Liene Smane-Filipova

**AUDU FUNKCIONĀLĀ MORFOLOĢIJA
BĒRNIEM AR ABPUSĒJU CAUREJOŠU
LŪPAS, ALVEOLĀRĀ IZAUGUMA
UN AUKSLĒJU ŠĶELTNI
ONTOĢENĒTISKĀ ASPEKTĀ**

Promocijas darbs
medicīnas doktora zinātniskā grāda iegūšanai
Specialitāte – morfoloģija

Rīga, 2016

RĪGAS STRADIŅA
UNIVERSITĀTE

Liene Smāne-Filipova

AUDU FUNKCIONĀLĀ MORFOLOĢIJA BĒRNIEM
AR ABPUSĒJU CAUREJOŠU LŪPAS, ALVEOLĀRĀ
IZAUGUMA UN AUKSLĒJU ŠĶELTNI
ONTOĢENĒTISKĀ ASPEKTĀ

Promocijas darbs
medicīnas doktora zinātniskā grāda iegūšanai

Specialitāte – morfoloģija

Darba zinātniskā vadītāja
Dr. med., Dr. habil. med. profesore Māra Pilmane

IEGULDĪJUMS TAVĀ NĀKOTNĒ

Promocijas darbs veikts ar ESF projekta “Atbalsts doktorantiem studiju programmas apguvei un zinātniskā grāda ieguvei Rīgas Stradiņa universitātē” finansiālu atbalstu, vienošanās Nr. 2009/0147/1DP/1.1.2.1.2/09/IPIA/VIAA/009

Rīga, 2016

ANOTĀCIJA

Lūpu un aukslēju šķeltne ir viena no izplatītākajām iedzimtajām anomālijām, kas bērnam izraisa estētiskus un funkcionālus traucējumus. Abpusēja caurejoša šķeltne ir smaga patoloģija, tās ārstēšanai tiek lietotas daudzetaļu plastiskas ķirurģiskas korekcijas, brūces slēdzas un veidojas rētaudi, kas var negatīvi ietekmēt sejas un mutes dobuma audu augšanu. Mūsdienās morfopatoģenētiskai sejas šķeltņu skarto audu izpētei ir būtiska nozīme, lai izprastu šīs embrionāli determinētās patoloģijas etiomorfoģenēzi un pēcoperācijas audu remodelācijas potenciālu. Sejas un mutes dobuma attīstības pamatā ir vairāki precīzi koordinēti procesi – šūnu proliferācija, diferenciācija, migrācija, programmēta šūnu nāve, ekstracelulārās matricē sintēze un degradācija, vietējās audu aizsardzības faktoru bāzes veidošanās. Minētos procesus embrija audos koordinē dažādas signālmolekulas un augšanas faktori. Noteikti gēni, ārvidē un teratogēnie faktori var izraisīt kādas noteiktas signālmolekulas un/vai augšanas faktoru trūkumu vai pārlieku lielu to esamību, kā rezultātā var attīstīties sejas šķeltne.

Pētījuma mērķis bija specifisku signālmolekulu un šūnu nāves noteikšana šķeltņu skartajos audos, kā arī to faktoru noteikšana, kuri visbūtiskāk raksturo abpusējas caurejošas šķeltnes morfopatoģenēzi ontogēnētiskajā aspektā.

Pētījumā tika iekļauti 46 pacienti: 22 bērniem bija abpusēja caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne, 24 bērniem – vienpusēja caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne.

Ar imūnhistoķīmisko metodi tika izpētīts un analizēts matricē metaloproteināzes-2 (*MMP-2*), matricē metaloproteināzes-8 (*MMP-8*), matricē metaloproteināzes-9 (*MMP-9*), matricē metaloproteināzes-2 audu inhibitora (*TIMP-2*), matricē metaloproteināzes-4 audu inhibitora (*TIMP-4*), gēnu proteīnu *MSX1*, *IRF6*, *PAX9*, *RYK*, vaskulārā endotēlija augšanas faktora (*VEGF*), transformējošā augšanas faktora beta-3 (*TGFβ3*), transmembranozā glikoproteīna *CD34* (*CD34*), proteīngēnvielas 9.5 (*PGP 9.5*), nestīna, proliferācijas marķiera *Ki-67* (*Ki-67*), osteokalcīna (*OC*), osteopontīna (*OP*), osteoproteģerīna (*OPG*) un kaula morfoģenētiskā proteīna 2/4 (*BMP2/4*) imūnreaktīvo šūnu un nervšķiedru relatīvais daudzums. Izmantojot *TUNEL* metodi, tika izpētīta apoptotisko šūnu klātbūtne un sadalījums.

Kopumā smagākajam šķeltnes veidam – abpusējai caurejošai lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltnei – tika konstatēta samazināta transkripcijas faktora *IRF6*, *MSX1* un *PAX9*, augšanas faktora *TGFβ3* un *VEGF* klātbūtne, kā arī samazināta šūnu proliferācija un apoptoze mīkstajos audos, bet balstaudos samazināta *OPN*, *OPG*, *MMP-2*, *TIMP-2*, *BMP2/4* un *TGFβ3* klātbūtne. Pārliecinoši identificējām, ka morfoloģiskās audu izmaiņas ir

smagākas pacientiem ar abpusēju šķeltni. Atkārtotu operāciju laikā vieniem un tiem pašiem pacientiem darbā novērojām palielinātu *MSX1*, *MMP-9*, *TIMP-4*, *TGFβ3*, *Ki-67* un samazinātu *VEGF* ekspresiju.

ANNOTATION

Cleft lip and palate is one of the most common congenital pathologies, causing esthetic and functional disorders in a child. Complete bilateral cleft lip and palate is a grave pathology, in its treatment multigrade plastic surgical corrections are needed, resulting in the closure of the wound and formation of scar tissue, which can negatively affect the growth of the facial and oral tissues. Nowadays the morphogenetic study of facial cleft-affected tissues is of great significance, in order to understand the etiomorphogenesis of this embryonally determined pathology and post-operation tissue remodeling potential. The development of the face and oral cavity contains the following specifically coordinated processes – tissue proliferation, differentiation, migration, programmed tissue death, synthesis and degradation of extracellular matrix, development of the basis of local protection factors. The processes mentioned in embryonic tissues are coordinated by different signal molecules and growth factors. Specific genes, external and teratogenic factors can cause the lack or excessive presence of a certain signal molecule and/or growth factor, resulting in the development of the facial cleft.

The aim of the research was to study specific signaling molecules and tissue death determination in the cleft-affected tissues, as well as determination of those factors, which most essentially characterize morphopathogenesis of bilateral cleft lip and palate in the ontogenetic aspect.

46 patients were included in the research: 22 children had bilateral complete cleft lip, alveolar process and palate, 24 children – unilateral complete cleft lip, alveolar process and palate.

By means of immunohistochemical method there were studied and analyzed matrix metalloproteinase-2 (*MMP-2*), matrix metalloproteinase-8 (*MMP-8*), matrix metalloproteinase-9 (*MMP-9*), tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 (*TIMP-2*), tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-4 (*TIMP-4*), gene protein *MSX1*, *IRF6*, *PAX9*, *RYK*, vascular endothelial growth factor (*VEGF*), transforming growth factor beta-3 (*TGFβ3*), transmembranous glycoprotein *CD34* (*CD34*), protein gene product 9.5 (*PGP 9.5*), nestin, proliferation marker *Ki-67* (*Ki-67*), osteocalcin (*OC*), osteopontin (*OP*), osteoprotegerin (*OPG*) and relative amount of bone morphogenetic protein 2/4 (*BMP2/4*) immunoreactive structures. By *TUNEL* method was studied the presence and distribution of apoptotic cells.

All in all, in the most severe type of the cleft – bilateral cleft lip and palate there was found the presence of decreased transcription factor *IRF6*, *MSX1* and *PAX9*, the growth factor *TGFβ3* and *VEGF*, as well as the decreased cell proliferation and apoptosis in the soft

tissues, but in the supporting tissues – the decreased *OPN*, *OPG*, *MMP-2*, *TIMP-2*, *BMP2/4* and *TGFβ3* presence. It was conclusively proved, that morphological tissue changes were more severe in patients with bilateral clefts. During repeated operations, one and the same patients we were identified an increased *MSX1*, *MMP-9*, *TIMP-4*, *TGFβ3*, *Ki-67* and decreased *VEGF* expression.

SATURS

Anotācija	2
Darbā lietotie saīsinājumi	9
Ievads	12
Darba aktualitāte	12
Darba mērķis	14
Darba uzdevumi	14
Darba hipotēzes.....	15
Darba novitāte.....	15
Mērķa populācija	16
Sadarbības partneri	16
Materiāli tehniskais nodrošinājums	16
Personīgais ieguldījums	16
Ētiskie aspekti	17
1. Literatūras apskats	18
1.1. Lūpas un aukslēju šķeltnes vispārīgs raksturojums	18
1.2. Sejas un mutes dobuma attīstības raksturojums	19
1.2.1. Augšlūpas morfoģenēzes molekulārie mehānismi.....	20
1.2.2. Sekundāro aukslēju morfoģenēzes molekulārie mehānismi	21
1.3. Audu degradācijas enzīmi (<i>MMP</i>) un ar tām saistītie endogēnie inhibitori (<i>TIMP</i>)	25
1.4. <i>IRF6</i> gēns.....	26
1.5. <i>PAX9</i> gēns.....	27
1.6. <i>MSX1</i> gēns	28
1.7. Ryk gēns	29
1.8. Angioģenēzi ietekmējošie faktori	30
1.9. Apoptoze.....	32
1.10. Nestīns un <i>Ki-67</i>	34
1.11. Proteīngēnviela 9.5 (<i>PGP 9.5</i>).....	35
1.12. Kaula morfoģenētiskie proteīni (<i>BMP</i>)	36
1.13. Osteoproteģerīns (<i>OPG</i>)	37
1.14. Alveolārā kaula ekstracelulārās matricēs (<i>ECM</i>) nekolagēnie proteīni.....	37
2. Materiāls un metodes	39
2.1. Morfoloģiski pētāmais materiāls un pacientu iedalījums grupās.....	39
2.1.1. Pirmās un otrās grupas – zīdaiņu un bērnu ar abpusējām caurejošām lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltnēm – raksturojums	40

2.1.2. Trešās grupas – bērnu ar abpusējām caurejošām lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltnēm – raksturojums	43
2.1.3. Ceturtās un piektās grupas – bērnu ar vienaspusējām caurejošām lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltnēm – raksturojums	44
2.1.4. Kontroles grupa.....	47
2.2. Morfoloģiskās metodes.....	48
2.2.1. Pētāmā audu materiāla fiksācija.....	48
2.2.2. Rutīnās histoloģijas krāsošanas metode	48
2.2.3. Imūnhistoķīmijas metode un reaģenti	49
2.2.4. <i>TUNEL</i> metode	51
2.3. Puskvantitatīvā skaitīšanas metode.....	53
2.4. Statistiskās metodes	54
3. Rezultāti.....	55
3.1. Morfoloģiskā atrade kontroles grupas pacientiem un pacientiem ar šķeltni.	55
3.1.1. Rutīnās histoloģijas dati kontroles grupas pacientiem	55
3.1.2. Rutīnās histoloģijas dati pacientiem ar šķeltni.....	55
3.2. Mīksto audu dažādu faktoru imūnhistoķīmisko pētījumu un apoptozes atrade.	56
3.2.1. Audu degradācijas enzīmu (<i>MMP</i>) un to endogēno inhibitoru (<i>TIMP</i>) imūnhistoķīmiskie dati	56
3.2.2. Gēnu proteīnu imūnhistoķīmiskie dati	57
3.2.3. Augšanas faktoru, <i>CD34</i> , invāzijas faktora <i>PGP 9.5</i> imūnhistoķīmiskie un statistiskie dati	59
3.2.4. Šūnu proliferācijas marķiera (<i>Ki-67</i>), nestīna un apoptozes atrade	60
3.2.5. Kaulaudu osteokalcīna (<i>OC</i>), osteopontīna (<i>OP</i>) un osteoproteģerīna (<i>OPG</i>) imūnhistoķīmiskie dati	61
3.2.6. Kaulaudu kaula morfoģenētiskā proteīna 2/4 (<i>BMP2/4</i>), matricas metaloproteināzes-2 (<i>MMP-2</i>), matricas metaloproteināzes-2 audu inhibitora (<i>TIMP-2</i>) un tranformējošā augšanas faktora beta3 (<i>TGFβ3</i>) imūnhistoķīmiskie dati	62
3.2.7. Imūnhistoķīmiski noteikto marķieru savstarpējās atbilstības ciešuma izvērtēšanas dati kontroles grupas pacientiem.....	63
3.3. Šķeltnu skartu audu faktoru atrade	64
3.3.1. Audu degradācijas enzīmu (<i>MMP</i>) un to endogēno audu inhibitoru (<i>TIMP</i>) imūnhistoķīmiskie un statistiskie dati.....	64
3.3.2. Gēnu proteīnu imūnhistoķīmiskie un statistiskie dati	78
3.3.3. Augšanas faktoru, <i>CD34</i> , invāzijas faktora <i>PGP 9.5</i> imūnhistoķīmiskie un statistiskie dati	89
3.3.4. Šūnu proliferācijas marķiera (<i>Ki-67</i>), nestīna un apoptozes imūnhistoķīmiskie un statistiskie dati.....	99

3.3.5. Osteokalcīna (<i>OC</i>), osteopontīna (<i>OPN</i>) un osteoprotegerīna (<i>OPG</i>) imūnhistoķīmiskie un statistiskie dati osteoplastikas laikā iegūtajā materiālā.....	106
3.3.6. Matrices metaloproteināzes-2 (<i>MMP-2</i>), matrices metaloproteināzes-2 audu inhibitora (<i>TIMP-2</i>), kaula morfoģenētiskā proteīna (<i>BMP 2/4</i>), transformējošā augšanas faktora beta3 (<i>TGFβ3</i>) imūnhistoķīmiskie un statistiskie dati osteoplastikas laikā iegūtajā materiālā.....	109
3.4. Imūnhistoķīmisko faktoru atrade un statistiskie dati atkārtoti ņemtajos audos pacientiem ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni	114
3.5. Imūnhistoķīmiski noteikto marķieru savstarpējās atbilstības ciešuma izvērtēšanas dati, izmantojot Spīrmena rangu korelācijas koeficientu	116
4. Diskusija	119
5. Secinājumi	138
6. Literatūras saraksts.....	140
Publikācijas un prezentācijas par pētījuma tēmu	156
Pateicības.....	159
Pielikumi.....	160
1. pielikums	161
Mikrofotogrāfijas.....	161
2. pielikums	210
RSU Ētikas komitejas lēmumi.....	210

DARBĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI

Saīsinājums	Nosaukums angļu valodā	Skaidrojums latviešu valodā
AAI	<i>Institute of Anatomy and Anthropology</i>	Anatomijas un antropoloģijas institūts
ADAMTS	<i>A Disintegrin And Metalloproteinase with Trombospondin Motifs</i>	Disintegrīns un metaloproteināze ar trombospondīna motīviem
ARHGAP29	<i>Rho GTPase activating protein 29 gene</i>	Rho GTPāzes aktivējošā proteīna gēns
AXIN2	<i>Axis inhibition protein 2 gene</i>	Ass inhibējošā proteīna-2 gēns
Barx1	<i>BarH-like homeobox 1</i>	BarH līdzīgais homeoboksa-1
BMP2/4	<i>Bone morphogenetic protein 2/4</i>	Kaula morfoģenētiskais proteīns 2/4
BMP4	<i>Bone morphogenetic protein 4</i>	Kaula morfoģenētiskais proteīns-4
Bmpr1a	<i>Bone morphogenetic protein receptor, type 1a</i>	Kaula morfoģenētiskā proteīna receptors-1a
Dlx5	<i>Distal-less homeobox 5</i>	Mazāk distālais homeobokss-1
E	-	Epitēlišūnas
ECM	<i>Extracellular matrix</i>	Ekstracelulārā matrice
EfnB1	<i>Ephrin B1</i>	Efrīna B1 gēns
EphB2	<i>Ephrin B2</i>	Efrīna B2 gēns
EphB3	<i>Ephrin B3</i>	Efrīna B3 gēns
ETM	<i>Epithelial-mesenchymal transition</i>	Epitēlija transformācija mezenhīmā
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>	Fibroblastu augšanas faktors
Fgf10	<i>Fibroblast growth factor 10</i>	Fibroblastu augšanas faktors-10
Fgf7	<i>Fibroblast growth factor 7</i>	Fibroblastu augšanas faktors-7
FGFR1	<i>Fibroblast growth factor receptor 1</i>	Fibroblastu augšanas faktora receptors 1
FGFR2	<i>Fibroblast growth factor receptor 2</i>	Fibroblastu augšanas faktora receptors 2
Fgfr2b	<i>Fibroblast growth factor receptor 2b</i>	Fibroblastu augšanas faktora receptors-2b
Fos	<i>FBJ osteosarcoma oncogene</i>	FBJ osteosarkomas onkogēns
g	-	Gadi
Hsp70	<i>Heat shock protein 70</i>	Karstumšoka proteīns 70
IRF6	<i>Interferon regulatory factor 6</i>	Interferona regulējošais faktors-6
LEF-1	<i>Lymphoid enhancer-binding factor 1</i>	Limfoidais enhancers (aktivators)-saistošais faktors-1
M	-	Meitene
MEE	<i>Medial edge epithelium</i>	Mediālās malas epitēlijs
Meox2	<i>Mesenchyme homeobox 2</i>	Mezenhīmas homeoboksa-2
mēn	-	Mēneši
MMP-13	<i>Matrix metalloproteinase-13</i>	Matrices metaloproteināze-13
MMP-14	<i>Matrix metalloproteinase-14</i>	Matrices metaloproteināze-14
MMP-16	<i>Matrix metalloproteinase-16</i>	Matrices metaloproteināze-16
MMP-2	<i>Matrix metalloproteinase-2</i>	Matrices metaloproteināze-2
MMP-8	<i>Matrix metalloproteinase-8</i>	Matrices metaloproteināze-8
MMP-9	<i>Matrix metalloproteinase-9</i>	Matrices metaloproteināze-9
Mn1	<i>Meningioma 1</i>	Meningioma-1
MSX	<i>MSX homeobox</i>	Muskuļu segmentācijas homeobokss
MSX1	<i>MSX homeobox 1</i>	Muskuļu segmentācijas homeobokss-1
MSX2	<i>MSX homeobox 2</i>	Muskuļu segmentācijas homeobokss-2
OC	<i>Osteocalcin</i>	Osteokalcīns
OPG	<i>Osteoprotegerin</i>	Osteoproteģerīns

tabulas turpinājums		
Saīsinājums	Nosaukums angļu valodā	Skaidrojums latviešu valodā
<i>OPN</i>	<i>Osteopontin</i>	Osteopontīns
<i>OSR1</i>	<i>Odd-skipped related transcription factor</i>	<i>Odd- skipped</i> radniecīgais transkripcijas faktors-1
<i>Osr2</i>	<i>Odd-skipped related 2 gene</i>	<i>Odd- skipped</i> radniecīgais transkripcijas faktors-2
<i>PAX7</i>	<i>Paired box 7 gene</i>	Pāra boksa transkripcijas faktors-7
<i>PAX9</i>	<i>Paired box 9 gene</i>	Pāra boksa transkripcijas faktors-9
<i>PDGFC</i>	<i>Platelet derived growth factor c</i>	Trombocitārais augšanas faktors c
<i>PDGFRA</i>	<i>Platelet derived growth factor receptor alpha</i>	Trombocitārais augšanas faktora receptors alfa
<i>PGP 9.5</i>	<i>Protein gene product 9.5</i>	Proteīngēniela 9.5
<i>PTC (RET)</i>	<i>Ret proto-oncogene</i>	Ret protoonkogēns
<i>RANK</i>	<i>Receptor activator of NF-kappaB</i>	NF-kappa B receptora aktivators
<i>RANKL</i>	<i>Receptor activator of NF-kappaB ligand</i>	NF-kappa B liganda receptora aktivators
<i>RFC1</i>	<i>Replication factor C (activator 1) 1</i>	Replikācijas faktors C (aktivators-1) 1
<i>RSU</i>	<i>Rīga Stradiņš University</i>	Rīgas Stradiņa universitāte
<i>RYK</i>	<i>Receptor-like tyrosine kinase</i>	Tirozīnkināzes receptoram līdzīgais
<i>S</i>	-	Saistaudu šūnas
<i>Shh</i>	<i>Sonic hedgehog</i>	Shh gēns
<i>Shox2</i>	<i>Short stature homeobox 2</i>	Īsā auguma homeoboksa (mājturības)-2 gēns
<i>SIP1</i>	<i>Sip1p</i>	Sip1p gēns
<i>Smo</i>	<i>Smoothened, frizzled class receptor</i>	<i>Smoothened</i> klases receptors (G olbaltumvielas saistītājsreceptors)
<i>SNAI1</i>	<i>Snail family zinc finger 1</i>	SNAI saimes cinka pirkstiņu transkripcijas faktors-1
<i>SNAI2 (Slug)</i>	<i>Snail family zinc finger 2</i>	SNAI saimes cinka pirkstiņu transkripcijas faktors-2
<i>Tbx22</i>	<i>T-box 22</i>	T-box 22 gēns
<i>TGFα</i>	<i>Transforming growth factor alpha</i>	Transformējošais augšanas faktors alfa
<i>TGFβ</i>	<i>Transforming growth factor beta</i>	Transformējošais augšanas faktors beta
<i>TGFβ1</i>	<i>Transforming growth factor beta 1</i>	Transformējošais augšanas faktors beta-1
<i>TGFβ2</i>	<i>Transforming growth factor beta 2</i>	Transformējošais augšanas faktors beta-2
<i>TGFβ3</i>	<i>Transforming growth factor beta 3</i>	Transformējošais augšanas faktors beta-3
<i>TIMP-2</i>	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinase-2</i>	Matrices metaloproteināzes-2 audu inhibitors
<i>TIMP-4</i>	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinase-4</i>	Matrices metaloproteināze-4 audu inhibitors
<i>TNF-α</i>	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>	Tumora nekrozes faktors alfa
<i>TRAIL</i>	<i>Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand</i>	Tumora nekrozes faktora saistītais apoptozi inducējošais ligands
<i>TUNEL</i>	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling</i>	Deoksinukleotidiltransferāzes mediēta DNS 3'-galu marķēšana ar deoksiuridīnfosfātu
<i>Twist</i>	<i>Twist basic helix-loop-helix transcription factor 1</i>	Spirāles-cilpas-spirāle vījuma pamata transkripcijas faktors-1
<i>VAX1</i>	<i>Ventral anterior homeobox 1</i>	Priekšējās un centrālās ass homeobokss-1
<i>VEGF</i>	<i>Vascular endothelial growth factor</i>	Vaskulārā endotēlija augšanas faktors

tabulas nobeigums		
Saīsinājums	Nosaukums angļu valodā	Skaidrojums latviešu valodā
VWS	<i>Van der Woude syndrome</i>	<i>Van der Woude</i> sindroms
WNT	<i>Protein Wnt-2</i>	Proteīna <i>Wnt-2</i> gēns
<i>Wnt11</i>	<i>Wingless-type MMTV integration site family, member 11</i>	Bezspārnu tipa MMTV integrācijas saita 11 olbaltumviela
WNT3A	<i>Wingless-type MMTV integration site family, member 3A</i>	Bezspārnu tipa MMTV integrācijas saita 3a olbaltumviela
WNT5	<i>Wnt oncogene analog 5</i>	<i>Wnt</i> onkogēna analogs 5
Z	-	Zēns

IEVADS

Darba aktualitāte

Sejas šķeltnes ir viena no izplatītākajām iedzimtajām kraniofaciālajām displāzijām, kas bērnam izraisa estētiskus un funkcionālus traucējumus (*Maclean et al.*, 2009). Ņemot vērā anatomisko un ģenētisko komponentu, tās iedala šādās kategorijās: nesindromāla lūpas šķeltne un/vai aukslēju šķeltne, nesindromāla izolēta aukslēju šķeltne, sindromāla lūpas šķeltne un/vai aukslēju šķeltne un sindromāla izolēta aukslēju šķeltne. No visiem šķeltnu gadījumiem nesindromālas šķeltnes ir 70–90%, savukārt sindromālas – 10–30% šķeltnu gadījumu (*Jugessur et al.*, 2009; *Ray and Niswander*, 2012). Šķeltnes, kas skar lūpu, alveolāro kaulu un aukslējas, var būt vienpusējas un abpusējas. Prevalence ir vidēji vienam bērnam no 1000 jaundzimušajiem pasaulē (*Mossey et al.*, 2009; *Kim et al.*, 2013). Latvijā dzimst vidēji viens bērns ar šķeltni uz 700–800 jaundzimušajiem vai vidēji 1,2 – 1,4 uz 1000 dzīvi dzimušajiem (*Akota et al.*, 2001).

Lūpas un aukslēju šķeltnes etioloģiju nosaka daudzu ģenētisko faktoru mijiedarbība ar teratogēniem faktoriem sejas embriogēnēzes laikā. Sejas attīstība sākas ceturtajā embriogēnēzes nedēļā, kad notiek nervu kores šūnu migrācija un to kombinēšanās ar mezodermas šūnām (*Bush and Jiang*, 2012). Augšlūpas un sekundāro aukslēju saplūšanas morfopatogēnēzē ir ietverti vairāki precīzi koordinēti procesi: šūnu proliferācija, diferenciācija, migrācija, programmēta šūnu nāve, ekstracelulārās matricēs (*ECM*) sintēze, vietējās audu aizsardzības faktoru bāzes veidošanās, kurus regulē dažādas signālmolekulas, un augšanas faktori. Ir zināms, ka augšlūpas saplūšana veicina sekundāro aukslēju saplūšanu, tāpēc nepareiza lūpas saplūšana var ietekmēt aukslēju saplūšanas molekulāro kompleksu. Noteikti gēni un ārvides faktori var izraisīt kādas noteiktas signālmolekulas un/vai augšanas faktora trūkumu vai pārlieku lielu to esamību, kā rezultātā var attīstīties sejas šķeltnes (*Meng et al.*, 2009).

Ir zināms, ka teratogēnie faktori var izraisīt izmaiņas ekstracelulārās matricēs sintēzē, kā arī pārlieku lielu tās komponentu uzkrāšanos audos. Salīdzinoši nesenos pētījumos atklāta matricēs metaloproteināžu (*MMPs*) un matricēs metaloproteināžu audu inhibitoru (*TIMPs*) iesaiste sejas šķeltnu attīstībā (*Letra et al.*, 2007, *Nikopensius et al.*, 2011, *Letra et al.*, 2012, *Letra et al.*, 2014), tomēr šo proteīnu darbības molekulārie aspekti šķeltnu skartajos audos bērniem joprojām pilnībā nav skaidri.

Būtiska loma sejas un mutes dobuma attīstībā ir angioģenēzi veicinošajiem faktoriem. Pētījumos atklāja tādu augšanas faktoru un to receptoru kā transformējošā augšanas faktora

beta-3 (*TGFβ3*), transformējošā augšanas faktora alfa (*TGFα*), fibroblastu augšanas faktora (*FGF*), fibroblastu augšanas faktora receptora-1 (*FGFR1*), fibroblastu augšanas faktora receptora-2 (*FGFR2*), trombocītu augšanas faktora c (*PDGFC*), trombocītu augšanas faktora receptora alfa (*PDGFRA*) iesaisti sejas šķeltņu attīstībā (*Zhu et al.*, 2012; *Vieira et al.*, 2003; *Reutter et al.*, 2008; *Choi et al.*, 2009; *Stanier and Pauws*, 2012; *Riley and Murray*, 2007; *Rafigdoost et al.*, 2014; *Webber et al.*, 2015; *Lu et al.*, 2014). Vaskulārā endotēlija augšanas faktora (*VEGF*) kā būtiska angiogēnēzi veicinošā signālproteīna loma sejas šķeltņu attīstībā joprojām nav precīzi noteikta, kaut gan divu pētījumu dati pieļauj diskusiju par šo faktoru kā potenciālo kandidātģēnu nozīmi sejas šķeltņu attīstībā (*Stalmans et al.*, 2003; *Patyna et al.*, 2009).

Arvien aktuālāki kļūst pētījumi par interferona regulējošā faktora-6 (*IRF6*), muskuļu segmentācijas homeoboksa-1 (*Msx1*), tirozīnkināzes receptoram līdzīgā (*RYK*), priekšējās un centrālās ass homeoboksa-1 (*VAX1*), replikācijas faktora C (aktivators-1) 1 (*RFC1*), kaula morfoģenētiskā proteīna-4 (*BMP4*), proteīna Wnt-2 (*WNT*), *Rho* GTPāzes aktivējošā proteīna (*ARHGAP29*), ass inhibējošā proteīna-2 (*AXIN2*), transformējošā augšanas faktora beta-3 (*TGFβ3*), pāra boksa transkripcijas faktora-9 (*PAX9*) un pāra boksa transkripcijas faktora-7 (*PAX7*) ģēnu iesaisti lūpas un aukslēju šķeltnes etioloģijā. Minētajiem ģēniem ir būtiska nozīme sejas un mutes dobuma attīstībā, jo tie iesaistās daudzos nozīmīgos bioloģiskos procesos, t. i., šūnu proliferācijā, diferenciācijā, migrācijā un apoptozē (*Halford et al.*, 2000; *Letra et al.*, 2012; *Song et al.*, 2013; *Tang et al.*, 2013; *Krasone et al.*, 2014; *Zawiślak et al.*, 2014; *Letra et al.*, 2014; *Girardi et al.*, 2014; *Nouri et al.*, 2015; *Leslie et al.*, 2015; *Li et al.*, 2015).

Joprojām tiek diskutēts par pēdējo gadu publikācijās atzīto koordinētu šūnu proliferācijas un apoptozes klātbūtni augšlūpas un sekundāro aukslēju aizmetņu saplūšanas laikā. Literatūrā ir atrodami dati, ka pilnīgs vai daļējs apoptozes trūkums var būt sejas šķeltņu attīstības cēlonis (*Cuervo and Covarrubias*, 2004; *Dudas et al.*, 2007).

Sejas šķeltnes ir viena no tām iedzimtajām patoloģijām, kuras ārstēšana vienmēr ir bijusi aktuāla. Tā ir kompleksa, ilgstoša un dārga. Pēc daudzetaļu operācijām audi var sadzīt ar paliekošu defektu, kas var negatīvi ietekmēt kraniofaciālā reģiona audu augšanu. Brūces dzīšanu un audu remodelāciju ietekmē augšanas faktori, transkripcijas faktori un to attiecīgie receptori, ģēnu proteīni, angiogēnēzi ietekmējošie faktori, *MMPs*, *TIMPs* un citas signālmolekulas.

Mūsdienās aktuālāki kļūst pētījumi par lokālu minēto faktoru ekspresiju, kā arī apoptozes relatīvā daudzuma noteikšanu sejas šķeltņu skartajos audos. Rīgas Stradiņa universitātes (RSU) Anatomijas un antropoloģijas institūta (AAI) docētāja, tagadējā docente

Benita Krivicka-Užkurele savulaik veikusi nopietnus pētījumus par dažādu audu faktoru sadalījumu dažādu šķeltnu audos korelācijā ar piena un patstāvīgo zobu izšķīlšanās vecumu (*Krivicka-Uzkurele et al.*, 2008; *Krivicka et al.*, 2013), un AAI kopā ar Latvijas Lūpu, aukslēju un sejas šķeltnu centru ir bijis nopietns Latvijas Zinātnes padomes finansēts projekts, kura izstrādes laikā atklājies, ka vissmagākais šķeltnes veids ir kompleksā caurejošā šķeltne. Jāpiebilst, ka, projektam beidzoties, turpināta unikālā šķeltnu operāciju materiāla vākšana. Tas ir būtiski, jo pasaulē joprojām nav pilnībā skaidru, kompleksu datu par dažādu specifisku proteolītisku enzīmu, angioģenēzi ietekmējošo faktoru, gēnu proteīnu un citu signālmolekulu, kā arī apoptozes daudzumu un atradi bērniem ar smagāko šķeltnes veidu – abpusēju caurejošu šķeltni – ontogēnētiskajā aspektā, proti, visā bērna ārstēšanas laikā. Mūsdienās, izmantojot morfoloģiskās un imūnhistoķīmiskās metodes, ir iespējams šūnu līmenī izpētīt morfopatoģenēzes procesus šīs embrionālās patoloģijas gadījumā.

Darba mērķis

Specifisku signālmolekulu un šūnu nāves noteikšana šķeltnes skartajos audos, kā arī to faktoru noteikšana, kuri visbūtiskāk raksturo abpusējas caurejošas šķeltnes morfopatoģenēzi ontogēnētiskā aspektā.

Darba uzdevumi

Mērķa sasniegšanai tika izvirzīti šādi uzdevumi:

1. Izpētīt audu šķelēnīnu – matricas metaloproteināzes *MMP-2*, *MMP-8*, *MMP-9* un ar tām saistīto endogēno audu inhibitoru *TIMP-2*, *TIMP-4* relatīvo daudzumu un sadalījumu šķeltnes skartajos audos bērniem ar caurejošu šķeltni, pielietojot imūnhistoķīmijas metodi.
2. Noteikt gēnu proteīnu *MSX1*, *IRF6*, *PAX9* un *RYK* relatīvo daudzumu un sadalījumu šķeltnes skartajos audos bērniem ar caurejošu šķeltni, pielietojot imūnhistoķīmijas metodi.
3. Izvērtēt augšanas faktoru *VEGF*, *TGFβ3*, *CD34* un inervācijas faktora *PGP 9.5* relatīvo daudzumu un sadalījumu šķeltnes skartajos audos.
4. Izpētīt nestīna un šūnu proliferācijas marķiera *Ki-67* relatīvo daudzumu un sadalījumu šķeltnes skartajos audos bērniem ar caurejošu šķeltni, pielietojot imūnhistoķīmijas metodi.
5. Noteikt apoptotisko šūnu relatīvo daudzumu un sadalījumu caurejošu šķeltnu skartajos audos, lietojot *TUNEL* metodi.

6. Noteikt alveolārā kaula remodelāciju ietekmējošo faktoru *OC*, *OP*, *OPG*, *MMP-2*, *TIMP-2*, *BMP2/4*, *TGFβ3* sadalījumu un relatīvo daudzumu šķeltnes skartajos audos bērniem ar caurejošu šķeltni, pielietojot imūnhistoķīmijas metodi.
7. Izpētīt audu šķelējenzīmu un ar tām saistīto endogēno audu inhibitoru, gēnu proteīnu, augšanas faktoru, angiogēnēzi ietekmējošo faktoru, alveolārā kaula remodelāciju ietekmējošo faktoru, šūnu proliferācijas marķieru, inervācijas un apoptozes sadalījumu un relatīvo daudzumu kontroles grupas pacientu materiālā.
8. Veikt datu statistisko analīzi un noteikt to iespējamo savstarpējo korelāciju.

Darba hipotēzes

1. Abpusēju caurejošu šķeltnu attīstības procesā raksturīga noteiktu atsevišķu faktoru lokāla ekspresijas mainība.
2. Abpusēju caurejošu šķeltnu skarto audu lokālo atbildes reakciju reģenerācijas un deģenerācijas procesos nosaka specifisko signālmolekulu relatīvais daudzums un ekspresija.

Darba novitāte

Kaut arī pasaulē ir daudz pētījumu ar dzīvnieku modeļiem un atsevišķi pētījumi izmantojot cilvēka audus, joprojām nav pilnībā skaidru datu par lokālu dažādu proteolītisku enzīmu, augšanas faktoru, transkripcijas faktoru, gēnu proteīnu, angiogēnēzi ietekmējošo faktoru, inervācijas, šūnu proliferācijas marķieru un apoptotisko šūnu sadalījumu un izvietojumu bērniem ar smagāko šķeltnes veidu – abpusēju caurejošu šķeltni – ontogēnētiskā aspektā.

Pirmo reizi tika veikts abpusējas caurejošas lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltnes skarto audu komplekss dažādu specifisku signālmolekulu morfoloģisks pētījums ontogēnētiskā aspektā, kurā bērniem ar abpusēju caurejošu šķeltni mīkstajos audos tika atklāta transkripcijas faktora *IRF6*, *MSX1* un *PAX9*, augšanas faktora *TGFβ3* un *VEGF* samazināta klātbūtne, kā arī samazināta šūnu proliferācija un apoptoze mīkstajos audos, bet balstaudos – samazināta *OPN*, *OPG*, *MMP-2*, *TIMP-2*, *BMP2/4* un *TGFβ3* klātbūtne. Pārliecinoši identificējām, ka morfoloģiskās audu izmaiņas ir smagākas pacientiem ar abpusēju šķeltni. Atkārtotu operāciju laikā vieniem un tiem pašiem pacientiem novērojām palielinātu *MSX1*, *MMP-9*, *TIMP-4*, *TGFβ3*, *Ki-67* un samazinātu *VEGF* ekspresiju.

Mērķa populācija

Mērķa populācija ir Latvijas Lūpu, aukslēju un sejas šķeltņu centrā uzskaitē esošie pacienti ar abpusējām un vienpusējām caurejošām lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltnēm. Izmantojot morfoloģiskās metodes, tika izanalizēti audu paraugi no 22 pacientiem ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni ontogēnētiskā aspektā, kā arī audu paraugi no 24 pacientiem ar vienpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni.

Sadarbības partneri

Pētījums tika veikts sadarbībā ar SIA “RSU Stomatoloģijas institūts” Lūpu, aukslēju un sejas šķeltņu centru, kur tika savākti audu paraugi morfoloģiskiem izmeklējumiem. Rutīnās histoloģijas krāsošanas metode un imūnhistoķīmiskās reakcijas tika veiktas RSU AAI Morfoloģijas laboratorijā.

Materiāli tehniskais nodrošinājums

RSU AAI Morfoloģijas katedrā un Morfoloģijas laboratorijā bija darba veikšanai viss nepieciešamais ekipējums – pusautomātiskās rotācijas mikrotoms (*Leica RM2245, Leica Biosystems Richmond Inc., Amerikas Savienotās Valstis*), gaismas mikroskops (*Leica DM500RB, Leica Biosystems Richmond Inc., Amerikas Savienotās Valstis*), digitālā kamera 300F (*Leica, Wetzlar, Vācija*), datori ar attēlu apstrādes programmu *Image Pro Plus 6.0* versiju (*Media Cybernetics, Silver Spring, MD, Amerikas Savienotās Valstis*).

Personīgais ieguldījums

Autore piedalījās visās pētījuma stadijās: pētījuma plānošanu, imūnhistoķīmisko marķieru izvēli, pētāmā materiāla vākšanu (t. sk. redzēja šķeltņu operācijas), zinātnisko datu iegūvi, un to statistisko analīzi, veica imūnhistoķīmiskās reakcijas un *TUNEL* metodi, veica imūnhistoķīmisko vizualizāciju, analizējot katru audu paraugu gaismas mikroskopā. Autore sarakstīja šo darbu un ir arī visu darbā iekļauto mikrofotogrāfiju autore.

Ētiskie aspekti

Pētījums ir veikts saskaņā ar Helsinku deklarāciju un RSU Ētikas komitejas atļauju: RSU Ētikas komitejas lēmumi 2003. gada 22. maijā un 2013. gada 17. janvārī (sk. 2. pielikumu).

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Lūpas un aukslēju šķeltnes vispārīgs raksturojums

Lūpu un aukslēju šķeltnes ir audu attīstības traucējumu rezultāts, kad tiek skarti dažādu audu veidi, piemēram, epitēlijaudi, saistaudi, skrimšļaudi un kaulaudi. Pasaulē sejas šķeltnes ir atrodamas vidēji 1–2 no 1000 dzīvi dzimušajiem. Izšķir izolētas aukslēju šķeltnes, kas 42–54% gadījumos ir saistītas ar citām ģenētiski determinētām anomālijām, un lūpas un/vai aukslēju šķeltnes, kas 14–30% ir sindromiskas. Šķeltnes, kas skar lūpu, 68–86% gadījumos kombinējas ar aukslēju šķeltni. Visbiežāk šķeltnes skar tieši lūpas un/vai aukslējas. Zēniem lūpas šķeltne ar vai bez aukslēju šķeltnes ir sastopama biežāk nekā meitenēm. Lūpas un/vai aukslēju šķeltnes sīkāk iedala apakštipos: slēpta lūpas vai aukslēju šķeltne, lūpas un alveolārā kaula šķeltne, vienpusēja necaurejoša lūpas un aukslēju šķeltne, vienpusēja caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne (1.1. attēls), abpusēja caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne (1.2. attēls). Lūpu un aukslēju šķeltnu biežums ir atkarīgs no rases, kā arī ģeogrāfiskā reģiona, tomēr arī vienai – baltajai rasei – dažādās valstīs tas nav vienāds. Tieši dzeltenās rases pārstāvjiem šī patoloģija ir sastopama visbiežāk, retāk – baltajai rasei (Arosarena, 2007; Mossey *et al.*, 2009; Dixon *et al.*, 2011).

