;150(7):675-82.

29. Hernández-Díaz S, Werler MM, Walker AM, Mitchell AA. Folic acid antagonists during pregnancy and the risk of birth defects. N Engl J Med. 2000;343(22):1608-14.

30. Shaw GM, Wasserman CR, Lammer EJ, O'Malley CD, Murray JC, Basart AM, et al. Orofacial clefts, parental cigarette smoking, and transforming growth factor-alpha gene variants. Am J Hum Genet. 1996;58(3):551-61.

31. KERNAHAN DA, STARK RB. A new classification for cleft lip and cleft palate. Plast Reconstr Surg Transplant Bull. 1958;22(5):435-41.

32. Davis, J.S., and Ritchie, H.P., Classification of congenital cleftsof the lip and palate, JAMA, 1922; 79, 1323.

33. Fogh – Andersen P. Genetic and non-genetic factors in the etiology of facial clefts. Scand. J Plast Reconstr Surg 1967, 1: 22 – 29.

34. Kernahan DA. The striped Y--a symbolic classification for cleft lip and palate. Plast Reconstr Surg. 1971;47(5):469-70.

35. BARDACH J, PERCZYNSKA PARTYKA W. [A NEW CLASSIFICATION OF CLEFTS OF THE UPPER LIP, ALVEOLAR PROCESS AND PALATE]. Pol Przegl Chir. 1964;36:701-5.

36. www.rejestrwad.pl

37. Mitchell LE, Beaty TH, Lidral AC, Munger RG, Murray JC, Saal HM, et al. Guidelines for the design and analysis of studies on nonsyndromic cleft lip and cleft palate in humans: summary report from a Workshop of the International Consortium for Oral Clefts Genetics. Cleft Palate Craniofac J. 2002;39(1):93-100.

38. Wyszynski DF, Wu T. Prenatal and perinatal factors associated with isolated oral clefting. Cleft Palate Craniofac J. 2002;39(3):370-5.

39. Stuppia L, Capogreco M, Marzo G, La Rovere D, Antonucci I, Gatta V, et al. Genetics of syndromic and nonsyndromic cleft lip and palate. J Craniofac Surg. 2011;22(5):1722-6.

40. Kohli SS, Kohli VS. A comprehensive review of the genetic basis of cleft lip and palate. J Oral Maxillofac Pathol. 2012;16(1):64-72.

41. Sunny AP, Arunachal G, Danda S. Van der Woude Syndrome: IRF6 Mutations. Indian J Pediatr. 2019;86(11):1070-1.

42. Tiwari M. Science behind human saliva. J Nat Sci Biol Med. 2011;2(1):53-8.

43. Proctor GB, Carpenter GH. Salivary secretion: mechanism and neural regulation. Monogr Oral Sci. 2014;24:14-29.

44. Edgar WM. Saliva: its secretion, composition and functions. Br Dent J. 1992;172(8):305-12.

45. Pedersen AML, Sørensen CE, Proctor GB, Carpenter GH, Ekström J. Salivary secretion in health and disease. J Oral Rehabil. 2018;45(9):730-46.

46. de Almeida PeV, Grégio AM, Machado MA, de Lima AA, Azevedo LR. Saliva composition and functions: a comprehensive review. J Contemp Dent Pract. 2008;9(3):72-80.

47. Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: normal composition, flow, and function. J Prosthet Dent. 2001;85(2):162-9.

48. Wray L. Saliva substitutes. Br Dent J. 2000;188(3):119.

49. Jankowska AK, Waszkiel D, Kobus A, Zwierz K. [Saliva as a main component of oral cavity ecosystem. Part II. Defense mechanisms]. Wiad Lek. 2007;60(5-6):253-7.

50. Yamagishi H, Fitzgerald DH, Sein T, Walsh TJ, O'Connell BC. Saliva affects the antifungal activity of exogenously added histatin 3 towards Candida albicans. FEMS Microbiol Lett. 2005;244(1):207-12.

51. Shimotoyodome A, Kobayashi H, Tokimitsu I, Matsukubo T, Takaesu Y. Statherin and histatin 1 reduce parotid saliva-promoted Streptococcus mutans strain MT8148 adhesion to hydroxyapatite surfaces. Caries Res. 2006;40(5):403-11.

52. Zalewska A, Pietruska MD, Knaś M, Zwierz K. [Non mucin proteins of saliva with high homology of polypeptide chains]. Postepy Hig Med Dosw. 2001;55(5):733-54.

53. Lenander-Lumikari M, Loimaranta V. Saliva and dental caries. Adv Dent Res. 2000;14:40-7.

54. Knaś M, Choromańska M, Karaszewska KDudzik D, Waszkiel D, Borzym-Kluczyk M, Zaniewska A, Zwierz K. Activity of lysosomal exoglycosidases in saliva of patients with HIV infection. Advances in Medical Sciences, 2007; 52, 186-190

55. Knaś M, Maciejczyk M, Waszkiel D, Zalewska A.Oxidative stress and salivary antioxidants = Stres oksydacyjny i antyoksydanty śliny, Dental and Medical Problems,2013; 50, 4, 461-466.

56. Knaś M, Maciejczyk M, Daniszewska I, Klimiuk A, Matczuk J, Kołodziej U, Waszkiel D, Ładny J R, Żendzian-Piotrowska M, Zalewska A, Oxidative damage to the salivary glands of rats with streptozotocin-induced diabetes-temporal study: oxidative stress and diabetic salivary glands, Journal of Diabetes Research, 2016, Article ID 4583742, 13 pp.

57. Borys J, Maciejczyk M, Antonowicz B, Sidun J, Świderska Ma, Zalewska A.

Free radical production, inflammation and apoptosis in patients treated with titanium mandibular fixations - an observational study, Frontiers in Immunology, 2019; 10, Article ID number 2662, 12pp.

58. Knaś M, Zalewska A, Waszkiewicz N, Szulimowska J, Dzięcioł J, Sierakowski S, Waszkiel D., Salivary: flow and proteins of the innate and adaptive immunity in the

limited and diffused systemic sclerosis. Journal of Oral Pathology & Medicine, 2014; 43, 7, 521-529.

59. Jabłońska-Trypuć A, Matejczyk M, Rosochacki S. Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs. J Enzyme Inhib Med Chem. 2016;31(sup1):177-83.

60. Murphy G, Nagase H. Progress in matrix metalloproteinase research. Mol Aspects Med. 2008;29(5):290-308..

61. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. Cardiovasc Res. 2006;69(3):562-73.

62. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. Circ Res. 2003;92(8):827-39.

63. Flannery CR. MMPs and ADAMTSs: functional studies. Front Biosci. 2006;11:544-69.

64. Amălinei C, Căruntu ID, Bălan RA. Biology of metalloproteinases. Rom J Morphol Embryol. 2007;48(4):323-34.

65. Das S, Mandal M, Chakraborti T, Mandal A, Chakraborti S. Structure and evolutionary aspects of matrix metalloproteinases: a brief overview. Mol Cell Biochem. 2003;253(1-2):31-40.

66. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. Annu Rev Cell Dev Biol. 2001;17:463-516.

67. Lombard C, Saulnier J, Wallach J. Assays of matrix metalloproteinases (MMPs) activities: a review. Biochimie. 2005;87(3-4):265-72.

68. Malemud CJ. Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. Front Biosci. 2006;11:1696-701.

69. Arpino V, Brock M, Gill SE. The role of TIMPs in regulation of extracellular matrix proteolysis. Matrix Biol. 2015;44-46:247-54.

70. Brew K, Dinakarpandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. Biochim Biophys Acta. 2000;1477(1-2):267-83.

71. Brew K, Nagase H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. Biochim Biophys Acta. 2010;1803(1):55-71.

72. Lee MH, Atkinson S, Murphy G. Identification of the extracellular matrix (ECM) binding motifs of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-3 and effective transfer to TIMP-1. J Biol Chem. 2007;282(9):6887-98.

73. Aiken A, Khokha R. Unraveling metalloproteinase function in skeletal biology and disease using genetically altered mice. Biochim Biophys Acta. 2010;1803(1):121-32.