Šīs patoloģijas ārstēšanai tiek pielietotas dažādas operāciju metodes noteiktā laikā un secībā. Lūpas plastika tiek veikta 3 līdz 5 mēnešu vecumā, mīksto aukslēju plastika – 8 līdz 12 mēnešu vecumā, cieto aukslēju plastika – 3 līdz 4 gadu vecumā, alveolārā izauguma osteoplastika ar kaula autotransplantāciju – 7 līdz 10 gadu vecumā. Tiek veiktas arī dažādas koriģējošas plastikas, piemēram, deguna korekcija, runas korekcijai – velofaringoplastika u.c. (Farronato *et al.*, 2015).

Izolēta lūpu un aukslēju šķeltne ir multifaktoriāla patoloģija, kad teratogēnie faktori mijiedarbojas ar ģenētiskajiem faktoriem. Šīs sejas apvidus slimības etioloģijas izprašanai ir jāzina sejas un mutes dobuma attīstības molekulārie mehānismi.

1.1. attēls. Vienpusēja caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne (adaptēts no *Alberto de Souza FREITAS*, 2012)

1. 2. attēls. Abpusēja caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne (adaptēts no *Alberto de Souza FREITAS*, 2012)

1.2. Sejas un mutes dobuma attīstības raksturojums

Sejas attīstība sākas 24. attīstības dienā, kad, proliferējot nervu kores šūnām, veidojas aizmetņi. Adu saplūšanai embrionālās attīstības laikā ir izšķiroša loma sirds, nervu caurules, acu, sejas un mutes dobuma formēšanas procesā. Sejas un mutes dobuma attīstība sākas ar priekšējo smadzeņu paplašināšanos, attīstoties pirmajam žaunu lokam, kā arī sirds valnītīm. Pirmais žaunu loks satur mezodermālas izcelsmes mezenhīmas šūnas, nervu kores šūnas, skrimšļa aizmetni, kā arī to caurauž trijzaru nervs un aortas loks. Sejas un mutes dobuma attīstība ir cieši saistīta ar funkcionāli nozīmīgām multipotentām nervu kores šūnām, kas

embrionālās attīstības laikā migrē uz žaunu lokiem un kombinējas ar mezodermas šūnām (Graham *et al.*, 2004). Tālākā attīstības gaitā izveidojas ektodermāls mutes padziļinājums, kas pārtop primārajā mutes dobumā un, mijiedarbojoties nervu korei, sejas mezodermai, kā arī apkārt esošai endodermai un ektodermai, attīstās piecas sejas krokas. Ceturtajā nedēļā sejas rajons primāri attīstās no pieres un deguna krokas, pāra augšžokļa krokas un pāra apakšžokļa krokas. No pieres un deguna krokas attīstās piere, virslūpas vidusdaļa, padegunes rievā, starpžoklis un primārās aukslējas. Savukārt no augšžokļa krokas attīstās virslūpas un augšžokļa sānu daļas, augšējie vaigu kauli, arī sekundāro aukslēju lielākā daļa (Pilmane un Šūmahers, 2006). Lūpas un aukslēju šķeltne izpaužas, ja notiek primāro aukslēju nepareiza formēšanās, savukārt traucējumi, kas rodas, saplūstot sekundāro aukslēju aizmetņiem, izpaužas kā aukslēju šķeltne (Ray and Niswander, 2012).

1.2.1. Augšlūpas morfoģenēzes molekulārie mehānismi

Sejas izaugumu saplūšana noris hronoloģiskā secībā: augšžokļa kroka un mediālais deguna aizmetnis, mediālais un laterālais deguna aizmetnis, augšžokļa kroka un laterālais deguna aizmetnis, kā arī augšžokļa un apakšžokļa krokas. Tieši mediālā un laterālā deguna aizmetņa saplūšana ir svarīgs posms augšlūpas attīstībai. Aizmetņu pamatu veido mezenhīma, bet klāj epitēlijs. Traucējumi šo aizmetņu saplūšanas laikā rada laterālo lūpas šķeltni, kas var izveidoties gan vienā, gan abās pusēs (Pilmane un Šūmahers, 2006). Augšlūpas attīstība beidzas 48. gestācijas dienā, kad notiek pilnīga deguna mediālā un augšžokļa krokas epitēlija – mezenhīmas saplūšana, kā arī no starpžokļa segmenta, kas attīstījies no distālās mediālā deguna aizmetņa daļas un formē virslūpas vidusdaļu (Jiang *et al.*, 2006). Lūpu aizmetņu saplūšana ir komplekss process, kas ietver nozīmīgas epitēlijšūnu, mezenhimocītu morfoloģiskās izmaiņas deguna mediālās, laterālās un augšžokļa krokas rajonos.

Interesanti, kā lūpu aizmetņu saplūšanas molekulāro mehānismu interpretē, proti, daži zinātnieki uzskata, ka lūpas aizmetņu saplūšanas laikā notiek bazālo epitēlijšūnu transformācija mezenhīmā (ETM), pamatojoties uz eksperimentiem ar vistas embrijiem (Sun *et al.*, 2000). Morfoloģiski epitēlijšūnas transformācijas laikā zaudē polaritāti, izzūd šūnu savienojumi, notiek citoskeleta reorganizācija un izmaiņas organoīdu izveidojumā (Thiery *et al.*, 2009).

20. gadsimta 50. gados tika izteikta hipotēze par programmētās šūnu nāves nozīmi aizmetņu saplūšanas laikā (Shuler, 1995; Iseki *et al.*, 2011). Daži zinātnieki uzskata, ka augšlūpas aizmetņu saplūšanas laikā notiek peridermas šūnu apoptoze (Jiang *et al.*, 2006). Cilvēka embrija audos ar skenējošā elektronu mikroskopa palīdzību tika vizualizētas apaļas,

iespējams, apoptotiskas šūnas starp augšžokļa un laterālo deguna aizmetni, kā arī starp mediālo un laterālo deguna aizmetni. Tika izvirzīta hipotēze, ka apoptoze peridermas šūnās veicina bazālo epitēlijšūnu saskarsmi ar pretējās puses šūnām un inducē katherīnu medietu desmosomu attīstību starp aizmetņiem. Šajā gadījumā desmosomu funkcija nav nodrošināt kontaktus starp epitēlijšūnām, bet gan inducēt *ETM*. Turklāt arī sindekāns un E-kadherīns kalpo par trigeri *ETM*. Sākotnēji epitēlijšūnu morfoloģijā redzamas filopodijas, kuras iesniedzas caur bazālās membrānas pātraukumiem mezenhīmas šūnu virzienā, bet tālākā pārveides procesā filopodijas attīstās par pseidopodijām, un notiek *ETM* (Sun et al., 2000). Bazālās membrānas degradāciju saplūšanas laikā nodrošina šūnu sintezētās *MMPs* (Blavier et al., 2001). Limfoīdais enhansera (aktivatora)-saistošais faktors-1 (*LEF-1*), beta-katenīns, integrīni, augšanas faktori, proto-onkogēna tirozīna kināze, FBJ osteosarkomas onkogēns (*Fos*), *SNAI* saimes cinka pirkstiņu transkripcijas faktors-1 (*SNAI1*), spirāles-cilpas-spirāle vijuma pamata transkripcijas faktors-1 (*Twist*), *SNAI* saimes cinka pirkstiņu transkripcijas faktors-2 (*Slug*), *sonic hedgehog* (*Shh*) gēni un citas specifiskas signālmolekulas ir iesaistītas *ETM* (Cano et al., 2000; Eger et al., 2000; Yang et al., 2004; Kang and Massagué, 2004; Del Barrio and Nieto, 2004; Thiery et al., 2009).

1.2.2. Sekundāro aukslēju morfoģenēzes molekulārie mehānismi

Sekundāro aukslēju attīstība sākas sestajā nedēļā, turklāt lielākā aukslēju daļa attīstās no pirmā žaunu loka augšžokļa krokas. Tā ir saistīta ar epitēlijšūnu un neiromezenhīmas mijiedarbību, kuru kontrolē dažādu signālmolekulu, augšanas faktoru, augšanas faktoru receptoru un transkripcijas faktoru ekspresijas dinamiskās izmaiņas. Aukslēju aizmetņu priekšpusē gļotādas epitēlijs ekspresē *Shh* gēnu, kas, saistoties ar *Shh* gēna receptoru Patē (*PTC*) aktivē *Smo* receptora ekspresiju mezenhīmā. Savukārt *Smothered* klases receptors (G olbaltumvielas saistītājreceptors) (*Smo*) aktivē fibroblastu augšanas faktora-10 (*Fgf10*) sintēzi. *Fgf10* saistās ar fibroblastu augšanas faktora receptoru-2b (*Fgfr2b*), un tiek regulēta šūnu proliferācija. Kaula morfoģenētiskais proteīns (*Bmp*) saistās ar kaula morfoģenētiskā proteīna receptoru-1a (*Bmpr1a*) un regulē gēnu *Msx1*, *Shh* un īsā auguma homeoboksa (mājturības)-2 (*Shox2*) ekspresiju. Aizmetņu augšanu kontrolē arī efrīns B1 (*EfnB1*) caur efrīna B2 (*EfnB2*) un efrīna B3 (*EfnB3*) receptoriem. Gēni meningiomas 1 (*Mn1*), T-box 22 (*Tbx22*), mezenhīmas homeoboksa-2 (*Meox2*) un BarH līdzīgais homeobokss-1 (*Barx1*) kontrolē mugurējās daļas aukslēju aizmetņu augšanu. Tieši *Odd-skipped* radniecīgā transkripcijas faktora-1 (*Osr1*), *Odd-skipped* radniecīgā transkripcijas faktora-2 (*Osr2*) gēni nodrošina aukslēju aizmetņu mediolaterālo augšanu. Šo gēnu ekspresija ir no *Shh* signālceļa

atkarīga. Mazāk distālais homeobokss-1 – fibroblastu augšanas faktora-7 (*Dlx5-Fgf7*) signālceļš var inhibēt *Shh* ekspresiju (1. 3. attēls) (*Chai and Maxson, 2006; Bush and Jiang, 2012*). Tas ir komplekss process, kuru regulē šūnu proliferācija, diferenciācija, migrācija, apoptoze un *ETM*.

1.3. attēls. Gēnu, augšanas un transkripcijas faktoru un to receptoru kontrolēta aukslāju attīstība un augšana (adaptēts no *Bush and Jiang, 2012*)

Saīsinājumi attēlā: *EfnB1* – efrīna B1 gēns; *Fgf 10* – fibroblastu augšanas faktors-10; *EphB2/B3* – efrīna B1/B3 gēns; *Fgfr2b* – fibroblastu augšanas faktora receptors-2b; *Ptc* – ret protoonkogēns; *Smo* – *Smothened* klases receptors (G olbaltumvielas saistītājreceptors); *Shox2* – īsā auguma homeoboksa (mājturības)-2 gēns; *Shn* – *sonic hedgehog* gēns; *Bmp4* – kaula morfoģenētiskais proteīns-4; *Bmpr1a* – kaula morfoģenētiskā proteīna receptors-1a; *Msx1* – muskuļu segmentācijas homeobokss-1; *Mn1* – meningiomas-1 gēns; *Tbx22* – T-box 22 gēns; *Barx1* – BarH līdzīgais homeobokss-1 gēns; *Osr1* – *Odd-skipped* radniecīgais transkripcijas faktors-1; *Osr2* – *Odd-skipped* radniecīgais transkripcijas faktors-2; *Fgf7* – fibroblastu augšanas faktors-7; *Dlx5* – mazāk distālais homeobokss-5.

Nervu kores izcelsmes mezenhīma, ektodermas izcelsmes epitēlijs, apikāli novietotas peridermas šūnas un kraniāli novietotās paraaksiālās mezodermas izcelsmes mioģenās šūnas veido morfoloģisko bāzi aukslējām (*Lane and Kaartinen, 2014*). Sekundāro aukslēju attīstības procesā izdala vairākas fāzes (1. 4. attēls) (*Dudas et al., 2007*). Vispirms aukslēju aizmetņi aug vertikāli, un starp tiem veidojas mēles aizmetnis, seko pacēlums, tad septītajā nedēļā notiek aizmetņu pagriešanās aptuveni par 90° horizontālā virzienā, tie aug viens pret otru. Aptuveni 9. nedēļā notiek aukslēju saplūšana pa viduslīniju priekšpusē, bet līdz 12. nedēļai epitēlija saplūšana turpinās virzienā uz mugurpusi (*Pilmane un Šūmahers, 2006*).

1. 4. attēls. Sekundāro aukslēju attīstības galvenie etapi (adaptēts no *Dudas et al., 2007*)

Attēla skaidrojums: **a.** Aukslēju aizmetņi aug vertikāli un izvietojas abās pusēs mēles aizmetnim, tad seko aizmetņu elevācija. **b.** Vēlāk tie pagriežas un izvietojas horizontāli. **c.** Aukslēju aizmetņi aug virzienā viens pret otru. **d.** Notiek aukslēju aizmetņu saplūšana.

Pēdējo gadu laikā tiek intensīvi pētīts sekundāro aukslēju aizmetņu epitēlijs. Literatūrā, pamatojoties uz eksperimentiem ar dzīvniekiem, šis jautājums tiek skaidrots vairākās teorijās. Daži autori uzskata, ka aukslēju aizmetņu epitēlija bazālās šūnas iet bojā

apoptozes ceļā, citi uzskata, ka notiek *ETM*, un trešās teorijas pārstāvji uzskata, ka epitēlijšūnas migrē mutes un deguna dobuma virzienā (*Sun et al.*, 2000; *Martinez-Alvarez et al.*, 2000; *Dudas et al.*, 2007; *Nawshad*, 2008; *Iseki*, 2011). Apkopojot literatūru, jāatzīmē, ka sekundāro aukslēju saplūšanas molekulārie mehānismi ir līdzīgi lūpu aizmetņu saplūšanai, kaut gan tieši aukslēju saplūšana ir intensīvāk pētīta, salīdzinot ar lūpu aizmetņu saplūšanu.

Sekundāro aukslēju aizmetņi sastāv no kraniālās nervu kores izcelsmes mezenhīmas šūnām, ektomezenhīmas šūnām un kraniofaringeālās ektodermas epitēlija, kas sastāv no diviem līdz četriem epitēlija slāņiem, kurus veido plakanas peridermas šūnas un bazālas kubiskas šūnas. Peridermas šūnas aizsargā zemāk esošo bazālo epitēliju, kas veido mediālās malas epitēliju (*MME*). *MME* no zemāk esošās neiromezenhīmas atdala funkcionāli nozīmīga bazālā membrāna. Literatūras dati liecina, ka *ETM* aukslēju aizmetņu saplūšana morfoloģiski ir līdzīga lūpas aizmetņu saplūšanai. Līdzīgi kā lūpu aizmetņu, arī aukslēju aizmetņu epitēlijšūnas transformācijas laikā zaudē apikāli-bazālo polaritāti, starp tām izzūd šūnu kontakti, notiek citoskeleta reorganizācija un izmaiņas organoīdu izvietojumā, kā arī notiek izmaiņas gēnu proteīnu ekspresijā (*Thiery et al.*, 2009). Pēc sekundāro aukslēju aizmetņu reorientācijas, peridermas šūnas morfoloģiski izmainās, un notiek saplūšanas process, izzūdot mediālās malas epitēlijam.

ETM celulārā programmā morfoloģiski izšķir vairākas stadijas. Pirmkārt, virspusējās peridermas šūnas morfoloģiski mainās, jo uzskata, ka tās iet bojā apoptozes ceļā. Pēc peridermas šūnu izzušanas zemāk esošās bazālās šūnas sāk producēt desmosomas komponentus. Otrkārt, vidusšuves epitēlijs zaudē šūnu-šūnu kontaktus un transformējas par mezenhīmas šūnām. Tiek samazināta E-kadherīna, sindekāna-1, kladīna un okludīna ekspresija. *ETM* laikā šūnas neekspresē keratīna starpdiedziņus, bet gan vimentīna starpdiedziņus. Treškārt, šūnas sāk sintezēt *MMPs* un ar tām saistītos *TIMPs*, un vienlaikus notiek arī ekstracelulārās matricas remodelācija, bazālās membrānas degradācija un palielinās mezenhīmas šūnu mobilitātes potenciāls (*Kang et al.*, 2005; *Lamouille et al.*, 2013; *Lamouille et al.*, 2014; *Gonzalez and Medici*, 2014). *ETM* process ir *MMP*, *TIMP*, *TGFβ*, *p63*, *IRF6* un citu specifisku signālmolekulu atkarīgs (*Jalali et al.*, 2012; *Iwata et al.*, 2014; *Nakajima et al.*, 2014; *Lane et al.*, 2015; *Hu et al.*, 2015).

Pasaulē tiek plaši diskutēts par programmētās šūnu nāves teorijas nozīmi sekundāro aukslēju saplūšanas laikā. Ir zinātnieki, kas uzskata, ka bazālā slāņa epitēlija šūnas iet bojā apoptozes ceļā, tādējādi nodrošinot ne tikai primāro, bet arī sekundāro aukslēju saplūšanu (*Cuervo and Covarrubias*, 2004; *Dudas et al.*, 2007; *Nawshad et al.*, 2008; *Lee et al.*, 2008; *Vukojevic et al.*, 2012; *Sohn et al.*, 2012; *Hirata et al.*, 2013; *Serrano et al.*, 2015). Interesanti, ka 2004. gadā veiktais pētījums ar pelēm *in vitro* norāda, ka programmēta šūnu nāve nav

nozīmīga aukslēju saplūšanas laikā, kaut gan dažās aukslēju attīstības stadijās atsevišķas apoptotiskas šūnas tika novērotas (*Takahara et al.*, 2004). Savukārt nesenā pētījumā ar cilvēka embrijiem tika novērota ne tikai nozīmīga šūnu apoptoze, bet arī šūnu proliferācijas esamība aukslēju attīstības laikā. Turklāt šūnu proliferācijas aktivitāte noris paralēli šūnu apoptozei, un abi procesi ir precīzi koordinēti (*Vukojevic et al.*, 2012). Uz jautājumu, kurš no iepriekš minētiem procesiem aukslēju attīstības laikā ir dominējošais, vēl nav atbildes. Citi pētnieki uzskata, ka nevar noteikt, kurš no šiem fenomeniem ir vadošais. Ahmeda zinātnieku kolektīvs no ASV domā, ka *ETM* un apoptoze viens otru papildina, tādējādi ieņem būtisku lomu primāro un sekundāro aukslēju attīstības laikā (*Ahmed et al.*, 2007).

Trešās teorijas pārstāvji domā, ka vidusšuves epitēlija šūnas migrē deguna vai mutes dobuma virzienā. No šīm šūnām var diferencēties gan mutes dobuma, gan deguna dobuma epitēlijs (*Shin et al.*, 2012).

Neskatoties uz daudzajiem pētījumiem, joprojām šis jautājums rada interesi zinātnieku vidū. Nav skaidras atbildes uz jautājumu, kas notiek ar vidusšuves epitēliju. Skaidrs ir viens, - sekundāro aukslēju attīstība ir fundamentāls, molekulāri sarežģīts process, kuru ietekmē dažādi proteolītiski enzīmi, augšanas faktori, augšanas faktoru receptori, transkripcijas faktori un gēni. Viennozīmīgi, traucējumi kaut vienā no šiem molekulāriem mehānismiem var izpausties kraniofaciālās displāzijās, proti, sejas šķeltnēs.

1.3. Audu degradācijas enzīmi (*MMP*) un ar tām saistītie endogēnie inhibitori (*TIMP*)

Audu degradācijas enzīmi un ar tiem saistītie endogēnie inhibitori piedalās audu remodelācijā un *ECM* degradācijā mutes dobuma attīstības laikā. Literatūrā ir aprakstītas trīs metaloproteināžu grupas, kas uztur *ECM* homeostāzi: *MMPs*, disintegrīna un metaloproteināzes ar trombospondīna motīviem (*ADAMTS*) proteīnāzes un astacīni. Pašlaik ir zināmas aptuveni 200 cinka atkarīgas metaloproteināzes zīdītājiem (*Puente et al.*, 2003; *Apte et al.*, 2015). Dažas proteāzes, piemēram, *MMP* un ar tām saistītie *TIMP*, nodrošina un uztur *ECM* homeostāzi embrionālās attīstības laikā (*Buckley and Jessen*, 2015). *MMPs*, *ADAMTS*, kā arī *TIMPs* piedalās morfoģenēzes, šūnu migrācijas, apoptozes, angiogēnēzes procesos, kā arī augšanas faktoru, to receptoru un citokīnu bioloģiskās aktivitātes regulēšanā. Šiem procesiem ir svarīga loma orgānu attīstībā, audu remodelācijā, brūču dzīšanā, iekaisuma un metastazēšanās procesā (*Gaffney et al.*, 2015; *Arpino et al.*, 2015; *Rohani and Parks*, 2015). *MMPs* proteolītiskais spektrs ietekmē šūnu virsmas proteīnu, ne-*ECM* atkarīgo pericelulāro molekulu, citu proteīnāžu, intracelulāro vielu, proteīnāžu inhibitoru, hemotakses molekulu, latentu augšanas faktoru, šūnas-šūnas un šūnas-*ECM* adhēziju molekulu funkcionālo

aktivitāti. Ir pierādīta *MMP* aktivitāte kaulaudu attīstībā un reģenerācijā. Eksperimentu rezultāti uz *knockout* peļu modeļiem norāda *MMP-2*, *MMP-9*, *MMP13*, *MMP-14* un *MMP-16* nozīmi skeleta attīstībā (*Paiva and Granjeiro*, 2014).

Turklāt šiem enzīmiem ir svarīga loma daudzu patoloģisku stāvokļu attīstībā, piemēram, sejas šķeltnes, zobu erozijas, reimatoīdā artrīta, osteoartrīta, glaukomas, neirodeģeneratīvo, nieru, plaušu, kardiovaskulāro slimību, kā arī malignitātes un fibrozes attīstībā (*Lu et al.*, 2011; *Letra et al.*, 2014; *Zarella et al.*, 2015; *Singh et al.*, 2015; *Musiał et al.*, 2015).

MMP un *TIMP* izdala dažādas epitēlija, saistaudu un iekaisuma veicinošas šūnas, piemēram, fibroblasti, makrofāgi, tuklās šūnas, plazmocīti, limfocīti, neitrofilie leukocīti, monocīti, endoteliālās šūnas, epiteliocīti, osteoblasti, osteocīti, hondroblasti, hondrocīti, hepatocīti, kardiomiocīti u.c. (*Nagase et al.*, 2006).

Sejas un mutes attīstības laikā *MMP* un *TIMP* ekspresija šūnu līmenī ir stingri kontrolēta. Būtiska nozīme aukslēju attīstības laikā ir *ECM* remodelācijai, kuru regulē iepriekš minētie enzīmi. Traucējumi *ECM* remodelācijas laikā var izpausties lūpas un aukslēju šķeltnēs. To pierāda aukslēju morfoģenēzes laikā novērota *MMP* un *TIMP* ekspresijas klātbūtne (*Morris-Wiman et al.*, 2000; *Blavier et al.*, 2001).

Nemot vērā daudzos pētījumus, joprojām *MMP* un *TIMP* funkciju molekulārie mehāniski iedzimu slimību skarto audu remodelācijā, šķeltnu pēcoperācijas brūču dzīšanā nav zināmi.

1.4. *IRF6* gēns

Nervu kores šūnas, kraniofaciālā ektoderma, prehordālā mezoderma sekmē kraniofaciālā reģiona attīstību, un precīzi regulēta šūnu proliferācija, migrācija un diferenciācija ir vadoši notikumi sejas un mutes dobuma morfoloģijā. Daudzi gēni, ieskaitot transkripcijas faktorus, augšanas faktorus un to receptorus, iesaistās šajos procesos, un mutācijas šajos gēnos var izraisīt lūpas un/vai aukslēju šķeltnes (*Dai et al.*, 2014).

IRF6 pieder pie *IRF* gēnu saimes, kas satur desmit eksonus un ir būtisks imūnās sistēmas šūnu aktivētājs. *IRF6* pavisam nesen tika identificēts zivīm, pelēm un arī cilvēkam (*Kondo et al.*, 2002; *Ben et al.*, 2005). Pašlaik ir aprakstīti deviņi *IRF* gēni, kam ir nozīme ne tikai imūnās sistēmas regulēšanā, bet arī šūnu proliferācijā un diferenciācijā. *Irf6* ekspresija tika novērota acu, plaušu, ādas, liesas, aknu, placentas un dzimumorgānu šūnās (*Kondo et al.*, 2002). Interesanti, ka Liu ar kolēģiem 2012. gadā publicē pētījuma rezultātus, kuros apraksta *IRF6* ekspresiju plaušās, aknās, limfmezglos, smadzenēs, nierēs, skeleta muskulatūrā, tīmusā,

sirdī, bet ne liesā (*Liu et al.*, 2012), un Flemings izpēta *IRF6* ekspresiju dzemdes epitēlijšūnās (*Fleming et al.*, 2009). Veiktajos eksperimentos ar *knockout* peļu modeļiem tika atklāta *Irf6* gēna nozīme skeleta, sejas un mutes dobuma attīstībā. Interesanti, ka tomēr *Irf6* pelēm primāri regulē epiteliocītu proliferāciju un diferenciāciju, kā arī mutes dobuma peridermas šūnu formēšanos embrionālās attīstības laikā (*Ingraham et al.*, 2006; *Richardson et al.*, 2006). Bez tam *Irf6* gēna nozīme tika atklāta incisivu epitēlija invaginācijas laikā (*Blackburn et al.*, 2012). Vashborne un Koks 2006. gadā atklāja, ka sejas aizmetņi ekspresē *Irf6* (*Washbourne and Cox*, 2006). Mutācijas *IRF6* gēnā var izraisīt *Van der Woude* (VWS) un *popliteal pterigium* sindromu. VWS ir autosomāli dominanta saslimšana, kas klīniski raksturojas ar lūpas un aukslēju šķeltņiem un ir biežākais iemesls sejas šķeltnei, kuras pamatā ir noteikta gēna defekts (*Malik et al.*, 2010). Analizējot daudzas populācijas, *IRF6* gēna ietekme nesindromālo lūpas un aukslēju šķeltņu gadījumos ir pierādīta (*Birnbaum et al.*, 2009; *Shi et al.*, 2011; *Letra et al.*, 2012; *Miller et al.*, 2014; *Ibarra-Arce et al.*, 2015; *Mijiti et al.*, 2015). Tikmēr pavisam nesenā pētījumā tika pierādīta šī gēna cieša saistība ar smagāko šķeltnes veidu, proti, abpusēju caurejošu lūpas un aukslēju šķeltņiem (*Kerameddin et al.*, 2015).

1.5. *PAX9* gēns

PAX9 gēns pieder pie *PAX* gēnu saimes un ir atbildīgs par transkripcijas faktoru kodēšanu. Pavisam izšķir 9 *PAX* gēnus. Eksperimentos ar peļu modeļiem tika novērota *Pax9* ekspresija tīmusa, epitēlijķermenīšu, barības vada, zemžokļa siekalu dziedzeru, mēles diegveida kārpīņu, aukslēju, vaigu gļotādas epitēlijšūnās, kā arī deguna un aukslēju mezenhīmas šūnās, aukslēju mugurējā epitēlijā (*Jaskoll et al.*, 2002; *Jonker et al.*, 2004; *Kist et al.*, 2007; *Nakatomi et al.*, 2010; *Zhou et al.*, 2013). Pasaulē tiek pētīta šī gēna nozīme nesindromālo šķeltņu attīstībā, jo *Pax9* ir atbildīgs par lūpu, aukslēju un zobu attīstību (*Nakatomi et al.*, 2010; *Zhou et al.*, 2011). Tika novērots, ka *Pax9* proteīns inducē mezenhīmas šūnu, epitēlijšūnu proliferāciju un ir svarīgs faktors mediālās malas epitēlija mijiedarbībā ar zemāk esošo mezenhīmu, ietekmējot *Shh* proteīna ekspresiju sekundāro aukslēju attīstības laikā (*Chi and Epstein*, 2002; *Nakatomi et al.*, 2010; *Zhou et al.*, 2013). Arī pētījumā ar *Pax9* mutācijām pelēm Zhou ar kolēģiem novēroja samazinātu *Bmp4*, *Fgf10*, *Msx1* un *Osr2* gēnu ekspresiju mezenhīmā, kas liecina par šī transkripcijas faktora nozīmi šo gēnu molekulārās darbības regulēšanā (*Zhou et al.*, 2013). *Pax9* regulē arī *TGFβ3* funkcijas, kas ir vadošais faktors sekundāro aukslēju aizmetņu saplūšanas laikā. Analizējot peļu aukslēju attīstību, *Pax9* ekspresija tika novērota tieši primāro aukslēju audos, kā arī sekundāro aukslēju sānu un mugurējā rajonā. Savukārt vāja ekspresija tika saskatīta mediālās malas epitēlijā

(Sasaki *et al.*, 2007). Ir pierādīts, ka mutācijas *PAX9* gēnā izraisa iedzimtu oligodontiju, kā arī arvien aktuālāki kļūst pētījumi par *PAX9* iesaisti nesindromālās lūpas un aukslēju šķeltnes attīstībā (Lee *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2013; Küchler *et al.*, 2014). Vēl joprojām *PAX9* proteīna funkcijas nav izpētītas līdz galam, kaut arī bijuši gan šie, gan arī vēl citi pētījumi. Literatūrā atrodami tikai atsevišķi ziņojumi par šī gēna nozīmi abpusēju caurejošu šķeltnu attīstībā.

1.6. *MSX1* gēns

Homeobox transkripcijas faktoriem ir svarīga loma šūnu proliferācijā, migrācijā un diferenciācijā embrija attīstības laikā. Tieši *MSX1* ir viens no vadošajiem gēniem sejas kaulu, aukslēju, skeleta, acu un nervu sistēmas attīstībā (Allapat *et al.*, 2003; Berdal *et al.*, 2009; Lopes *et al.*, 2012). Literatūrā ir aprakstīti trīs *MSX* saimes gēni. *MSX1* un *MSX2* ir vislielākā funkcionālā loma sejas struktūru attīstībā. Visu trīs gēnu ekspresija tika novērota sejas un mutes dobuma attīstības laikā tajos rajonos, kur visintensīvāk notiek epitēlija un mezenhīmas mijiedarbība (Finnerty *et al.*, 2009). Pelēm *Msx1*, *Msx2* ekspresija tika novērota galvaskausa, *dura mater* šūnās, kā arī sejas aizmetņos, redzes un dzirdes orgānā, zobu attīstības laikā. Izteikti *Msx1*, *Msx2* ekspresē struktūras nervu kores šūnu migrācijas laikā. Interesanti, ka izteikta *MSX1* ekspresija tika novērota galvaskausa morfoģenēzē postnatāli, savukārt *MSX2* ekspresija samazinājās pēc dzimšanas. Aukslēju attīstības laikā *Msx1* regulē *Bmp* funkcijas. Traucējumi *MSX* gēna funkcijās var radīt kraniofaciālā rajona, ekstremitāšu un zobu anomālijas (Allapat *et al.*, 2003; Levi *et al.*, 2006). Ar *knockout* dzīvnieku modeļiem ir veikti arī *Msx1* pētījumi, kuru rezultātā tiek uzskatīts, ka nulles mutācijas rada aukslēju šķeltnes, ekstremitāšu anomālijas, zobu aģenēziju un dažādas iekšējās auss malformācijas (Lallemand *et al.*, 2005; Nassif *et al.*, 2014). Savukārt *Msx2* mutācijas rada zobu un smadzenīšu attīstības anomālijas pelēm, kā arī *MSX2* mutācijas sekas ir kraniosinostozes (Satokata *et al.*, 2000; De Coster *et al.*, 2007). Ir svarīgi minēt, ka mutācijas *Msx1* gēnā izraisa defektus šūnu proliferācijas līmenī tieši aukslēju priekšējās daļas mezenhīmā (Meng *et al.*, 2009). Cilvēkam mutācijas šajā gēnā ir asociētas ar nesindromālām lūpas un aukslēju šķeltnēm, autosomāli dominanti pārmantoto hipodontiju un divu veidu sindromiskām sejas šķeltnēm: Vitkopa sindromu un Volf-Hiršhorna sindromu (Cardoso *et al.*, 2013; Souza *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2014). *MSX1* gēna polimorfisms ir vadošais dažādu populāciju nesindromālo šķeltnu attīstībā (Jezewski *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2013; Gurramkonda *et al.*, 2015)

1.7. Ryk gēns

Wnt signālceļam ir noteicoša loma skeleta ass attīstībā, šūnu augšanas, proliferācijas un diferenciācijas procesos embrionālās attīstības laikā, kā arī neironu attīstībā. Tam ir būtiska nozīme audu homeostāzē, reģenerācijā un cilmes šūnu, cilmsūnu funkciju ietekmēšanā. *Wnt* ekspresija audos tika novērota sejas un aukslēju attīstības laikā. Tieši bezspārnu tipa *MMTV* integrācijas saita 11 olbaltumvielu (*Wnt11*) tipu ekspresēja aukslēju aizmetņu mediālās malas epitēlija šūnas. Lī ar kolēģiem novēroja, ka *Wnt11* gēna proteīns ierosināja mediālās malas epitēlija šūna apoptozi, kas ir svarīgs molekulārais mehānisms aukslēju saplūšanas laikā (Lee et al., 2008). Traucējumi *WNT* signālceļa funkcijās var radīt iedzimtas sejas un mutes dobuma malformācijas, deģeneratīvas saslimšanas vai malignitātes cilvēkam. Mūsdienās, pateicoties ģenētiskajiem skrīningiem, bezspārnu tipa *MMTV* integrācijas saita 3a olbaltumviela (*WNT3A*), *Wnt* onkogēna analogs 5 (*WNT5*) un *WNT11* tiek uzskatīti kā iespējamie kandidātģēni nesindromālās sejas šķeltnes attīstībā (Chiquet et al., 2008; Menezes et al., 2010; Mostowska et al., 2012). *RYK* pieder pie tirozīnkināzes receptoru saimes un ir šūnu virsmas proteīni, kas darbojas kā receptori *Wnt* gan bezmugurkaulniekiem, gan mugurkaulniekiem (Logan and Nusse, 2004; Berndt et al., 2011; Macheda et al., 2012). Tikai 2000. gadā, analizējot *knockout* peļu audus, tika aprakstītas *Ryk* gēna funkcijas zīdītājiem. Šis proteīns pirmo reizi tika klonēts pelēs 1992. gadā, un tas sastāv no ekstracelulārā *Wnt* inhibējošā faktora domēna un intracelulārās atipiskās kināzes domēna. *RYK* regulē šūnu polaritāti, šūnu diferenciāciju, šūnu migrāciju, šūnu selekciju, skeleta attīstību, nervu šūnu izaugumu augšanu (Halford and Stacker, 2001; Halford et al., 2013). Tika pierādīts, ka *Ryk* gēna zudums pelēm rada perinatālu mirstību iespējamās kardiovaskulāras patoloģijas dēļ, kā arī kraniofaciālas un skeleta anomālijas, piemēram, caurejošas aukslēju šķeltnes, īpatnēju kraniofaciālo fenotipu, saīsinātas ekstremitātes (Halford et al., 2000; Halford and Stacker, 2001). Analizējot embrija un pieaugušas peles audus, *Ryk* proteīna lokalizācija tika novērota krūšu dziedzeru, nieru, plaušu, zarnu epitēlijšūnās un mezodermālas izcelsmes audos (Keeble et al., 2006; Keeble and Cooper, 2006). Dažu pētījumu dati liecina par iespējamu *RYK* gēna asociāciju ar nesindromālām sejas šķeltnēm (Watanabe et al., 2006; Carter et al., 2010). Jāatzīmē, ka joprojām nav zināmi šī proteīna molekulārie darbības mehānismi audos sejas šķeltnu attīstībā un vēl jo vairāk, šķeltnu skartos audos to korekcijas laikā.

1.8. Angioģenēzi ietekmējošie faktori

Angioģenēze pirmo reizi tika aprakstīta 1935. gadā placentas audos. Mūsdienās jaunu asinsvadu veidošanās no iepriekš esošajiem aktīvi tiek pētīta embriogēnēzē un postnatālajā periodā, kā arī dažādu patoloģisku stāvokļu attīstībā. Angioģenēzi ietekmējošo gēnu izpēte lūpu un aukslēju šķeltnu attīstībā ir nenoliedzami aktuāla (*François-Fiquet et al.*, 2014). Jaunu asinsvadu veidošanos kontrolē angioģēni augšanas faktori un to inhibitori. Vadošo lomu šajā procesā ieņem vaskulārais endotēlija augšanas faktors (*VEGF*), kuru sintezē keratinocīti, makrofāgi, audzēju šūnas u.c., kamēr endotēlija šūnas, keratinocīti, melanocīti, audzēju, mata ārējās epitēlija maksts, mutes dobuma gļotādas šūnas sintezē *VEGF* receptorus (*Li et al.*, 2012; *Pianka et al.*, 2015). *VEGF* regulē asinsvadu veidošanos embriogēnēzes, mutes dobuma gļotādas brūču dzīšanas un reģenerācijas laikā, kā arī uztur asinsvadu homeostāzi un piedalās endohondrālās osifikācijas procesā, stimulējot ne tikai šūnu proliferāciju un migrāciju, bet arī inhibējot šūnu apoptozi (*Andisheh-Tadbir et al.*, 2014). *VEGF* gēna polimorfismi ir asociēti bērniem ar retinopātijas attīstību, autoimūnām slimībām, hronisku periodontītu, kā arī mutes dobuma vēzi (*Ku et al.*, 2005; *Tian et al.*, 2013; *Ali et al.*, 2015; *Che et al.*, 2015). Haigs ar kolēģiem atklāja, ka traucējumi *VEGF* gēnā rada letālu iznākumu peļu embrijiem dažādu orgānu sistēmu skarto attīstības anomāliju dēļ (*Haigh et al.*, 2000). Pēdējo gadu laikā publicētie pētījumi liek diskutēt par iespējamu *VEGF* gēna nozīmi aukslēju aizmetņu saplūšanas laikā. Pelēm tika konstatētas minētā faktora novietojuma izmaiņas aukslēju gļotādas brūču dzīšanas laikā un atklājās, ka samazināts *VEGF* līmenis siekalās ietekmē brūces slēgšanos, kā arī izmaina asinsvadu veidošanos sejas šķeltnu patoģenēzes laikā (*Stalmans*, 2005; *Patyna et al.*, 2009). Pasaulē nav pētījumu, kas pārliecinoši pierādītu šī faktora nozīmi sejas šķeltnu attīstībā. Nav arī pētīta šī faktora ekspresija aukslēju aizmetņu saplūšanas laikā (*Keswani et al.*, 2013).

CD34 ir 110-kDa transmembranozs virsmas glikoproteīns, kuru sintezē hematopoētiskās cilmes šūnas, endotēlija šūnas, embrionālie fibroblasti, intersticiālās Kajaļ (*Cajal*) šūnas, dendrītiskās un tuklās šūnas. Šo transmembranozo virsmas glikoproteīnu var izmantot, lai identificētu jaunu asinsvadu veidošanos no esošiem asinsvadiem. Tas ir svarīgs angioģenēzi regulējošais marķieris un raksturo normālas vai patoloģiskas mutes dobuma gļotādas mikroasinsvadu blīvumu. Asinsvadu veidošanās ir būtiski nozīmīga audu reģenerācijā (*Desai et al.*, 2010; *Stănescu et al.*, 2012).

Literatūrā ir aprakstīta virkne augšanas faktoru, gēnu, kas ietekmē angioģenēzi un korelē ar lūpu un aukslēju šķeltni. Jaunu asinsvadu veidošanos ietekmē ne tikai *VEGF*, *CD34*,

bet arī *TGFβ*, fibroblastu augšanas faktors (*FGF*), fibroblastu augšanas faktora receptors (*FGFR*) u.c. (1.5. attēls) (François-Fiquet et al., 2014).

1.5. attēls. Šķeltnu etiopatogēnēzē iesaistītie angiogēnēzi ietekmējošie gēni (adaptēts no François-Fiquet et al., 2014)

Saīsinājumi: *FGFR1* – fibroblastu augšanas faktora receptors-1; *FGFR2* – fibroblastu augšanas faktora receptors-2; *FGF* – fibroblastu augšanas faktors; *BMP* – kaula morfoģenētiskais proteīns; *SPRY2* – *sprouty* RTK signālceļa antagonists-2; *SOX* – SOX proteīns; *EGR1* – cinka pirkstiņu proteīns 225; *IRF6* – interferona regulējošais faktors-6; *TGFA* – transformējošais augšanas faktors alfa; *EGF* – epidermālais augšanas faktors; *EGFR* – epidermālā augšanas faktora receptors; *MMP* – matricas metaloproteināzes; *TIMP2* – matricas metaloproteināzes-2 audu inhibitors; *MSX1* – muskuļu segmentācijas homeobokss-1; *SATB2* – SATB homeobokss-2; *SUMO1* – mazais ubikvitīnam līdzīgais modifikators-1; *VEGF* – vaskulārā endotēlija augšanas faktors; *VEGFR* – vaskulārā endotēlija augšanas faktora receptors; *PDGFRc* – trombocītu atvasinātais augšanas faktors c; *PDGFRα* – trombocītu atvasinātā augšanas faktora receptors alfa; *PAX1* – pāra boksa transkripcijas faktors-1; *TIF* – tulkošanas uzsākšanas faktors; *TBX1* – T-boksa-1 gēns; *Ras/MAKP* – Ras proteīns/mitogēn-aktivētā proteīnkināze; *CD31* – trombocītu/endotēlijšūnu adhēzijas molekula; *PAX9* – pāra boksa transkripcijas faktors-9; *RARA* – retiniskābes receptors alfa; *BCL3* – B šūnu CLL/limfoma-3; *Wnt* – proteīna Wnt-2 gēns; *caspase* – kaspāze; *TGFβ* – transformējošais augšanas faktors beta; *DAXX* – nāves-domēna asociētais proteīns; *SMAD* – SMAD saimes loceklis; *Ski* – ski protoonkogēns; *FOXE1* – *forkhead* bokss E1; *GLI* – GLI saimes cinka pirkstiņu transkripcijas faktors-1; *SHH* – *sonic hedgehog*; *PITCH1* – ret protoonkogēns; *RUNX2* – runt radniecīgais transkripcijas faktors-2.

Transformējošais augšanas faktors (*TGF*) un tā receptori nosaka normālu sejas un mutes dobuma struktūru attīstību. Multifunkcionāls *TGFβ* citokīns ir būtiski nozīmīgs nervu kores šūnu proliferāciju regulējošais faktors aukslēju attīstības laikā (Iwata et al., 2012). Interesanti, ka šis faktors regulē embrionālo cilmes šūnu diferenciāciju, kā arī epitēlija šūnu transformāciju mezenhīmas šūnās, un otrādi, kas ir svarīgi molekulārie mehānismi lūpu un aukslēju saplūšanas laikā (François-Fiquet et al., 2014). Ir zināmas trīs *TGFβ* izoformas: transformējošais augšanas faktors beta-1 (*TGFβ1*), transformējošais augšanas faktors beta-2 (*TGFβ2*), *TGFβ3*. Šīm izoformām ir fundamentālas spējas regulēt dažādus bioloģiskos

procesus, piemēram, šūnu proliferāciju, šūnu diferenciāciju, šūnu migrāciju, šūnu izdzīvošanu un adhēziju, inducēt apoptozi, ietekmēt angiogēnēzi, ekstracelulārās matricē sintēzi, asinsvadu homeostāzi, kā arī audu dzīšanu un reģenerāciju. Analizējot visu trīs izoformu un to receptoru ekspresiju aukslēju attīstības laikā, tika pierādīta to nozīme aukslēju mediālās malas epitēlija un neiromezenhīmas saplūšanas laikā (Iwata *et al.*, 2012; Yumoto *et al.*, 2013; Nakajima *et al.*, 2014; Lane *et al.*, 2015; Poniatowski *et al.*, 2015). Eksperimentā ar peļu modeļiem tika pierādīta arī *TGFβ3* loma šūnu proliferācijas un angiogēnēzes veicināšanā lūpas attīstības laikā. Tika atklāta šī proteīna funkcija inducēt endotēlija šūnu diferenciāciju un mezenhīmas šūnu proliferāciju (Muraoka *et al.*, 2005). Pelēm *Tgfβ3* gēna trūkums izraisa defektīvu aukslēju aizmetņu saplūšanu (Mankarious and Goudy, 2010). Loejs ar kolēģiem secināja, ka mutācijas gēnos, kuri kodē *TGFβR1* un *TGFβR2* receptorus, izraisa cilvēkam multiplas iedzimtas malformācijas, piemēram, mentālu retardāciju, aneirismas, kraniosinostozes un arī aukslēju šķeltnes (Loeys *et al.*, 2005).

Izpētot visu *TGFβ* izoformu ekspresiju embrija attīstības laikā, tika secināts, ka tieši *TGFβ3* ir vadošais faktors lūpu un aukslēju aizmetņu saplūšanas laikā. Interesanti, ka, ārstējot *TGFβ3-knockout* peles ar eksogēni pievadītu *TGFβ*, notika sekundāro aukslēju aizmetņu saplūšana, un pavisam nesen tika atklāts, ka *TGFβ3* veicina epitēlija transformāciju mezenhīmā, aktivējot šī procesa divus nozīmīgākos transkripcijas faktorus: *Snail* un *SIP1* (Jalali *et al.*, 2012). Tiesa arī *TGFβ1* un *TGFβ2* aukslēju attīstības laikā regulē epitēlija transformāciju mezenhīmā, mezenhīmas šūnu proliferāciju un ekstracelulārās matricē sintēzi, bet šo faktoru ietekme aizmetņu saplūšanas laikā ir neliela. Interesanti, ka *TGFβ* mediētā *IRF6* faktora ekspresijas traucējumu rezultātā nenotiek mediālās malas epitēlija šūnu apoptoze (Meng *et al.*, 2009).

1.9. Apoptoze

Apoptoze ir iepriekš ģenētiski programmēta vai kaitīgu faktoru izraisīta šūnas bojāeja, kas norit ne tikai embrionālās attīstības laikā, bet arī pieauguša cilvēka organismā, nodrošinot audu homeostāzi. Embrionālās attīstības laikā apoptozi var novērot morfoloģisko formu veidošanās, audu un orgānu diferenciācijas un filoģenēzes laikā. 1972. gadā Kers un viņa līdzautori aprakstīja apoptozi, veicot aknu audu eksperimentālos pētījumus, kad tika pierādītas apoptozei raksturīgas molekulārās, bioķīmiskās un morfoloģiskās pārmaiņas šūnā (Ouyang *et al.*, 2012). 2002. gadā apoptozes pētniecības jomā tika piešķirta Nobela prēmija S. Brenneram, R. Horvicam un Dž. Salstonam. Mūsdienās apoptoze tiek pētīta saistībā ar dažādu malformāciju attīstību, bet īpaši sejas šķeltnu attīstību.

Izmantojot gaismas mikroskopiju un caurstarojošo elektronmikroskopiju, tika novērotas šādas morfoloģiskās pārmaiņas šūnā apoptozes laikā: šūnas formas un izmēra izmaiņas, šūnas citoplazmas un kodola kondensācija, šūnas citoskeleta elementu sablīvēšanās, kodola piknoze, kodoliņa izzušana, kurai seko kariorekse jeb šūnas kodola un hromatīna fragmentācija. Turklāt piknoze ir visraksturīgākā apoptozes morfoloģiskā iezīme, kas rodas, kondensējoties kodola hromatīnam, savukārt apoptotisko ķermenīšu veidošanās ir vēlīna programmētās šūnu nāves pazīme. Apoptozi aktivē gan signāli no ārpusē caur Fas receptoriem, gan no iekšpusē caur mitohondriālo citohromu un endoplazmatiskā tīkla signālceļu (Arya and White, 2015). Tā ir raksturīga praktiski visām normālām šūnām, kas nepārtraukti atjaunojas. Apoptozes molekulārā mehānisma pamatā ir kaspāžu aktivizēšana no prokaspāzēm, kas atrodas šūnas citoplazmā. Pēc prokaspāžu aktivizēšanas šūnas destruktīvais process kļūst neatgriezenisks (Elmore, 2007; Tower, 2015; Teng et al., 2015).

Apoptoze pieauguša cilvēka un embrija šūnās ir normāla fizioloģiskos apstākļos noritoša parādība, kaut gan mūsdienās aktuāla ir šūnu bojāejas pētīšana dažādu slimību gadījumos. Izmainīta šūnu apoptoze var būt par iemeslu neirodeģeneratīvu, išēmisku bojājumam, autoimūnu un hronisku iekaisuma slimību, audzēju, kā arī, iespējams, iedzimtu embrionāli determinētu malformāciju, piemēram, sejas šķeltņu attīstībā (Vukojevic et al., 2012; Yang et al., 2015; Mohammad et al., 2015). Apoptozes nozīmes izpēšanai tieši sejas šķeltņu attīstībā tika pētīts šis process lūpu un aukslēju aizmetņu saplūšanas laikā, izmantojot dzīvnieku modeļus. 2006. gadā tika izteikta hipotēze, ka pilnīgs vai daļējs apoptozes trūkums augšlūpas un aukslēju aizmetņu saplūšanas laikā var būt par iemeslu šķeltņu izveidē (Burdī, 2006). Lots ar līdzautoriem izpētīja apoptozes nozīmīgumu vaigu, apakšžokļa un nazolakrimālā izvada attīstībā (Lotz et al., 2006). Bosnijas un Hercegovinas pētnieki, pielietojot imūnhistoķīmijas un TUNEL metodi, pierādīja apoptozes klātbūtni cilvēka aukslēju attīstības laikā (Vukojevic et al., 2012).

Apoptotisko procesu regulē daudzi ģenētiskie un molekulārie mehānismi, kas vēl joprojām nav izzināti. Ir izpētīts, ka apoptozi regulē audzēja nekrozes faktors alfa (*TNF-α*), interleikīns-1, *TGFβ*, *Fas* ligands, *CD40* ligands, onkogēni, piemēram, *c-myc*, kā arī audzēju gēnu supresori, piemēram, *p53* (Elmore, 2007).

Apoptozi var izvērtēt, izmantojot dažādas bioķīmijas, morfoloģijas un molekulārās bioloģijas metodes, kas palīdz atpazīt un raksturot šo procesu audos. Jau gaismas mikroskopijas preparātos, kas krāsoti ar hematoksilīnu un eozīnu, var novērot raksturīgo apoptozei morfoloģisko iezīmju kopumu. Agrīnu apoptozes pazīmju noteikšanai pētījumos izmanto specifiskākas metodes. Tā, piemēram, viena no agrīnākajām apoptozes pazīmēm ir fosfatidilserīna pārvietošanās no plazmatiskās membrānas iekšējā līdī uz tā ārpusi.

Aktuāli šīs pazīmes noteikšanai ir izmantot apoptozes *Annexin V FITC* kitu (Rieger et al., 2011; Hankins et al., 2015). Mikroskopijas līmenī apoptozes noteikšanai tiek izmantots arī *CaspASETM* kits kaspāzes-3 un kaspāzes-7 noteikšanai kvantitatīvi, mitohondriju potenciāla noteikšanas kits izmantojams dzīvu šūnu pētīšanai, kā arī augstas sensitivitātes un specifitātes biežāk izmantotā *TUNEL (TdT-mediated Dntp Nick End Labeling)* metode, kas ietver DNS fragmentēšanas noteikšanu. Tiek pielietota arī plūsmas citometrija apoptozes noteikšanai. No kaspāzēm tieši kaspāze-3 ir labs marķieris šūnu apoptozes noteikšanā. Karstumšoka proteīns 70 (*Hsp70*) ekspresējas šūnas diferenciācijas un morfoģenēzes laikā un inhibē apoptozi, tādējādi kontrolē šūnas dzīves ciklu. Vukojevics ar līdzautoriem pierādīja *Hsp70* ekspresiju mediālās malas epitēlija šūnās (Vukojevic et al., 2012). Makroskopijas līmenī apoptozi var noteikt, pielietojot radionukleotīdu vizualizācijas metodi un optiskās vizualizācijas metodes: marķējot ar fluoroforu, bioluminiscences izmantošanu, magnētisko rezonansi un multimodālās vizualizācijas metodes (Zeng et al., 2015).

Arī pēdējo gadu publikācijās ir akcentēta šūnu proliferācijas nozīme lūpu un aukslēju aizmetņu attīstības laikā. Līdzsvarotai šūnu proliferācijai un šūnu nāvei ir nozīme normālu sejas un mutes dobuma struktūru attīstībā (Kalibović et al., 2010).

1.10. Nestīns un *Ki-67*

Mutes dobuma gļotādas epitēlijs ir pakļauts pastāvīgai iekšējo un ārējo faktoru iedarbībai, kas izraisa šūnu bojāeju, līdz ar to epitēlijam piemīt fizioloģiskā reģenerācija. Lūpas gļotādas daļu veido daudzkārtains, plakans, nepārragots epitēlijs un *lamina propria*, savukārt cietās aukslējas sedz parakeratinizēts daudzkārtu plakanaiss epitēlijs. Mīkstās aukslējas ir cieto aukslēju turpinājums, un tās sedz atkal nepārragots daudzkārtu plakanaiss epitēlijs. Jāsaka, ka mutes dobuma gļotādas uzbūve ir līdzīga ādas uzbūvei un satur mitotiski aktīvas šūnas. Tā ir bagātīgi apasiņota un labi inervēta. To pierāda imūnhistoķīmijas pētījumi par *PGP 9.5* un *VEGF* lokalizāciju dažādos mutes dobuma rajonos (Watanabe et al., 2013; Anura et al., 2014). Nakamura 2007. gadā izolēja un aprakstīja cilmes šūnas mutes dobuma gļotādas epitēlijā, izmantojot *p75* marķieri. Dongs ar līdzautoriem izolēja nestīna - pozitīvas cilmšūnas žurkas - *lamina propria* (Dong et al., 2010). Cilmsšūnas tiek raksturotas ar spēju uz savas virsmas ekspresēt specifiskus marķierus (Loeffler and Roeder, 2002).

Nestīns ir selektīvs VI tipa starpdiedziņu filaments, kas pēc struktūras ir līdzīgs vimentīnam, desmīnam un neurofilamentam. Šo proteīnu ekspresē dažādos cilvēka embrija, augļa un pieauguša cilvēka audos. Pēc reaktivācijas nestīnu ekspresējošām šūnām ir nozīme šūnu proliferācijas, diferenciācijas un migrācijas uzturēšanā, kā arī apoptozes regulēšanā. Bez

tam nestīnam ir svarīga funkcija audu reģenerācijā. Pēc audu ievainojuma palielinās lokāla nestīna ekspresija, kuru ietekmē augšanas faktori, transkripcijas faktori un starpdiedziņu remodelācija (Wiese et al., 2004; Chen et al., 2010; Liu et al., 2015). Nestīna ekspresija tika aprakstīta žurkas un cilvēka mutes dobuma gļotādas *lamina propria*, deguna gļotādā, sviedru dziedzeros, mēles sēņveida kārpīnās, mata folikulās, ādā, jaunizveidotajos asinsvados un audzēju gadījumos, piemēram, ādas, siekalu dziedzeru audzējos (Amoh et al., 2009; Amoh et al., 2012; Nagel et al., 2013; Yanai et al., 2013; Liu et al., 2014; Mii et al., 2014; Sabet et al., 2014).

Šūnu proliferācija ir svarīgs fizioloģisks process aukslēju, arī augšžokļa attīstībai un augšanai. *Ki-67* ir labs marķieris šūnu proliferācijas noteikšanai audos. *Ki-67* ir kodola proteīns, kas ekspresējas gandrīz visu šūnas cikla fāžu laikā, izņemot miera jeb G_0 fāzi (Kim and Sederstrom, 2015). Literatūrā ir atrodami tikai daži pētījumi par *Ki-67* proteīna lomu cilvēka sejas un mutes dobuma struktūru attīstībā (Kalibović Govorko et al., 2010; Novakovic et al., 2011; Vukojevic et al., 2012).

Audu homeostāzes pamatā ir šūnu proliferācijas, diferenciācijas un apoptozes mijiedarbība. Minētos procesus embrija audos kontrolē gēni un koordinē dažādas signālmolekulas. Kādas noteiktas signālmolekulas trūkums vai pārlieku lielā esamība un mutācijas kādā noteiktā gēnā var izsaukt traucējumus iepriekš minētos audu homeostāzes nodrošinātāja fizioloģiskos procesos. Rezultātā rodas disbalanss, kas var radīt sejas un mutes dobuma attīstības malformācijas, piemēram, lūpas un aukslēju šķeltnes.

1. 11. Proteīngēnviela 9.5 (*PGP 9.5*)

Proteīngēnviela 9.5 (*PGP 9.5*) pirmo reizi tika izolēta pirms 34 gadiem no smadzeņu audiem. *PGP 9.5* sintezē perifērās un centrālās nervu sistēmas šūnas, visu tipu nervu šķiedras, kā arī difūzās neiroendokrīnās sistēmas (*DNES*) šūnas (Day and Thompson, 2010). Minēto proteīnu ekspresē arī nieru tubulīšu šūnas, spermatagoniji, Leidiga šūnas, *corpus luteum*, mutes dobuma gļotādas un ādas šūnas (Genç et al., 2015). *PGP 9.5* ekspresija tika identificēta peļu embriju ektodermas šūnās agrīnā attīstības stadijā, tas liecina par šī faktora nozīmi ektodermas šūnu diferenciācijā (Sekiguchi et al., 2003). Lūpas, mutes dobuma gļotādas epitēlija un epidermas uzbūve ir sarežģīta un satur dažādas specializētas struktūras (matu folikulus, sviedru un tauku dziedzerus) un dažādas šūnas (epiteliocītus, keratinocītus, melanocītus, Langerhasna šūnas, neiroendokrīnās un Merkela šūnas), kā arī dažādus receptoru veidus (sāpju, taustes u.c.). Turklāt lielākā daļa no šīm morfoloģiskām struktūrām ir labi inervētas (Boulais and Misery, 2008). 2000. gadā japāņu pētnieku kolektīvs pētīja žurku cieto

aukslēju inervāciju. *PGP 9.5* intraepiteliālās nervu šķiedras tika vizualizētas visos cieto aukslēju rajonos. *PGP 9.5* saturošas nervu šķiedras tika atrastas arī subepitēlijā. Tādēļ tika secināts, ka cieto aukslēju gļotāda ir bagātīgi inervēta (*Mitsui et al.*, 2000). Ir pētīta cilvēka vaigu gļotādas inervācija, un *PGP 9.5* pozitīvas nervu šķiedras, nervu šķiedru kūlīši tika vizualizēti ap asinsvadiem, dziedzeriem un arī muskuļiem. Zviedru zinātnieku grupa identificēja arī *PGP 9.5* pozitīvas Merkeļa šūnas (*Hilliges et al.*, 1994).

Interesanti, ka imūnhistoķīmiski tika pierādīta *PGP 9.5* ekspresija ādas fibroblastos brūces dzīšanas laikā (*Day and Thompson*, 2010). 2014. gada pētījumā tika atklāta palielināta *PGP 9.5* ekspresija hipertrofiku rētu epidermā (*Kwak et al.*, 2014).

1.12. Kaula morfoģenētiskie proteīni (*BMP*)

BMP ir multifunkcionāli augšanas faktori un pieder pie *TGFβ* klases. Pirmo reizi *BMP* tika aprakstīti 1960. gadā, veidojoties ektopiskajiem kaulaudiem (*Nie et al.*, 2006). Literatūrā ir aprakstīti vairāk kā 20 dažādi *BMP* veidi. *BMP* ir nozīmīgi gastrulācijas, organoģenēzes, embriogēneses laikā, kā arī skeleta attīstībā, neuroģenēzē un hematopoēzē, tie regulē endohondrālo un tiešo kaulaudu veidošanos. Embrionālās attīstības laikā *BMP* signālceļam ir svarīga nozīme šūnu determinācijā, kondensācijā, augšanā, diferenciācijā, migrācijā un apoptozē (*Bragdon et al.*, 2011). Līdzīgi kā *TGFβ*, arī *BMP* nodrošina šūnu augšanu, migrāciju un diferenciāciju sekundāro aukslēju attīstības laikā (*Chen et al.*, 2004). Pētījumos tika pierādīta *Bmp2*, *Bmp4*, *Bmp7* un *Bmpr1a* receptora ekspresija peļu lūpu un aukslēju aizmetņu saplūšanas laikā (*Liu et al.*, 2005; *Levi et al.*, 2006; *Baek et al.*, 2011; *Kouskoura et al.*, 2013). Eksperimentā ar *knockout* peļu modeļiem tika apstiprināta *Bmp2* un *Bmp4* iesaiste kaula remodelācijā un homeostāzē. Turklāt kopā ar *Bmp7* tiem ir izšķiroša loma kaula dzīšanā, inducējot mezenhimālo šūnu diferenciāciju par osteoblastiem un hondroblastiem (*Bonilla-Claudio et al.*, 2012; *Wang et al.*, 2014).

Bmp2, *Bmp4* ekspresē nervu kores šūnas, agrīni sejas aizmetņu epitēlijs un mezehņīma, kā arī zoba attīstības laikā - odontoblasti, hipertrofēti hondrocīti, aukslēju aizmetņu un mēles aizmetņa šūnas (*Nie et al.*, 2006). Tieši *Bmp4* ir spēcīgs apoptozes induktors. ASV zinātnieku kolektīvs demonstrēja TUNEL - pozitīvas šūnas aukslēju aizmetņu peridermas šūnās. Iespējams, *Bmp4* regulē lūpu un aukslēju aizmetņu peridermas šūnu apoptozi (*Sun et al.*, 2000; *Gong and Guo*, 2003). Kaut arī ir npublicēti daudzi pētījumi par *BMP* proteīnu lomu skeleta malformāciju attīstībā, joprojām pastāv nozīmīgas pretrunas morfoloģiskajā un imūnhistoķīmiskajā izpētē.

1.13. Osteoprotegerīns (*OPG*)

Osteoklasti ir lielas (līdz 100 mikrometri) daudzkodolu monocītu-makrofāgu līnijas šūnas, kas atbildīgas par kaula rezorbciju. Šīs šūnas sintezē *OPG* jeb osteoklastus inhibējošo faktoru, kas ir galvenais osteoklastu attīstības modulators un pieder tumora nekrozes faktora (*TNF*) receptoru klasei. Tas ir sekretors glikoproteīns, kuru aprakstīja divas neatkarīgas pētnieku grupas 1997. gadā (*Baud'huin et al.*, 2013). *OPG* savienojas ar nukleāro kappā B faktora ligandu (*RANKL*), tādējādi neļauj nukleārā faktora kappā B ligandam (*RANKL*) savienoties ar receptoru. *RANKL* sintezē un producē osteoblasti, tas saistās ar *RANK* un tiek ierosināta osteoklastu diferenciācija. Kopumā tiek inducēta osteoklastu attīstība un regulēta šo šūnu aktivācija. *In vivo* pētījumi atklāja, ka *OPG* trūkums palielina kaula remodelācijas spējas un veicina osteoporozes attīstību, kamēr palielinātas *OPG* ekspresijas rezultātā pelēm attīstās osteopetroze (*Kang et al.*, 2014).

OPG/RANK/RANKL triāde regulē osteoklastu funkcijas, tajā skaitā arī kaulu rezorbciju. Šai triādei ir būtiska loma alveolārā kaula remodelācijā (*Koide et al.*, 2013).

Osteoklastu apoptozes regulācija ir molekulāri sarežģīts process, kas tika intensīvi pētīts, izmantojot grauzēju modeļus, bet par osteoklastu apoptozes molekulāro mehānismu cilvēkiem ir zināms maz. Zauli ar kolēģiem pierādīja to, ka osteoklastu priekšteči ekspresē tumora nekrozes faktora saistītā apoptozi inducējošā liganda (*TRAIL*) receptorus (*Zauli et al.*, 2004). *TRAIL*, saistoties ar *TRAIL* receptoriem, inducē osteoklastu apoptozi (*Brunetti et al.*, 2007). Tātad *OPG* regulē ne tikai *RANK/RANKL*, bet arī *TRAIL/TRAIL* receptora sistēmu (*Chamoux et al.*, 2008).

OPG sintezē dažādas šūnas, piemēram, osteoblasti, osteocīti, endotēlija šūnas, gludie miocīti, fibroblasti, kā arī asinsrades un imūnās sistēmas šūnas (*Udagawa et al.*, 2000; *Aoki et al.*, 2010).

Pētījumu rezultāti norāda, ka šim glikoproteīnam ir nozīme kaula remodelācijā, tomēr tā klātbūtne un loma alveolārā kaula šķeltnes audos nav plaši pētīta.

1.14. Alveolārā kaula ekstracelulārās matricēs (*ECM*) nekolagēnie proteīni

Alveolārā kaula *ECM* sastāv no organiskās un minerālās komponentes. Kolagēns mineralizētos kaulaudos veido aptuveni 80-90% organisko komponenti. I tipa kolagēns veido vairāk nekā 95%, bet 5% organiskās matricēs sastāvā ir V tipa kolagēns. Otrā lielāko *ECM* komponentu grupu veido alveolārā kaula nekolagēnie proteīni, kuriem ir svarīga loma

kaulaudu homeostāzes un remodelācijas regulācijā. Pie alveolārā kaula nekolagēniem proteīniem pieder osteopontīns (*OPN*) un osteokalcīns (*OC*) (*Sodek and McKee*, 2000).

OPN ir fosforilēts mineralizētas kaula *ECM* sialoproteīns, kuru ekspresē dažādu audu šūnās: kaulaudos, cementā, dentīnā, skrimšļaudos, smadzenēs, nierēs, asinsvados un epitēlijaudos (*Sodek et al.*, 2000). Alveolārā kaulā tieši diferencēti osteoblasti, osteocīti un arī osteoklasti sintezē šo proteīnu. *OPN* regulē osteoklastu attīstību, migrāciju un piesaisti kaula matricē kaula rezorbcijas laikā (*Sodek et al.*, 2006). Kaulu veidojošās šūnas sintezē *OPN* fizioloģiski kaulaudu remodelācijas laikā. Literatūrā ir dati par *OPN* iesaistīšanos mutes dobuma iekaisuma regulēšanā un brūču dzīšanas procesā (*Lao et al.*, 2006; *Miragliotta et al.*, 2014). *OPN* ekspresija tika novērota arī audos embrionālās attīstības laikā, attīstoties sekundārajām aukslējām (*Jakobsen et al.*, 2009).

OC ir nekolagēns kaula matricē gamma-karboksiglutamāta proteīns, kas ir cieši saistīts ar kaula *ECM* mineralizāciju. *OC* sintezē osteoblasti, osteocīti, cementoblasti, odontoblasti un hondrocīti. Ja osteoblasti ekspresē *OC*, tad tā ir vēlīna šo šūnu diferencēšanas pazīme (*Ferron and Lacombe*, 2014). *OC* ekspresiju kaulaudu šūnās regulē vairāki faktori – kaula morfogēnēzes proteīns (*BMP 2*) (*Jang et al.*, 2012), transformējošais augšanas faktors beta (*TGFβ*), fibroblastu augšanas faktors (*FGF*) u.c. (*Shiba et al.*, 2001).

OC ir nozīme kaula rezorbcijas un mineralizācijas procesos ne tikai postnatāli, bet arī embrionālās attīstības laikā. Tas stimulē angiogēzi, līdz ar to *OC* piemīt kaula remodelācijas funkcija (*Cantatore et al.*, 2005).

Neskatoties uz daudzajiem pētījumiem par *OC*, vēl joprojām nav precīzi definēti tā molekulārie darbības mehānismi un bioloģiskā nozīme šķeltnes skartajā alveolārā kaula remodelācijas laikā.

2. MATERIĀLS UN METODES

2.1. Morfoloģiski pētāmais materiāls un pacientu iedalījums grupās

Morfoloģiskajiem pētījumiem materiāls tika vākts RSU Stomatoloģijas institūta Lūpu, aukslēju un sejas šķeltņu centrā laika posmā no 2003. līdz 2015. gadam. Lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņu skartie audi tika savākti primārās lūpas, mīksto un cieto aukslēju plastikas laikā, kā arī veicot alveolārā izauguma osteoplastiku ar kaula autotransplantāciju. Lūpas plastika vienpusējām caurejošām lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltnēm tika veikta pēc Millarda metodes (*Millard, 1964*). Lūpas plastika abpusējām caurejošām lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltnēm tika veikta pēc *Veau* metodes modifikācijas (*Lehman et al., 1990*). Mīksto aukslēju plastikas metode – izmantojot mugurējā *vomer* lēvera metodi, osteoplastikas laikā kaula autotransplantācija veikta no *tibia* vai *crista iliaca anterior superior* rajona (*Robin et al., 2006*).

Rutinās histoloģiskās un imūnhistoķīmiskās metodes veikšanai pētāmais materiāls tika apstrādāts RSU AAI Morfoloģijas laboratorijā.

Pētījumā ar caurejošām lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltnēm tika iekļauti 46 pacienti: 22 bērniem bija abpusēja caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne, 24 bērniem – vienpusēja caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne. Kopējais morfoloģiskā materiāla vienību skaits, kas tika iegūts no pacientiem abpusējas šķeltnes lūpas primārās plastikas laikā, bija 16, mīksto aukslēju plastikas laikā – 10, cieto aukslēju plastikas laikā – 9, osteoplastikas laikā – 11. Morfoloģiskā materiāla vienību skaits no pacientiem ar vienpusēju šķeltni bija 24 audu paraugi, kas tika iegūti lūpas primārās plastikas laikā, un 12 audu paraugi, kas tika iegūti osteoplastikas laikā.

Pacientu grupas, no kurām tika iegūts izmeklējamais materiāls:

1. grupa – zīdaiņi un bērni ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni pēc lūpas plastikas;
2. grupa – bērni ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni pēc mīksto un cieto aukslēju plastikas;
3. grupa – zīdaiņi un bērni ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni pēc osteoplastikas;
4. grupa – zīdaiņi ar vienpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni pēc lūpas plastikas;
5. grupa – bērni ar vienpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni pēc osteoplastikas;

6. grupa – kontroles grupa, no kuras tika iegūti mīkstie un cietie audi operācijās, kuras nav saistītas ar šķeltnēm.

2.1.1. Pirmās un otrās grupas – zīdaiņu un bērnu ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni – raksturojums

Pirmajā grupā tika iekļauti 12 zīdaiņi vecumā no trīs līdz septiņiem mēnešiem. Vienam bērnam lūpas plastika tika veikta astoņu gadu un piecu mēnešu vecumā. Kopumā 13 bērniem vecumā no 0,3 līdz 8,5 gadiem tika paņemts mīksto audu materiāls lūpas plastikas laikā. Otrajā grupā tika iekļauti 10 zīdaiņi un bērni vecumā no deviņiem mēnešiem līdz pieciem gadiem un diviem mēnešiem; šiem pacientiem tika paņemts audu materiāls mīksto aukslēju plastikas laikā. Cieto aukslēju plastika tika veikta astoņiem pacientiem vecumā no trīs gadiem un diviem mēnešiem līdz pieciem gadiem un diviem mēnešiem.

Pavisam pirmajā un otrajā grupā tika iekļauti 22 pacienti. No tiem 17 bija zēni un 5 – meitenes, septiņiem no šiem bērniem tika veiktas atkārtotas operācijas, proti, lūpas un mīksto aukslēju plastika tika veikta četriem pacientiem, lūpas un cieto aukslēju plastika - vienam pacientam, mīksto un cieto aukslēju plastika – vienam pacientam. Vienam bērnam tika veiktas trīs secīgas operācijas: lūpas plastika, mīksto un cieto aukslēju plastika, kā arī visu operāciju laikā tika savākts mīksto audu materiāls no šķeltnes malām. Trīs bērniem audu materiāls tika savākts mīksto aukslēju plastikas laikā, un trīs bērniem – tikai cieto aukslēju plastikas laikā. Šiem bērniem nebija savākts audu materiāls no lūpas plastikas.

Kopējais pētāmā materiāla vienību skaits mīkstajiem audiem bija 35 (no 22 bērniem): 16 audu paraugi savākti lūpas plastikas laikā, 10 – mīksto aukslēju plastikas laikā un 9 – cieto aukslēju plastikas laikā. Informācija par pacientiem redzama 2.1. tabulā.

Informācija par 1. un 2. grupas pacientiem

Nr.	Šifrs	Pacienta dzimums	Klīniskā diagnoze	1. op.	Bērna vecums materiāla ņemšanas laikā (gados, mēnešos)	Operācijas veids, kuras laikā ņemts audu materiāls
				2. op.		
				3. op.		
1.	180	Z	Abpusēja caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne	28.02.2006	3 g. 5 mēn.	Cieto aukslēju plastika
2.	79	M	Abpusēja caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne	31.03.2004	5 g. 2 mēn.	Mīksto un cieto aukslēju plastika
3.	81	Z	Abpusēja caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne	27.04.2004	5 g. 0 mēn.	Cieto aukslēju plastika
4.	134	Z	Abpusēja caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne	24.05.2005	3 g. 6 mēn.	Cieto aukslēju plastika
5.	150	Z	Abpusēja caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne	24.08.2005	3 g. 5 mēn.	Cieto aukslēju plastika
6.	168	Z	Abpusēja caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne	20.12.2005	0 g. 6 mēn.	Lūpas plastika
	187			25.04.2006	0 g. 10 mēn.	Mīksto aukslēju plastika
	232			07.10.2008	3 g. 3 mēn.	Cieto aukslēju plastika
7.	177	Z	Abpusēja caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne	31.01.2006	0 g. 6 mēn.	Lūpas plastika
8.	194	M	Abpusēja caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne	23.01.2007	0 g. 5 mēn.	Lūpas plastika
	207			14.08.2007	1 g. 0 mēn.	Mīksto aukslēju plastika
9.	196	M	Abpusēja caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne	10.04.2007	0 g. 11 mēn.	Mīksto aukslēju plastika
	253			30.06.2009	3 g. 2 mēn.	Cieto aukslēju plastika
10.	204	Z	Abpusēja caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne	12.06.2007	0 g. 7 mēn.	Lūpas plastika
	265			23.03.2010	3 g. 4 mēn.	Cieto aukslēju plastika
11.	206	Z	Abpusēja caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne	14.08.2007	0 g. 7 mēn.	Lūpas plastika

tabulas nobeigums						
Nr.	Šifrs	Pacienta dzimums	Klīniskā diagnoze	1. op.	Bērna vecums ņemšanas laikā (gados, mēnešos)	Operācijas veids, kuras laikā ņemts audu materiāls
				2. op.		
				3. op.		
12.	212	Z	Abpusēja caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne	23.10.2007	0 g. 4 mēn.	Lūpas plastika
13.	213	Z	Abpusēja caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne	30.10.2007	0 g. 4 mēn.	Lūpas plastika
14.	221	M	Abpusēja caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne	15.04.2008	0 g. 3 mēn.	Lūpas plastika
15.	238	Z	Abpusēja caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne	25.11.2008	0 g. 4 mēn.	Lūpas plastika
	249			26.05.2009	0 g. 10 mēn.	Mīksto aukslēju plastika
16.	244	Z	Abpusēja caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne	03.02.2009	0 g. 3 mēn.	Lūpas plastika
	254			04.08.2009	0 g. 9 mēn.	Mīksto aukslēju plastika
17.	245	M	Abpusēja caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne	03.02.2009	1 g. 0 mēn.	Mīksto aukslēju plastika
18.	261	Z	Abpusēja caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne	09.09.2010	0 g. 9 mēn.	Mīksto aukslēju plastika
19.	264	Z	Abpusēja caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne	23.03.2010	0 g. 4 mēn.	Lūpas plastika
20.	267	Z	Abpusēja caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne	27.10.2010	0 g. 4 mēn.	Lūpas plastika
	276			21.09.2010	0 g. 9 mēn.	Mīksto aukslēju plastika
21.	273	Z	Abpusēja caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne	01.10.2009	0 g. 10 mēn.	Mīksto aukslēju plastika
22.	55L/ 55R	Z	Abpusēja caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne	25.11.2003	8 g. 5 mēn.	Lūpas plastika

Saīsinājumi tabulā: M – meitene; Z – zēns; g – gadi; mēn – mēneši.

2.1.2. Trešās grupas – bērnu ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņi – raksturojums

Trešajā grupā tika iekļauti 10 bērni vecumā no sešiem gadiem līdz divpadsmit gadiem un diviem mēnešiem ar abpusējām šķeltņēm. No tiem bija 9 zēni un viena meitene. Četriem pacientiem tika veiktas atkārtotas alveolārā izauguma osteoplastikas ar kaula autotransplantāciju. Diviem pacientiem tika veiktas gan cieto aukslēju plastikas, gan secīgas osteoplastikas, kuru laikā tika savākts pētāmais materiāls. Informācija par pacientiem 2.2. tabulā.

2.2. tabula

Informācija par 3. grupas pacientiem

Nr.	Šifrs	Bērna dzimums	Klīniskā diagnoze	Bērna vecums	Operācijas veids, kuras laikā ņemts materiāls
1.	210	Z	Abpusēja caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne	8 g. 6 mēn.	Osteoplastika labajā pusē
2.	286	Z	Abpusēja caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne	8 g. 11 mēn.	Osteoplastika
3.	292	Z	Abpusēja caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne	8 g. 11 mēn.	Osteoplastika
4.	185	Z	Abpusēja caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne	9 g. 2 mēn.	Osteoplastika
5.	35	Z	Abpusēja caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne	9 g. 6 mēn.	Osteoplastika
6.	145	Z	Abpusēja caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne	9 g. 6 mēn.	Osteoplastika
7.	235	Z	Abpusēja caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne	9 g. 6 mēn.	Osteoplastika kreisajā pusē
8.	214	Z	Abpusēja caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne	11 g. 1 mēn.	Osteoplastika
9.	266	Z	Abpusēja caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne	11 g. 1 mēn.	Osteoplastika
10.	125	M	Abpusēja caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne	12 g. 2 mēn.	Osteoplastika

Saīsinājumi tabulā: M – meitene; Z – zēns; g – gadi; mēn – mēneši.

2.1.3. Ceturtās un piektās grupas – bērnu ar vienpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne – raksturojums

Ceturtajā grupā tika iekļauti 24 zīdaiņi vecumā no trīs mēnešiem līdz septiņiem mēnešiem ar vienpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne. No tiem bija 6 meitenes un 18 zēni. 8 zīdaiņiem bija labās puses caurejoša šķeltne, bet 16 - kreisās puses caurejoša šķeltne. Visiem zīdaiņiem pētāmais materiāls tika paņemts lūpas plastikas laikā.

Piektajā grupā tika iekļauti 12 bērni vecumā no sešiem gadiem un astoņiem mēnešiem līdz deviņiem gadiem un pieciem mēnešiem ar vienpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne. No tiem bija 7 zēni un 5 meitenes. 9 bērniem bija kreisās puses šķeltne, un 3 - labās puses. Visiem bērniem audu materiāls tika paņemts osteoplastikas laikā. Informācija par pacientiem 2.3. un 2.4. tabulās.

2.3. tabula

Informācija par 4. grupas pacientiem

Nr.	Šifrs	Bērna dzimums	Klīniskā diagnoze	Bērna vecums	Operācijas veids, kuras laikā ņemts materiāls
1.	195	Z	Kreisās puses caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne	3 mēn.	Lūpas plastika
2.	205	Z	Kreisās puses caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne	4 mēn.	Lūpas plastika
3.	217	Z	Kreisās puses caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne	7 mēn.	Lūpas plastika
4.	220	Z	Labās puses caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne	3 mēn.	Lūpas plastika
5.	223	Z	Kreisās puses caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne	1 g. 5 mēn.	Lūpas plastika
6.	224	Z	Kreisās puses caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne	3 mēn.	Lūpas plastika
7.	227	Z	Labās puses caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne	5 mēn.	Lūpas plastika
8.	247	Z	Kreisās puses caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne	3 mēn.	Lūpas plastika
9.	258	Z	Kreisās puses caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne	3 mēn.	Lūpas plastika
10.	259	Z	Kreisās puses caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne	4 mēn.	Lūpas plastika
11.	262	Z	Kreisās puses caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne	4 mēn.	Lūpas plastika
12.	277	M	Kreisās puses caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne	3 mēn.	Lūpas plastika

tabulas nobeigums					
Nr.	Šifrs	Bērna dzimums	Klīniskā diagnoze	Bērna vecums	Operācijas veids, kuras laikā ņemts materiāls
13.	279	M	Labās puses caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne	4 mēn.	Lūpas plastika
14.	282	Z	Labās puses caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne	4 mēn.	Lūpas plastika
15.	283	Z	Labās puses caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne	4 mēn.	Lūpas plastika
16.	284	M	Kreisās puses caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne	4 mēn.	Lūpas plastika
17.	288	M	Kreisās puses caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne	4 mēn.	Lūpas plastika
18.	289	Z	Labās puses caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne	4 mēn.	Lūpas plastika
19.	299	Z	Labās puses caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne	3 mēn.	Lūpas plastika
20.	300	Z	Kreisās puses caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne	4 mēn.	Lūpas plastika
21.	302	M	Labās puses caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne	7 mēn.	Lūpas plastika
22.	303	Z	Kreisās puses caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne	4 mēn.	Lūpas plastika
23.	306	M	Kreisās puses caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne	3 mēn.	Lūpas plastika
24.	307	Z	Kreisās puses caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne	3 mēn.	Lūpas plastika

Saīsinājumi tabulā: M – meitene; Z – zēns; g – gadi; mēn – mēneši.