74. Emonard H, Grimaud JA. Matrix metalloproteinases. A review. Cell Mol Biol. 1990;36(2):131-53.

75. Verma RP, Hansch C. Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical-biological functions and (Q)SARs. Bioorg Med Chem. 2007;15(6):2223-68.

76. Fingleton B. Matrix metalloproteinases: roles in cancer and metastasis. Front Biosci. 2006;11:479-91.

77. Kwiatkowski P., Godlewski J., Śliwińska-Jewsiewicka A., Kmieć Z. Rola metaloproteina macierzy zewnątrzkomórkowej w procesie inwazji nowotworu. Pol. Ann. Med., 2008; 15(1): 43–50.

78. Coleman MP, Quaresma M, Berrino F, Lutz JM, De Angelis R, Capocaccia R, et al. Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD). Lancet Oncol. 2008;9(8):730-56.

79. Chen X, Li Y. Role of matrix metalloproteinases in skeletal muscle: migration, differentiation, regeneration and fibrosis. Cell Adh Migr. 2009;3(4):337-41.

80. Kleifeld O, Van den Steen PE, Frenkel A, Cheng F, Jiang HL, Opdenakker G, et al. Structural characterization of the catalytic active site in the latent and active natural gelatinase B from human neutrophils. J Biol Chem. 2000;275(44):34335-43.

81. Opdenakker G, Masure S, Grillet B, Van Damme J. Cytokine-mediated regulation of human leukocyte gelatinases and role in arthritis. Lymphokine Cytokine Res. 1991;10(4):317-24.

82. Chaussain C, Boukpessi T, Khaddam M, Tjaderhane L, George A, Menashi S. Dentin matrix degradation by host matrix metalloproteinases: inhibition and clinical perspectives toward regeneration. Front Physiol. 2013;4:308.

83. Goldberg M, Smith AJ. CELLS AND EXTRACELLULAR MATRICES OF DENTIN AND PULP: A BIOLOGICAL BASIS FOR REPAIR AND TISSUE ENGINEERING. Crit Rev Oral Biol Med. 2004;15(1):13-27.

84. Mazzoni A, Papa V, Nato F, Carrilho M, Tjäderhane L, Ruggeri A, et al. Immunohistochemical and biochemical assay of MMP-3 in human dentine. J Dent. 2011;39(3):231-7.

85. Mazzoni A, Pashley DH, Tay FR, Gobbi P, Orsini G, Ruggeri A, et al. Immunohistochemical identification of MMP-2 and MMP-9 in human dentin: correlative FEI-SEM/TEM analysis. J Biomed Mater Res A. 2009;88(3):697-703.

86. Sulkala M, Tervahartiala T, Sorsa T, Larmas M, Salo T, Tjäderhane L. Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) is the major collagenase in human dentin. Arch Oral Biol. 2007;52(2):121-7.

87. Sulkala M, Pääkkönen V, Larmas M, Salo T, Tjäderhane L. Matrix metalloproteinase-13 (MMP-13, collagenase-3) is highly expressed in human tooth pulp. Connect Tissue Res. 2004;45(4-5):231-7.

88. Sulkala M, Larmas M, Sorsa T, Salo T, Tjäderhane L. The localization of matrix metalloproteinase-20 (MMP-20, enamelysin) in mature human teeth. J Dent Res. 2002;81(9):603-7.

89. Palosaari H, Ding Y, Larmas M, Sorsa T, Bartlett JD, Salo T, et al. Regulation and interactions of MT1-MMP and MMP-20 in human odontoblasts and pulp tissue in vitro. J Dent Res. 2002;81(5):354-9.

90. Palosaari H, Pennington CJ, Larmas M, Edwards DR, Tjäderhane L, Salo T. Expression profile of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in mature human odontoblasts and pulp tissue. Eur J Oral Sci. 2003;111(2):117-27.

91. Basi DL, Hughes PJ, Thumbigere-Math V, Sabino M, Mariash A, Lunos SA, et al. Matrix metalloproteinase-9 expression in alveolar extraction sockets of Zoledronic acid-treated rats. J Oral Maxillofac Surg. 2011;69(11):2698-707.

92. Zhou XJ, Sugerman PB, Savage NW, Walsh LJ. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in oral lichen planus. J Cutan Pathol. 2001;28(2):72-82.

93. Chaussain-Miller C, Fioretti F, Goldberg M, Menashi S. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. J Dent Res. 2006;85(1):22-32.

94. Mansell JP, Kerrigan J, McGill J, Bailey J, TeKoppele J, Sandy JR. Temporal changes in collagen composition and metabolism during rodent palatogenesis. Mech Ageing Dev. 2000;119(1-2):49-62.

95. François-Fiquet C, Poli-Merol ML, Nguyen P, Landais E, Gaillard D, Doco-Fenzy M. Role of angiogenesis-related genes in cleft lip/palate: review of the literature. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2014;78(10):1579-85.

96. Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjäderhane L. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. Acta Odontol Scand. 2007;65(1):1-13.

97. Kouskoura T, Fragou N, Alexiou M, John N, Sommer L, Graf D, et al. The genetic basis of craniofacial and dental abnormalities. Schweiz Monatsschr Zahnmed. 2011;121(7-8):636-46.

98. Brown NL, Yarram SJ, Mansell JP, Sandy JR. Matrix metalloproteinases have a role in palatogenesis. J Dent Res. 2002;81(12):826-30.

99. Carinci P, Becchetti E, Baroni T, Carinci F, Pezzetti F, Stabellini G, et al. Extracellular matrix and growth factors in the pathogenesis of some craniofacial malformations. Eur J Histochem. 2007;51 Suppl 1:105-15.

100. Sandy JR. Molecular, clinical and political approaches to the problem of cleft lip and palate. Surgeon. 2003;1(1):9-16.

101. Letra A, Silva RA, Menezes R, Astolfi CM, Shinohara A, de Souza AP, et al. MMP gene polymorphisms as contributors for cleft lip/palate: association with MMP3 but not MMP1. Arch Oral Biol. 2007;52(10):954-60.

102. Kadir A, Mossey PA, Blencowe H, Moorthie S, Lawn JE, Mastroiacovo P, et al. Systematic Review and Meta-Analysis of the Birth Prevalence of Orofacial Clefts in Low- and Middle-Income Countries. Cleft Palate Craniofac J. 2017;54(5):571-81.

103. Ishorst N, Francheschelli P, Böhmer AC, Khan MFJ, Heilmann-Heimbach S, Fricker N, et al. Nonsyndromic cleft palate: An association study at GWAS candidate loci in a multiethnic sample. Birth Defects Res. 2018;110(10):871-82.

104. Mossey PA, Little J, Steegers-Theunissen R, Molloy A, Peterlin B, Shaw WC, et al. Genetic Interactions in Nonsyndromic Orofacial Clefts in Europe-EUROCRAN Study. Cleft Palate Craniofac J. 2017;54(6):623-30.

105. Przylipiak Stanisław, Przylipiak Halina. Leczenie ortodontyczne obróconych siekaczy górnych u pacjentów z rozszczepem wargi, wyrostka zębodołowego i podniebienia. Orthodontic treatment of rotated upper incisors in patients with cleft lip, alveolar process and palate. Czasopismo Stomatologiczne, 1976 : 29, 4, s. 331-334

106. Vieira AR. Unraveling human cleft lip and palate research. J Dent Res. 2008;87(2):119-25.

107. Beaty TH, Marazita ML, Leslie EJ. Genetic factors influencing risk to orofacial clefts: today's challenges and tomorrow's opportunities. F1000Res. 2016;5:2800.

108. Meng L, Bian Z, Torensma R, Von den Hoff JW. Biological mechanisms in palatogenesis and cleft palate. J Dent Res. 2009;88(1):22-33.

109. Murray JC. Gene/environment causes of cleft lip and/or palate. Clin Genet. 2002;61(4):248-56.

110. Morris-Wiman J, Burch H, Basco E. Temporospatial distribution of matrix metalloproteinase and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases during murine secondary palate morphogenesis. Anat Embryol (Berl). 2000;202(2):129-41.