Informācija par 5. grupas pacientiem

Nr.	Šifrs	Bērna dzimums	Klīniskā diagnoze	Bērna vecums materiāla ņemšanas laikā	Operācijas veids, kuras laikā ņemts materiāls
1.	176/3	Z	Labās puses caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne	6 g. 10 mēn.	Osteoplastika
2.	190/2	Z	Kreisās puses caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne	14 g. 6 mēn.	Osteoplastika
3.	225/2	Z	Kreisās puses caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne	7 g. 1 mēn.	Osteoplastika
4.	228/2	M	Kreisās puses caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne	7 g. 8 mēn.	Osteoplastika
5.	248/2	M	Kreisās puses caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne	7 g. 2 mēn.	Osteoplastika
6.	263/2	M	Labās puses caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne	6 g. 8 mēn.	Osteoplastika
7.	268	Z	Kreisās puses caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne	8 g. 5 mēn.	Osteoplastika
8.	269	Z	Kreisās puses caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne	9 g. 1 mēn.	Osteoplastika
9.	278/2	M	Kreisās puses caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne	9 g. 5 mēn.	Osteoplastika
10.	295/2	Z	Labās puses caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne	8 g. 5 mēn.	Osteoplastika
11.	296/2	Z	Kreisās puses caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne	7 g. 5 mēn.	Osteoplastika
12.	246	M	Kreisās puses caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne	7 g. 10 mēn.	Osteoplastika

Saīsinājumi tabulā: M – meitene; Z – zēns; g – gadi; mēn – mēneši.

2.1.4. Kontroles grupa

Kontroles materiāls tika iegūts augšlūpas saitītes plastikas laikā un zobu ekstrakcijas laikā. Mīksto audu materiāls tika ievākts SIA "RSU Stomatoloģijas institūtā" 2013. gadā no bērniem ar augšlūpas saitītes hipertrofiju. Cietajiem audiem tika izmantots RSU AAI arhīvā esošais alveolārā kaula materiāls. Kontroles grupas pacienti – 3 meitenes un 4 zēni mīksto audu materiāla paņemšanas laikā bija vecumā no pieciem līdz 14 gadiem. Kontroles grupas pacienti – 4 meitenes un 3 zēni cieto audu materiāla paņemšanas laikā bija vecumā no sešiem gadiem un deviņiem mēnešiem līdz 14 gadiem un pieciem mēnešiem.

Informācija par kontroles grupas pacientiem aplūkojama 2.5. un 2.6. tabulās.

2.5. tabula

Informācija par mīksto audu kontroles grupas pacientiem

Nr.	Šifrs	Bērna dzimums	Klīniskā diagnoze	Bērna vecums materiāla ņemšanas laikā	Operācijas veids, kuras laikā ņemts materiāls
1.	1/1	M	Hipertrofēta augšlūpas saitīte	5 g.	Augšlūpas saitītes plastika
2.	1/2(1)	Z	Hipertrofēta augšlūpas saitīte	7 g.	Augšlūpas saitītes plastika
3.	1/2(2)	Z	Hipertrofēta augšlūpas saitīte	9 g.	Augšlūpas saitītes plastika
4.	2/1	Z	Hipertrofēta augšlūpas saitīte	8 g.	Augšlūpas saitītes plastika
5.	5	Z	Hipertrofēta augšlūpas saitīte	10 g.	Augšlūpas saitītes plastika
6.	11	M	Hipertrofēta augšlūpas saitīte	14 g.	Augšlūpas saitītes plastika
7.	18	M	Hipertrofēta augšlūpas saitīte	13 g.	Augšlūpas saitītes plastika

Saīsinājumi tabulā: M – meitene; Z – zēns; g – gadi; mēn – mēneši.

2.6. tabula

Informācija par cieto audu kontroles grupas pacientiem

Nr.	Šifrs	Bērna dzimums	Bērna vecums materiāla ņemšanas laikā	Operācijas veids, kuras laikā ņemts materiāls
1.	1.	M	10 g. 5 mēn.	Zoba ekstrakcija
2.	2.	Z	9 g. 9 mēn.	Zoba ekstrakcija
3.	3.	M	10 g. 2 mēn.	Zoba ekstrakcija
4.	5.	Z	11 g. 7 mēn.	Zoba ekstrakcija
5.	8.	Z	14 g. 5 mēn.	Zoba ekstrakcija
6.	9	M	12 g. 8 mēn.	Zoba ekstrakcija
7.	10.	M	6 g. 9 mēn.	Zoba ekstrakcija

Saīsinājumi tabulā: M – meitene; Z – zēns; g – gadi; mēn – mēneši.

2.2. Morfoloģiskās metodes

2.2.1. Pētēmā audu materiāla fiksācija

Audu fiksācija 24 stundas tika veikta RSU Stomatoloģijas institūta Lūpu, aukslēju un sejas šķeltņu centrā pēc lūpas plastikas, mīksto aukslēju plastikas, cieto aukslēju plastikas un osteoplastikas veikšanas. Minēto operāciju laikā iegūtais audu materiāls nekavējoties tika ievietots tālāk minētajā fiksatorā. Jāpiemin, ka fiksējošie šķīdumi var būt dažādi, bet pētījumā audu materiāls tika fiksēts Stefanini (Zamboni) šķīdumā, kuru Stefanini ar līdzautoriem 1967. gadā pirmo reizi izmantoja spermatozoīdu fiksācijai (*Stefanini et al.*, 1967). Šī fiksējošā šķīduma pagatavošanai ir nepieciešami šādi reaģenti: 20 g paraformaldehīds, 150 ml pikrīnskābe, 425 ml Sorensena buferis (pH 7.2) un 425 ml destilēts ūdens. Pēc fiksācijas pētāmais materiāls tika nogādāts RSU AAI Morfoloģijas laboratorijā skalošanai ar *Tyrode* (sastāvs: NaCl, KCl, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, NaHCO_3 , $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, glukoze, sukroze) šķīdumu 24 stundas, atūdeņošanai pieaugošas koncentrācijas spirta šķīdumos (50°, 70°, 90°, 95° un absolūtais spirts), attaukošanai ksilolā 30 min, tad vienu stundu ilgi izturēšanai parafīnā I un divas stundas ilgi parafīnā II, ieguldīšanai izkausētā parafīnā, sacietināšanai un tālākai apstrādei rutīnās un imūnhistoķīmijas metodes veikšanai.

2.2.2. Rutīnās histoloģijas krāsošanas metode

No katra zīdaiņa vai bērna operāciju laikā iegūtā audu materiāla bloka tika sagatavoti 3 mikrometri plāni audu griezumi ar pusautomātiskā rotācijas mikrotoma (*Leica RM2245*, *Leica Biosystems Richmond Inc.*, Amerikas Savienotās Valstis) palīdzību. Griezumi tika pārnesti uz priekšmetstikliņiem (*code-6130603*; *Histobond*^{®+}, *Paul Marienfeld GmbH & Co. KG*, Vācija), ievietoti žāvēšanai termostātā, pēc tam deparafinizēti ksilolā, atūdeņoti, izmantojot dažādas koncentrācijas spirtus, nokrāsoti ar hematoksilīnu un eozīnu, uzpilināta histoloģiskā līme un pārklāti ar ļoti plāniem 0,13–0,16 mm segstikliņiem (*code-H875.2*; *Carl Roth GmbH + Co*, Vācija) (*Lillie et al.*, 1976). Hematoksilīna un eozīna krāsojums bija nepieciešams, lai iegūtu pārskata morfoloģisko ainu. Nokrāsotie preparāti tika analizēti ar gaismas mikroskopu (*Leica DM500RB*, *Leica Biosystems Richmond Inc.*, Amerikas Savienotās Valstis).

2.2.3. Imūnhistoķīmijas metode un reaģenti

Specifisku proteolītisku enzīmu, transkripcijas faktoru, gēnu proteīnu, augšanas faktoru, šūnu proliferācijas marķieru, kaula morfoģenēzes proteīnu, nekologēno kaula proteīnu un osteoproteģerīna noteikšanai tika pielietota imūnhistoķīmijas metodi (*Hsu et al.*, 1981).

Informācija par imūnhistoķīmijā pielietotām primārām antivielām apkopota 2.7. tabulā.

Imūnhistoķīmijas krāsošanas protokolam, lai vizualizētu antigēna-antivielas reakciju, tika pielietoti sekojoši reaģenti:

1. *EDTA* (pH 9.0) buferis (*code-T0103; Diapath, Martinengo BG, Itālija*);
2. *TRIS* buferis (*code-15-M106; Bio-Optica, Milano, Itālija*);
3. *BIODEC R* dekalcifikācijas šķīdums (*code-05-M03009; Bio-Optica, Milano, Itālija*);
4. Antivielu atšķaidītājs Antibody Diluent (*code-ab64211; Abcam, Burlingame, CA, Amerikas Savienotās Valstis*);
5. HiDef DetectionTM reakcijas amplifikators (*code-954D-31; Sigma-Aldrich, Rocklin, CA, Amerikas Savienotās Valstis*);
6. HiDef DetectionTM HRP polimēra iezīmētājs (*code-954D-32; Sigma-Aldrich, Rocklin, CA, Amerikas Savienotās Valstis*);
7. Kazas ImmunoCruzTM ABC krāsošanas sistēma (*code-sc-2023; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, Amerikas Savienotās Valstis*), tā ietver biotīnu saturošas sekundāras un terciālas antivielas, kas satur avidīnu un biotīna-mārrutku peroksidāzes šķīdumu;
8. *DAB Substrate Kit* (*code-957D-30; Cell Marque, Rocklin, CA, Amerikas Savienotās Valstis*);
9. Hematoksilīns (*code-ab143166; Abcam, Burlingame, CA, Amerikas Savienotās Valstis*);
10. Histoloģiskā līme Pertex[®] (*code-00811; HistoLab[®], Gothenburg, Zviedrija*).

Kaulaudi pirms tālāk minētās apstrādes tika izturēti vienu diennakti *BIODEC R* dekalcifikācijas šķīdumā.

No katra bloka tika griezti 3 mikrometri plāni audu griezumi, kas tika pārnesti uz adhezīviem ar silānu pārklātiem priekšmetstikliņiem, deparafinizēti ksilolā un hidratēti spirta šķīdumos ar dilstošu koncentrāciju. Tika veikta skalošana 2 reizes pa piecām minūtēm ar *TRIS* bufera šķīdumu, vārīšanu *EDTA* buferī 5 min mikroviļņu krāsnī. Pēc tam 10 min tika

bloķēta endogēnās peroksidāzes aktivitāte ar 3% peroksidāzi. Visas pētījumā pielietotās antivielas tika atšķaidītas ar *Antibody Diluent*.

Peles vai truša izcelsmes antivielām tika lietota *HiDef DetectionTM HRP* polimēra sistēma. Šīs sistēmas pielietošanas gadījumā pēc primāro antivielu inkubācijas un trīsreizējas skalošanas ar *TRIS* bufera šķīdumu tika izmantota *HiDef DetectionTM* reakcijas amplifikators 10 min istabas temperatūrā. Pēc šīs apstrādes preparāti tika skaloti ar *TRIS* bufera šķīdumu trīs reizes pa piecām minūtēm. Tālāk 10 min istabas temperatūrā tika izmantots *HiDef DetectionTM HRP* polimēra iezīmētājs, un atkal tika veikta skalošana ar *TRIS* bufera šķīdumu. Pēc skalošanas, pielietojot šo polimēra sistēmu, 5 min tika izmantots *HRP* hromogēns.

Kazas izcelsmes antivielām tika izmantota *ImmunoCruzTM ABC* krāsošanas sistēma. *ABC* krāsošanas sistēmas pielietošanas gadījumā mikropreparāti inkubēti ar 1,5 % bloķēšanas serumu *TRIS* bufera šķīdumā līdz vienai stundai istabas temperatūrā. Tad sekoja preparātu inkubācija ar primāro antivielu vienu stundu istabas temperatūrā. Pēc trīsreizējas piecu minūšu skalošanas *TRIS* bufera šķīdumā griezumam inkubēti 30 min ar biotīnu saturošu sekundāru antivielu (*biotinylated goat Ig*). Pēc tam sekoja atkārtoti trīsreizēja pa piecām minūtēm paraugu skalošana *TRIS* bufera šķīdumā un inkubācija ar terciālo antivielu 30 min istabas temperatūrā. Tad tika veikta skalošana ar *TRIS* bufera šķīdumu. Turpmāk tika lietots *DAB Substrate Kit* 10 min.

Pēc hromogēna, lietojot gan kazas *ImmunoCruzTM ABC* krāsošanas sistēmu, gan *HiDef DetectionTM HRP* polimēra sistēmu, tika izmantots šūnu kodolu krāsviela hematoksilīns. Pēc krāsošanas ar hematoksilīnu mikropreparāti skaloti destilētā ūdenī un dehidratēti augošas koncentrācijas spirtos, caurspīdināti ksilolā un pārklāti ar līmi *Pertex[®]*.

Minēto preparātu paralēliem griezumiem primārā antivielā tika aizstāta ar antivielu atšķaidītāju *Antibody Diluent*. Šie griezumam tika lietoti kā negatīvā kontrole. Katrai preparātu sērijai tika pagatavotas arī pozitīvās kontroles (audos, kuros vienmēr ir pozitīva reakcija).

2.2.4. *TUNEL* metode

Programmēta šūnu nāve jeb apoptoze operāciju laikā iegūtajos mīksto audu paraugos tika izvērtēta, pielietojot augstas sensitivitātes un specifitātes *TUNEL* (code: 11 684 817 910, *In Situ Cell Death Detection Kit*, Roche Diagnostics, Vācija) kita standartizētu komplektu.

Komplektā ietilps šādi svarīgi reaģenti: gala deoksilnukleotidil-transferāze, kas iegūta no teļa aizkrūts dziedzeris, nukleotidu maisījums buferī, anti-fluorescēna antivielas un no aitām iegūti *Fab* fragments, kas konjugēts ar mārutku peroksidāzi.

Pirmkārt, *TUNEL* reakcijas veikšanai audu paraugi tika deparafinizēti, izmantojot ksilolu un dilstošas koncentrācijas etanola šķīdumos (absolūts, 95%, 90%, 80%, 70% etanols), tad aptuveni 10 min skaloti destilētā ūdenī un pēc tam *TRIS* šķīdumā. Otrkārt, tika bloķēta endogēnās peroksidāzes aktivitāte ar 3% ūdeņraža peroksīdu un audu paraugi tika skaloti *TRIS* šķīdumā trīs reizes pa 5 min. Treškārt, audu paraugi tika ievietoti *EDTA* buferšķīdumā uz 10 min un ielikti mikroviļņu krāsnī uz 5 min, pēc tam atdzesēti istabas temperatūrā. Tam sekoja preparātu skalošana *TRIS* šķīdumā. Ceturtkārt, preparāti tika mazgāti *TRIS* buferšķīdumā un atstāti 0,1% govju seruma albumīna fosfāta buferšķīdumā. Nākamā darba gaitas etapā vienu stundu 37°C temperatūrā audu paraugi tika pārklāti ar *TUNEL mix* (*TUNEL Enzyme solution*). Pēc skalošanas *TRIS* bufera šķīdumā divas reizes pa piecām minūtēm griezumi inkubēti ar mārutku peroksidāzi saturošu reaģentu *Converte-POD solution* 30 min 37°C temperatūrā. Atkārtoti paraugi pa piecām minūtēm tika skaloti ar *TRIS* buferi, tad griezumi pārklāti ar *DAB* (10 min) šķīdumu peroksidāzes noteikšanai un skaloti destilētā ūdenī.

Pēdējā protokola etapā šūnu kodolu kontrastēšana veikta ar Meijera hematoksilīnu, audu paraugi dehidratēti pieaugošas koncentrācijas spirta šķīdumos, caurspīdināti ksilolā un ieslēgti histoloģiskā *Pertex*[®] līmē, pārklāti ar plānu segstikliņu.

Informācija par imūnhistoķīmijā pielietotām primārām antivielām

Nr.	Antiviela	Kods	Klons	No kā iegūts	Darba atšķaidījums	Ražotājs
1.	<i>MMP-2</i>	sc-53630	<i>4D3</i>	Peles	1:100	<i>Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, Amerikas Savienotās Valstis</i>
2.	<i>MMP-8</i>	sc-80206	<i>6-19Z</i>	Peles	1:50	<i>Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, Amerikas Savienotās Valstis</i>
3.	<i>MMP-9</i>	sc-10737	<i>H-129</i>	Truša	1:100	<i>Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, Amerikas Savienotās Valstis</i>
4.	<i>TIMP-2</i>	sc-21735	<i>3A4</i>	Peles	1:100	<i>Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, Amerikas Savienotās Valstis</i>
5.	<i>TIMP-4</i>	sc-30076	<i>H-60</i>	Truša	1:100	<i>Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, Amerikas Savienotās Valstis</i>
6.	<i>MSX1</i>	orb18823	-	Kazas	1:100	<i>Biorbyt Ltd., Cambridge, Anglija</i>
7.	<i>IRF6</i>	ab167403	<i>EPR6348</i>	Truša	1:100	<i>Abcam, Burlingame, CA, Amerikas Savienotās Valstis</i>
8.	<i>PAX9</i>	sc-56823	<i>7C2</i>	Peles	1:100	<i>Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, Amerikas Savienotās Valstis</i>
9.	<i>RYK</i>	orb38371	-	Truša	1:50	<i>Biorbyt Ltd, Cambridge, Anglija</i>
10.	<i>TGFβ3</i>	sc-82	<i>V</i>	Truša	1:200	<i>Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, Amerikas Savienotās Valstis</i>
11.	<i>Nestin</i>	ab22035	<i>10C2</i>	Peles	1:200	<i>Abcam, Burlingame, CA, Amerikas Savienotās Valstis</i>
12.	<i>CD34</i>	sc-19621	<i>BI-3C5</i>	Peles	1:200	<i>Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, Amerikas Savienotās Valstis</i>

tabulas nobeigums						
Nr.	Antiviela	Kods	Klons	No kā iegūts	Darba atšķaidījums	Ražotājs
13.	<i>VEGF</i>	sc-7269	<i>C-1</i>	Peles	1:50	<i>Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, Amerikas Savienotās Valstis</i>
14.	<i>PGP 9.5</i>	ab10404	-	Truša	1:50	<i>Abcam, Burlingame, CA, Amerikas Savienotās Valstis</i>
15.	<i>OC</i>	sc-30044	<i>FL-100</i>	Truša	1:100	<i>Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, Amerikas Savienotās Valstis</i>
16.	<i>OPN</i>	sc-73631	<i>LFMb-14</i>	Peles	1:100	<i>Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, Amerikas Savienotās Valstis</i>
17.	<i>OPG</i>	sc-8468	<i>N-20</i>	Kazas	1:50	<i>Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, Amerikas Savienotās Valstis</i>
18.	<i>BMP2/4</i>	AF355	-	Kazas	1:100	<i>R&D Systems, Inc., Minneapolis, Amerikas Savienotās Valstis</i>
19.	<i>Ki-67</i>	ab16667	<i>SP6</i>	Truša	1:100	<i>Abcam, Burlingame, CA, Amerikas Savienotās Valstis</i>

Saīsinājumi tabulā: *MMP-2* – matricē metaloproteināze-2; *MMP-8* – matricē metaloproteināze-8; *MMP-9* – matricē metaloproteināze-9; *TIMP-2* – matricē metaloproteināzes-2 audu inhibitors; *TIMP-4* – matricē metaloproteināzes-4 audu inhibitors; *MSX1* – transkripcijas faktors *MSX1*; *IRF6* – transkripcijas faktors *IRF6*; *PAX9* – transkripcijas faktors *PAX9*; *RYK* – *RYK* gēns; *TGFβ3* – transformējošais augšanas faktors beta3; *Nestin* – VI tipa starpdziedziņu proteīns nestīns; *CD34* – transmembranozs glikoproteīns *CD34*; *VEGF* – vaskulārais endotēlija augšanas faktors; *PGP9.5* – proteīngēniels 9.5; *OC* – osteokalcīns; *OPN* – osteopontīns; *BMP2/4* – kaula morfoģenētiskais proteīns 2/4; *Ki-67* – šūnu proliferācijas marķieris *Ki-67*.

2.3. Puskvantitatīvā skaitīšanas metode

Imūnhistoķīmiski noteikto struktūru relatīvais daudzums tika izvērtēts gaismas mikroskopā, izmantojot 40x objektīvu un 10x okulārās lēcas. Imūnhistoķīmisko marķieru klātbūtne audos tika izvērtēta atbilstoši puskvantitatīvai skaitīšanas metodei (*Pilmane et al., 1998*). Pozitīvo struktūru relatīvais daudzums tika analizēts desmit nejauši izvēlētos redzes laukos katram sagatavotajam audu griezumam (sk. 2.8. tabulu).

Imūnhistoķīmiski noteikto struktūru relatīvā biežuma vērtēšanas kritēriji
(*Pilmane et al., 1998*)

Lietotie apzīmējumi	Paskaidrojumi
0	Redzes laukā netika konstatēta neviena pozitīva struktūra
0/+	Redzes laukā retas pozitīvās struktūras
+	Redzes laukā maz pozitīvo struktūru
+ / ++	Redzes laukā maz līdz vidēji daudz pozitīvo struktūru
++	Redzes laukā vidēji daudz pozitīvo struktūru
++ / +++	Redzes laukā vidēji daudz līdz daudz pozitīvo struktūru
+++	Redzes laukā daudz pozitīvo struktūru
+++ / ++++	Redzes laukā daudz līdz ļoti daudz pozitīvo struktūru
++++	Redzes laukā ļoti daudz pozitīvo struktūru

2.4. Statistiskās metodes

Pētījuma grupu vispārīgai raksturošanai tika izmantotas vispārpieņemtās aprakstošās statistikas metodes (*Teibe, 2007*). Pētījuma datu izvērtēšanai izmantotas neparametriskās statistikas metodes. Vairāku nesaistītu grupu salīdzināšanai – Kraskela–Vollisa (*Kruskal-Wallis*) rangu dispersijas analīze, kas ir Manna–Vitnija testa paplašinājums. Piecu grupu salīdzināšanai pa pāriem pielietots Bonferoni (*Bonferroni*) labojums p vērtības būtiskuma līmeņa noteikšanai. Pēc rangu skalas lielumiem tika aprēķināts arī Spīrmena (*Spearman*) korelācijas koeficients $|r|$, kuru pirmo reizi sāka lietot Č. Spīrmens 1904. gadā, pētot jautājumu, kas ir intelekts (*Deary et al., 2004*). Iegūtie rezultāti tika interpretēti: $|r| \leq 0,25$ – vāja korelācija, $0,25 < |r| < 0,75$ – vidēja korelācija, $|r| \geq 0,75$ – cieša korelācija. Rezultāti uzskatīti par statistiski ticamiem, ja $p < 0,05$. Statistiskā analīze veikta ar SPSS 22. versiju (*IBM Corp., Armonk, NY, Amerikas Savienotās Valstis*).

3. REZULTĀTI

3.1. Morfoloģiskā atrade kontroles grupas pacientiem un pacientiem ar šķeltņi

3.1.1. Rutīnās histoloģijas dati kontroles grupas pacientiem

No pētījumā izmantotajiem kontroles grupas pacientu pārskata preparātiem septiņu pacientu mutes dobuma audu paraugos, kas tika iegūti augšlūpas saitītes plastikas laikā, tika konstatēta vispārpieņemtajai normai atbilstoša histoloģiskā atrade (3.1. mikrofotogrāfija pielikumā). Visos preparātos tika fiksēta seggļotāda un košļāšanas funkciju nodrošinātājgļotāda, kā arī gļotādas saistaudi jeb *lamina propria* bez izmaiņām. Trīs pacientiem tika vizualizēti mazie siekalu dziedzeri, matu folikuli un tauku dziedzeri. Visu kontroles grupas pacientu zobu ekstrakciju laikā iegūtajos kaulaudos tika konstatēta vispārpieņemtajai normai atbilstoša balstaudu morfoloģiskā aina (3.2. mikrofotogrāfija pielikumā).

3.1.2. Rutīnās histoloģijas dati pacientiem ar šķeltņi

Audu paraugos, kas tika iegūti lūpas primārās plastikas laikā, bija labi redzama mutes dobuma gļotāda. Pacientu audu materiālā tika atrasta lūpas ārējās virsmas āda ar matiem, tauku dziedzeriem, kā arī matu folikuli un neliela perivaskulāra iekaisuma šūnu infiltrācija (3.3. mikrofotogrāfija pielikumā). Atsevišķos paraugos bija lūpas pārejas daļas gļotādas daudzkārtainais plakanais epitēlijs ar pārragošanās pazīmēm (ortokeratinizāciju). Lūpas gļotādā tika vizualizēti arī mazie siekalu dziedzeri. Mīksto un cieto aukslēju audu paraugos bija vispārpieņemtajai normai atbilstošas uzbūves mutes dobuma gļotāda. Cieto aukslēju audu materiālu veidoja parakeratinizēts daudzkārtainais plakanais epitēlijs, zemāk esoša *lamina propria*, zemgļotādā tika konstatēti jauktie siekalu dziedzeri. Tādus atradām arī mīkstajās aukslējās, un šeit nereti to izvadus veidoja hiperplazētas šūnas (3.4. mikrofotogrāfija pielikumā).

Visizteiktākās morfoloģiskās pārmaiņas atradām epitēlijā. Tā biežums dažiem pacientiem bija atšķirīgs, proti, dažiem pacientiem redzējām plānu, atrofisku, bet citiem novērojām biezu epitēliju ar izteiktu bazālā slāņa šūnu hiperplāziju, proliferāciju un epitēlija polimorfo šūnu vakuolizāciju (3.5. mikrofotogrāfija pielikumā). Turklāt, daļai bērnu ar šķeltņi epitēlijādi garu izaugumu veidā iestiepās zemāk novietotajā *lamina propria* (3.6. mikrofotogrāfija pielikumā).

Pacientiem ar šķeltņi nereti vizualizējām *lamina propria* ar blīvi un dažkārt haotiski novietotiem kolagēno šķiedru kūlīšiem, starp kuriem bija atsevišķas saistaudu šūnas, galvenokārt, fibroblasti (3.7. mikrofotogrāfija pielikumā). Redzējām daudz sīku asinsvadu un neizmainītu matu folikulu, tauku dziedzeru, kā arī mazo siekalu dziedzeru sekretorās daļas un izvadus. Mutes dobuma gļotādas epitēlijā un saistaudos redzējām arī iekaisuma šūnu infiltrāciju, bet ne visu pacientu audu paraugos.

Pacientu audu materiālā, kas tika iegūts osteoplastikas laikā, nereti redzējām deģeneratīvu alveolārā kaula izaugumu. To raksturoja niecīgs osteonu daudzums un neregulārs to izvietojums, kā arī mazs osteocītu daudzums. Dažiem pacientiem bija vispārpieņemtajai normai atbilstoša kaula uzbūve, kā arī izteikts periosts (3.8. mikrofotogrāfija pielikumā).

3.2. Miksto audu dažādu faktoru imūnhistoķīmisko pētījumu un apoptozes atrade kontroles grupas pacientiem

3.2.1. Audu degradācijas enzīmu (*MMP*) un to endogēno inhibitoru (*TIMP*) imūnhistoķīmiskie dati

Matrices metaloproteināzes-2 (*MMP-2*) klātbūtne tika analizēta atsevišķi epitēlijā un zemāk esošajos saistaudos. Visu kontroles grupas pacientu epitēlijā bija *MMP-2* pozitīvas šūnas. *MMP-2* pozitīvas epitēlijšūnas variēja robežās no maz (+) līdz vidēji daudz (++) redzes laukā (3.1. tabula; 3.9. mikrofotogrāfija pielikumā). Kopumā *MMP-2* pozitīvas epitēlijšūnas bija maz līdz vidēji daudz (+/++). Tikai vienam no septiņiem pacientiem tika konstatēts vidēji daudz (++) *MMP-2* saturošu saistaudu šūnu (3.1. tabula).

Matrices metaloproteināzes-8 (*MMP-8*) atrade kontroles grupas pacientu mutes dobuma gļotādā arī tika vizualizēta epitēlijā un saistaudos. Pacientiem epitēlijā bija sastopamas retas (0/+) līdz vidēji daudz (++) *MMP-8* pozitīvas šūnas, un arī saistaudos atrade bija līdzīga, *MMP-8* pozitīvas šūnas bija robežās no retām (0/+) līdz maz (+) redzes laukā (3.10. mikrofotogrāfija pielikumā). Vienam pacientam netika atklātas *MMP-8* saturošas struktūras (3.1. tabula).

Matrices metaloproteināzes-9 (*MMP-9*) klātbūtne arī tika analizēta visos mutes dobuma gļotādas slāņos. Lielākajai daļai pacientu *MMP-9* pozitīvas epitēlijšūnas bija robežās no retām (0/+) līdz vidēji daudz (++) šūnām redzes laukā. Viena pacienta audos tika novērots daudz (+++) *MMP-9* pozitīvu epitēlijšūnu. Saistaudos konstatētas *MMP-9* pozitīvas šūnas bija robežās no retām (0/+) līdz vidēji daudz (++) (3.11. mikrofotogrāfija pielikumā), kaut gan vienam pacientam saistaudos netika redzētas *MMP-9* pozitīvas šūnas (3.1. tabula).

Matrices metaloproteināzes-2 audu inhibitora (TIMP-2) klātbūtne tika atrasta epitēlijā un saistaudos. *TIMP-2* saturošas epitēlijšūnas bija robežās no retām (0/+) līdz vidēji daudz (++) šūnām (3.1. tabula; 3.12. mikrofotogrāfija pielikumā). Vienam pacientam epitēlijā netika konstatētas *TIMP-2* saturošas šūnas. Diviem pacientiem atradām retas (0/+) *TIMP-2* pozitīvas saistaudu šūnas (3.1. tabula).

Visiem kontroles grupas pacientiem epitēlijā un saistaudos tika vizualizēta **matrices metaloproteināzes-4 audu inhibitora (TIMP-4)** klātbūtne. Epitēlijā *TIMP-4* klātbūtne variēja no retām (0/+) līdz vidēji daudz (++) pozitīvām šūnām redzes laukā (3.1. tabula; 3.13. mikrofotogrāfija pielikumā), savukārt saistaudos *TIMP-4* pozitīvu šūnu relatīvais daudzums redzes laukā bija robežās no retām (0/+) līdz maz (+) (3.1. tabula).

3.1. tabula

Audu degradācijas enzīmu (MMP), to endogēno inhibitoru (TIMP) pozitīvu struktūru relatīvais daudzums kontroles grupas pacientu audos

Nr.	Šifrs	<i>MMP-2</i>		<i>MMP-8</i>		<i>MMP-9</i>		<i>TIMP-2</i>		<i>TIMP-4</i>	
		E	S	E	S	E	S	E	S	E	S
1.	1/1	++	0	+/++	0/+	+++	+/++	++	0	++	+
2.	1/2(1)	+	0	0/+	+	+/++	++	0/+	0	+/++	0/+
3.	1/2(2)	+	0	+	+	+	++	+	0	+	+
4.	2/1	++	0	+	0/+	+	0/+	++	0	0/+	0/+
5.	5	+	0	0/+	+	++	+	+	0	++	+/++
6.	11	++	++	0	0	+	++	++	++	+	+
7.	18	+/++	0	+	+	0/+	0	+/++	0	0/+	+

Apzīmējumi tabulā: 0 – redzes laukā nav konstatēta neviena pozitīva struktūra; 0/+ - redzes laukā ir retas pozitīvas struktūras; + – redzes laukā ir maz pozitīvu struktūru; +/+ – redzes laukā ir maz līdz vidēji daudz pozitīvu struktūru; ++ – redzes laukā ir vidēji daudz pozitīvu struktūru; +++ – redzes laukā ir vidēji daudz līdz daudz pozitīvu struktūru; +++ – redzes laukā ir daudz pozitīvu struktūru; +++/++++ – redzes laukā ir daudz līdz ļoti daudz pozitīvu struktūru; ++++ – redzes laukā ir ļoti daudz pozitīvu struktūru.

Saīsinājumi tabulā: E – epitēlijšūnas; S – saistaudu šūnas; *MMP-2* – matrices metaloproteināze-2; *MMP-8* – matrices metaloproteināze-8; *MMP-9* – matrices metaloproteināze-9; *TIMP-2* – matrices metaloproteināzes-2 audu inhibitors; *TIMP-4* – matrices metaloproteināzes-4 audu inhibitors.

3.2.2. Gēnu proteīnu imūnhistokīmiskie dati

Transkripcijas faktora MSX1 atrade kontroles grupas pacientu mutes dobuma gļotādā bija pārliecinoša. Epitēlijā tika konstatētas maz (+) līdz daudz (+++) *MSX1* pozitīvas šūnas redzes laukā (3.2. tabula; 3.14. mikrofotogrāfija pielikumā). Tāpat tika konstatēti arī *MSX1* pozitīvi fibroblasti un makrofāgi *lamina propria*. *MSX1* saistaudos variēja no maz (+) līdz vidēji daudz (++) pozitīvām šūnām redzes laukā (3.2. tabula).

Transkripcijas faktors IRF6 tika konstatēts gan epitēlijā, gan saistaudos visos kontroles grupas pacientu audu griezumos. Epitēlijā *IRF6* pozitīvas šūnas tika redzētas

robežās no maz (+) līdz vidēji daudz (++), bet saistaudos – no retām (0/+) līdz daudz (+++) redzes laukā (3.2. tabula; 3.15. mikrofotogrāfija pielikumā).

Transkripcijas faktora PAX9 klātbūtne arī tika analizēta visos mutes dobuma gļotādas epitēlija slāņos un zemāk esošajos saistaudos. Kopumā epitēlijā pārliecinoši tika konstatēts vidēji daudz (++) PAX9 pozitīvu šūnu. Vidēji daudz (++) PAX9 pozitīvu bazālā un dzeloņainā slāņa epitēlijšūnu tika konstatēts pieciem kontroles grupas pacientiem (3.16. mikrofotogrāfija pielikumā) un vidēji daudz līdz daudz (++/+++) diviem pacientiem. Trīs kontroles grupas pacientiem tika konstatētas retas (0/+) PAX9 saturošas saistaudu šūnas (3.2. tabula).

RYK gēna proteīna klātbūtne tika novērota gandrīz visiem kontroles grupas pacientiem. Epitēlijā un saistaudos bija atrodamas RYK saturošas šūnas robežās no retām (0/+) līdz vidēji daudz (++) redzes laukā (3.17. mikrofotogrāfija pielikumā). Vienam pacientam netika vizualizētas RYK pozitīvas šūnas epitēlijā, citam pacientam – RYK pozitīvas šūnas saistaudos (3.2. tabula).

3.2. tabula

Gēnu proteīnu pozitīvu struktūru relatīvais daudzums kontroles grupas pacientu audos

Nr.	Šifrs	MSX1		IRF6		PAX9		RYK	
		E	S	E	S	E	S	E	S
1.	1/1	++	+/+++	+	+	++	0/+	0/+	0/+
2.	1/2(1)	++/++++	+	+	+	++	0	0/+	0
3.	1/2(2)	+++	+	+	0/+	++/++++	0	0/+	+
4.	2/1	++	++	++	+	++	0	+	+
5.	5	++	+	++	++	++	0	0	+
6.	11	++	++	++	++/++++	++	0/+	++	++
7.	18	+/+++	++	+	++	++/++++	0/+	+	+

Apzīmējumi tabulā: 0 – redzes laukā nav konstatēta neviena pozitīva struktūra; 0/+ - redzes laukā ir retas pozitīvas struktūras; + – redzes laukā ir maz pozitīvu struktūru; +/+ – redzes laukā ir maz līdz vidēji daudz pozitīvu struktūru; ++ – redzes laukā ir vidēji daudz pozitīvu struktūru; ++/+++ – redzes laukā ir vidēji daudz līdz daudz pozitīvu struktūru; +++ – redzes laukā ir daudz pozitīvu struktūru; +++/++++ – redzes laukā ir daudz līdz ļoti daudz pozitīvu struktūru; ++++ – redzes laukā ir ļoti daudz pozitīvu struktūru.

Saīsinājumi tabulā: E – epitēlijšūnas; S – saistaudu šūnas; MSX1 – transkripcijas faktors MSX1; IRF6 – transkripcijas faktors IRF6; PAX9 – transkripcijas faktors PAX9; RYK – RYK gēna proteīns.

3.2.3. Augšanas faktoru, *CD34* un inervācijas faktora *PGP 9.5* imūnhistoķīmiskie dati

Transformējošā augšanas faktora beta-3 (*TGFβ3*) saturošas struktūras tika novērotas visu kontroles grupas pacientu audos. Četriem pacientiem tika atrasts daudz (+++) *TGFβ3* pozitīvu epitēlijšūnu, diviem pacientiem – vidēji daudz (++) un vienam pacientam – daudz līdz ļoti daudz (+++/++++) pozitīvu epitēlijšūnu (3.18. mikrofotogrāfija pielikumā), kamēr imūnhistoķīmiski noteikto saistaudu šūnu relatīvais daudzums variēja no vidēji daudz (++) līdz daudz (+++) redzes laukā (3.3. tabula). Četriem pacientiem tika konstatētas *TGFβ3* saturošas šūnas asinsvadu sienīnās.

Vaskulārā endotēlija augšanas faktora (*VEGF*) saturošo šūnu klātbūtne tika konstatēta visu kontroles grupas pacientu audu paraugos asinsvadu sienīnā, kur tas iezīmēja maz (+) līdz vidēji daudz (++) endoteliocītus (3.3. tabula; 3.19. mikrofotogrāfija pielikumā).

CD34 klātbūtne tika konstatēta visos kontroles grupas pacientu audu paraugos – asinsvadu sienīnās. Imūnhistoķīmiski noteikto *CD34* pozitīvo šūnu relatīvais daudzums variēja no vidēji daudz (++) līdz daudz (+++) redzes laukā (3.3. tabula; 3.20. mikrofotogrāfija pielikumā).

Proteīngēnvielas 9.5 (*PGP 9.5*) pozitīvas nervšķiedras tika konstatētas visiem audu paraugiem, pārsvarā starp epiteliocītiem. Dažos gadījumos tika novērotas *PGP 9.5* pozitīvas struktūras asinsvadu sienīnās un to tuvumā. Tika atrasti arī *PGP 9.5* saturoši nervu šķiedru kūlīši. Kopumā *PGP 9.5* saturošas struktūras bija retas (0/+) līdz daudz (+++) redzes laukā (3.3. tabula; 3.21. mikrofotogrāfija pielikumā).

***TGFβ3*, *VEGF*, *CD34* un *PGP 9.5* pozitīvu struktūru relatīvais daudzums kontroles grupas pacientu audos**

Nr.	Šifrs	<i>TGFβ3</i>		<i>VEGF</i>	<i>CD34</i>	<i>PGP 9.5</i>
		E	S			
1.	1/1	++	++	++	+++	+
2.	1/2(1)	+++	+++	++	++	0/+
3.	1/2(2)	+++	++	++	++	+++
4.	2/1	+++	+++	+	+++	+
5.	5	++	++	+/++	+++	+
6.	11	+++ / ++++	+++	+	+++	+/+++
7.	18	+++	+++	+/+++	+++	+

Apzīmējumi tabulā: 0 – redzes laukā nav konstatēta neviena pozitīva struktūra; 0/+ - redzes laukā ir retas pozitīvas struktūras; + – redzes laukā ir maz pozitīvu struktūru; +/+ – redzes laukā ir maz līdz vidēji daudz pozitīvu struktūru; ++ – redzes laukā ir vidēji daudz pozitīvu struktūru; ++/+++ – redzes laukā ir vidēji daudz līdz daudz pozitīvu struktūru; +++ – redzes laukā ir daudz pozitīvu struktūru; +++/++++ – redzes laukā ir daudz līdz ļoti daudz pozitīvu struktūru; ++++ – redzes laukā ir ļoti daudz pozitīvu struktūru.

Saīsinājumi tabulā: E – epitēlijšūnas; S – saistaudu šūnas; *TGFβ3* – transformējošais augšanas faktors beta3; *VEGF* – vaskulārais endotēlija augšanas faktors; *CD34* – transmembranozais glikoproteīns *CD34*; *PGP 9.5* – proteīngēni 9.5.

3.2.4. Šūnu proliferācijas marķiera *Ki-67*, nestīna un apoptozes atrade

Ki-67 pozitīvi epitēlijšūnu kodoli tika konstatēti piecu kontroles grupas pacientu audu paraugos. Vienam pacientam nebija redzama neviena *Ki-67* pozitīva šūna. Vienam pacientam pētījumā bija maz (+) *Ki-67* pozitīvas šūnas epitēlijā (3.22. mikrofotogrāfija pielikumā), un piecu pacientu audu paraugos tika vizualizētas retas (0/+) *Ki-67* pozitīvas šūnas redzes laukā (3.4. tabula).

Nestīns bagātīgi iezīmēja epitēlijšūnas četriem pacientiem. Vienam pacientam bija vidēji daudz līdz daudz (++/+++) pozitīvu epitēlijšūnu, diviem pacientiem – daudz līdz ļoti daudz (+++ /++++) pozitīvu epitēlijšūnu (3.4. tabula; 3.23. mikrofotogrāfija pielikumā). Jāatzīmē, ka kontroles grupas pacientiem nestīnu bagātīgi saturēja epitēlija bazālā slāņa šūnas, bet tika novērotas arī nestīna saturošas saistaudu šūnas.