111. Blanton SH, Bertin T, Serna ME, Stal S, Mulliken JB, Hecht JT. Association of chromosomal regions 3p21.2, 10p13, and 16p13.3 with nonsyndromic cleft lip and palate. Am J Med Genet A. 2004;125A(1):23-7.

112. 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(7):540-8.

113. Nikopensius T, Kempa I, Ambrozaitytė L, Jagomägi T, Saag M, Matulevičienė A, 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.

114. Smane-Filipova L, Pilmane M, Akota I. MMPs and TIMPs expression in facial tissue of children with cleft lip and palate. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2016;160(4):538-42.

115. Krivicka B, Pilmane M, Akota I. Expression of TGFβ-3, PAX9, RYK, matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in human cleft-affected tissue. Papers on Anthropology XXIV/1, 2015, pp. 90–100.

116. de Oliveira Demarchi AC, Zambuzzi WF, Paiva KB, da Silva-Valenzuela M, Nunes FD, de Cássia Sávio Figueira R, et al. Development of secondary palate requires strict regulation of ECM remodeling: sequential distribution of RECK, MMP-2, MMP-3, and MMP-9. Cell Tissue Res. 2010;340(1):61-9.

117. Gonçalves PF, Huang H, McAninley S, Alfant B, Harrison P, Aukhil I, et al. Periodontal treatment reduces matrix metalloproteinase levels in localized aggressive periodontitis. J Periodontol. 2013;84(12):1801-8.

118. Luukkaa H, Klemi P, Hirsimäki P, Vahlberg T, Kivisaari A, Kähäri VM, et al. Matrix metalloproteinase (MMP)-7 in salivary gland cancer. Acta Oncol. 2010;49(1):85-90.

119. Luukkaa H, Klemi P, Leivo I, Mäkitie AA, Irish J, Gilbert R, et al. Expression of matrix metalloproteinase-1, -7, -9, -13, Ki-67, and HER-2 in epithelial-myoepithelial salivary gland cancer. Head Neck. 2010;32(8):1019-27.

120. Shpitzer T, Hamzany Y, Bahar G, Feinmesser R, Savulescu D, Borovoi I, et al. Salivary analysis of oral cancer biomarkers. Br J Cancer. 2009;101(7):1194-8.

121. P Popat R, Bhavsar NV, Popat PR. Gingival crevicular fluid levels of Matrix Metalloproteinase-1 (MMP-1) and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 (TIMP-1) in periodontal health and disease. Singapore Dent J. 2014;35:59-64.

122. Stott-Miller M, Houck JR, Lohavanichbutr P, Méndez E, Upton MP, Futran ND, et al. Tumor and salivary matrix metalloproteinase levels are strong diagnostic markers of oral squamous cell carcinoma. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2011;20(12):2628-36.

8. STRESZCZENIE

Rozszczepy wargi i/lub podniebienia stanowią jedną z najczęściej występujących wrodzonych anomalii rozwojowych twarzoczaszki. W większości przypadku jest to wada wrodzona o skomplikowanej etiologii, wykazująca wieloczynnikowy model dziedziczenia, obejmujący zarówno genetyczne jak i środowiskowe czynniki ryzyka. Istnieje wiele czynników środowiskowych, które powodują zmiany w specyficznych białkach sygnałowych i tym samym indukują rozszczep wargi i/lub podniebienia. Do jednych z nich można zaliczyć MMPs i TIMPs, które są odpowiedzialne za niszczenie macierzy zewnątrzkomórkowej i mogą uczestniczyć w procesie rozszczepu wargi i/lub podniebienia.

Celem niniejszej pracy doktorskiej była ocena stężenia metaloproteazy -3 i -9 i ich inhibitora TIMP-3 w ślinie dzieci z rozszczepami twarzoczaszki w porównaniu ze stężeniem tych MMPs i inhibitora u pacjentów operowanych z powodu wady rozszczepowej jak i u dzieci bez wady rozszczepowej. Dodatkowo oceniono przydatność diagnostyczną badanych parametrów w oparciu o wyliczenie czułości i swoistości diagnostycznej, dodatniej i ujemnej wartości predykcyjnej (PPV, NPV) oraz mocy diagnostycznej testu.