Apoptotiskās šūnas tika novērotas pieciem pacientiem. Šiem pacientiem maz (+) līdz vidēji daudz (++) epiteliocītu bija apoptotiski (3.4. tabula; 3.24. mikrofotogrāfija pielikumā). Apoptotiskas šūnas saistaudos netika vizualizētas. Diviem pacientiem netika atrasta neviena apoptotiska šūna (3.4. tabula).

Ki-67, nestīna un apoptotisko šūnu relatīvais daudzums kontroles grupas pacientu audos

Nr.	Šifrs	Ki-67	Nestīns	Apoptoze
1.	1/1	0/+	++/+++	+ /++
2.	1/2(1)	0	++++	0
3.	1/2(2)	+	++++	+ /++
4.	2/1	0/+	++++	0
5.	5	0/+	++++	+
6.	11	0/+	+++ /++++	+ /++
7.	18	0/+	+++ /++++	+

Apzīmējumi tabulā: 0 – redzes laukā nav konstatēta neviena pozitīva struktūra; 0/+ - redzes laukā ir retas pozitīvas struktūras; + – redzes laukā ir maz pozitīvu struktūru; +/+ – redzes laukā ir maz līdz vidēji daudz pozitīvu struktūru; ++ – redzes laukā ir vidēji daudz pozitīvu struktūru; ++/+ – redzes laukā ir vidēji daudz līdz daudz pozitīvu struktūru; +++ – redzes laukā ir daudz pozitīvu struktūru; +++/+ – redzes laukā ir daudz līdz ļoti daudz pozitīvu struktūru; ++++ – redzes laukā ir ļoti daudz pozitīvu struktūru.

Saīsinājums tabulā: Ki-67 – šūnu proliferācijas marķieris Ki-67.

3.2.5. Kaulaudu osteokalcīna (OC), osteopontīna (OP) un osteoproteģerīna (OPG) imūnhistoķīmiskie dati

Osteokalcīna (OC) klātbūtne kontroles grupas pacientu audos tika konstatēta osteocītos un osteoblastos visos audu paraugos. Imūnhistoķīmiski noteikto kaulaudu šūnu relatīvais daudzums variēja no vidēji daudz un daudz (++/+++) līdz ļoti daudz (++++) redzes laukā (3.5. tabula; 3.25. mikrofotogrāfija pielikumā).

Osteopontīnu (OPN) saturēja galvenokārt osteocīti. Pieciem pacientiem tika novēroti reti (0/+) pozitīvi osteocīti, vienam pacientam – vidēji daudz līdz daudz (++/+++) pozitīvu osteocītu (3.26. mikrofotogrāfija pielikumā), bet vienam pacientam imūnreaktīvas šūnas netika vizualizētas (3.5. tabula).

Osteoproteģerīna (OPG) klātbūtne cietajos audos tika novērota visu kontroles grupas pacientu osteoblastos un osteocītos. OPG pozitīvas šūnas variēja no retām (0/+) līdz ļoti daudz (++++) redzes laukā (3.5. tabula; 3.27. mikrofotogrāfija pielikumā).

OC, OP un OPG pozitīvu struktūru relatīvais daudzums kontroles grupas pacientu kaulaudos

Nr.	Šifrs	OC	OPN	OPG
1.	1	+++	0/+	+ /++
2.	2	+++	0/+	0/+
3.	3	+++	0/+	++
4.	5	++/+++	0	+ /++
5.	8	++++	0/+	+++ /++++
6.	9	++/+++	++/+++	+++ /++++
7.	10	++++	0/+	+++
8.	11	++/+++	0/+	+++ /++++

Apzīmējumi tabulā: 0 – redzes laukā nav konstatēta neviena pozitīva struktūra; 0/+ - redzes laukā ir retas pozitīvas struktūras; + – redzes laukā ir maz pozitīvu struktūru; +/+ – redzes laukā ir maz līdz vidēji daudz pozitīvu struktūru; ++ – redzes laukā ir vidēji daudz pozitīvu struktūru; ++/+++ – redzes laukā ir vidēji daudz līdz daudz pozitīvu struktūru; +++ – redzes laukā ir daudz pozitīvu struktūru; +++/++++ – redzes laukā ir daudz līdz ļoti daudz pozitīvu struktūru; ++++ – redzes laukā ir ļoti daudz pozitīvu struktūru.

Saīsinājumi tabulā: OC – osteokalcīns; OP – osteopontīns; OPG – osteoproteģerīns.

3.2.6. Kaulaudu kaula morfoģenētiskā proteīna 2/4 (*BMP2/4*), matricas metaloproteināzes-2 (*MMP-2*), matricas metaloproteināzes-2 audu inhibitora (*TIMP-2*) un tranformējošā augšanas faktora beta-3 (*TGFβ3*) imūnhistoķīmiskie dati

Kaula morfoģenētiskais proteīns 2/4 (*BMP2/4*) tika konstatēts visiem kontroles grupas pacientiem. *BMP2/4* saturošo osteoblastu un osteocītu skaits variēja no maz (+) līdz daudz (+++) redzes laukā (3.6. tabula; 3.28. mikrofotogrāfija pielikumā).

Matricas metaloproteināze-2 (*MMP-2*) un tās endogēnais audu inhibitors (*TIMP-2*) tika novērots visos cieto audu griezumos. *MMP-2*, *TIMP-2* variēja no reti sastopamām (0/+) līdz daudz (++) pozitīvām šūnām redzes laukā (3.6. tabula; 3.29. un 3.30. mikrofotogrāfija pielikumā).

Transformējošā augšanas faktora beta-3 (*TGFβ3*) klātbūtne kaulaudu šūnās tika konstatēta visiem pacientiem. *TGFβ3* saturošas šūnas variēja robežās no maz (+) līdz daudz (+++) redzes laukā (3.6. tabula; 3.31. mikrofotogrāfija pielikumā).

***BMP 2/4, MMP-2, TIMP-2 un TGFβ3* pozitīvu struktūru relatīvais daudzums kontroles grupas pacientu kaulaudos**

Nr.	Šifrs	<i>BMP2/4</i>	<i>MMP-2</i>	<i>TIMP-2</i>	<i>TGFβ3</i>
1.	1	+/++	0/+	++	+
2.	2	+/++	0/+	0/+	+
3.	3	+	+	0/+	++
4.	5	++/+++	++/+++	0/+	++
5.	8	+	+	+	++
6.	9	+	+	+/++	++
7.	10	++	+	+/++	++
8.	11	++	0/+	0/+	+++

Apzīmējumi tabulā: 0 – redzes laukā nav konstatēta neviena pozitīva struktūra; 0/+ - redzes laukā ir retas pozitīvas struktūras; + – redzes laukā ir maz pozitīvu struktūru; +/+ – redzes laukā ir maz līdz vidēji daudz pozitīvu struktūru; ++ – redzes laukā ir vidēji daudz pozitīvu struktūru; ++/+++ – redzes laukā ir vidēji daudz līdz daudz pozitīvu struktūru; +++ – redzes laukā ir daudz pozitīvu struktūru; +++/++++ – redzes laukā ir daudz līdz ļoti daudz pozitīvu struktūru; ++++ – redzes laukā ir ļoti daudz pozitīvu struktūru.

Saīsinājumi tabulā: *BMP2/4* – kaula morfoģenētiskais proteīns 2/4; *MMP-2* – matricas metaloproteināze-2; *TIMP-2* – matricas metaloproteināzes-2 audu inhibitors; *TGFβ3* – transformējošais augšanas faktors beta-3.

3.2.7. Imūnhistoķīmiski noteikto marķieru savstarpējās atbilstības ciešuma izvērtēšanas dati kontroles grupas pacientiem

Kontroles grupas audu paraugos noteikto faktoru savstarpējās atbilstības ciešuma izvērtēšanai tika izmantots Spīrmena rangu korelācijas koeficients.

Statistiski nozīmīga cieša, pozitīva ($|r| \geq 0,75$) korelācija tika konstatēta:

$r_s = 0,938$; $p < 0,01$ – starp *TIMP-2* un *TIMP-4* pozitīvām epitēlijšūnām;

$r_s = -0,933$; $p < 0,01$ – starp *MMP-9* pozitīvām saistaudu šūnām un *MMP-2* pozitīvām epitēlijšūnām;

$r_s = 0,889$; $p < 0,01$ – starp *MSX1* pozitīvām saistaudu šūnām un *RYK* pozitīvām epitēlijšūnām.

3.3. Šķeltnu skartu audu faktoru atrade

3.3.1. Audu degradācijas enzīmu (*MMP*) un to endogēno audu inhibitoru (*TIMP*) imūnhistoķīmiskie un statistiskie dati

Matrices metaloproteināzes-2 (*MMP-2*) atrade lūpas primārās plastikas laikā iegūtajā materiālā zīdaiņiem un bērniem ar lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltnēm

MMP-2 klātbūtne pacientiem abpusēju caurejošu šķeltnu audos tika redzēta gan epitēlijā, gan *lamina propria*. Dažiem pacientiem pētījumā tika vizualizētas vidēji daudz līdz daudz (++) *MMP-2* pozitīvas šūnas mazo siekalu dziedzeru izvados un sekretorajās daļās. *MMP-2* pozitīvas šūnas redzējām arī tauku dziedzeros. Visos audu paraugos tika konstatēts vidēji daudz (++) līdz ļoti daudz (+++++) pozitīvu epitēlijšūnu (3.7. tabula). *MMP-2* pozitīvas saistaudu šūnas variēja no retām (0/+) līdz daudz (+++) redzes laukā (3.7. tabula; 3.32. mikrofotogrāfija pielikumā).

3.7. tabula

MMP un *TIMP* pozitīvu struktūru relatīvais daudzums abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltnu skartajos audos, kas iegūti lūpas plastikas laikā

Nr.	Šifrs	<i>MMP-2</i>		<i>MMP-8</i>		<i>MMP-9</i>		<i>TIMP-2</i>		<i>TIMP-4</i>	
		E	S	E	S	E	S	E	S	E	S
1.	55L	++	++	++	+	0/+	0/+	+	+/++	+	0/+
2.	55R	++	++/++++	+	+	0/+	0/+	+/++	++	0/+	0/+
3.	168	++	+/++	0/+	0/+	0	0	+/++	+/++	0	0
4.	177	++	0/+	+	0/+	0	0/+	++	0/+	0	0
5.	194	++/++++	+/++	++	0/+	+	0/+	++	+/++	0/+	0/+
6.	204	++	+/++	+	0/+	0/+	0	+	+	0	0
8.	206	++/++++	++	0/+	0/+	0	0	+/++	+/++	0	0
9.	212	++	++	0	0/+	0/+	0/+	+/++	+	0	0
10.	213	++/++++	+	+	0/+	0/+	0	+/++	+/++	0	0
11.	221	+++ /+++++	+++	+++	0/+	++	+/++	+++ /+++++	++	+/++	+
12.	238	+++ /+++++	++	+/++	0/+	0/+	0/+	++	++	+	0/+
13.	244	++/++++	++	+++	0/+	+	0/+	+	+	++	0/+
14.	264	++/++++	++	++	0/+	0/+	0/+	++	++	+	0/+
15.	267	++	++	++	+	0/+	0	+	++	0/+	+
16.	197	++	+	++	0/+	+	0	++	+	0/+	0

Apzīmējumi tabulā: 0 – redzes laukā nav konstatēta neviena pozitīva struktūra; 0/+ - redzes laukā ir retas pozitīvas struktūras; + – redzes laukā ir maz pozitīvu struktūru; +/+ – redzes laukā ir maz līdz vidēji daudz pozitīvu struktūru; ++ – redzes laukā ir vidēji daudz pozitīvu struktūru; ++/++++ – redzes laukā ir vidēji daudz

līdz daudz pozitīvu struktūru; +++ – redzes laukā ir daudz pozitīvu struktūru; +++/++++ – redzes laukā ir daudz līdz ļoti daudz pozitīvu struktūru; ++++ – redzes laukā ir ļoti daudz pozitīvu struktūru.

Saīsinājumi tabulā: E – epitēlijšūnas; S – saistaudu šūnas; *MMP-2* – matrices metaloproteināze-2; *MMP-8* – matrices metaloproteināze-8; *MMP-9* – matrices metaloproteināze-9; *TIMP-2* – matrices metaloproteināzes-2 audu inhibitors; *TIMP-4* – matrices metaloproteināzes-4 audu inhibitors.

Epitēlijā un saistaudos visiem vienpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņu skartajiem audu paraugiem tika konstatētas *MMP-2* saturošas šūnas. Epitēlijā *MMP-2* pozitīvas šūnas bija redzamas robežās no reti (0/+) līdz vidēji daudz (++) redzes laukā. *Lamina propria* tika fiksēti galvenokārt *MMP-2* pozitīvi makrofāgi un fibroblasti. Kopumā saistaudos atrade variēja robežās no reti (0/+) līdz ļoti daudz (++++) *MMP-2* saturošām šūnām redzes laukā (3.8. tabula; 3.33. mikrofotogrāfija pielikumā).

3.8. tabula

***MMP* un *TIMP* pozitīvu struktūru relatīvais daudzums vienpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņu skartajos audos, kas iegūti lūpas plastikas laikā**

Nr.	Šifrs	<i>MMP-2</i>		<i>MMP-8</i>		<i>MMP-9</i>		<i>TIMP-2</i>		<i>TIMP-4</i>	
		E	S	E	S	E	S	E	S	E	S
1.	195.	+/++	+	+	0/+	++	0/+	+	0/+	++	+
2.	205.	+/++	+	++	0/+	++	0/+	++	+/++	++/+++	+
3.	217.	+/++	0/+	+/++	0/+	++	+/++	0/+	0/+	++	++
4.	220.	0/+	0/+	++	+	++	++	+/+	+/++	++/+++	+++
5.	223.	+	0/+	+	0/+	+/++	++	+/+	0/+	++	+/++
6.	224.	0/+	0/+	+/++	0/+	++	+	+/+	0/+	++	++
7.	227.	+	0/+	+++	0	+++	+/++	+++	+	+++	++
8.	247.	0/+	0	0	0	+/++	0/+	0	0	0/+	0/+
9.	258.	++	+++	0/+	0/+	++	+/++	+/+	+++	++/+++	+/++
10.	259.	++	+++	++	0/+	+/++	+/++	+/+	+++	+++	+/++
11.	262.	0/+	+++	++/++	++	++	+/++	+++	+++	+++	+++
12.	277.	0/+	0/+	+/++	+	++	++	+++	+++	+	+
13.	279.	0/+	0/+	0	0	++	++	++	++	+++	+/++
14.	282.	++	+++	+/++	0/+	+/++	+++	+	+	+++/+++	++++
15.	283.	++	+++	+/++	0/+	++	++	+/+	+/++	++/+++	+++
16.	284.	++	+++	++	+/+	+++	++	++/	++	+++	++++
17.	288.	0/+	0/+	0/+	0/+	+/++	0/+	+	+	++	++
18.	289.	++	+++	0	0	++	++	+/+	+++	++/+++	++++
19.	299.	++	+/++	+/++	+	++	++	+/+	++	+++	++++
20.	300.	++/++	+++	++	0/+	+/++	0/+	++	+++	++	++

tabulas nobeigums											
Nr.	Šifrs	<i>MMP-2</i>		<i>MMP-8</i>		<i>MMP-9</i>		<i>TIMP-2</i>		<i>TIMP-4</i>	
		E	S	E	S	E	S	E	S	E	S
21.	302.	++	+++	++	0/+	+++	+/++	+++	++/++ +	+++	+++
22.	303.	+/++	++/+ ++	++	0/+	++/++ +	++	0/+	0/+	+++	+++
23.	306.	0/+	0/+	+/++	0/+	++	+	+	+	++/+++	++
24.	307.	0/+	+++	+/++	0/+	++/++ +	+++	+/+ +	+++	+++/ ++	++++

Apzīmējumi tabulā: 0 – redzes laukā nav konstatēta neviena pozitīva struktūra; 0/+ - redzes laukā ir retas pozitīvas struktūras; + – redzes laukā ir maz pozitīvu struktūru; +/+ – redzes laukā ir maz līdz vidēji daudz pozitīvu struktūru; ++ – redzes laukā ir vidēji daudz pozitīvu struktūru; ++/+++ – redzes laukā ir vidēji daudz līdz daudz pozitīvu struktūru; +++ – redzes laukā ir daudz pozitīvu struktūru; +++/++++ – redzes laukā ir daudz līdz ļoti daudz pozitīvu struktūru; ++++ – redzes laukā ir ļoti daudz pozitīvu struktūru.

Saīsinājumi tabulā: E – epitēlijšūnas; S – saistaudu šūnas; *MMP-2* – matricē metaloproteināze-2; *MMP-8* – matricē metaloproteināze-8; *MMP-9* – matricē metaloproteināze-9; *TIMP-2* – matricē metaloproteināzes-2 audu inhibitors; *TIMP-4* – matricē metaloproteināzes-4 audu inhibitors.

Statistiskie dati. Tika atklāta tendence uz imūnhistoķīmiski noteikto epitēlijšūnu relatīvā daudzuma vidējo rangu atšķirību starp vienpusējām un abpusējām caurejošām lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltnēm. Pacienti ar abpusēju caurejošu šķeltni *MMP-2* pozitīvo epitēlijšūnu relatīvais daudzums bija statistiski ticami lielāks, salīdzinot ar pacientiem, kuriem bija vienpusēja caurejoša šķeltne ($p < 0,001$) (3.1. attēls). Imūnhistoķīmiski noteikto *MMP-2* pozitīvo saistaudu šūnu vidējais relatīvais daudzums gan vienpusēju, gan abpusēju caurejošu šķeltnu skartajos audos bija statistiski ticami lielāks nekā kontroles grupas pacientiem ($p < 0,05$) (3.2. attēls).

3.1. attēls. Matrices metaloproteināzi-2 (MMP-2) saturošo imūnhistoķīmiski noteikto epitēlijšūnu relatīvā daudzuma vidējo rangu atšķirības starp dažādām izmeklējamā materiāla grupām

Saīsinājumi attēlā: MMP-2 – matricas metaloproteināze-2; P1 – vienpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc lūpas plastikas; P2 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc lūpas plastikas; P3 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc mīksto aukslēju plastikas; P4 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc cieto aukslēju plastikas; P5 – kontroles grupa.

3.2. attēls. Matrices metaloproteināzi-2 (MMP-2) saturošo imūnhistoķīmiski noteikto saistaudu šūnu relatīvā daudzuma vidējo rangu atšķirības starp dažādām izmeklējamā materiāla grupām

Saīsinājumi attēlā: MMP-2 – matricas metaloproteināze-2; P1 – vienpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc lūpas plastikas; P2 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc lūpas plastikas; P3 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc mīksto aukslēju plastikas; P4 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc cieto aukslēju plastikas; P5 – kontroles grupa

Matrices metaloproteināzes-2 (*MMP-2*) atrade mīksto un cieto aukslēju plastikas laikā iegūtajā materiālā bērniem ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņi

Visiem audu paraugiem mīksto aukslēju plastikas laikā iegūtajā materiālā tika novērotas *MMP-2* pozitīvas epitēlijšūnas un saistaudu šūnas. Mīksto aukslēju epitēlijā bija reti (0/+) līdz vidēji daudz (++) *MMP-2* saturošu šūnu redzes laukā (3.9. tabula). Saistaudu *MMP-2* pozitīvās šūnas variēja no retām (0/+) līdz daudz (+++) redzes laukā (3.9. tabula; 3.34. mikrofotogrāfija pielikumā).

3.9. tabula

***MMP* un *TIMP* pozitīvu struktūru relatīvais daudzums abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņņu skartajos audos, kas iegūti mīksto aukslēju plastikas laikā**

Nr.	Šifrs	<i>MMP-2</i>		<i>MMP-8</i>		<i>MMP-9</i>		<i>TIMP-2</i>		<i>TIMP-4</i>	
		E	S	E	S	E	S	E	S	E	S
1.	79	+/++	++/+++	0/+	0/+	++	+++	0/+	++	+++	++
2.	187	++	++	0	0	0	0	0	0	0	0
3.	196	+/++	0/+	0/+	0	+/++	+/++	0/+	0/+	+/++	+++
4.	207	0/+	+/++	0	0	+	+	0/+	0/+	++	++
5.	245	0/+	+	0	0	+/++	+++	0	0	+/++	+++
6.	249	+	+	0/+	+	+	+	0/+	0	+	++
7.	254	+/++	0/+	0/+	0/+	++	++	0/+	0/+	+/++	+/++
8.	261	++/+++	++/+++	+	0/+	++	+++	+/++	0/+	++/+++	++
9.	273	++	++/+++	+/+	0/+	++/++	+++	+/++	+	++/+++	+++/ ++++
10.	276	+/++	++	++	+++	+++	+++	+/++	++	+++	+++

Apzīmējumi tabulā: 0 – redzes laukā nav konstatēta neviena pozitīva struktūra; 0/+ - redzes laukā ir retas pozitīvas struktūras; + – redzes laukā ir maz pozitīvu struktūru; +/+ – redzes laukā ir maz līdz vidēji daudz pozitīvu struktūru; ++ – redzes laukā ir vidēji daudz pozitīvu struktūru; ++/+++ – redzes laukā ir vidēji daudz līdz daudz pozitīvu struktūru; +++ – redzes laukā ir daudz pozitīvu struktūru; +++/++++ – redzes laukā ir daudz līdz ļoti daudz pozitīvu struktūru; ++++ – redzes laukā ir ļoti daudz pozitīvu struktūru.

Saīsinājumi tabulā: E – epitēlijšūnas; S – saistaudu šūnas; *MMP-2* – matrices metaloproteināze-2; *MMP-8* – matrices metaloproteināze-8; *MMP-9* – matrices metaloproteināze-9; *TIMP-2* – matrices metaloproteināzes-2 audu inhibitors; *TIMP-4* – matrices metaloproteināzes-4 audu inhibitors.

Cieto aukslēju audos *MMP-2* saturošas morfoloģiskās struktūras variēja no retām (0/+) līdz daudz (+++) redzes laukā (3.10. tabula; 3.35. mikrofotogrāfija pielikumā). Diviem pacientiem netika novērota šī enzīma ekspresija.

3.10. tabula

***MMP* un *TIMP* pozitīvu struktūru relatīvais daudzums abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņņu skartajos audos, kas iegūti cieto aukslēju plastikas laikā**

Nr.	Šifrs	<i>MMP-2</i>		<i>MMP-8</i>		<i>MMP-9</i>		<i>TIMP-2</i>		<i>TIMP-4</i>	
		E	S	E	S	E	S	E	S	E	S
1.	79/1	+/++	++/+++	0/+	0/+	++	+++	+/++	++	+++	++
2.	81	0	0	0	0	0	0	0	0	++	+++
3.	134/1	0/+	0	0	0/+	0	+	0	0	++	++
4.	134/2	+	0/+	0/+	0/+	+	+++	0	0	++	++

Nr.	Šifrs	tabulas nobeigums									
		<i>MMP-2</i>		<i>MMP-8</i>		<i>MMP-9</i>		<i>TIMP-2</i>		<i>TIMP-4</i>	
		E	S	E	S	E	S	E	S	E	S
5.	150	++	+	0	0	0	0	++	++	++	++
6.	180	+	++	0/+	+	+/++	+++	0/+	+	++	+++
7.	232	++	++	+/++	0/+	+++	+++	+	+	++/+++	++/+++
8.	253	+	+/++	0/+	0/+	+/++	++	+	0/+	++	+++
9.	265	++/++ +	+++	+	0/+	+++	+++	+	0/+	+++	+++

Apzīmējumi tabulā: 0 – redzes laukā nav konstatēta neviena pozitīva struktūra; 0/+ - redzes laukā ir retas pozitīvas struktūras; + – redzes laukā ir maz pozitīvu struktūru; +/+ – redzes laukā ir maz līdz vidēji daudz pozitīvu struktūru; ++ – redzes laukā ir vidēji daudz pozitīvu struktūru; ++/+++ – redzes laukā ir vidēji daudz līdz daudz pozitīvu struktūru; +++ – redzes laukā ir daudz pozitīvu struktūru; +++/++++ – redzes laukā ir daudz līdz ļoti daudz pozitīvu struktūru; ++++ – redzes laukā ir ļoti daudz pozitīvu struktūru.

Saīsinājumi tabulā: E – epitēlijšūnas; S – saistaudu šūnas; *MMP-2* – matricē metaloproteināze-2; *MMP-8* – matricē metaloproteināze-8; *MMP-9* – matricē metaloproteināze-9; *TIMP-2* – matricē metaloproteināzes-2 audu inhibitors; *TIMP-4* – matricē metaloproteināzes-4 audu inhibitors.

Statistiskie dati. Vidējais *MMP-2* pozitīvo epitēlijšūnu relatīvais daudzums mīksto un cieto aukslēju plastikas laikā iegūtajos audos bija statistiski ticami mazāks nekā lūpas plastikas laikā iegūtos audos no bērniem ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni ($p < 0,05$) (3.2. attēls). Statistiski ticamas atšķirības ar kontroles grupas pacientiem netika konstatētas.

Matrices metaloproteināzes-8 (MMP-8) atrade lūpas primārās plastikas laikā iegūtajā materiālā zīdaiņiem un bērniem ar caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni

MMP-8 klātbūtne tika konstatēta pacientiem ar abpusēju šķeltni – 13 pacientu epitēlijā un visu 15 pacientu saistaudos – fibroblastos un makrofāgos. Epitēlijā bija retas (0/+) *MMP-8* pozitīvas šūnas diviem pacientiem, maz (+) – pieciem pacientiem, vidēji daudz (++) – pieciem pacientiem, bet vienam pacientam – daudz (+++) pozitīvu struktūru redzes laukā. Divpadsmit pacientiem *lamina propria* bija atsevišķas (0/+) *MMP-8* pozitīvas un trīs pacientiem – maz (+) pozitīvas šūnas (3.7. tabula; 3.36. mikrofotogrāfija pielikumā).

MMP-8 saturēja arī 21 pacienta ar vienpusēju šķeltni šūnas epitēlijā. Trīs pacientu paraugos netika fiksētas *MMP-8* saturošas šūnas. Pētījumā novērots no retām (0/+) līdz daudz (+++) *MMP-8* pozitīvām šūnām epitēlijā (3.8. tabula). *Lamina propria* saturēja retas (0/+) līdz maz (+) *MMP-8* pozitīvas saistaudu šūnas (3.8. tabula; 3.37. mikrofotogrāfija pielikumā). Kopumā tika konstatēts maz līdz vidēji daudz (+/++) *MMP-8* pozitīvu šūnu epitēlijā, kamēr saistaudos tikai atsevišķas (0/+) pozitīvas šūnas.

Statistiskie dati. Salīdzinot imūnhistoķīmiski noteikto epitēlijšūnu un saistaudu šūnu vidējos rangus, netika novērota statistiski ticama atšķirība starp vienpusēju un abpusēju caurejošu šķeltni, kā arī kontroles grupas pacientiem ($p > 0,05$) (3.3. attēls).

Matrices metaloproteināzes-8 (MMP-8) atrade mīksto un cieto aukslēju plastikas laikā iegūtajā materiālā bērniem ar abpusējām caurejošām lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltnēm

Trim pacientiem ar abpusēju šķeltni netika fiksētas *MMP-8* pozitīvas šūnas mīkstajās aukslējās. Vienam pacientam bija vidēji daudz (++) *MMP-8* saturošas šūnas epitēlijā un daudz (+++) pozitīvas šūnas saistaudos (3.9. tabula; 3.38. mikrofotogrāfija pielikumā). Citos audu paraugos *MMP-8* pozitīvo šūnu relatīvais daudzums bija no retām (0/+) līdz maz (+) šūnām gan mutes dobuma gļotādas epitēlijā, gan saistaudos (3.9. tabula).

Kopumā cieto aukslēju gļotādā *MMP-8* pozitīvo epitēlijšūnu un saistaudu šūnu relatīvais daudzums variēja no retām (0/+) līdz vidēji daudz (++) redzes laukā (3.10. tabula; 3.39. mikrofotogrāfija pielikumā).

Statistiskie dati. Imūnhistoķīmiski noteikto *MMP-8* pozitīvo epitēlijšūnu vidējais relatīvais daudzums cieto aukslēju plastikas laikā paņemtajos audos bija statistiski ticami mazāks nekā lūpas plastikas laikā paņemtajā materiālā ($p < 0,05$) (3.3. attēls). Salīdzinot imūnhistoķīmiski noteiktas saistaudu šūnu vidējos rangus, netika novērota statistiski ticama atšķirība starp izmeklējamā materiāla grupām ($p > 0,05$). Statistiski ticamas atšķirības starp

pacienti ar abpusēju caurejošu šķeltni pēc mīksto un cieto aukslēju plastikas un kontroles grupas pacientiem netika konstatētas.

3.3. attēls. Matrices metaloproteināzi-8 (*MMP-8*) saturošo imūnhistoķīmiski noteikto epitēlijšūnu relatīvā daudzuma vidējo rangu atšķirības starp dažādām izmeklējamā materiāla grupām

Saīsinājumi attēlā: *MMP-8* – matrices metaloproteināze-8; P1 – vienpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc lūpas plastikas; P2 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc lūpas plastikas; P3 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc mīksto aukslēju plastikas; P4 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc cieto aukslēju plastikas; P5 – kontroles grupa.

Matrices metaloproteināzes-9 (*MMP-9*) atrade lūpas primārās plastikas laikā iegūtajā materiālā no zīdaiņiem un bērniem ar caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni

Lūpas plastikas laikā iegūtajā materiālā no pacientiem ar abpusēju šķeltni tika konstatēta *MMP-9* ekspresija epitēlijā, saistaudos, matu folikulos un tauku dziedzeros. Augšlūpas gļotādā *MMP-9* pozitīvas šūnas netika saskatītas divu pacientu audu paraugos. Pacienti ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni tika fiksētas tikai retas (0/+) *MMP-9* pozitīvas epitēlijšūnas un saistaudu šūnas (3.7. tabula; 3.40. mikrofotogrāfija pielikumā).

Interesanti, ka visiem pacientiem ar vienpusēju šķeltni *MMP-9* pozitīvu epitēlijšūnu bija robežās no maz (+) līdz daudz (+++) redzes laukā (3.8. tabula). Turklāt šo enzīmu ekspresēja bazālā slāņa šūnas un arī saistaudu šūnas (3.41. mikrofotogrāfija pielikumā). Šāda atrade netika manīta pacientiem abpusēju šķeltnu materiālā. Kopumā konstatējām vidēji daudz (++) *MMP-9* pozitīvas epitēlijšūnas. Mutes dobuma gļotādas *lamina propria* šūnas arī saturēja *MMP-9*. Saistaudos *MMP-9* klātbūtne variēja no atsevišķām (0/+) līdz daudz (+++) pozitīvām šūnām redzes laukā (3.8. tabula).

Statistiskie dati. Imūnhistoķīmiski noteikto MMP-9 pozitīvo epitēlijšūnu vidējais relatīvais daudzums vienpusēju šķeltnu skartajos audos bija statistiski ticami lielāks nekā kontroles grupas pacientiem ($p < 0,001$) (3.4. attēls). Vidējais imūnhistoķīmiski noteiktais MMP-9 pozitīvo šūnu relatīvais daudzums saistaudos abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes pacientu audos bija statistiski ticami mazāks nekā vienpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes pacientu audos ($p < 0,001$) (3.5. attēls).

3.4. attēls. **Matrices metaloproteināzi-9 (MMP-9) saturošo imūnhistoķīmiski noteikto epitēlijšūnu relatīvā daudzuma vidējo rangu atšķirības starp dažādām izmeklējamā materiāla grupām**

Saīsinājumi attēlā: MMP-9 – matrices metaloproteināze-9; P1 – vienpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc lūpas plastikas; P2 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc lūpas plastikas; P3 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc mīksto aukslēju plastikas; P4 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc cieto aukslēju plastikas; P5 – kontroles grupa.

3.5. attēls. **Matrices metaloproteināzi-9 (MMP-9) saturošo imūnhistoķīmiski noteikto saistaudu šūnu relatīvā daudzuma vidējo rangu atšķirības starp dažādām izmeklējamā materiāla grupām**

Saīsinājumi attēlā: *MMP-9* – matrices metaloproteināze-9; P1 – vienpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc lūpas plastikas; P2 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc lūpas plastikas; P3 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc mīksto aukslēju plastikas; P4 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc cieto aukslēju plastikas; P5 – kontroles grupa.

Matrices metaloproteināzes-9 (MMP-9) atrade mīksto un cieto aukslēju plastikas laikā iegūtajā materiālā bērniem ar abpusējām caurejošām lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltnēm

Mīksto aukslēju plastikas laikā iegūtajā materiālā *MMP-9* pozitīvie epiteliocīti variēja no maz (+) līdz daudz (+++) redzes laukā (3.9. tabula). *MMP-9* pozitīvo saistaudu šūnu atrade bija līdzīga, kaut gan vidējais imūnreaktīvo struktūru daudzums saistaudos bija lielāks (3.9. tabula; 3.42. mikrofotogrāfija pielikumā). Pieciem pacientiem konstatējām daudz (+++) *MMP-9* pozitīvas saistaudu šūnas (3.9. tabula).

Cieto aukslēju plastikas laikā iegūtajā materiālā *MMP-9* pozitīvas epitelijsūnas sešiem pacientiem variēja no maz (+) līdz daudz (+++), trīs pacietiem *MMP-9* ekspresija netika konstatēta (3.10. tabula). *MMP-9* pozitīvas saistaudu šūnas septiņiem pacientiem tika konstatētas robežās no maz (+) līdz daudz (+++), diviem pacientiem *MMP-9* saistaudu šūnās netika vizualizētas.

Statistiskie dati. Mīksto aukslēju plastikas laikā iegūtajā materiālā vidējais *MMP-9* pozitīvo struktūru relatīvais daudzums epitelijā bija statistiski ticami lielāks nekā lūpas plastikas laikā iegūtajā materiālā ($p < 0,002$) (3.4. attēls). Saistaudos tika novērots statistiski ticami lielāks *MMP-9* saturošo šūnu relatīvais daudzums mīksto un cieto aukslēju plastikas laikā iegūtajā materiālā nekā lūpas plastikas laikā iegūtajos audos ($p < 0,001$) (3.5. attēls).

Matrices metaloproteināzes-2 audu inhibitora (*TIMP-2*) atrade lūpas primārās plastikas laikā iegūtajā materiālā zīdaiņiem un bērniem ar caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņi

Epitēlijā visos audu paraugos, kas tika iegūti no pacientiem ar abpusēju šķeltņi, *TIMP-2* klātbūtne variēja no maz (+) līdz daudz (+++) pozitīvām šūnām redzes laukā (3.7. tabula; 3.43. mikrofotogrāfija pielikumā). *Lamina propria* *TIMP-2* klātbūtne tika novērota vienlaikus fibroblastos un iekaisuma šūnās, galvenokārt makrofāgos un atsevišķos limfocītos. *TIMP-2* saturošas saistaudu šūnas variēja robežās no atsevišķām (0/+) līdz vidēji daudz (++) redzes laukā.

Izvērtējot vienpusēju šķeltņu lūpas audus, tika novērota *TIMP-2* ekspresija epitēlijā, saistaudos un matu folikulos. Interesanti, ka tika vizualizētas *TIMP-2* saturošas bazālā slāņa šūnas, lai gan pacientiem abpusēju šķeltņu audu paraugos bazālās šūnas nesaturēja *TIMP-2* (3.44. mikrofotogrāfija pielikumā). *TIMP-2* saturošas šūnas tika konstatētas 23 no 24 pacientiem ar vienpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņi. *TIMP-2* pozitīvas šūnas epitēlijā variēja robežās no retām (0/+) līdz daudz (+++) redzes laukā. Tieši tāda pati atrade tika konstatēta *lamina propria* audos (3.8. tabula).

Statistiskie dati. Izvērtējot imūnhistoķīmiski noteikto struktūru relatīvā daudzuma vidējos rangus, statistiska ticamība starp grupām pētījumā netika novērota.

Matrices metaloproteināzes-2 audu inhibitora (*TIMP-2*) atrade mīksto un cieto aukslēju plastikas laikā iegūtajā materiālā bērniem ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņi

Mīksto aukslēju plastikas laikā iegūtos audos, respektīvi, epitēlijā un saistaudos, arī tika konstatēta *TIMP-2* ekspresija. Trīs pacientu audu paraugos *TIMP-2* saturošas šūnas netika vizualizētas. Citu pacientu audu paraugos tika konstatētas atsevišķas (0/+) līdz vidēji daudz (++) pozitīvas epitēlijšūnas un saistaudu šūnas redzes laukā (3.9. tabula; 3.45. mikrofotogrāfija pielikumā).

Cieto aukslēju plastikas laikā iegūtajos audos tika iegūti tādi paši rezultāti kā mīksto aukslēju materiālā (3.10. tabula).

Statistiskie dati. Vidējais *TIMP-2* pozitīvo šūnu relatīvais daudzums epitēlijā statistiski ticami mazāks bija mīksto aukslēju plastikas laikā iegūtajā materiālā nekā abpusēju šķeltņu pacientu lūpas plastikas laikā iegūtajos audos ($p < 0,05$) (3.6. attēls). Imūnhistoķīmiski izvērtējot noteikto saistaudu šūnu relatīvo daudzumu, atšķirības netika konstatētas.

3.6. attēls. Matrices metaloproteināzes-2 audu inhibitora (*TIMP-2*) saturošo imūnhistoķīmiski noteikto epitēlijšūnu relatīvā daudzuma vidējo rangu atšķirības starp dažādām izmeklējamā materiāla grupām. Saīsinājumi attēlā: *TIMP-2* – matrices metaloproteināzes-2 audu inhibitors; P1 – vienpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc lūpas plastikas; P2 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc lūpas plastikas; P3 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc mīksto aukslēju plastikas; P4 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc cieto aukslēju plastikas; P5 – kontroles grupa.

Matrices metaloproteināzes-4 audu inhibitora (*TIMP-4*) atrade lūpas primārās plastikas laikā iegūtajā materiālā zīdaiņiem un bērniem ar caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni

Sešiem pacientiem ar abpusēju šķeltni netika novērota *TIMP-4* klātbūtne ne epitēlijā, ne saistaudos. Kopumā mutes dobuma gļotādā maz (+) epiteliocītu saturēja *TIMP-4*. Četriem pacientiem tika fiksēti reti (0/+) *TIMP-4* saturoši epiteliocīti, kamēr pārējiem četriem tika atrasts maz (+) līdz vidēji daudz (++) *TIMP-4* saturošu epiteliocītu (3.7. tabula). Septiņos audu paraugos *lamina propria* netika konstatēta neviena *TIMP-4* saturoša šūna. Astoņiem šķeltnu pacientiem *TIMP-4* pozitīvas saistaudu šūnas tika konstatētas robežās no retām (0/+) līdz maz (+) redzes laukā (3.7. tabula; 3.46. mikrofotogrāfija pielikumā).

TIMP-4 ekspresija vienpusējas šķeltnes lūpu plastikas laikā iegūtajā materiālā bija gan epitēlijā, gan saistaudos. Matu folikulu un tauku dziedzeru šūnas arī saturēja *TIMP-4*. Epitēlijā kopumā *TIMP-4* saturēja vidēji daudz līdz daudz (++) šūnu. Visvairāk bija pacientu (16) ar vidēji līdz vidēji daudz (++) un daudz (+++) *TIMP-4* saturošu epiteliocītu, kamēr astoņiem pacientiem tika redzētas vidēji daudz (++) *TIMP-4* saturošas epitēlijšūnas (3.8. tabula). Pētījumā konstatējām interesantu faktu, ka *TIMP-4* pozitīvas šūnas tika novērotas bazālajā slānī, kaut gan pacientu abpusēju šķeltnu audu paraugos *TIMP-4*

saturošas šūnas šajā slānī netika fiksētas, savukārt saistaudos *TIMP-4* klātbūtne variēja no maz (+) līdz ļoti daudz (+++++) pozitīvām šūnām redzes laukā (3.8. tabula; 3.47. mikrofotogrāfija pielikumā).

Statistiskie dati. Izvērtējot imūnreaktīvo epiteliocītu un saistaudu šūnu vidējo relatīvo daudzumu, tika novērotas statistiski ticamas atšķirības starp pētījuma grupām. *TIMP-4* saturošo šūnu vidējais relatīvais daudzums bija statistiski ticami lielāks pacientiem ar vienpusēju caurejošas lūpas un aukslēju šķeltni, nekā pacientiem ar abpusēju caurejošu lūpas un aukslēju šķeltni un kontroles grupas pacientiem ($p < 0,05$) (3.7. un 3.8. attēls).

3.7. attēls. Matrices metaloproteināzes-4 audu inhibitora (*TIMP-4*) saturošo imūnhistoķīmiski noteikto epitēlijšūnu relatīvā daudzuma vidējo rangu atšķirības starp dažādām izmeklējamā materiāla grupām. Saīsinājumi attēlā: *TIMP-4* – matrices metaloproteināzes-4 audu inhibitors; P1 – vienpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc lūpas plastikas; P2 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc lūpas plastikas; P3 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc mīksto aukslēju plastikas; P4 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc cieto aukslēju plastikas; P5 – kontroles grupa.