Badaniami objęto dwie podgrupy pacjentów, gdzie pierwszą z nich stanowiło 40 pacjentów z rozpoznanym rozszczepem twarzoczaszki i/lub tkanek miękkich, natomiast drugą – pacjenci po przeprowadzonym zabiegu operacyjnym z powodu rozszczepu wargi i/lub podniebienia. Grupę kontrolną stanowiło 40 pacjentów bez rozszczepu twarzoczaszki.

Badane parametry (MMP-3, MMP-9, TIMP-3) zostały oznaczone w ślinie za pomocą metody immunoenzymatycznej ELISA, która jest powszechnie stosowana i charakteryzuje się wysoką czułością i swoistością.

Na podstawie analizy wyników badań wykazano, że pacjenci z nieleczonym rozszczepem wargi i/lub podniebienia mieli wyższe stężenia MMP-3 w porównaniu z grupą kontrolną. Ponadto stwierdzono, że wartości stężeń MMP-9 i TIMP-3 u pacjentów nie operowanych były niższe niż w grupach kontrolnych. Dodatkowo, oceniając stężenia wszystkich badanych parametrów zaobserwowano, iż zmniejszały się one po

przeprowadzeniu operacji, jednak różnica istotna statystycznie dotyczyła MMP-3 i TIMP-3. Ponadto stwierdzono, iż stężenia MMP-3 były wyższe u pacjentów poddanych zabiegowi operacyjnemu w porównaniu z kontrolą, natomiast stężenia MMP-9 były niższe. Zaobserwowano również wysoką swoistość diagnostyczną wszystkich badanych parametrów. Najwyższą mocą diagnostyczną badań w przypadku pacjentów z rozszczepem wargi i/lub podniebienia cechowały się oznaczenia MMP-3. Natomiast w grupie osób po przeprowadzonym zabiegu operacyjnym, wartości te były najwyższe dla MMP-9.

Przedstawione wyniki wskazują na udział MMP-3 w procesach patologicznych dotyczących rozszczepów wargi i/lub podniebienia.

9. STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM

Cleft lip and/or palate are one of the most common congenital facial cranial anomalies. In most cases, it is a congenital malformation with a complicated etiology, showing a multifactorial inheritance model that includes both genetic and environmental risk factors. There are many environmental factors that cause changes in specific signal proteins and thus induce cleft lip and / or palate. One of them includes MMPs and TIMPs, which are responsible for the destruction of the extracellular matrix and can participate in the cleft process of the lip and / or palate.

The aim of this work was to measure the concentration of metalloprotease -3 and -9 and their TIMP-3 inhibitor in the saliva of children with craniofacial cleft compared to the concentration of these MMPs and the inhibitor in patients after surgery due to a innate cleft defect and children without a cleft defect. Additionally, the diagnostic usefulness of the tested parameters was assessed based on the calculation of diagnostic sensitivity and specificity, positive and negative predictive values (PPV, NPV) and diagnostic test power. The study included two subgroups of patients, the first of which was 40 patients with diagnosed craniofacial cleft, while the second - patients after surgery due to cleft lip and / or palate or after surgery. The control group consisted of 40 patients without craniofacial cleft.

The tested parameters (MMP-3, MMP-9, TIMP-3) were determined in saliva using the enzyme-linked ELISA method, which is widely used and is characterized by high sensitivity and specificity. Based on the analysis of test results, it was shown that patients with untreated cleft lip and / or palate had higher MMP-3 levels compared to the control group. In addition, it was found that MMP-9 and TIMP-3 values in patients not yet operated were lower than in the control groups. In addition, when assessing the concentrations of all the parameters examined, it was found that they were lower after the surgery. However this phenomenon was statistically significant only in the case of MMP-3 and TIMP-3. In addition, MMP-3 levels were found to be higher in patients after surgery compared to controls, while MMP-9 levels were lower. Assessing diagnostic sensitivity, it was shown that it was the highest for MMP-9 both in patients before and after surgery. High diagnostic

specificity was also observed for all tested parameters. MMP-3 determinations had the highest diagnostic power in the case of patients with cleft lip and / or palate. However, in the group of people after surgery, these values were the highest for MMP-9.