3.8. attēls. Matrices metaloproteināzes-4 audu inhibitora (*TIMP-4*) saturošo imūnhistoķīmiski noteikto saistaudu šūnu relatīvā daudzuma vidējo rangu atšķirības starp dažādām izmeklējamā materiāla grupām. Saīsinājumi attēlā: *TIMP-4* – matrices metaloproteināzes-4 audu inhibitors; P1 – vienpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc lūpas plastikas; P2 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc lūpas plastikas; P3 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc mīksto aukslēju plastikas; P4 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc cieto aukslēju plastikas; P5 – kontroles grupa.

Matrices metaloproteināzes-4 audu inhibitora (*TIMP-4*) atrade mīksto un cieto aukslēju plastikas laikā iegūtajā materiālā bērniem ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni

Vienā mīksto aukslēju plastikas laikā iegūtajā audu paraugā netika vizualizēta neviena *TIMP-4* saturoša šūna. Pārējos audu paraugos *TIMP-4* pozitīvas epitēlijšūnas redzes laukā variēja no maz (+) līdz daudz (+++). Vienlaikus zemāk esošos saistaudos kopumā vidēji daudz (++) fibroblasti, makrofāgi un atsevišķi polimorfonukleārie leukocīti saturēja *TIMP-4* (3.9. tabula; 3.48. mikrofotogrāfija pielikumā).

Visos cieto aukslēju plastikas laikā iegūtajos audu paraugos tika konstatētas *TIMP-4* pozitīvas šūnas gan epitēlijā, gan saistaudos, kas redzes laukā variēja no vidēji daudz (++) līdz daudz (+++) (3.10. tabula; 3.49. mikrofotogrāfija pielikumā).

Statistiskie dati. Vidējais imūnhistoķīmiski noteikto struktūru relatīvais daudzums gan epitēlijā, gan saistaudos bija statistiski ticami lielāks mīksto un cieto aukslēju plastikas laikā iegūtajā materiālā, nekā lūpas plastikas laikā iegūtajos audos ($p < 0,001$) (3.7. un 3.8. attēls). Kontroles grupas pacientu audos *TIMP-4* pozitīvas saistaudu šūnas bija statistiski ticami mazāk, salīdzinot ar abpusēju caurejošu šķeltni mīksto un cieto aukslēju plastikas laikā iegūtajiem audu paraugiem ($p < 0,05$) (3.8. attēls).

3.3.2. Gēnu proteīnu imūnhistokīmiskie un statistiskie dati

Transkripcijas faktora MSX1 atrade lūpas primārās plastikas laikā iegūtajā materiālā zīdaiņiem un bērniem ar lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni

MSX1 gēna proteīna klātbūtne pacientiem ar abpusēju caurejošu šķeltni tika novērota gandrīz visos lūpas primārās plastikas laikā paņemtajos audu paraugos, izņemot divus pacientus. Minēto transkripcijas faktoru saturēja mutes dobuma gļotādas epiteliocīti, un vienam pacientam tika fiksētas atsevišķas pozitīvas saistaudu šūnas. MSX1 saturēja retas (0/+) līdz vidēji daudz (++) šūnas seggļotādas epitēlijā (3.11. tabula; 3.50. mikrofotogrāfija pielikumā). Imūnreaktīvas struktūras tika konstatētas arī matu folikulu ārējā epiteliālajā makstī un tauku dziedzeros.

3.11. tabula

Gēnu proteīnu pozitīvu struktūru relatīvais daudzums abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltnu skartajos audos, kas iegūti lūpas plastikas laikā

Nr.	Šifrs	MSX1		IRF6		PAX9		RYK	
		E	S	E	S	E	S	E	S
1.	55L	0/+	0	+	++	+ / ++	0	0	0
2.	55R	0/+	0	0/+	+ / ++	0/+	0	0	0
3.	168	0/+	0	0/+	++	0/+	0	0/+	0
4.	177	+	0	0/+	+	0/+	0	0	0
5.	194	+ / ++	0/+	+	+ / ++	+	0	0	0
6.	204	0/+	0	0	0/+	0	0	0	0
8.	206	0/+	0	0	0/+	0/+	0	0	0
9.	212	0	0	0	0	0	0	0	0
10.	213	+	0	0/+	+	+	0	0/+	0
11.	221	0/+	0	0/+	++	+	0	0/+	0
12.	238	0/+	0	0	++	+	0	0/+	0
13.	244	+ / ++	0	+	0/+	+ / ++	0	0/+	0
14.	264	+	0	0	++	+	0	0/+	0
15.	267	0	0	+	+	+	0	0	0
16.	197	+	0	0/+	0/+	+	0	0/+	0

Apzīmējumi tabulā: 0 – redzes laukā nav konstatēta neviena pozitīva struktūra; 0/+ - redzes laukā ir retas pozitīvas struktūras; + – redzes laukā ir maz pozitīvu struktūru; + / ++ – redzes laukā ir maz līdz vidēji daudz pozitīvu struktūru; ++ – redzes laukā ir vidēji daudz pozitīvu struktūru; ++ / ++ – redzes laukā ir vidēji daudz līdz daudz pozitīvu struktūru; +++ – redzes laukā ir daudz pozitīvu struktūru; +++ / +++ – redzes laukā ir daudz līdz ļoti daudz pozitīvu struktūru; ++++ – redzes laukā ir ļoti daudz pozitīvu struktūru.

Saīsinājumi tabulā: E – epitēlijšūnas; S – saistaudu šūnas; MSX1 – transkripcijas faktors MSX1; IRF6 – transkripcijas faktors IRF6; PAX9 – transkripcijas faktors PAX9; RYK – RYK gēna proteīns.

Pacientiem ar vienpusēju caurejošu lūpas un aukslēju šķeltni šķeltnes epitēlijā tika atrastas maz (+) līdz ļoti daudz (++++) MSX1 pozitīvas šūnas redzes laukā, saistaudos – no retām (0/+) līdz daudz (+++) pozitīvām šūnām redzes laukā (3.12. tabula; 3.51. mikrofotogrāfija pielikumā).

Gēnu proteīnu pozitīvu struktūru relatīvais daudzums vienaspusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltnu skartajos audos, kas iegūti lūpas plastikas laikā

Nr.	Šifrs	MSX1		IRF6		PAX9		RYK	
		E	S	E	S	E	S	E	S
1.	195.	+/++	0	++	0/+	+	0	0/+	0
2.	205.	++	+	0/+	++	++	0/+	0/+	0
3.	217.	++	0/+	++	++	+++	+	+	0
4.	220.	+/++	0/+	++	++	+++ /++++	++	0	0
5.	223.	+/++	+/++	+	+++	++ /+++	0/+	+	0
6.	224.	+	+	++	++ /+++	++	+	0/+	0
7.	227.	++++	+/++	++++	++	++++	+	++	0
8.	247.	+	0/+	0/+	0/+	++	0/+	0	0
9.	258.	+	+/++	++	++	++	++	0/+	0
10.	259.	+++	++	+++	++ /+++	++ /+++	+	0/+	0
11.	262.	+++	+++	+++	++ /+++	++++	++	0/+	0
12.	277.	++	++	++	+++	+++	++ /+++	0/+	0
13.	279.	+	++	++	++	+++	++ /+++	0/+	0
14.	282.	++	+	++	+++	+++ /++++	+++	0/+	0
15.	283.	++	++	++	++	++ /+++	++	+	0
16.	284.	++	++	++ /+++	++	++ /+++	+	++	0
17.	288.	+	0/+	++ /+++	+/++	+/++	0/+	0	0
18.	289.	+	0/+	++	+++	+++	0/+	0	0
19.	299.	+++	+	+/++	++	+++	0/+	0/+	0
20.	300.	++	++	+++	+++	++ /+++	+/++	0/+	0
21.	302.	++	+/++	++ /+++	+++	++	0/+	0/+	0
22.	303.	++ /+++	+	++	++	+++	0/+	0/+	0
23.	306.	++	0/+	+/++	++	+++	0/+	0/+	0
24.	307.	++	++	+/++	+++	+++	++	0/+	0

Apzīmējumi tabulā: 0 – redzes laukā nav konstatēta neviena pozitīva struktūra; 0/+ - redzes laukā ir retas pozitīvas struktūras; + – redzes laukā ir maz pozitīvu struktūru; +/+ – redzes laukā ir maz līdz vidēji daudz pozitīvu struktūru; ++ – redzes laukā ir vidēji daudz pozitīvu struktūru; ++/+++ – redzes laukā ir vidēji daudz līdz daudz pozitīvu struktūru; +++ – redzes laukā ir daudz pozitīvu struktūru; +++/++++ – redzes laukā ir daudz līdz ļoti daudz pozitīvu struktūru; ++++ – redzes laukā ir ļoti daudz pozitīvu struktūru.

Saīsinājumi tabulā: E – epitēlijšūnas; S – saistaudu šūnas; MSX1 – transkripcijas faktors MSX1; IRF6 – transkripcijas faktors IRF6; PAX9 – transkripcijas faktors PAX9; RYK – RYK gēna proteīns.

Statistiskie dati. Tika secināts, ka vidējais imūnhistoķīmiski noteikto struktūru relatīvais daudzums gan epitēlijā, gan saistaudos bija statistiski ticami mazāks pacientiem ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni nekā pacientiem ar vienaspusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni, kā arī kontroles grupas pacientiem ($p < 0,001$; $p < 0,001$) (3.9. un 3.10. attēls).

3.9. attēls. **MSX1 saturošo imūnhistoķīmiski noteikto epitēlijšūnu relatīvā daudzuma vidējo rangū atšķirības starp dažādām izmeklējamā materiāla grupām**
 Saīsinājumi attēlā: MSX1 – transkripcijas faktors MSX1; P1 – vienpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc lūpas plastikas; P2 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc lūpas plastikas; P3 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc mīksto aukslēju plastikas; P4 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc cieto aukslēju plastikas; P5 – kontroles grupa.

3.10. attēls. **MSX1 saturošo imūnhistoķīmiski noteikto saistaudu šūnu relatīvā daudzuma vidējo rangū atšķirības starp dažādām izmeklējamā materiāla grupām**
 Saīsinājumi attēlā: MSX1 – transkripcijas faktors MSX1; P1 – vienpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc lūpas plastikas; P2 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc lūpas plastikas; P3 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc mīksto aukslēju plastikas; P4 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc cieto aukslēju plastikas; P5 – kontroles grupa.

Transkripcijas faktora MSX1 atrade mīksto un cieto aukslēju plastikas laikā iegūtajā materiālā bērniem ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņi

Visos mīksto aukslēju plastikas laikā iegūtajos audu paraugos tika redzētas MSX1 saturošas šūnas. Mīksto aukslēju plastikas laikā iegūtajos paraugos tika konstatētas retas (0/+) līdz vidēji daudz (++) MSX1 pozitīvas epitēlijšūnas, savukārt MSX1 saistaudos variēja no retām (0/+) MSX1 līdz daudz (+++) pozitīvām šūnām redzes laukā (3.13. tabula).

3. 13. tabula

Gēnu proteīnu pozitīvu struktūru relatīvais daudzums abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņu skartajos audos, kas iegūti mīksto aukslēju plastikas laikā

Nr.	Šifrs	MSX1		IRF6		PAX9		RYK	
		E	S	E	S	E	S	E	S
1.	79	0/+	++	+++	+++	+++	0	0	0/+
2.	187	0	0	0	0	+++	0	0	+
3.	196	+	0	++	++	+++	0	0	0
4.	207	+	0	+	+	0/+	0	0	0
5.	245	0/+	0	++	+++	+++	0	0/+	+
6.	249	+	+	0/+	++	+	0	0	0/+
7.	254	+/++	0	0/+	++	+/++	0	0/+	+
8.	261	+	0/+	++/+++	+++	+++	0	0	0/+
9.	273	++	+++	++/+++	++	++	0	0/+	0
10.	276	+/++	+	+++	++++	+++	0	0/+	+

Apzīmējumi tabulā: 0 – redzes laukā nav konstatēta neviena pozitīva struktūra; 0/+ - redzes laukā ir retas pozitīvas struktūras; + – redzes laukā ir maz pozitīvu struktūru; +/+ – redzes laukā ir maz līdz vidēji daudz pozitīvu struktūru; ++ – redzes laukā ir vidēji daudz pozitīvu struktūru; ++/+++ – redzes laukā ir vidēji daudz līdz daudz pozitīvu struktūru; +++ – redzes laukā ir daudz pozitīvu struktūru; +++/++++ – redzes laukā ir daudz līdz ļoti daudz pozitīvu struktūru; ++++ – redzes laukā ir ļoti daudz pozitīvu struktūru.

Saīsinājumi tabulā: E – epitēlijšūnas; S – saistaudu šūnas; MSX1 – transkripcijas faktors MSX1; IRF6 – transkripcijas faktors IRF6; PAX9 – transkripcijas faktors PAX9; RYK – RYK gēna proteīns.

Cieto aukslēju materiālā MSX1 saturoši epiteliocīti variēja no retām (0/+) līdz daudz (+++) pozitīvām šūnām redzes laukā (3.52. mikrofotogrāfija pielikumā), bet MSX1 pozitīvas saistaudu šūnas – no retām (0/+) līdz vidēji daudz (++) redzes laukā (3.14. tabula).

Gēnu proteīnu pozitīvu struktūru relatīvais daudzums abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņu skartajos audos, kas iegūti cieto aukslēju plastikas laikā

Nr.	Šifrs	MSX1		IRF6		PAX9		RYK	
		E	S	E	S	E	S	E	S
1.	79(1)	0/+	++	+++	+++	+++	0	0	0
2.	81	0	++	+++	+++	+++	0	0/+	0
3.	134(1)	+	0/+	++/+++	++/+++	+++	0	+++	+
4.	134(2)	+	0/+	+++	++/+++	+++	0	++	+
5.	150	++	++	++	+/+++	++++	++	++++	++
6.	180	0/+	++	+++	+++	+++	0	0/+	0
7.	232	+	++	+++	+++	++	0	0/+	0
8.	253	+/++	0/+	+++	+++	+++	0	0/+	0
9.	265	+++//++ ++	++	+++	+++	+++	0	0/+	0

Apzīmējumi tabulā: 0 – redzes laukā nav konstatēta neviena pozitīva struktūra; 0/+ - redzes laukā ir retas pozitīvas struktūras; + – redzes laukā ir maz pozitīvu struktūru; +/+ – redzes laukā ir maz līdz vidēji daudz pozitīvu struktūru; ++ – redzes laukā ir vidēji daudz pozitīvu struktūru; ++/+ – redzes laukā ir vidēji daudz līdz daudz pozitīvu struktūru; +++ – redzes laukā ir daudz pozitīvu struktūru; +++/+ – redzes laukā ir daudz līdz ļoti daudz pozitīvu struktūru; ++++ – redzes laukā ir ļoti daudz pozitīvu struktūru.

Saīsinājumi tabulā: E – epitēlijšūnas; S – saistaudu šūnas; MSX1 – transkripcijas faktors MSX1; IRF6 – transkripcijas faktors IRF6; PAX9 – transkripcijas faktors PAX9; RYK – RYK gēna proteīns.

Statistiskie dati. Netika konstatēta statistiski ticama atšķirība MSX1 saturošu epitēlijšūnu relatīvā daudzumā mīksto un cieto aukslēju plastikas laikā iegūtajos audos, tomēr vidējais relatīvais struktūru daudzums bija statistiski ticami mazāks, salīdzinot ar kontroles grupu (attieciņi $p < 0,01$ un $p < 0,03$) (3.9. attēls). Statistiski ticama atšķirība starp MSX1 saturošām saistaudu šūnām mīksto un cieto aukslēju, kā arī kontroles grupas pacientu audiem netika konstatēta. Taču MSX1 pozitīvo saistaudu šūnu vidējais relatīvais daudzums bija statistiski ticami lielāks cieto aukslēju plastikas laikā iegūtajos audu paraugos, salīdzinot ar lūpas plastikas laikā iegūtajiem audu paraugiem ($p < 0,001$) (3.10. attēls).

Transkripcijas faktora IRF6 atrade lūpas primārās plastikas laikā iegūtajā materiālā zīdaiņiem un bērniem ar lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni

IRF6 klātbūtne abpusējas caurejošas šķeltnes skartā mutes dobuma gļotādā tika konstatēta gan epitēlijā, gan saistaudos. Atsevišķu pacientu lūpu materiālā tika novērota IRF6 ekspresija mazo siekalu dziedzeru šūnās. No 16 pacientiem ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni IRF6 daudzkārtainajā plakanajā epitēlijā tika konstatēts 11 pacientiem robežās no retām (0/+) līdz maz (+) pozitīvām šūnām redzes laukā. IRF6 pozitīvas saistaudu šūnas tika konstatētas visiem pacientiem, izņemot vienu, un to daudzums bija robežās no retām (0/+) līdz vidēji daudz (++) redzes laukā (3.53. mikrofotogrāfija pielikumā) (3.11. tabula).

Visiem 24 pacientiem ar vienpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni IRF6 ekspresija tika fiksēta gan epitēlijā, gan saistaudos. Lūpas gļotādas epitēlijā IRF6 variēja no retām (0/+) līdz ļoti daudz (+++++) pozitīvām šūnām redzes laukā. Saistaudos IRF6 saturošas šūnas tika redzētas robežās no retām (0/+) līdz daudz (+++) redzes laukā (3.12. tabula; 3.54. mikrofotogrāfija pielikumā).

Statistiskie dati. Vidējais IRF6 saturošo šūnu daudzums epitēlijā un saistaudos statistiski ticami mazāks bija pacientiem ar abpusēju šķeltni, salīdzinot ar pacientiem, kuriem bija vienpusēja caurejoša šķeltne, un kontroles grupas pacientiem ($p < 0,05$) (3.11. attēls). IRF6 saturošo saistaudu šūnu relatīvais daudzums statistiski ticami mazāks bija abpusējas caurejošas šķeltnes skartajos audos, salīdzinot ar vienpusējas caurejošas šķeltnes audiem ($p < 0,001$) (3.12. attēls).

3.11. attēls. IRF6 saturošo imūnhistoķīmiski noteikto epitēlijšūnu relatīvā daudzuma vidējo rangu atšķirības starp dažādām izmeklējamā materiāla grupām

Saīsinājumi attēlā: IRF6 – transkripcijas faktors IRF6; P1 – vienpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc lūpas plastikas; P2 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc lūpas plastikas; P3 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc mīksto aukslēju plastikas; P4 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc cieto aukslēju plastikas; P5 – kontroles grupa.

3.12. attēls. **IRF6 saturošo imūnhistoķīmiski noteikto saistaudu šūnu relatīvā daudzuma vidējo rangu atšķirības starp dažādām izmeklējamā materiāla grupām**

Saīsinājumi attēlā: IRF6 – transkripcijas faktors IRF6; P1 – vienpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc lūpas plastikas; P2 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc lūpas plastikas; P3 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc mīksto aukslēju plastikas; P4 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc cieto aukslēju plastikas; P5 – kontroles grupa.

Transkripcijas faktora IRF6 atrade mīksto un cieto aukslēju plastikas laikā iegūtajā materiālā bērniem ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni

IRF6 atrade abpusēju šķeltnu pacientu mīksto aukslēju gļotādā dominēja tieši saistaudos. IRF6 saturoši epiteliocīti, fibroblasti un makrofāgi tika atrasti deviņiem no desmit šķeltnu pacientiem. Epitēlijā tika redzētas retas (0/+) līdz daudz (+++), savukārt saistaudos – maz (+) līdz ļoti daudz (+++++) pozitīvas šūnas redzes laukā (3.13. tabula; 3.55. mikrofotogrāfija pielikumā).

IRF6 gēna proteīna klātbūtne cieto aukslēju plastikas laikā iegūtajā materiālā arī tika novērota epitēlijā un saistaudos, abos audu veidos tika konstatētas IRF6 saturošas šūnas robežās no vidēji daudz (++) līdz daudz (+++) (3.14. tabula; 3.56. mikrofotogrāfija pielikumā).

Statistiskie dati. Kopumā tika fiksēta būtiska statistiski ticama pieaugoša IRF6 klātbūtne cieto aukslēju gļotādas epitēlijā, salīdzinot ar mīksto aukslēju gļotādas epitēliju ($p < 0,05$). Mīksto un cieto aukslēju gļotādā IRF6 pozitīvo epitēlijšūnu un saistaudu šūnu relatīvais daudzums bija statistiski ticami lielāks, salīdzinot ar lūpas gļotādā esošo IRF6 pozitīvo šūnu relatīvo daudzumu ($p < 0,05$). Salīdzinot ar kontroles grupas pacientiem, pētījumā tika

konstatēts, ka tikai cieto aukslēju gļotādas vidējais imūnhistoķīmiski noteikto saistaudu šūnu relatīvais daudzums bija statistiski ticami lielāks ($p < 0,05$) (3.11. un 3.12. attēls).

Transkripcijas faktora PAX9 atrade lūpas primārās plastikas laikā iegūtajā materiālā zīdaiņiem un bērniem ar lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni

PAX9 saturošas struktūras tika novērotas visu 16 abpusēju šķeltnu pacientu epitēlijā, bet saistaudos PAX9 klātbūtne netika novērota. Tika redzēti reti (0/+) PAX9 saturoši siekalu dziedzeru glandulocīti, bet daudz PAX9 pozitīvas šūnas to izvados (3.57. mikrofotogrāfija pielikumā). Kopumā epitēlijā bija maz (+) epiteliocītu, kas saturēja PAX9 (3.58. mikrofotogrāfija pielikumā), taču trīs šķeltnu pacientu epitēlijā tika fiksēti reti (0/+) PAX9 saturoši epiteliocīti. Vienam pacientam netika novērota neviena PAX9 pozitīva šūna. Interesanti, ka nevienā no lūpas primārās plastikas laikā iegūtajiem audu paraugiem netika redzētas PAX9 pozitīvas saistaudu šūnas (3.11. tabula).

PAX9 saturēja arī visu 24 vienpusējas lūpu, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltnes pacientu mutes dobuma gļotādas audu paraugi, epitēlijā tika konstatēti vidēji daudz (+++) PAX9 saturoši epiteliocīti. Turklāt 23 pacientu lūpas gļotādā tika atrastas PAX9 saturošas saistaudu šūnas. *Lamina propria* bija redzamas retas (0/+) līdz daudz (+++) PAX9 pozitīvas šūnas redzes laukā (3.12. tabula; 3.59. mikrofotogrāfija pielikumā).

Statistiskie dati. Vidējais imūnhistoķīmiski noteikto epitēlijšūnu un saistaudu šūnu relatīvais daudzums bija statistiski ticami mazāks pacientiem ar abpusēju šķeltni nekā pacientiem ar vienpusēju šķeltni ($p < 0,001$) (3.13. un 3.14. attēls). Kontroles grupas pacientiem vidējais PAX9 pozitīvo epitēlijšūnu relatīvais daudzums bija būtiski lielāks nekā pacientiem ar abpusēju šķeltni ($p < 0,001$).

3.13. attēls. **PAX9 saturošo imūnhistokīmiski noteikto epitēlijšūnu relatīvā daudzuma vidējo rangu atšķirības starp dažādām izmeklējamā materiāla grupām**

Saīsinājumi attēlā: PAX9 – transkripcijas faktors PAX9; P1 – vienpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc lūpas plastikas; P2 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc lūpas plastikas; P3 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc mīksto aukslēju plastikas; P4 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc cieto aukslēju plastikas; P5 – kontroles grupa

3.14. attēls. **PAX9 saturošo imūnhistokīmiski noteikto saistaudu šūnu relatīvā daudzuma vidējo rangu atšķirības starp dažādām izmeklējamā materiāla grupām**

Saīsinājumi attēlā: PAX9 – transkripcijas faktors PAX9; P1 – vienpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc lūpas plastikas; P2 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc lūpas plastikas; P3 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc mīksto aukslēju plastikas; P4 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc cieto aukslēju plastikas; P5 – kontroles grupa

Transkripcijas faktora PAX9 atrade mīksto un cieto aukslēju plastikas laikā iegūtajā materiālā bērniem ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņi

Mīksto aukslēju gļotādā tika novērotas retas (0/+) līdz daudz (+++) PAX9 pozitīvas epitēlijšūnas. Deviņiem pacientiem bija daudz (+++) PAX9 pozitīvas epitēlijšūnas, savukārt tikai vienam pacientam bija retas (0/+) PAX9 pozitīvas šūnas (3.12. tabula). Saistaudos netika vizualizētas PAX9 pozitīvas šūnas (3.13. tabula).

Cieto aukslēju gļotādas epitēlijā tika konstatētas vidēji daudz (++) līdz ļoti daudz (+++++) PAX9 pozitīvas šūnas redzes laukā (3.14. tabula; 3.60. mikrofotogrāfija pielikumā). Cieto aukslēju *lamina propria* vienam pacientam saturēja daudz (++) PAX9 pozitīvas saistaudu šūnas.

Statistiskie dati. Tika konstatēts, ka mīksto un cieto plastikas laikā ņemtajos audos būtiski pieaug PAX9 pozitīvu epitēlijšūnu skaits, salīdzinot ar lūpas plastikas laikā iegūtajiem audu paraugiem ($p < 0,001$) (3.13. attēls).

RYK gēna proteīna atrade lūpas primārās plastikas laikā iegūtajā materiālā zīdaiņiem un bērniem ar caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņi

RYK klātbūtne epitēlijā tika konstatēta tikai sešiem pacientiem ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņi, turklāt nevienam pacientam netika redzēta RYK ekspresija lūpas *lamina propria*. Interesanti, ka visiem sešiem pacientiem tika atrasti reti (0/+) RYK saturoši epitelociāti (3.11. tabula; 3.61. mikrofotogrāfija pielikumā).

RYK ekspresija tika fiksēta 22 pacientiem ar vienpusēju caurejošu šķeltņi. Pacientiem ar vienpusēju caurejošu šķeltņi tika atrastas retas (0/+) (3.62. mikrofotogrāfija pielikumā) līdz vidēji daudz (++) RYK pozitīvas epitēlijšūnas. Tomēr arī šai pacientu grupai netika konstatēta RYK ekspresija saistaudu šūnās (3.12. tabula).

Statistiskie dati. Analizējot vidējo RYK pozitīvo epitēlijšūnu relatīvo daudzumu, netika novērota statistiski ticama atšķirība starp pacientiem ar abpusēju šķeltņi, pacientiem ar vienpusēju šķeltņi un arī kontroles grupas pacientiem (3.15. attēls). Tomēr saistaudos tika novērots statistiski ticami lielāks RYK pozitīvo šūnu relatīvais daudzums kontroles grupas pacientiem, salīdzinot ar šķeltņu pacientiem ($p < 0,001$) (3.16. attēls).

3.15. attēls. **RYK saturošo imūnhistoķīmiski noteikto epitēlijšūnu relatīvā daudzuma vidējo rangū atšķirības starp dažādām izmeklējamā materiāla grupām**

Saīsinājumi attēlā: RYK – RYK gēna proteīns; P1 – vienpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc lūpas plastikas; P2 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc lūpas plastikas; P3 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc mīksto aukslēju plastikas; P4 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc cieto aukslēju plastikas; P5 – kontroles grupa.

3.16. attēls. **RYK saturošo imūnhistoķīmiski noteikto saistaudu šūnu relatīvā daudzuma vidējo rangū atšķirības starp dažādām izmeklējamā materiāla grupām**

Saīsinājumi attēlā: RYK – RYK gēna proteīns; P1 – vienpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc lūpas plastikas; P2 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc lūpas plastikas; P3 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc mīksto aukslēju plastikas; P4 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc cieto aukslēju plastikas; P5 – kontroles grupa.

RYK gēna proteīna atrade mīksto un cieto aukslēju plastikas laikā iegūtajā materiālā bērniem ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni

RYK gēna proteīns tika atrasts četru pacientu mīksto aukslēju gļotādas epitēlijā. Retas (0/+) mīksto aukslēju epitēlijšūnas saturēja RYK proteīnu. Mīksto aukslēju plastikas laikā iegūtajā materiālā RYK ekspresējošu saistaudu šūnu relatīvais daudzums variēja no retām (0/+) līdz vidēji daudz (++) šūnām (3.13. tabula).

RYK ekspresija tika redzēta astoņu pacientu cieto aukslēju gļotādas epitēlijā. Tika novērotas retas (0/+) līdz ļoti daudz (+++++) RYK pozitīvas epitēlijšūnas (3.14. tabula; 3.63. mikrofotogrāfija pielikumā). Cieto aukslēju plastikas laikā iegūtajā materiālā RYK ekspresējošu saistaudu šūnu relatīvais daudzums variēja no retām (0/+) līdz vidēji daudz (++).

Statistiskie dati. Pētījumā tika novērota pieaugoša RYK ekspresija cieto aukslēju epitēlijā, salīdzinot ar mīksto aukslēju un lūpas gļotādas epitēliju ($p < 0,05$) (3.15. attēls). RYK saturošo saistaudu šūnu skaits mīkstajās aukslējās bija statistiski ticami lielāks nekā tās lūpas gļotādas saistaudos ($p < 0,05$) (3.16. attēls). Salīdzinot RYK pozitīvo vidējo struktūru daudzumu atkārtoti ņemtajos audos ar kontroles grupu, būtiskas atšķirības netika konstatētas.

3.3.3. Augšanas faktoru, *CD34*, invāzijas faktora *PGP9.5* imūnhistoķīmiskie un statistiskie dati

Transformējošā augšanas faktora beta-3 (*TGFβ3*) atrade lūpas primārās plastikas laikā iegūtajā materiālā zīdaiņiem un bērniem ar caurejošām lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltnēm

Kopumā pacientiem ar abpusēju caurejošu šķeltni epitēlijā retas (0/+) šūnas saturēja *TGFβ3*. Sešiem pacientiem *TGFβ3* saturošas šūnas mutes dobuma gļotādā netika konstatētas. Saistaudos *TGFβ3* pozitīvas šūnas variēja robežās no retām (0/+) līdz maz (+) redzes laukā (3.64. mikrofotogrāfija pielikumā), izņemot vienu pacientu – zīdaiņi (3.15. tabula), kuram tika redzētas maz līdz vidēji daudz (+/++) *TGFβ3* pozitīvas šūnas. Pacienti tika konstatēti arī *TGFβ3* saturoši glandulocīti, matu folikulu šūnas, mazo siekalu dziedzeru izvadu šūnas un asinsvadu endoteliocīti.

***TGFβ3*, *VEGF*, *CD34* un *PGP 9.5* pozitīvu struktūru relatīvais daudzums abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņu skartajos audos, kas iegūti lūpas plastikas laikā**

Nr.	Šifrs	<i>TGFβ3</i>		<i>VEGF</i>	<i>CD34</i>	<i>PGP 9.5</i>
		E	S			
1.	55L	0	+	0	++++	++
2.	55R	0	+	0	++++	0/+
3.	168	0	+	+	++++	++
4.	177	0/+	+	+	++++	+/>++
5.	194	0	0/+	++	++++	++
6.	204	0	+	++	++++	++
8.	206	0/+	+	++	++++	+
9.	212	0/+	0/+	0	++++	+
10.	213	+	0/+	+	++++	+
11.	221	0	0/+	++/++++	++++	+
12.	238	0/+	+/>++	++	++++	+
13.	244	0/+	0/+	++	++++	++
14.	264	0/+	0/+	+	++++	++
15.	267	0/+	0/+	++	++++	++
16.	197	0/+	0/+	+	++++	++

Apzīmējumi tabulā: 0 – redzes laukā nav konstatēta neviena pozitīva struktūra; 0/+ - redzes laukā ir retas pozitīvas struktūras; + – redzes laukā ir maz pozitīvu struktūru; +/>++ – redzes laukā ir maz līdz vidēji daudz pozitīvu struktūru; ++ – redzes laukā ir vidēji daudz pozitīvu struktūru; ++/++++ – redzes laukā ir vidēji daudz līdz daudz pozitīvu struktūru; +++ – redzes laukā ir daudz pozitīvu struktūru; +++/++++ – redzes laukā ir daudz līdz ļoti daudz pozitīvu struktūru; ++++ – redzes laukā ir ļoti daudz pozitīvu struktūru.

Saīsinājumi tabulā: E – epitēlijšūnas; S – saistaudu šūnas; *TGFβ3* – transformējošais augšanas faktors beta-3; *VEGF* – vaskulārais endotēlija augšanas faktors; *CD-34* – transmembranozais glikoproteīns *CD-34*; *PGP 9.5* – proteīngēni 9.5.

TGFβ3 klātbūtne tika novērota visu 24 pacientu, kuriem bija vienpusēja caurejoša šķeltne, audu paraugos. Ļoti daudz (+++++) pozitīvu epitēlijšūnu redzes laukā tika fiksēts deviņiem pacientiem, daudz līdz ļoti daudz (+++/+++++) – pieciem pacientiem (3.65. mikrofotogrāfija pielikumā), daudz (+++) – deviņiem pacientiem un vidēji daudz (++) – vienam pacientam. Vienpusēju caurejošu šķeltņu skartajos audos tika konstatēti arī *TGFβ3* saturoši glandulocīti, matu folikulu šūnas, mazo siekalu dziedzeru izvadu šūnas un asinsvadu endoteliocīti. *TGFβ3* saturošas saistaudu šūnas tika novērotas asinsvadu un nervu šķiedru tuvumā. *TGFβ3* saturošus fibroblastus un makrofāgus konstatējām visos audu paraugos. Vienpusēju caurejošu šķeltņu pacientu saistaudos *TGFβ3* relatīvais šūnu daudzums variēja no retām (0/+) līdz ļoti daudz (+++++) redzes laukā (3.16. tabula).

***TGFβ3, VEGF, CD34 un PGP 9.5* pozitīvu struktūru relatīvais daudzums vienpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņu skartajos audos, kas iegūti lūpas plastikas laikā**

Nr.	Šifrs	<i>TGFβ3</i>		<i>VEGF</i>	<i>CD34</i>	<i>PGP 9.5</i>
		E	S			
1.	195.	++	0/+	+	++++	+
2.	205.	+++	0/+	++	++++	+
3.	217.	++++	+++	++	++++	+
4.	220.	+++ /++++	++	+++	++++	0/+
5.	223.	++++	++	+	++++	++
6.	224.	+++ /++++	+/++	++ /+++	++++	++
7.	227.	++++	+	+++ /++++	++++	++
8.	247.	+++	0/+	++	++++	0
9.	258.	++++	++	+/++	++++	+
10.	259.	++++	+++	++ /+++	++++	+
11.	262.	++++	++++	+++ /++++	++++	+++
12.	277.	+++	++ /+++	+++ /++++	++++	+++
13.	279.	++++	+++ /++++	+++	++++	+/++
14.	282.	++++	+++	+/++	++++	+
15.	283.	++++	+++	+/++	++++	+
16.	284.	+++ /++++	++ /+++	++	++++	+
17.	288.	+++	0/+	+	++++	+/++
18.	289.	+++ /++++	++ /+++	0/+	++++	+/++
19.	299.	+++	+++	++ /+++	++++	0/+
20.	300.	+++	+++ /++++	++	++++	+/++
21.	302.	+++	++	++ /+++	++++	+
22.	303.	+++ /++++	++	+	++++	+
23.	306.	+++	+	+	++++	0/+
24.	307.	+++	+++	++	++++	+

Apzīmējumi tabulā: 0 – redzes laukā nav konstatēta neviena pozitīva struktūra; 0/+ - redzes laukā ir retas pozitīvas struktūras; + – redzes laukā ir maz pozitīvu struktūru; +/+ – redzes laukā ir maz līdz vidēji daudz pozitīvu struktūru; ++ – redzes laukā ir vidēji daudz pozitīvu struktūru; +++ /+++ – redzes laukā ir vidēji daudz līdz daudz pozitīvu struktūru; +++ – redzes laukā ir daudz pozitīvu struktūru; +++ /++++ – redzes laukā ir daudz līdz ļoti daudz pozitīvu struktūru; ++++ – redzes laukā ir ļoti daudz pozitīvu struktūru.

Saīsinājumi tabulā: E – epitēlijšūnas; S – saistaudu šūnas; *TGFβ3* – transformējošais augšanas faktors beta-3; *VEGF* – vaskulārais endotēlija augšanas faktors; *CD-34* – transmembranozais glikoproteīns *CD-34*; *PGP 9.5* – proteīngēni 9.5.

Statistiskie dati. *TGFβ3* saturošo šūnu skaits epitēlijā un saistaudos pacientiem ar vienpusēju lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņi bija statistiski ticami lielāks nekā pacientiem ar abpusēju lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņi ($p < 0,001$). Pacientiem ar vienpusēju lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņi *TGFβ3* saturošo epitēlijšūnu bija statistiski ticami vairāk nekā kontroles grupas pacientiem ($p < 0,05$) (3.17. attēls). Pacientiem ar abpusēju lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņi *TGFβ3* saturošas epitēlijšūnas un saistaudu šūnas tika konstatētas statistiski ticami mazāk, salīdzinot ar kontroles pacientiem ($p < 0,001$) (3.17. un 3.18. attēls).

3.17. attēls. *TGFβ3* saturošo imūnhistoķīmiski noteikto epitēlijšūnu relatīvā daudzuma vidējo rangu atšķirības starp dažādām izmeklējamā materiāla grupām

Saīsinājumi attēlā: *TGFβ3* – transformējošais augšanas faktors beta-3; P1 – vienpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc lūpas plastikas; P2 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc lūpas plastikas; P3 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc mīksto aukslēju plastikas; P4 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc cieto aukslēju plastikas; P5 – kontroles grupa.

3.18. attēls. *TGFβ3* saturošo imūnhistoķīmiski noteikto saistaudu šūnu relatīvā daudzuma vidējo rangu atšķirības starp dažādām izmeklējamā materiāla grupām

Saīsinājumi attēlā: *TGFβ3* – transformējošais augšanas faktors beta-3; P1 – vienpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc lūpas plastikas; P2 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc lūpas plastikas; P3 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc mīksto aukslēju plastikas; P4 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc cieto aukslēju plastikas; P5 – kontroles grupa.

Transformējošā augšanas faktora beta-3 (*TGFβ3*) atrade mīksto un cieto aukslēju plastikas laikā iegūtajā materiālā bērniem ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni

Mīksto aukslēju plastikas laikā iegūtajā materiālā tika novērotas vidēji daudz (++) līdz ļoti daudz (+++++) *TGFβ3* saturošas epitēlijšūnas un saistaudu šūnas (3.17. tabula; 3.66. mikrofotogrāfija pielikumā).

3. 17. tabula

***TGFβ3*, *VEGF*, *CD34* un *PGP 9.5* pozitīvu struktūru relatīvais daudzums abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltnu skartajos audos, kas iegūti mīksto aukslēju plastikas laikā**

Nr.	Šifrs	<i>TGFβ3</i>		<i>VEGF</i>	<i>CD34</i>	<i>PGP 9.5</i>
		E	S			
1.	79	++++	++++	+	++	0/+
2.	187	+++	++++	+	++	0/+
3.	196	++	+++	+	++	0/+
4.	207	+++	+++	+	++	0/+
5.	245	+++	+++	0/+	++	0
6.	249	++	+++	+	++	0
7.	254	+++	+++	0/+	++++	0
8.	261	++++	+++	+	++	+
9.	273	+++ /++++	+++	+	++	+
10.	276	+++	+++	0/+	+++	0

Apzīmējumi tabulā: 0 – redzes laukā nav konstatēta neviena pozitīva struktūra; 0/+ - redzes laukā ir retas pozitīvas struktūras; + – redzes laukā ir maz pozitīvu struktūru; +/+ – redzes laukā ir maz līdz vidēji daudz pozitīvu struktūru; ++ – redzes laukā ir vidēji daudz pozitīvu struktūru; +++/+++ – redzes laukā ir vidēji daudz līdz daudz pozitīvu struktūru; +++ – redzes laukā ir daudz pozitīvu struktūru; +++/++++ – redzes laukā ir daudz līdz ļoti daudz pozitīvu struktūru; ++++ – redzes laukā ir ļoti daudz pozitīvu struktūru.

Saīsinājumi tabulā: E – epitēlijšūnas; S – saistaudu šūnas; *TGFβ3* – transformējošais augšanas faktors beta-3; *VEGF* – vaskulārais endotēlija augšanas faktors; *CD-34* – transmembranozais glikoproteīns *CD-34*; *PGP 9.5* – proteīngēnviela 9.5.

Cieto aukslēju plastikas laikā iegūtajā materiālā atrade bija līdzīga, tika vizualizētas maz līdz vidēji daudz (+/++) līdz ļoti daudz (+++++) *TGFβ3* pozitīvas šūnas (3.18. tabula).

***TGFβ3*, *VEGF*, *CD34* un *PGP 9.5* relatīvais daudzums abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņu skartajos audos, kas iegūti cieto aukslēju plastikas laikā**

Nr.	Šifrs	<i>TGFβ3</i>		<i>VEGF</i>	<i>CD34</i>	<i>PGP 9.5</i>
		E	S			
1.	79(1)	+++	+++	+	++	+++
2.	81	+++	+++	+	+++	++
3.	134(1)	+++	+++	+	++	+
4.	134(2)	+++	+++	+	++	0/+
5.	150	+++	+++	+	+++	+
6.	180	+ / ++	++++	0/+	+	++
7.	232	+++	++++	+	++++	0/+
8.	253	+++	+++	+ / ++	+++	0/+
9.	265	+++	+++ / +++++	++	++++	++

Apzīmējumi tabulā: 0 – redzes laukā nav konstatēta neviena pozitīva struktūra; 0/+ – redzes laukā ir retas pozitīvas struktūras; + – redzes laukā ir maz pozitīvu struktūru; + / ++ – redzes laukā ir maz līdz vidēji daudz pozitīvu struktūru; ++ – redzes laukā ir vidēji daudz pozitīvu struktūru; ++ / +++ – redzes laukā ir vidēji daudz līdz daudz pozitīvu struktūru; +++ – redzes laukā ir daudz pozitīvu struktūru; +++ / +++++ – redzes laukā ir daudz līdz ļoti daudz pozitīvu struktūru; +++++ – redzes laukā ir ļoti daudz pozitīvu struktūru.

Saīsinājumi tabulā: E – epitēlijšūnas; S – saistaudu šūnas; *TGFβ3* – transformējošais augšanas faktors beta-3; *VEGF* – vaskulārais endotēlija augšanas faktors; *CD-34* – transmembranozais glikoproteīns *CD-34*; *PGP 9.5* – proteīngēnviela 9.5.

Statistiskie dati. Analizējot datus, tika secināts, ka *TGFβ3* pozitīvo struktūru vidējais relatīvais daudzums bija statistiski ticami lielāks mīksto un cieto aukslēju plastikas laikā iegūtajos audos nekā lūpas materiālā ($p < 0,001$) (3.17. un 3.18. attēls).

Vaskulārā endotēlija augšanas faktora (*VEGF*) atrade lūpas primārās plastikas laikā iegūtajā materiālā zīdaiņiem un bērniem ar caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņi

Triju pacientu abpusējas šķeltnes audu paraugos netika konstatēti *VEGF* saturoši endoteliocīti. Divpadsmit bērnu audu paraugi saturēja maz (+) līdz daudz (+++) pozitīvus endoteliocītus redzes laukā (3.15. tabula; 3.67. mikrofotogrāfija pielikumā).

Taču *VEGF* saturēja visu 24 pacientu, kuriem bija vienpusēja caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne, audu paraugi. *VEGF* pozitīvas endotēlijšūnas variēja no retām (0/+) līdz ļoti daudz (+++++) redzes laukā (3.16. tabula; 3.68. mikrofotogrāfija pielikumā).

Statistiskie dati. *VEGF* pozitīvo struktūru vidējais relatīvais daudzums vienpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņu audos tika vizualizēts vairāk nekā abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņu skartajos audos ($p < 0,05$) (3.19. attēls).

3.19. attēls. *VEGF* saturošo imūnhistoķīmiski noteikto struktūru relatīvā daudzuma vidējo rangū atšķirības starp dažādām izmeklējamā materiāla grupām

Saīsinājumi attēlā: *VEGF* – vaskulārais endotēlija augšanas faktors; P1 – vienpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc lūpas plastikas; P2 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc lūpas plastikas; P3 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc mīksto aukslēju plastikas; P4 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc cieto aukslēju plastikas; P5 – kontroles grupa.

Vaskulārā endotēlija augšanas faktora (*VEGF*) atrade mīksto un cieto aukslēju plastikas laikā iegūtajā materiālā bērniem ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni

Mīksto aukslēju plastikas laikā iegūtajos audu paraugos tika konstatētas retas (0/+) līdz maz (+) *VEGF* saturošas endotēlijšūnas (3.17. tabula; 3.69. mikrofotogrāfija pielikumā).

Visos cieto aukslēju plastikas laikā iegūtajos audu paraugos novērotas *VEGF* pozitīvas endotēlijšūnas; to skaits variēja no retām (0/+) līdz vidēji daudz (++) redzes laukā (3.18. tabula).

Statistiskie dati. Šajās pētījuma grupās statistiski ticamas atšķirības netika konstatētas ($p > 0,05$).

Transmembranozā glikoproteīna *CD34* (*CD34*) atrade lūpas primārās plastikas laikā iegūtajā materiālā zīdaiņiem un bērniem ar caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni

Visos (16) abpusējas caurejošas šķeltnes gadījumos tika novērota bagātīga *CD34* ekspresija asinsvadu sienīnās. Kopumā *CD34* pozitīvo šūnu relatīvais daudzums bija ļoti daudz (+++++) redzes laukā (3.15. tabula).

Divdesmit četriem pacientiem ar vienpusēju caurejošu šķeltni arī tika konstatēta bagātīga *CD34* klatbūtne asinsvadu sienīnās. *CD34* pozitīvo endoteliocītu relatīvais daudzums bija ļoti daudz (++++) redzes laukā (3.16. tabula; 3.70. mikrofotogrāfija pielikumā).

Statistiskie dati. Salīdzinot ar kontroles grupu, novērojām statistiski ticami vairāk *CD34* pozitīvo struktūru šķeltnu pacientu audos ($p < 0,001$) (3.20. attēls).

3.20. attēls. *CD34* saturošo imūnhistoķīmiski noteikto struktūru relatīvā daudzuma vidējo rangū atšķirības starp dažādām izmeklējamā materiāla grupām

Saīsinājumi attēlā: *CD34* – transmembranoza glikoproteīns *CD34*; P1 – vienpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc lūpas plastikas; P2 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc lūpas plastikas; P3 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc mīksto aukslēju plastikas; P4 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc cieto aukslēju plastikas; P5 – kontroles grupa.

Transmembranozā glikoproteīna *CD34* (*CD34*) atrade mīksto un cieto aukslēju plastikas laikā iegūtajā materiālā bērniem ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni

Visos (10) mīksto aukslēju plastikas laikā iegūtajos audu paraugos tika vizualizētas *CD34* saturošas šūnas asinsvadu sienīnās. Mīksto aukslēju plastikas laikā iegūtajos audu paraugos *CD34* pozitīvas šūnas variēja no vidēji daudz (++) līdz ļoti daudz (++++) redzes laukā (3.17. tabula).

Visos (9) cieto aukslēju plastikas laikā iegūtajos audu paraugos tika konstatētas *CD34* pozitīvas šūnas asinsvadu sienīnās. Cieto aukslēju plastikas laikā iegūtajos audu paraugos *CD34* pozitīvas šūnas bija robežās no vidēji daudz (++) līdz ļoti daudz (++++) redzes laukā (3.18. tabula; 3.71. mikrofotogrāfija pielikumā).

Statistiskie dati. Minētā proteīna klātbūtne abpusējas lūpas šķeltnes materiālā bija statistiski ticami izteiktāka nekā mīksto un cieto aukslēju audos ($p < 0,001$) (3.20. attēls).

Proteīngēnvielas 9.5 (PGP 9.5) atrade lūpas primārās plastikas laikā iegūtajā materiālā zīdaiņiem un bērniem ar caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni

PGP 9.5 saturošas struktūras mūsu pētījumā tika novērotas visu 16 pacientu ar abpusēju šķeltni operāciju laikā paņemtajos audos. Vidēji tika konstatētas maz līdz vidēji daudz (+/++) *PGP 9.5* saturošas DNES struktūras, no retām (0/+) līdz vidēji daudz (++) redzes laukā (3.15. tabula). Dažos paraugos tika fiksētas *PGP 9.5* saturošas neiroendokrīnās šūnas epitēlijā. *PGP 9.5* lūpas plastikas iegūtajos audos bagātīgi saturēja nervu šķiedras ap tauku dziedzeriem, matu folikuliem, asinsvadiem, kā arī atsevišķas nervu šķiedras epitēlijā (3.72. mikrofotogrāfija pielikumā). Tika redzētas sīkas *PGP 9.5* saturošas nervu šķiedras subepitēlijā.

PGP 9.5 iekrāsoja DNES struktūras gandrīz visu vienpusējas šķeltnes pacientu audus, kas tika iegūti lūpas plastikas laikā. Redzes laukā bija retas (0/+) līdz daudz (+++) *PGP 9.5* pozitīvas struktūras (3.16. tabula). *PGP 9.5* bagātīgi iekrāsoja nervu šķiedras ap asinsvadiem un asinsvadu sienīnās (3.73. mikrofotogrāfija pielikumā), ap matu folikuliem (3.74. mikrofotogrāfija pielikumā), tauku un mazajiem siekalu dziedzeriem (3.75. mikrofotogrāfija pielikumā), kā arī nervu šķiedru kūlīšus (3.76. mikrofotogrāfija pielikumā). Jāatzīmē, ka *PGP 9.5* iekrāsoja arī sīkas nervu šķiedras subepitēlijā un epitēlijā. Tika novērotas arī *PGP 9.5* saturošas neiroendokrīnās šūnas epitēlijā (3.77. mikrofotogrāfija pielikumā).

Statistiskie dati. *PGP 9.5* pozitīvo struktūru vidējais relatīvais daudzums šo šķeltnu pacientu grupās bija variabls un neatšķīrās no kontroles grupas vidējā relatīvā rādītāja (3.21. attēls).

3.21. attēls. **PGP 9.5** saturošo imūnhistoķīmiski noteikto struktūru relatīvā daudzuma vidējo rangu atšķirības starp dažādām izmeklējamā materiāla grupām

Saīsinājumi attēlā: **PGP 9.5** – proteīngēniela 9.5; P1 – vienpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc lūpas plastikas; P2 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc lūpas plastikas; P3 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc mīksto aukslēju plastikas; P4 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc cieto aukslēju plastikas; P5 – kontroles grupa.

Proteīngēnielas 9.5 (PGP 9.5) atrade mīksto un cieto aukslēju plastikas laikā iegūtajā materiālā bērniem ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni

Mīksto aukslēju plastikas laikā iegūtajos audu paraugos četriem pacientiem netika saskatīta neviena **PGP 9.5** pozitīva struktūra. Četrus pacientu audos tika redzētas retas (0/+) nervu šķiedras saistaudos un divu pacientu audos tādu bija maz – (+) (3.17. tabula; 3.78. mikrofotogrāfija pielikumā).

Cieto aukslēju plastikas laikā iegūtajos audu paraugos tika fiksētas retas (0/+) līdz daudz (++++) **PGP 9.5** saturošas nervu šķiedras epitēlijā un subepitēlijā (3.18. tabula; 3.79. mikrofotogrāfija pielikumā).

Statistiskie dati. PGP 9.5 klātbūtne abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni lūpas plastikas laikā iegūtajā materiālā bija statistiski ticami lielāka nekā mīksto aukslēju plastikas laikā iegūtajā materiālā ($p < 0,001$). Cieto aukslēju plastikas laikā iegūtajos audu paraugos PGP 9.5 saturošo struktūru relatīvais daudzums bija statistiski ticami lielāks nekā mīksto aukslēju plastikas laikā iegūtajos audu paraugos ($p < 0,05$) (3.21. attēls).

3.3.4. Šūnu proliferācijas marķiera (*Ki-67*), nestīna un apoptozes imūnhistoķīmiskie un statistiskie dati

***Ki-67* atrade lūpas plastikas laikā iegūtajā materiālā zīdaiņiem un bērniem ar caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņi**

Tikai vienam pacientam ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņi tika konstatēta šūnu proliferācijas marķiera *Ki-67* ekspresija epitēlijšūnu kodolos. Jāatzīmē, ka šī pacienta audos tika redzēti tikai reti (0/+) *Ki-67* pozitīvi mutes dobuma gļotādas epiteliocīti (3.19. tabula) (3.80. mikrofotogrāfija pielikumā).

3.19. tabula

***Ki-67*, nestīna un apoptozes relatīvais daudzums abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņu skartajos audos, kas iegūti lūpas plastikas laikā**

Nr.	Šifrs	<i>Ki-67</i>	Nestīns	Apoptoze
1.	55L	0	++	++
2.	55R	0	+	0/+
3.	168	0	++	0/+
4.	177	0	+	+
5.	194	0	+++	+
6.	197	0	+ / ++	+
7.	204	0	++	+
8.	206	0	++	0/+
9.	212	0	0	+
10.	213	0	+ / +++	+
11.	221	0	+++	+ / +++
12.	238	0	++	+ / +++
13.	244	0	++	+
14.	264	0/+	+++	+
15.	267	0	++	0/+

Apzīmējumi tabulā: 0 – redzes laukā nav konstatēta neviena pozitīva struktūra; 0/+ - redzes laukā ir retas pozitīvas struktūras; + – redzes laukā ir maz pozitīvu struktūru; + / ++ – redzes laukā ir maz līdz vidēji daudz pozitīvu struktūru; ++ – redzes laukā ir vidēji daudz pozitīvu struktūru; ++ / +++ – redzes laukā ir vidēji daudz līdz daudz pozitīvu struktūru; +++ – redzes laukā ir daudz pozitīvu struktūru; +++ / ++++ – redzes laukā ir daudz līdz ļoti daudz pozitīvu struktūru; ++++ – redzes laukā ir ļoti daudz pozitīvu struktūru.

Saīsinājums tabulā: *Ki-67* – šūnu proliferācijas marķieris *Ki-67*.

Divdesmit trijiem no 24 pacientiem ar vienpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņi pacientiem epitēlijā tika konstatētas retas (0/+) līdz maz (+) *Ki-67* pozitīvas struktūras redzes laukā (3.20. tabula; 3.81. mikrofotogrāfija pielikumā).

Ki-67 un nestīna pozitīvu struktūru relatīvais daudzums vienaspusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltnu skartajos audos, kas iegūti lūpas plastikas laikā

Nr.	Šifrs	Ki-67	Nestīns	Apoptoze
1.	195	0/+	+++	+
2.	205	0/+	+++	++
3.	217	0/+	++/+++	+++
4.	220	0/+	+++	+++ /++++
5.	223	0	++	++
6.	224	0/+	++/+++	++
7.	227	0/+	+++ /++++	+++
8.	247	0/+	++	0/+
9.	258	0/+	+++	+/++
10.	259	0/+	++	++
11.	262	0/+	+++ /++++	++
12.	277	0/+	++	++ /+++
13.	279	0/+	++/+++	++
14.	282	0/+	++	+/++
15.	283	0/+	+++	+
16.	284	+	+++	+/++
17.	288	0/+	++	+
18.	289	0/+	+/++	+
19.	299	+	++	0/+
20.	300	0/+	++/+++	+/++
21.	302	0/+	+++	0/+
22.	303	+	+++	++
23.	306	0/+	++/+++	+/++
24.	307	0/+	+++	+/++

Apzīmējumi tabulā: 0 – redzes laukā nav konstatēta neviena pozitīva struktūra; 0/+ – redzes laukā ir retas pozitīvas struktūras; + – redzes laukā ir maz pozitīvu struktūru; +/+ – redzes laukā ir maz līdz vidēji daudz pozitīvu struktūru; ++ – redzes laukā ir vidēji daudz pozitīvu struktūru; ++/+++ – redzes laukā ir vidēji daudz līdz daudz pozitīvu struktūru; +++ – redzes laukā ir daudz pozitīvu struktūru; +++/++++ – redzes laukā ir daudz līdz ļoti daudz pozitīvu struktūru; ++++ – redzes laukā ir ļoti daudz pozitīvu struktūru.

Saīsinājums tabulā: Ki-67 – šūnu proliferācijas marķieris Ki-67.

Statistiskie dati. Imūnhistoķīmiski noteiktie Ki-67 pozitīvo šūnu relatīvā daudzuma vidējie rangi audos bija statistiski ticami lielāki pacientiem ar vienpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni nekā pacientiem ar abpusēju caurejošu šķeltni ($p < 0,05$) (3.22. attēls).

3. 22. attēls. ***Ki-67* saturošo imūnhistoķīmiski noteikto struktūru relatīvā daudzuma vidējo rangu atšķirības starp dažādām izmeklējamā materiāla grupām**

Saīsinājumi attēlā: *Ki-67* – proliferācijas marķieris *Ki-67*; P1 – vienpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc lūpas plastikas; P2 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc lūpas plastikas; P3 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc mīksto aukslēju plastikas; P4 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc cieto aukslēju plastikas; P5 – kontroles grupa.

***Ki-67* atrade mīksto un cieto aukslēju plastikas laikā iegūtajā materiālā bērniem ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni**

Mīksto aukslēju plastikas laikā iegūtajos audu paraugos tika novēroti reti (0/+) līdz maz (+) *Ki-67* pozitīvi epitēlijšūnu kodoli (3.21. tabula; 3.82. mikrofotogrāfija pielikumā). Četriem pacientiem netika redzēts neviens pozitīvs kodols.

Ki-67 un nestīna pozitīvu struktūru relatīvais daudzums abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņu skartajos audos, kas iegūti mīksto aukslēju plastikas laikā

Nr.	Šifrs	Ki-67	Nestīns
1.	79	+	++/+++
2.	187	0	++/+++
3.	196	0	+
4.	207	0	+/++
5.	245	0	++
6.	249	0/+	+
7.	254	0/+	++
8.	261	0/+	++/+++
9.	273	0/+	+++
10.	276	+	++

Apzīmējumi tabulā: 0 – redzes laukā nav konstatēta neviena pozitīva struktūra; 0/+ - redzes laukā ir retas pozitīvas struktūras; + – redzes laukā ir maz pozitīvu struktūru; +/+ – redzes laukā ir maz līdz vidēji daudz pozitīvu struktūru; ++ – redzes laukā ir vidēji daudz pozitīvu struktūru; ++/+++ – redzes laukā ir vidēji daudz līdz daudz pozitīvu struktūru; +++ – redzes laukā ir daudz pozitīvu struktūru; +++/++++ – redzes laukā ir daudz līdz ļoti daudz pozitīvu struktūru; ++++ – redzes laukā ir ļoti daudz pozitīvu struktūru.

Saīsinājums tabulā: Ki-67 – šūnu proliferācijas marķieris Ki-67.

Cieto aukslēju plastikas laikā iegūtajā materiālā vienam pacientam epitēlijā tika fiksēts vidēji daudz (++), diviem pacientiem – maz (+), diviem pacientiem – retas (0/+) Ki-67 saturošas šūnas redzes laukā (3.22. tabula).

Ki-67 un nestīna pozitīvu struktūru relatīvais daudzums abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņu skartajos audos, kas iegūti cieto aukslēju plastikas laikā

Nr.	Šifrs	Ki-67	Nestīns
1.	79/1	+	++/+++
2.	81	0	++
3.	134/1	0	+++
4.	134/2	0	++
5.	150	0/+	+++
6.	180	0/+	++/+++
7.	232	++	+++
8.	253	0	++
9.	265	+	+++

Apzīmējumi tabulā: 0 – redzes laukā nav konstatēta neviena pozitīva struktūra; 0/+ - redzes laukā ir retas pozitīvas struktūras; + – redzes laukā ir maz pozitīvu struktūru; +/+ – redzes laukā ir maz līdz vidēji daudz pozitīvu struktūru; ++ – redzes laukā ir vidēji daudz pozitīvu struktūru; ++/+++ – redzes laukā ir vidēji daudz līdz daudz pozitīvu struktūru; +++ – redzes laukā ir daudz pozitīvu struktūru; +++/++++ – redzes laukā ir daudz līdz ļoti daudz pozitīvu struktūru; ++++ – redzes laukā ir ļoti daudz pozitīvu struktūru.

Saīsinājums tabulā: Ki-67 – šūnu proliferācijas marķieris Ki-67.

Statistiskie dati. Relatīvais pozitīvo struktūru daudzums cieto aukslēju plastikas laikā iegūtajā materiālā bija statistiski ticami lielāks, salīdzinot ar lūpu plastikas laikā iegūto materiālu ($p < 0,05$) (3.22. attēls).

Nestīna atrade lūpas plastikas laikā iegūtajā materiālā zīdaiņiem un bērniem ar caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni

Visiem abpusējas šķeltnes lūpas plastikas laikā iegūtajiem audu paraugiem tika novērotas nestīnu saturošas šūnas. Kopumā tika konstatēts vidēji daudz (++) nestīna pozitīvu epitēlijšūnu. Septiņiem pacientiem tika vizualizētas vidēji daudz (++) nestīnu saturošas šūnas, trīs pacientiem tādu bija daudz (+++) (3.19. tabula). Mutes dobuma gļotādas epitēlijā tika konstatēts daudz līdz ļoti daudz (+++/++++) faktora pozitīvu bazālā slāņa šūnu (3.83. mikrofotogrāfija pielikumā). Šo pacientu audu paraugos tika redzētas ne tikai nestīnu saturošas epitēlijšūnas, bet arī endotēlijšūnas, mazo siekalu dziedzeru, matu folikula ārējās epitēliālās maksts un saistaudu šūnas.

Vienpusējas lūpas primārās plastikas laikā iegūtajos mīksto audu paraugos tika novērots arī nestīnu saturošas epitēlijšūnas. Nestīna pozitīvās šūnas variēja no vidēji daudz (++) līdz ļoti daudz (+++++) redzes laukā (3.20. tabula; 3.84. mikrofotogrāfija pielikumā). Kopumā desmit pacientiem tika novērots daudz (+++) nestīnu saturošu šūnu epitēlijā. Minēto proteīnu saturēja arī glandulocīti tauku dziedzeros un mazos siekalu dziedzeros, kā arī saistaudu šūnas. Jāatzīmē, ka arī šai pacientu grupai nestīnu bagātīgi saturēja bazālā slāņa šūnas.

Statistiskie dati. Pacientiem ar vienpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni audu materiālā tika konstatēts statistiski ticams nestīna pozitīvo šūnu vidējā relatīvā daudzuma pieaugums nekā pacientiem ar abpusēju šķeltni ($p < 0,05$). Kontroles grupas pacientu audu materiālā tika fiksētas statistiski ticami vairāk nestīna saturošu šūnu nekā šķeltnu pacientu audu materiālā ($p < 0,05$) (3.23. attēls).

3.23. attēls. Nestīna saturošo imūnhistoķīmiski noteikto struktūru relatīvā daudzuma vidējo rangu atšķirības starp dažādām izmeklējamā materiāla grupām

Saīsinājumi attēlā: P1 – vienpusējās caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc lūpas plastikas; P2 – abpusējās caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc lūpas plastikas; P3 – abpusējās caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc mīksto aukslēju plastikas; P4 – abpusējās caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc cieto aukslēju plastikas; P5 – kontroles grupa.

Nestīna atrade mīksto un cieto aukslēju plastikas laikā iegūtajā materiālā bērniem ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni

Nestīnu saturošas šūnas tika novērotas visos mīksto aukslēju audu paraugos. Tajos bija maz (+) līdz daudz (+++) pozitīvas šūnas redzes laukā (3.21. tabula). Nestīnu saturošas šūnas tika redzētas arī augšanas slānī un asinsvadu sienīņās, un saistaudos.

Cieto aukslēju plastikas laikā iegūtajos audu paraugos nestīnu saturēja arī epitēlija, asinsvadu un saistaudu šūnas. Nestīnu saturošas šūnas tika redzētas robežās no vidēji daudz (++) līdz daudz (+++) redzes laukā (3.22. tabula; 3.85. mikrofotogrāfija pielikumā).

Statistiskie dati. Nestīna klātbūtnes vidējie rangi kontroles grupas pacientu audu materiālā bija statistiski ticami lielāki nekā mīksto un cieto aukslēju plastikas laikā iegūtajos audu paraugos ($p < 0,05$) (3.23. attēls).

Apoptozes izvērtējums lūpas plastikas laikā iegūtajā materiālā zīdaiņiem un bērniem ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni

Pacienti ar abpusēju šķeltni visos audu paraugos vizualizējām variablu epitēlija un siekalu dziedzeru apoptotisko šūnu relatīvo daudzumu; šūnas variēja no retām (0/+) līdz vidēji daudz (++) redzes laukā (3.19. tabula; 3.86. mikrofotogrāfija pielikumā).

Apoptozes izvērtējums lūpas plastikas laikā iegūtajā materiālā zīdaiņiem un bērniem ar vienaspusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni

Apoptotisko šūnu klātbūtne tika novērota visos audu paraugos, kas tika iegūti lūpas plastikas laikā, bet pozitīvo struktūru relatīvais daudzums bija variabls. Apoptotiskās šūnas variēja robežās no retām (0/+) līdz ļoti daudz (++++ redzes laukā (3.20. tabula; 3.87. mikrofotogrāfija pielikumā). Pārsvārā šūnu apoptoze tika novērota epitēlijā. Vienam pacientam redzējām apoptotiskas šūnas matu folikulos un tauku dziedzeros.

Statistiskie dati. Apoptotisko šūnu vidējais relatīvais daudzums bija statistiski ticami lielāks bērniem ar vienaspusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni, salīdzinot ar bērniem, kuriem bija abpusēja caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne ($p < 0,001$). Salīdzinot audos esošo apoptotisko šūnu vidējo relatīvo daudzumu pacientiem ar šķeltnēm un kontroles grupas pacientiem, novērojām statistiski ticami palielinātu *TUNEL* pozitīvo šūnu relatīvo daudzumu pacientiem ar vienaspusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni ($p < 0,05$) (3.24. attēls).

3.24. attēls. Apoptotisko šūnu relatīvā daudzuma vidējo rangu atšķirības starp dažādām izmeklējamā materiāla grupām

Saīsinājumi attēlā: P1 – vienaspusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc lūpas plastikas; P2 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc lūpas plastikas; P3 – kontroles grupa.

3.3.5. Osteokalcīna (OC), osteopontīna (OPN) un osteoproteģerīna (OPG) imūnhistoķīmiskie un statistiskie dati osteoplastikas laikā iegūtajā materiālā

OC pozitīvie osteocīti abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņū skartajos audos variēja no maz (+) līdz daudz (+++) redzes laukā (3.23. tabula; 3.88. mikrofotogrāfija pielikumā).

3.23. tabula

OC, OP un OPG pozitīvu struktūru relatīvais daudzums abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņū pacientu audos, kas iegūti osteoplastikas laikā

Nr.	Šifrs	OC	OPN	OPG
1.	100/1	+++	+	++/+++
2.	145	++/+++	0	0/+
3.	172	+++	0/+	++
4.	185	+++	0	0/+
5.	214	+++	0	+
6.	235	+++	0	0/+
7.	241	+++	0	++/+++
8.	266	+++	0/+	++/+++
9.	280	+ /++	0	0/+
10.	286	++	0	0/+
11.	292	+ /++	0	0/+

Apzīmējumi tabulā: 0 – redzes laukā nav konstatēta neviena pozitīva struktūra; 0/+ – redzes laukā ir retas pozitīvas struktūras; + – redzes laukā ir maz pozitīvu struktūru; + /++ – redzes laukā ir maz līdz vidēji daudz pozitīvu struktūru; ++ – redzes laukā ir vidēji daudz pozitīvu struktūru; ++/+++ – redzes laukā ir vidēji daudz līdz daudz pozitīvu struktūru; +++ – redzes laukā ir daudz pozitīvu struktūru; +++/++++ – redzes laukā ir daudz līdz ļoti daudz pozitīvu struktūru; ++++ – redzes laukā ir ļoti daudz pozitīvu struktūru.

Saīsinājumi tabulā: OC – osteokalcīns; OP – osteopontīns; OPG – osteoproteģerīns.

Bērniem ar vienpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņū tika konstatēts vidēji daudz (++) līdz ļoti daudz (+++++) pozitīvu struktūru redzes laukā (3.24. tabula).

3. 24. tabula

OC, OP un OPG pozitīvu struktūru relatīvais daudzums vienpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņū pacientu audos, kas iegūti osteoplastikas laikā

Nr.	Šifrs	OC	OPN	OPG
1.	176/3	++	++	++/+++
2.	190/2	++	+	++
3.	225/2	+++	+++	+++ /++++
4.	229/2	+++	++/+++	++++
5.	246/2	++	++	++/+++
6.	248/2	++++	++++	++++
7.	263/2	++++	++++	++++

tabulas nobeigums				
Nr.	Šifrs	OC	OPN	OPG
8.	268/2	+++	++	+++ /++++
9.	270/2	++++	+++	++++
10.	278/2	+++	+++	+++ /++++
11.	295/2	+++ /++++	+++ /++++	++++
12.	296/2	+++	+++	+++ /++++
13.	305/1	++	++	+++

Apzīmējumi tabulā: 0 – redzes laukā nav konstatēta neviena pozitīva struktūra; 0/+ - redzes laukā ir retas pozitīvas struktūras; + – redzes laukā ir maz pozitīvu struktūru; +/+ – redzes laukā ir maz līdz vidēji daudz pozitīvu struktūru; ++ – redzes laukā ir vidēji daudz pozitīvu struktūru; ++/+ – redzes laukā ir vidēji daudz līdz daudz pozitīvu struktūru; +++ – redzes laukā ir daudz pozitīvu struktūru; +++/+ – redzes laukā ir daudz līdz ļoti daudz pozitīvu struktūru; ++++ – redzes laukā ir ļoti daudz pozitīvu struktūru.

Saīsinājumi tabulā: OC – osteokalcīns; OP – osteopontīns; OPG – osteoprotegerīns.

Statistiskie dati. OC klātbūtne pacientiem ar vienusēju un abpusēju šķeltni statistiski ticami neatšķiras. Tomēr vidējais imūnhistoķīmiski noteiktais OC pozitīvo šūnu relatīvais daudzums statistiski ticami mazāks bija pacientiem ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni nekā kontroles grupas pacientiem ($p < 0,05$) (3.25. attēls).

3.25. attēls. Osteokalcīna (OC) saturošo imūnhistoķīmiski noteikto struktūru relatīvā daudzuma vidējo rangū atšķirības starp dažādām izmeklējamā materiāla grupām

Saīsinājumi attēlā: OC – osteokalcīns; P1 – vienusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc osteoplastikas; P2 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc osteoplastikas; P3 – kontroles grupa.

OPN saturošas šūnas tika vizualizētas trijiem pacientiem ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņi. *OPN* pozitīvi osteocīti un osteoblasti variēja robežās no reti (0/+) līdz maz (+) redzes laukā (3.23. tabula; 3.89. mikrofotogrāfija pielikumā).

Pacientiem ar vienpusēju šķeltņi tika novērots maz (+) līdz ļoti daudz (+++++) *OPN* pozitīvu šūnu redzes laukā (3.24. tabula; 3.90. mikrofotogrāfija pielikumā).

Statistiskie dati. Pacientiem ar vienpusēju caurejošu šķeltņi *OPN* pozitīvo šūnu daudzums bija statistiski ticami lielāks nekā pacientiem ar abpusēju caurejošu šķeltņi ($p < 0,001$). *OPN* pozitīvo struktūru relatīvais daudzums abpusēju šķeltņu pacientu audos un kontroles grupas pacientu audos neatšķīrās, bet pacientiem ar vienpusēju šķeltņi *OPN* pozitīvo šūnu vidējais relatīvais daudzums bija statistiski ticami lielāks, salīdzinot ar kontroles grupu ($p < 0,001$) (3.26. attēls).

3.26. attēls. Osteopontīnu (*OPN*) saturošo imūnhistoķīmiski noteikto struktūru relatīvā daudzuma vidējo rangū atšķirības starp dažādām izmeklējamā materiāla grupām

Saīsinājumi attēlā: *OPN* – osteopontīns; P1 – vienpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc osteoplastikas; P2 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc osteoplastikas; P3 – kontroles grupa.

Pacientiem ar abpusēju šķeltņi audos *OPG* pozitīvās šūnas variēja no retām (0/+) līdz daudz (+++) redzes laukā (3.23. tabula; 3.91. mikrofotogrāfija pielikumā).

Izvērtējot *OPG* klātbūtni osteoplastikas laikā iegūtajos audos, tika konstatēts, ka pacientiem ar vienpusēju šķeltni audos *OPG* pozitīvās šūnas variēja no vidēji daudz (++) līdz ļoti daudz (++++) redzes laukā (3.24. tabula).

Statistiskie dati. *OPG* pozitīvo šūnu vidējais relatīvais daudzums audos statistiski ticami lielāks bija pacientiem ar vienpusēju caurejošu šķeltni, nevis pacientiem ar abpusēju šķeltni ($p < 0,001$). Abpusēju šķeltni skartajos audos *OPG* pozitīvo šūnu vidējais relatīvais daudzums bija statistiski ticami mazāks nekā kontroles grupas pacientiem ($p < 0,05$) (3.27. attēls).

3.27. attēls. Osteoproteģerīna (*OPG*) saturošo imūnhistoķīmiski noteikto struktūru relatīvā daudzuma vidējo rangu atšķirības starp dažādām izmeklējamā materiāla grupām

Saīsinājumi attēlā: *OPG* – osteoproteģerīns; P1 – vienpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc osteoplastikas; P2 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc osteoplastikas; P3 – kontroles grupa.

3.3.6. Matrices metaloproteināzes-2 (*MMP-2*), matrices metaloproteināzes-2 audu inhibitora (*TIMP-2*), kaula morfoģenētiskā proteīna (*BMP2/4*), transformējošā augšanas faktora beta-3 (*TGFβ3*) imūnhistoķīmiskie un statistiskie dati osteoplastikas laikā iegūtajā materiālā

Bērniem ar abpusēju šķeltni *MMP-2* pozitīvās šūnas variēja no retām (0/+) līdz daudz (+++) redzes laukā (3.25. tabula; 3.92. mikrofotogrāfija pielikumā).

Bērniem ar vienpusēju šķeltņi *MMP-2* pozitīvie osteocīti variēja no maz (+) līdz ļoti daudz (+++++) redzes laukā (3.26. tabula; 3.93. mikrofotogrāfija pielikumā).

3. 25. tabula

***MMP-2, TIMP-2, BMP2/4 un TGFβ3* pozitīvu struktūru relatīvais daudzums abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņu pacientu audos, kas iegūti osteoplastikas laikā**

Nr.	Šifrs	<i>MMP-2</i>	<i>TIMP-2</i>	<i>BMP2/4</i>	<i>TGFβ3</i>
1.	100/1	+	0/+	+ /+++	+++
2.	145	+	0/+	0/+	++
3.	172	+	0/+	++	++
4.	185	0/+	0/+	0/+	++
5.	214	++	+	++ /++++	+++
6.	235	+	0/+	+	++
7.	241	+	0/+	+ /+++	++ /++++
8.	266	+ /+++	0/+	++	++
9.	280	+	0/+	+ /+++	++
10.	286	0/+	0/+	+	++
11.	292	+++	+++	++ /++++	+++

Apzīmējumi tabulā: 0 – redzes laukā nav konstatēta neviena pozitīva struktūra; 0/+ - redzes laukā ir retas pozitīvas struktūras; + – redzes laukā ir maz pozitīvu struktūru; + /+++ – redzes laukā ir maz līdz vidēji daudz pozitīvu struktūru; ++ – redzes laukā ir vidēji daudz pozitīvu struktūru; ++ /+++ – redzes laukā ir vidēji daudz līdz daudz pozitīvu struktūru; +++ – redzes laukā ir daudz pozitīvu struktūru; +++ /++++ – redzes laukā ir daudz līdz ļoti daudz pozitīvu struktūru; ++++ – redzes laukā ir ļoti daudz pozitīvu struktūru.

Saīsinājums tabulā: *MMP-2* – matricē metaloproteināze-2; *TIMP-2* – matricē metaloproteināzes-2 audu inhibitors; *BMP 2/4* – kaula morfoģenētiskais proteīns 2/4; *TGFβ3* – transformējošais augšanas faktors beta-3.

3. 26. tabula

***MMP-2, TIMP-2, BMP 2/4 un TGFβ3* pozitīvu struktūru relatīvais daudzums vienpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņu pacientu audos, kas iegūti osteoplastikas laikā**

Nr.	Šifrs	<i>MMP-2</i>	<i>TIMP-2</i>	<i>BMP2/4</i>	<i>TGFβ3</i>
1.	176/3	++	+	++	+++
2.	190/2	+	+	++	++ /+++
3.	225/2	++++	++++	++++	++++
4.	229/2	+++	++++	+++ /++++	+++ /++++
5.	246/2	+++	+++	+++	++++
6.	248/2	++++	+++	++++	++++
7.	263/2	++++	++ /+++	++++	++++
8.	268/2	++++	+ /+++	++++	++++
9.	270/2	++++	+	++++	++++
10.	278/2	+++	++	++++	++++
11.	295/2	+++ /++++	+++	++++	++++
12.	296/2	+++	++	+++	+++
13.	305/1	++	+ /+++	+++	++

Apzīmējumi tabulā: 0 – redzes laukā nav konstatēta neviena pozitīva struktūra; 0/+ - redzes laukā ir retas pozitīvas struktūras; + – redzes laukā ir maz pozitīvu struktūru; + /+++ – redzes laukā ir maz līdz vidēji daudz pozitīvu struktūru; ++ – redzes laukā ir vidēji daudz pozitīvu struktūru; ++ /+++ – redzes laukā ir vidēji daudz līdz daudz pozitīvu struktūru; +++ – redzes laukā ir daudz pozitīvu struktūru; +++ /++++ – redzes laukā ir daudz līdz ļoti daudz pozitīvu struktūru; ++++ – redzes laukā ir ļoti daudz pozitīvu struktūru.

Saīsinājumi tabulā: *MMP-2* – matricē metaloproteināze-2; *TIMP-2* – matricē metaloproteināzes-2 audu inhibitors; *BMP 2/4* – kaula morfoģenētiskais proteīns 2/4; *TGFβ3* – transformējošais augšanas faktors beta-3.

Statistiskie dati. Izvērtējot imūnhistoķīmiski noteiktos šūnu relatīvā daudzuma vidējos rangus, tika konstatēts statistiski ticami lielāks MMP-2 pozitīvo šūnu daudzums bērniem ar vienpusēju šķeltņi nekā bērniem ar abpusēju šķeltņi ($p < 0,001$). Pacientiem ar vienpusēju šķeltņi MMP-2 pozitīvo šūnu vidējais relatīvais daudzums bija statistiski ticami lielāks, salīdzinot ar kontroles grupu ($p < 0,001$) (3.28. attēls).

3.28. attēls. **Matrices metaloproteināzi-2 (MMP-2) saturošo imūnhistoķīmiski noteikto struktūru relatīvā daudzuma vidējo rangu atšķirības starp dažādām izmeklējamā materiāla grupām**

Saīsinājumi attēlā: MMP-2 – matrices metaloproteināze-2; P1 – vienpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc osteoplastikas; P2 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc osteoplastikas; P3 – kontroles grupa.

Abpusēju šķeltņu pacientiem *TIMP-2* pozitīvas kaulaudu šūnas variēja robežās no retām (0/+) līdz daudz (+++) redzes laukā (3.25. tabula; 3.94. mikrofotogrāfija pielikumā).

Vienpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņu pacientu audos tika atrastas maz (+) līdz ļoti daudz (+++++) *TIMP-2* pozitīvas kaulaudu šūnas redzes laukā (3.26. tabula).

Statistiskie dati. Pacientiem ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņi audos *TIMP-2* pozitīvas struktūras bija statistiski ticami mazāk, salīdzinot ar pacientiem, kuriem bija vienpusēja caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne ($p < 0,001$). Vienpusēju šķeltņu skartajos audos *TIMP-2* klātbūtne bija pārliecinoša, un tika

fiksēts statistiski ticami vairāk imūnreaktīvo šūnu nekā abpusēju šķeltņu skartajos un kontroles pacientu audos ($p < 0,001$) (3.29. attēls).

3.29. attēls. **Matrices metaloproteināzes-2 audu inhibitora (*TIMP-2*) saturošo imūnhistoķīmiski noteikto struktūru relatīvā daudzuma vidējo rangu atšķirības starp dažādām izmeklējamā materiāla grupām**
 Saīsinājumi attēlā: *TIMP-2* – matrices metaloproteināzes-2 audu inhibitors; P1 – vienpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc osteoplastikas; P2 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc osteoplastikas; P3 – kontroles grupa.

Pacienti ar abpusēju šķeltni audos tika atrastas retas (0/+) līdz daudz (+++) pozitīvas šūnas redzes laukā (3.95. mikrofotogrāfija pielikumā).

Bērniem ar vienpusēju šķeltni *BMP2/4* pozitīvas struktūras variēja no vidēji daudz (++) līdz ļoti daudz (+++++) redzes laukā (3.96. mikrofotogrāfija pielikumā). Lielākam pacientu skaitam (7) tika novērots ļoti daudz (+++++) *BMP2/4* pozitīvu šūnu.

Statistiskie dati. Bērniem ar abpusēju šķeltni *BMP2/4* pozitīvo šūnu relatīvais daudzums bija statistiski ticami mazāks nekā bērniem ar vienpusēju šķeltni ($p < 0,001$) (3.30. attēls).

3.30. attēls. Kaula morfoģenētiskā proteīnu (*BMP2/4*) saturošo imūnhistoķīmiski noteikto struktūru relatīvā daudzuma vidējo rangu atšķirības starp dažādām izmeklējamā materiāla grupām

Saīsinājumi attēlā: *BMP2/4* – kaula morfoģenētiskais proteīns; P1 – vienpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc osteoplastikas; P2 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc osteoplastikas; P3 – kontroles grupa.