The presented results indicate that MMP-3 is involved in etiology of congenital cleft lip and/or palate.

10. SPIS RYCIN

Rycina 1. Klasyfikacja rozszczepów wargi i podniebienia według Kernahana. Zmodyfikowano na podstawie (34).

Rycina 2. Lokalizacja anatomiczna dużych i małych gruczołów ślinowych (kolor fioletowy) (45).

Rycina 3. Proces powstawania śliny (45).

Rycina 4. Struktura domen MMPs (65).

Rycina 5. Struktura przestrzenna TIMP-3 przedstawiająca względne pozycje jedenastu reszt aminokwasowych (72).

Rycina 6. Rola metaloproteinaz w procesach biologicznych organizmu (77).

Rycina 7. Porównanie budowy MMPs. Budowa strukturalna MMP-3 i MMP-9 (81).

Rycina 8. Udział metaloproteinaz w procesie odontogenezy.

Rycina 9. Schemat metody ELISA do oznaczania badanych parametrów (opracowanie własne).

Rycina 10. Analiza stężenia metaloproteinazy-3 u pacjentów przed i po operacji oraz w grupie kontrolnej. * $p<0,001$

Rycina 11. Analiza stężenia metaloproteinazy-9 u pacjentów przed i po operacji oraz w grupie kontrolnej. * $p<0,001$

Rycina 12. Analiza stężenia tkankowego inhibitora metaloproteinazy-3 u pacjentów przed i po operacji oraz w grupie kontrolnej.

Rycina 13. Czułość diagnostyczna w grupie chorych z rozszczepem wargi i/lub podniebienia.

Rycina 14. Swoistość diagnostyczna w grupie chorych z rozszczepem wargi i/lub podniebienia.

Rycina 15. Wartość predykcyjna wyniku dodatniego w grupie chorych z rozszczepem wargi i/lub podniebienia.

Rycina 16. Wartość predykcyjna wyniku ujemnego w grupie chorych z rozszczepem wargi i/lub podniebienia.

Rycina 17. Analiza krzywych ROC MMP-3, MMP-9 i TIMP-3 w grupie chorych z rozszczepem wargi i/lub podniebienia.

Rycina 18. Czułość diagnostyczna w grupie chorych z rozszczepem wargi i/lub podniebienia po zabiegu operacyjnym.

Rycina 19. Swoistość diagnostyczna w grupie chorych z rozszczepem wargi i/lub podniebienia po zabiegu operacyjnym.

Rycina 20. Wartość predykcyjna wyniku dodatniego w grupie chorych z rozszczepem wargi i/lub podniebienia po zabiegu operacyjnym.

Rycina 21. Wartość predykcyjna wyniku ujemnego w grupie chorych z rozszczepem wargi i/lub podniebienia po zabiegu operacyjnym.

Rycina 22. Analiza krzywych ROC MMP-3, MMP-9 i TIMP-3 w grupie chorych z rozszczepem wargi i/lub podniebienia po zabiegu operacyjnym.

11. SPIS TABEL

Tabela 1. Częstość występowania rozszczepów wargi i/lub podniebienia na terenie województw objętych Polskim Rejestrem Wrodzonych Wad Rozwojowych w latach 2005-2006 (na 10 000 urodzeń) (36).

Tabela 2. Podział metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (61).

Tabela 3. Podział metaloproteinaz na podstawie specyfiki substratowej (63).

Tabela 4. Stężenie MMP-3, MMP-9 i TIMP-3 w pacjentów z rozszczepami wargi i/lub podniebienia i u osób zdrowych.

Tabela 5. Analiza pola pod krzywą ROC (AUC) MMP-3, MMP-9 i TIMP-3 w grupie chorych z rozszczepem wargi i/lub podniebienia.

Tabela 6. Analiza pola pod krzywą ROC (AUC) MMP-3, MMP-9 i TIMP-3 w grupie chorych z rozszczepem wargi i/lub podniebienia po zabiegu operacyjnym.

Nr ISBN: 978-83-978350-2-3