Kopumā tika konstatēti daudz līdz ļoti daudz (+++/++++) *TGFβ3* pozitīvi osteocīti bērniem ar vienpusēju lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni (3.97. mikrofotogrāfija pielikumā), bet bērniem ar abpusēju šķeltni kopumā tika konstatēti vidēji daudz (++) pozitīvi osteocīti redzes laukā (3.98. mikrofotogrāfija pielikumā).

Statistiskie dati. Bērniem ar abpusēju šķeltni *TGFβ3* pozitīvo šūnu relatīvais daudzums bija statistiski ticami mazāks nekā bērniem ar vienpusēju šķeltni ($p < 0,001$). Pacientiem ar vienpusēju šķeltni *TGFβ3* pozitīvo šūnu vidējais relatīvais daudzums bija statistiski ticami lielāks, salīdzinot ar kontroles grupu ($p < 0,001$) (3.31. attēls).

3.31. attēls. Transformējošais augšanas faktors beta-3 ($TGF\beta 3$) saturošo imūnhistoķīmiski noteikto struktūru relatīvā daudzuma vidējo rangu atšķirības starp dažādām izmeklējamā materiāla grupām. Saīsinājumi attēlā: $TGF\beta 3$ – transformējošais augšanas faktors beta-3; P1 – vienpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc osteoplastikas; P2 – abpusējas caurejošas lūpas un aukslēju šķeltnes grupa pēc osteoplastikas; P3 – kontroles grupa.

3.4. Imūnhistoķīmisko faktoru atrade un statistiskie dati atkārtoti ņemtajos audos pacientiem ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni

Septiņiem pacientiem tika veiktas atkārtotas secīgas šķeltnes korekcijas operācijas, kuru laikā tika savākts unikāls audu materiāls no šķeltnes malām un imūnhistoķīmiski izanalizētas visas primārās antivielas.

Atkārtoti ņemtajos audos tika novērotas *MSX1*, *MMP-9*, *TIMP-4*, *TGFβ3*, *Ki-67* un *VEGF* ekspresiju savstarpējās atšķirības.

Pārējiem 10 marķieriem (*nestīnam*, *MMP-2*, *MMP-8*, *TIMP-2*, *IRF6*, *PAX9*, *RYK*, *CD34*, *PGP 9.5*) statistiski ticamas atšķirības starp pirmo un atkārtoto operāciju netika konstatētas.

Transkripcijas faktora *MSX1* pozitīvas retas (0/+) saistaudu šūnas tika vizualizētas vienam pacientam lūpas plastikas laikā ņemtajā audu paraugā. Pārējiem pieciem pacientiem nekonstatējām *MSX1* pozitīvas saistaudu šūnas. Šiem pašiem pacientiem tika veikta mīksto aukslēju plastika, kuras laikā iegūtajā materiālā – mīksto aukslēju audu paraugos – redzējām statistiski ticami vairāk *MSX1* saturošas šūnas saistaudos ($p < 0,05$).

Matrices metaloproteināzes-9 (*MMP-9*) klātbūtne saistaudos tika konstatēta trīs pacientu lūpas plastikas laikā iegūtajos audu paraugos, diviem pacientiem netika konstatētas

imūnreaktīvas struktūras saistaudos. Trim pacientiem tika novērotas retas (0/+) *MMP-9* pozitīvas saistaudu šūnas. Šo triju pacientu mīksto aukslēju plastikas laikā iegūtajos paraugos tika fiksētas maz (+) līdz daudz (+++) pozitīvas saistaudu šūnas redzes laukā. Atkārtotu operāciju laikā paņemtajos mīksto audu paraugos tika novērota statistiski ticami lielāka *MMP-9* klātbūtne saistaudos ($p < 0,05$).

Matrices metaloproteināzes-4 audu inhibitora (*TIMP-4*) klātbūtne bija četrus pacientu lūpas plastikas laikā iegūtajos audos, vienam pacientam netika konstatētas *TIMP-4* imūnreaktīvas saistaudu šūnas. *TIMP-4* saturošas saistaudu šūnas variēja no retām (0/+) līdz maz (+) redzes laukā, bet mīksto aukslēju plastikas laikā iegūtajos audos tika fiksēts maz (+) un vidēji daudz (+/+), līdz daudz (+++) šūnu redzes laukā. Analizējot iegūtos datus, tika konstatēts, ka *TIMP-4* pozitīvu šūnu bija statistiski ticami vairāk atkārtoti ņemtajos audos ($p < 0,05$).

Transformējošā augšanas faktora beta-3 (*TGFβ3*) klātbūtne epitēlijā tika atrasta trīs pacientu audos pēc lūpas primārās plastikas. *TGFβ3* pozitīvas šūnas bija reti (0/+) vizualizējamas. Visiem pacientiem saistaudos tika novērotas *TGFβ3* pozitīvas struktūras. Tās variēja no retām (0/+) līdz maz un vidēji daudz (+/++) redzes laukā. Visiem pacientiem mīksto aukslēju plastikas laikā iegūtajos audu paraugos tika konstatētas *TGFβ3* saturošas šūnas epitēlijā un saistaudos. Epitēlijā *TGFβ3* pozitīvas šūnas variēja no vidēji daudz (++) līdz daudz (+++), kamēr saistaudos – no daudz (+++) līdz ļoti daudz (+++++) redzes laukā. Līdz ar to tika konstatēta statistiski ticama palielināta *TGFβ3* klātbūtne pētījuma audu paraugos ($p < 0,05$).

Šūnu proliferācijas marķiera *Ki-67* klātbūtne netika vizualizēta abpusējas caurejošas šķeltnes lūpas primārās plastikas laikā paņemtajos audu paraugos, bet atkārtotu operāciju laikā iegūtajos audos bija retas (0/+) līdz vidēji daudz (++) *Ki-67* pozitīvas šūnas epitēlijā. Tika konstatēta statistiski ticama palielināta *Ki-67* ekspresija atkārtoti paņemtajos pētījuma audu paraugos ($p < 0,05$).

Vaskulārā endotēlija augšanas faktoru (*VEGF*) vizualizējām epitēlijā un endotēlijā. Kopumā *VEGF* saturošas struktūras lūpas plastikas laikā iegūtajā materiālā bija vidēji daudz (++) . Jāatzīmē, ka visu pacientu lūpas plastikas laikā iegūtajos audos redzējām *VEGF* pozitīvas struktūras. Tomēr šo pacientu mīksto aukslēju plastikas laikā iegūtajos audos *VEGF* pozitīvo struktūru bija statistiski ticami mazāk ($p < 0,05$).

3.5. Imūnhistokīmiski noteikto marķieru savstarpējās atbilstības ciešuma izvērtēšanas dati, izmantojot Spīrmena rangu korelācijas koeficientu

Audu materiālā, kas tika iegūts lūpas plastikas laikā no zīdaiņiem ar vienpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni tika konstatēta statistiski nozīmīga cieša, pozitīva korelācija starp *MMP-9* un *TIMP-4* saistaudos (3.28. tabula), bet audu paraugos, kas tika iegūti lūpas plastikas laikā no zīdaiņiem ar abpusēju šķeltni – starp *MMP-8* un *TIMP-4* epitēlijā, kā arī starp *TIMP-4* epitēlijā un *TIMP-4* saistaudos (3.29. tabula). Visvairāk ciešas, pozitīvas korelācijas tika konstatētas mīksto un cieto aukslēju plastikas laikā iegūtajos audu paraugos (3.30. un 3.31. tabula). Vienpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltnu pacientu audos, kas iegūti osteoplastikas laikā, tika konstatētas ciešas, pozitīvas korelācijas starp *OC* un *OPG*, *OC* un *OP*, *BMP2/4* un *TIMP-2*, *BMP2/4* un *TGFβ3*, *OC* un *MMP-2*, *MMP-2* un *TGFβ3*, *OP* un *OPG*, *OC* un *BMP2/4* kaulu šūnās (3.32. tabula), bet abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltnu skartajos kaulaudos cieša, pozitīva korelācija tika konstatēta tikai starp *BMP2/4* un *MMP-2* kaulu šūnās (3.33. tabula).

3. 28. tabula

Imūnhistokīmiski noteikto marķieru savstarpējās korelācijas dati vienpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltnu pacientu audos, kas iegūti lūpas primārās plastikas laikā

Marķieris 1	Marķieris 2	r_s	p	n
Cieša, pozitīva ($r \geq 0,75$) korelācija konstatēta:				
<i>MMP-9</i> saistaudos	<i>TIMP-4</i> saistaudos	0,772	< 0,01	24

Apzīmējumi tabulā: r_s – Spīrmena korelācijas koeficients; p – Spīrmena korelācijas p vērtība; n – morfoloģiskā materiāla vienību skaits

3. 29. tabula

Imūnhistokīmiski noteikto marķieru savstarpējās korelācijas dati abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltnu pacientu audos, kas iegūti lūpas primārās plastikas laikā

Marķieris 1	Marķieris 2	r_s	p	n
Cieša, pozitīva ($r \geq 0,75$) korelācija konstatēta:				
<i>MMP-8</i> epitēlijā	<i>TIMP-4</i> epitēlijā	0,857	< 0,01	15
<i>TIMP-4</i> epitēlijā	<i>TIMP-4</i> saistaudos	0,768	< 0,01	15

Apzīmējumi tabulā: r_s – Spīrmena korelācijas koeficients; p – Spīrmena korelācijas p vērtība; n – morfoloģiskā materiāla vienību skaits

Imūnhistoķīmiski noteikto marķieru savstarpējās korelācijas dati abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltnu pacientu audos, kas iegūti mīksto aukslēju plastikas laikā

Marķieris 1	Marķieris 2	r_s	p	n
Cieša, pozitīva ($r \geq 0,75$) korelācija konstatēta:				
<i>MMP-8</i> epitēlijā	<i>TIMP-2</i> epitēlijā	0,915	< 0,01	10
<i>TIMP-4</i> epitēlijā	<i>TIMP-2</i> saistaudos	0,910	< 0,01	10
<i>TIMP-2</i> saistaudos	<i>TIMP-4</i> saistaudos	0,910	< 0,01	10
<i>MMP-8</i> epitēlijā	<i>MMP-9</i> epitēlijā	0,852	< 0,01	10
<i>TGFβ3</i> epitēlijā	<i>Nestīns</i> epitēlijā	0,857	< 0,01	10
<i>MMP-9</i> epitēlijā	<i>MMP-9</i> saistaudos	0,846	< 0,01	10
<i>MMP-2</i> saistaudos	<i>TGFβ3</i> epitēlijā	0,838	< 0,01	10
<i>MMP-9</i> epitēlijā	<i>TIMP-2</i> saistaudos	0,809	< 0,01	10
<i>MMP-9</i> epitēlijā	<i>TIMP-4</i> epitēlijā	0,805	< 0,01	10
<i>IRF6</i> epitēlijā	<i>IRF6</i> saistaudos	0,802	< 0,01	10
<i>MMP-8</i> epitēlijā	<i>MMP-8</i> saistaudos	0,781	< 0,01	10
<i>MMP-9</i> saistaudos	<i>TIMP-4</i> epitēlijā	0,773	< 0,01	10
<i>MMP-9</i> epitēlijā	<i>TIMP-2</i> epitēlijā	0,767	< 0,01	10
<i>VEGF</i> saistaudos	<i>CD34</i> saistaudos	0,759	< 0,05	10

Apzīmējumi tabulā: r_s – Spīrmena korelācijas koeficients; p – Spīrmena korelācijas p vērtība; n – morfoloģiskā materiāla vienību skaits

Imūnhistoķīmiski noteikto marķieru savstarpējās korelācijas dati abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltnu pacientu audos, kas iegūti cieto aukslēju plastikas laikā

Marķieris 1	Marķieris 2	r_s	p	n
Cieša, pozitīva ($r \geq 0,75$) korelācija konstatēta:				
<i>MMP-8</i> epitēlijā	<i>MMP-9</i> epitēlijā	0,955	< 0,01	9
<i>IRF6</i> saistaudos	<i>RYK</i> epitēlijā	0,917	< 0,01	9
<i>RYK</i> saistaudos	<i>RYK</i> epitēlijā	0,917	< 0,01	9
<i>TIMP-2</i> epitēlijā	<i>TIMP-2</i> saistaudos	0,898	< 0,01	9
<i>MMP-9</i> epitēlijā	<i>MMP-2</i> saistaudos	0,897	< 0,01	9
<i>MMP-8</i> epitēlijā	<i>MMP-9</i> saistaudos	0,849	< 0,01	9
<i>MMP-9</i> epitēlijā	<i>MMP-9</i> saistaudos	0,819	< 0,01	9
<i>IRF6</i> epitēlijā	<i>IRF6</i> saistaudos	0,818	< 0,01	9
<i>RYK</i> saistaudos	<i>IRF6</i> epitēlijā	0,818	< 0,01	9
<i>MMP-9</i> epitēlijā	<i>TIMP-4</i> epitēlijā	0,812	< 0,01	9
<i>MMP-2</i> saistaudos	<i>TIMP-4</i> epitēlijā	0,809	< 0,01	9
<i>IRF6</i> epitēlijā	<i>RYK</i> epitēlijā	0,800	< 0,01	9
<i>MMP-2</i> epitēlijā	<i>MMP-2</i> saistaudos	0,777	< 0,05	9
<i>MMP-8</i> epitēlijā	<i>MMP-2</i> saistaudos	0,773	< 0,05	9
<i>MMP-8</i> saistaudos	<i>MMP-9</i> saistaudos	0,768	< 0,05	9
<i>MMP-2</i> epitēlijā	<i>TIMP-2</i> epitēlijā	0,767	< 0,05	9

Apzīmējumi tabulā: r_s – Spīrmena korelācijas koeficients; p – Spīrmena korelācijas p vērtība; n – morfoloģiskā materiāla vienību skaits

Imūnhistokīmiski noteikto marķieru savstarpējās korelācijas dati vienpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņu pacientu audos, kas iegūti osteoplastikas laikā

Marķieris 1	Marķieris 2	r_s	p	n
Cieša, pozitīva ($r \geq 0,75$) korelācija konstatēta:				
OC kaulu šūnās	OPG kaulu šūnās	0,923	< 0,01	12
OC kaulu šūnās	OP kaulu šūnās	0,884	< 0,01	12
BMP2/4 kaulu šūnās	TIMP-2 kaulu šūnās	0,883	< 0,01	12
BMP2/4 kaulu šūnās	TGFβ3 kaulu šūnās	0,841	< 0,01	12
OC kaulu šūnās	MMP-2 kaulu šūnās	0,828	< 0,01	12
MMP-2 kaulu šūnās	TGFβ3 kaulu šūnās	0,827	< 0,01	12
OP kaulu šūnās	OPG kaulu šūnās	0,826	< 0,01	12
OC kaulu šūnās	BMP2/4 kaulu šūnās	0,825	< 0,01	12

Apzīmējumi tabulā: r_s – Spīrmena korelācijas koeficients; p – Spīrmena korelācijas p vērtība; n – morfoloģiskā materiāla vienību skaits

Imūnhistokīmiski noteikto marķieru savstarpējās korelācijas dati abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņu pacientu audos, kas iegūti osteoplastikas laikā

Marķieris 1	Marķieris 2	r_s	p	n
Cieša, pozitīva ($r \geq 0,75$) korelācija konstatēta:				
BMP2/4 kaulu šūnās	MMP-2 kaulu šūnās	0,828	< 0,01	11

Apzīmējumi tabulā: r_s – Spīrmena korelācijas koeficients; p – Spīrmena korelācijas p vērtība; n – morfoloģiskā materiāla vienību skaits

Mūsu darbā tika izvērtēts arī visu imūnhistokīmiski noteikto marķieru savstarpējās atbilstības ciešums pacientu audos saistībā ar vecumu atkārtotu operāciju laikā iegūtajos audos, izmantojot Spīrmena rangi korelācijas koeficientu.

Ja korelācijas koeficients sasniedza maksimumu 1 vai minimumu -1, tad p vērtība netika rēķināta.

Statistiski nozīmīga cieša, pozitīva ($|r| \geq 0,75$) korelācija tika konstatēta:

$r_s = -0,882$; $p < 0,05$ – starp **vecumu (mēnešos)** un **TIMP-4** pozitīvām epitēlijšūnām;

$r_s = -0,840$; $p < 0,05$ – starp **vecumu (mēnešos)** un **VEGF** pozitīvām struktūrām;

$r_s = 0,868$; $p < 0,05$ – starp **vecumu (mēnešos)** un **MMP-8** pozitīvām struktūrām;

$r_s = 0,939$; $p < 0,001$ – starp **vecumu (mēnešos)** un **PGP 9.5** pozitīvām struktūrām.

4. DISKUSIJA

Kopumā pacientiem ar vienpusēju un abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņi audu paraugu morfoloģiskā atrade atbilda vispārpieņemtajai normai. Tomēr daļai pacientu mīksto un cieto audu paraugos gaismas mikroskopijā konstatējām tādas nespecifiskas audu pārmaiņas, kā epitēlija atrofiju, bazālā slāņa šūnu hiperplāziju un proliferāciju, dzeloņainā slāņa šūnu vakuolizāciju, kā arī iekaisuma šūnu infiltrāciju.

Pētījumi par sejas šķeltņu iespējamajiem patoģenēzes, pēcoperācijas brūču dzīšanas un audu remodelācijas molekulārajiem mehānismiem pārsvarā ir veikti ar eksperimenta dzīvniekiem laboratorijas apstākļos. Pasaulē plaši tiek pētītas dažādu gēnu ģenētiskās variācijas, izmantojot dažādu populāciju bērnu audu paraugus. Nav daudz pētījumu par cilvēka sejas un mutes dobuma embrionālās attīstības morfoģenēzes mehānismiem, kā arī nav daudz dažādu audu faktoru imūnhistoķīmisku pētījumu par postnatāli operāciju laikā iegūtu zīdaiņu un bērnu sejas šķeltņu skarto audu morfoloģiju ontoģenētiskā aspektā. Tādēļ diskusiju lielākoties var balstīt uz mūsu datiem korelācijā ar literatūrā pieejamajiem pētījumu rezultātiem, kas iegūti no eksperimenta dzīvniekiem. Būtiski, ka *Bodo* ar kolēģiem veicis nozīmīgu pētījumu, kurā pierādīts, ka pēc dzimšanas cilvēka šķeltņu skarto audu šūnu fenotips atšķiras no normālu audu šūnu fenotipa (*Bodo et al.*, 1999). Šī iemesla dēļ pētījumi ar šķeltņu skarto audu paraugiem, kas iegūti postnatāli, var tikt uzskatīti par piemērotiem šķeltņu etiopatogēzes izpētei pat tad, ja šķeltne ir embrionālas izcelsmes audu attīstības traucējums. Lūpu un aukslēju morfoģenēze ietver šūnu proliferāciju, diferenciāciju, migrāciju, programmēto šūnu nāvi, ekstracelulārās matricē sintēzi un degradāciju, kā arī vietējās audu aizsardzības faktoru bāzes veidošanos. Minētos procesus embrija audos koordinē dažādas signālmolekulas, augšanas faktori, transkripcijas faktori un to receptori, audu degradācijas enzīmi un to endogēnie inhibitori, kā arī šūnu adhēzijas molekulas. Minēto faktoru trūkums audos vai pārlietu liels to daudzums var izraisīt bērnam sejas šķeltņi (*Meng et al.*, 2009).

MMP un TIMP imūnhistoķīmiskais profils šķeltnes skartajos mīkstajos audos. Augšlūpas un aukslēju aizmetņu attīstības laikā *ECM* remodelāciju, epitēlija transformāciju mezenhīmā un postnatāli sejas audu homeostāzi regulē *MMPs* un audu endogēnie inhibitori *TIMPs*, ko pierāda šo enzīmu ekspresijas izpēte peļu audos. Tieši *MMP-2*, *MMP-3*, *MMP-7*, *MMP-9*, *MMP-13*, *MMP-25* un *TIMP-1*, *TIMP-2*, *TIMP-3* ekspresija tika izvērtēta peļu embrijiem aukslēju aizmetņu saplūšanas laikā. Nenoliedzami, ka lokālas izmaiņas šo enzīmu relatīvā daudzumā var izraisīt audu defektus lūpu un aukslēju aizmetņu saplūšanas laikā (*Blavier et al.*, 2001; *Wiman et al.*, 2000; *Brown and Nazarali*, 2010). Tiek uzskatīts, ka *MMPs* un *TIMPs* ir iespējamie nesindromālo lūpas un aukslēju šķeltņu kandidātģēni. Daudzās

populācijās ir analizētas ģenētiskās variācijas *MMPs* un *TIMPs* gēnos saistībā ar sejas šķeltnēm, bet atklātie rezultāti dažādām populācijām un rasēm ir pretrunīgi (Nikopensius *et al.*, 2011; Letra *et al.*, 2012; Letra *et al.*, 2014). Lai gan dažu *MMPs* un *TIMPs* veidu nozīme sejas šķeltnu attīstībā ir pamatota, tomēr šo enzīmu lokāla ekspresija nav plaši pētīta audos, kas iegūti postnatāli no bērniem ar vienpusēju un abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni ontogēnētiskā aspektā. Šajā pētījumā vienpusēju un abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltnu skartajos audos tika kompleksi izvērtēti *MMP-2*, *MMP-8*, *MMP-9* un *TIMP-2*, *TIMP-4* imūnreaktīvo struktūru relatīvais daudzums un sadalījums, tos salīdzinot ar kontroles grupas audu paraugiem.

Pētījumā konstatējām pārliecinoši palielinātu *MMP-2* klātbūtni epitēlijā, kas lūpas plastikas laikā iegūts no bērniem ar abpusēju caurejošu šķeltni ($p < 0,001$), kamēr mīksto un cieto aukslēju audos *MMP-2* bija samazināta ($p < 0,05$). Jāatzīmē, ka *MMP-2* klātbūtne saistaudos kontroles grupas pacientiem bija statistiski ticami mazāka nekā pacientiem ar šķeltnēm ($p < 0,05$). Tādējādi uzskatām, ka *MMP-2* šūnu membrānas asociētajam *MMP (MT1-MMP)/TIMP-2* signālceļam nenoliedzami ir nozīme sejas šķeltnu skarto audu pēcooperācijas dzīšanas fāzēs, proti, proliferācijas un remodelēšanās, kā arī rētaudu veidošanās procesā un audu homeostāzē. Iespējams, ar palielinātu *MMP-2* enzīma ekspresiju tiek kompensēts kāda cita enzīma funkcionālās aktivitātes trūkums. Kopumā tika novērota *MMP-2* relatīvā daudzuma un novietojuma mainība, tādēļ, iespējams, šiem mūsu pacientiem raksturīgas arī *MMP-2* ģenētiskās variācijas.

Lielbritānijas zinātnieku kolektīvs 2002. gadā pierādīja tieši *MMP-2* izteiktu ekspresiju *in vivo* aukslēju attīstības laikā. Tika atklāts, ka, inaktivējot *MMP-2*, tika ietekmētas vēl citas - *MMP-13* - *MMP* funkcijas (Brown *et al.*, 2002). Cits zinātnieku kolektīvs 2009. gadā atklāja, ka heparināzes trūkums tiek kompensēts ar palielinātu *MMP-2*, *MMP-9* un *MMP-14* ekspresiju (Zcharia *et al.*, 2009). Pētījuma rezultāti nenoliedzami apstiprina šādu faktu: ja ir pilnīgi vai nepilnīgi traucēta viena proteolītiska enzīma funkcija, tiek ietekmēta cita audu degradācijas enzīma un ar to saistītā endogēnā inhibitora funkcionālā aktivitāte vai tiek kompensēta šī enzīma funkcija ar cita enzīma lokālu pieaugošu ekspresiju audos. Jāpiemin, ka *MMP-2* izpēte sejas un mutes dobuma audos attīstības laikā ir radījusi plašu interesi vairāku gadu garumā, jo *MMP-2* degradē arī fibronektīnu un III tipa kolagēnu, kas ir peļu aukslēju aizmetņu pamatkomponenti līdz 13. embrionālās attīstības dienai. Pēc tam, no 13. līdz 14. embrionālās attīstības dienai, peļu aukslēju audos notiek fibronektīna un III tipa kolagēna degradācija, kas saistīta tieši ar *MMP-2* aktivitāti (de Oliveira Demarchi *et al.*, 2010). Samazināta *MMP-2* ekspresija žurku

ādas brūces dzīšanas procesā tika pierādīta arī saistībā ar palielinātu rētaudu veidošanās risku (Dang et al., 2003).

Interesanti, ka *MMP-2* funkcijas līdzinās *MMP-9* funkcijām, proti, tās degradē līdzīgus *ECM* komponentus: želatīnu, bazālās membrānas proteīnus un elastīnu (Ravanti and Kähäri, 2000). Ir pierādīts, ka *MMP-9* būtiski ietekmē audu dzīšanu, stimulējot epitēlija migrāciju un reģenerāciju (Mohan et al., 2002). Mūsu pētījumā, kas tika veikts ar vienpusēju un abpusēju šķeltnu skartajiem audiem postnatāli, vieglākos šķeltnes gadījumos atradām izteiktu *MMP-9* ekspresiju, bet smagākos gadījumos, proti, pacientiem ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni konstatējām nozīmīgi samazinātu *MMP-9* klātbūtni. Tādus pašus rezultātus ieguvuši arī Čehijas zinātnieki lūpas plastikas laikā iegūtajos audos bērniem vecumā no diviem līdz četriem mēnešiem (Blaha et al., 2013). Eksperimentos ar dzīvniekiem ir atklāts, ka palielināta *MMP-9* ekspresija samazina rētaudu veidošanos, kamēr zema vai nenosakāma *MMP-9* aktivitāte norāda uz hipertrofiskas rētas veidošanos brūces dzīšanas laikā un pārmērīgu kolagēna produkciju kontrastā ar samazinātu tā degradāciju (Hosokawa et al., 2003; Manuel and Gawronska-Kozak, 2006). Balstoties uz iepriekš minēto, pieļaujam, ka samazināta *MMP-9* klātbūtne mūsu pacientu augšlūpas audos norāda uz lielāku rētaudu veidošanos risku abpusējas šķeltnes gadījumos.

Papildus jāatzīmē, ka *MMP-9* pieaugoši ekspresējas audos peļu aukslēju aizmetņu saplūšanas laikā (Wiman et al., 2000). *MMP-9* gēns ir lokalizēts 20q12.2 un atbild par *ECM* pamatkomponenta IV tipa kolagēna degradāciju, tādējādi nodrošinot šūnu migrāciju (Zhang et al., 1999). Ņemot vērā *MMP-9* funkcijas, iespējams, ka samazināta *MMP-9* klātbūtne audos rada nepilnu bazālās membrānas degradāciju, tāpēc arī nenotiek epitēlija transformācija mezenhīmā un līdz ar to lūpu un aukslēju aizmetņu saplūšana. Lai gan ir konstatēta nozīmīga *MMP-9* ekspresija dzīvnieku aukslēju attīstības laikā, tomēr nav pārliecinošu pētījumu par šī enzīma iesaisti nesindromālo šķeltnu etioloģijā. Letra ar līdzautoriem pētīja *MMP-9* gēna nozīmi Brazīlijas iedzīvotāju populācijā. Pētījumā netika pārliecinoši identificēts *MMP-9* – 1562 C/T polimorfisms saistībā ar nesindromālām lūpas un aukslēju šķeltnēm. Paši autori to saista ar, iespējams, nepietiekamu gadījumu skaitu, kas tika iekļauts šajā pētījumā (Letra et al., 2007). De Oliveira Demarchi ar kolēģiem noteica *MMP-9* klātbūtni aukslēju aizmetņos dzīvniekiem dažādos embrionālās attīstības laikos. Peļu aukslēju attīstības 13. embrionālās attīstības dienā *MMP-9* ekspresija netika vizualizēta, bet no 14. līdz 15. embrionālās attīstības dienai tika atklāta *MMP-9* ekspresija aukslēju mediālās malas epitēlijā. Šajā laikā pelēm, degradējoties bazālajai membrānai un ekstracelulārajai matricei, notiek aukslēju aizmetņu saplūšana. Līdz ar to tika izteikta doma par iespējamu *MMP-9* nozīmi aukslēju ontogēnēzē (de Oliveira Demarchi et al., 2010).

Interesants pētījums saistībā ar *TIMP-1* un *MMP-9* lomu brūces dzīšanā un rētaudu veidošanos bērniem ar lūpas šķeltnēm ir veikts Čehijā. Tiesa, šis pētījums nebalstījās uz šķeltnes diagnozi un smaguma pakāpi. Pētījuma autori izpētīja *TIMP-1* un *MMP-9* koncentrāciju lūpas plastikas laikā iegūtajā materiālā: gan epitēlijā, gan saistaudos. Pacienti tika iedalīti divās grupās: pirmajā grupā audi tika paņemti no zīdaiņiem, kuriem operācija veikta septiņu dienu vecumā, otrajā grupā audi tika paņemti no zīdaiņiem, kuriem operācija tika veikta divu līdz četrus mēnešu vecumā. Pētnieki agrīnu operāciju laikā paņemtajos audos konstatēja samazinātu *TIMP-1* daudzumu saistaudos ($p = 0,018$), bet *MMP-9* daudzums gan epitēlijā, gan saistaudos bija palielināts (Blaha et al., 2013). Augsts *MMP-9* līmenis apstiprina arī kolagēna produkcijas un degradācijas procesu, kā arī atšķirīgu brūces reorganizācijas kinētiku (Gawronska-Kozak, 2011). Divu līdz četrus mēnešu vecu zīdaiņu operācijas laikā iegūtajos audos tika konstatēts palielināts *TIMP-1* un samazināts *MMP-9* daudzums. Iespējams, ka zems *TIMP-1*, *TIMP-2* līmenis saistaudos kavē rētaudu veidošanos, savukārt paaugstināts rada pretēju efektu (Chen et al., 2007).

Šajā pētījumā konstatējām samazinātu *MMP-8* klātbūtni abpusēju caurejošu šķeltnu cieto aukslēju epitēlijaudos ($p < 0,05$), kamēr lūpas plastikas laikā iegūtajos audos *MMP-8* tika konstatēts pārliecinoši daudz ($p < 0,05$), liecinot, ka šim enzīmam ir nozīme šķeltnu skarto audu remodelācijā. Atradām ciešu negatīvu korelāciju ar bērna vecumu mēnešos ($r_s = -0,868$; $p < 0,05$).

Literatūrā netika atrasti pārliecinoši ziņojumi par šī enzīma nozīmi aukslēju ontogēnēzē un saistībā ar lūpu un aukslēju šķeltnēm, kā arī ekspresijas mainību saistībā ar bērna vecumu, un ir maz nopublicētu pētījumu par šī faktora lokālu ekspresiju lūpu un aukslēju šķeltnu skartajos audos saistībā ar brūces dzīšanas, audu remodelācijas un homeostāzes procesiem, lai gan *MMP-8* ir plaši izplatīts audos un to ekspresē dažādas šūnas - epitēlijšūnas, fibroblasti, makrofāgi u.c. (Van Lint and Libert, 2006). Ir zināms, ka kraniofaciālā rajona audi primāri attīstās no nervu kores šūnām, un zinātnieki ir pierādījuši *MMP-8* klātbūtni dažādos embrionālos audos, tostarp nervu kores šūnās (Giambernardi et al., 2001). Turklāt Korpi ar līdzautoriem norāda, ka *MMP-8* spēj modulēt iekaisuma procesu un kolagēna metabolismu alveolārā kaulā un mutes dobuma gļotādā, tādējādi ietekmējot brūces dzīšanu (Korpi et al., 2008). Pētījumā ar cilvēka periodontālās saites audu paraugiem tika pierādīts, ka *MMP-8* ekspresija samazinās, palielinoties cilvēka vecumam (Grzibovskis et al., 2011).

Mūsu pētījumā tika izvērtēta *TIMP-2* klātbūtne trīs līdz sešus mēnešus vecu zīdaiņu lūpas plastikas laikā iegūtajā materiālā. Tika atklāta statistiski nozīmīga *TIMP-2* samazināta klātbūtne mīksto un cieto aukslēju plastikas laikā iegūtajā materiālā, salīdzinot ar lūpas

plastikas laikā iegūtajiem audu paraugiem no bērniem ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni, turklāt novērotā saistība saglabājās arī, aprēķinot Bonferoni korekciju ($p < 0,05$), kas norāda uz iegūtā rezultāta būtiskumu. *TIMP-2* samazināta ekspresija tika novērota epitēlijšūnās. Šo faktu varētu skaidrot ar *TIMP-2* spēcīgu inhibējošo nozīmi audu deģenerācijā mīksto un cieto aukslēju šķeltnes skartajos audos, kamēr palielināta *TIMP-2* klātbūtne varētu liecināt par augšlūpas brūces dzīšanu ar lielāku rētaudu veidošanās risku. Šie dati atbilst uzskatam, ka *TIMP-2* atkarīga, precīzi koordinēta *MMP* aktivitāte nosaka veiksmīgu aukslēju aizmetņu saplūšanu, proti, ka izmainīta *Timp-2* ekspresija un funkcionālā aktivitāte kavē aukslēju aizmetņu saplūšanu un epitēlija transformāciju mezenhīmā (Verstappen and Von den Hoff et al., 2006).

Pētījumā ar cilvēka audu paraugiem ir uzrādīta *TIMP-2* gēna saistība ar nesindromālām lūpas un aukslēju šķeltnēm Eiropas populācijā, un nesenā 2014. gada pētījumā tika identificēts *TIMP-2* promotera polimorfisms, atklājot tā saistību ar šo embrionāli determinēto patoloģiju (Nikopensius et al., 2011; Letra et al., 2014).

Mēs vizualizējām nozīmīgi samazinātu *TIMP-4* klātbūtni bērniem ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni, savukārt *TIMP-4* bagātīgi saturēja vienpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma šķeltni audi ($p < 0,001$). Tomēr aukslēju plastikas laikā iegūtajos audos *TIMP-4* ekspresija pieauga ($p < 0,001$). Tika novērota pārliecinoši ticama *TIMP-4* pieaugoša ekspresija atkārtotās operācijās iegūtajos saistaudos vieniem un tiem pašiem pacientiem ar abpusēju lūpas un aukslēju šķeltni ($p < 0,05$). Šī atrade skaidrojama ar to, ka, iespējams, samazinātu *TIMP-2* ekspresiju šķeltni skartajos audos kompensē palielināta cita inhibitora, proti, *TIMP-4* lokāla ekspresija. Interesanti, ka atradām *TIMP-4* ciešu negatīvu korelāciju ar bērna vecumu mēnešos ($r_s = -0,882$; $p < 0,05$).

TIMP-4 inhibē dažādas *MMPs* un līdz ar to šim enzīmam, iespējams, ir nozīmīga loma sekundāro aukslēju morfoģenēzē. Mums nav izdevies atrast publicētus datus par *TIMP-4* lomu sejas un mutes dobuma attīstībā, tā funkcionālo nozīmi sejas šķeltni skartajos audos bērniem, kā arī par ekspresijas mainību saistībā ar bērna vecumu. Interesanti, ka līdzīgi kā *TIMP-2*, arī *TIMP-4* funkcionālā aktivitāte ir saistīta ar *MMP-2*, proti, viena no šī proteīna funkcijām ir inhibēt *MMP-2* un noteiktos apstākļos aktivēt *proMMP-2* (Wang et al., 2000). Šis proteīns inhibē arī dažādas *MMPs*, kuru loma ir pierādīta sekundāro aukslēju attīstības laikā, piemēram, *MMP-2*, *MMP-3*, *MMP-9* un *MMP-13* (Koskivirta et al., 2010). Turklāt *TIMP-4* netieši regulē *MMP-2* un *MMP-9* gēnu transkripcijas līmeņus (Zhang et al., 2003). Pētījumos tika analizēta *TIMP-4* ekspresija augošo smaganu un periodontīta skartajos audos. Domājams, ka *TIMP-4* ir būtiska nozīme periodontīta patoģenēzē (Kubota et al., 2008;

Nakasone et al., 2009). 2006. gadā *Zhang* ar līdzautoriem pierādīja ciešu saistību starp *TIMP* ekspresiju un orgānu vecuma pārmaiņām (*Zhang et al.*, 2006).

Kopumā audu degradācijas enzīmu un to endogēno inhibitoru relatīvais daudzums un sadalījums atšķirās, proti, pacientiem ar vienpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņi, kā arī kontroles gadījumos tas bija lielāks, nekā pacientiem ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņi, kas liecina par šo proteīnu nozīmi ne tikai aukslēju embrionālās attīstības laikā, kas ir pierādīts daudzos pētījumos, bet arī postnatāli, kad šķeltne jau ir attīstījusies.

Gēnu un to produktu imūnhistoķīmiskais profils šķeltnes skartajos audos. Noteikti transkripcijas faktori, augšanas faktori un gēni regulē sejas un mutes dobuma attīstību, kā arī ietekmē *MMP* un *TIMP* un citu faktoru ekspresiju. Ir atklāta transkripcijas faktora *IRF6* nozīme aukslēju ontogēnēzē, un ir atrodami pārliecinoši pētījumi par transkripcijas faktora *IRF6* būtisku lomu sindromisko un nesindromisko lūpas un aukslēju šķeltņu attīstībā (*Beaty et al.*, 2010; *Dougherty et al.*, 2013). Nesenā pētījumā tika atklāta saistība starp *IRF6* gēna V274I polimorfismu un vienpusēju caurejošu kreisās puses lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņi (*Letra et al.*, 2012). Citu autoru rezultātu dati *IRF6* saista galvenokārt ar lūpas šķeltņi, lūpas un/vai aukslēju šķeltņi un izolētu aukslēju šķeltņi (*Mostowska et al.*, 2010; *Nikopensius et al.*, 2010; *Larrabee et al.*, 2011). Vienā no pētījumiem ir publicēti rezultāti par *IRF6* kā smaguma pakāpes marķieri pacientiem ar lūpas un aukslēju šķeltņi (*Kerameddin et al.*, 2015).

Mēs identificējām pārliecinoši samazinātu *IRF6* klātbūtni bērniem ar smagāko šķeltnes veidu - abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņi ($p < 0,001$), kas norāda uz šī faktora saistību ar šķeltnes smaguma pakāpi. Jāatzīmē, ka tika konstatēta cieša, pozitīva korelācija starp *IRF6* pozitīvām epitēlijšūnām un saistaudu šūnām mīksto un cieto aukslēju plastikas laikā iegūtos audos no bērniem ar abpusēju šķeltņi ($r_s = 0,802$; $p < 0,05$; $r_s = 0,818$; $p < 0,05$). Atkārtoto operāciju laikā vieniem un tiem pašiem pacientiem atšķirības šī transkripcijas faktora klātbūtnē netika konstatētas. Šī atrade norāda uz vēl ciešāku šī faktora saistību ar šķeltnes smaguma pakāpi neatkarīgi no šķeltnes skarto audu anatomiskās lokalizācijas un operācijas veida. Mēs konstatējām palielinātu *IRF6* klātbūtni mutes dobuma epitēlijšūnās, saistaudu šūnās un mazo siekalu dziedzeru šūnās bērniem ar vienpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņi ($p < 0,001$). Interesanti, ka nesenā pētījumā tika konstatētas svarīgas *IRF6* funkcijas – epiteliocītu proliferācijas regulācija un mutes dobuma embrionālās attīstības laika peridermas veidošana (*Ke et al.*, 2015). Tika pierādīts, ka *IRF6* intensīvi ekspresējas sejas aizmetņos pirms primāro un primāro aukslēju morfoģenēzes laikā (*Washbourne and Cox*, 2006). Provizoriski pelēm

tika atklāta *IRF6* ekspresija aukslēju mediālās malas epitēlijā sekundāro aukslēju aizmetņu saplūšanas laikā, zobu aizmetņos, matu folikulos un ādā (*Kondo et al.*, 2002).

Mēs analizējām arī *RYK* gēna proteīna lokālu klātbūtni šķeltnes skartajos audos. Kopumā nav daudz pētījumu par *RYK* gēna iespējamo nozīmi lūpu un aukslēju šķeltnu etiopatogēnēzē un šķeltnēm raksturīgo fenotipisko šūnu proliferācijā, diferenciācijā un polaritātes regulēšanā postnatālajā periodā. Salīdzinot ar kontroles grupas pacientiem ($p < 0,001$), pētījumā redzējām samazinātu *RYK* imūnreaktīvo struktūru daudzumu saistaudos pacientiem ar abpusēju šķeltni lūpas plastikas laikā iegūtajos audos, kas liecina par iespējamu būtisku šī faktora nozīmi sejas šķeltnu etiopatogēnēzē. Pacientiem ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni pēc lūpas plastikas vizualizējām mazāk pozitīvas struktūras, kamēr mīksto un cieto aukslēju plastikas laikā iegūtajos audu paraugos ievērojām pieaugošu pozitivitāti ($p < 0,05$). Šo novērojumu var skaidrot ar samazinātu šūnu diferenciācijas potenciālu lūpas audos, salīdzinot ar mīksto un cieto aukslēju plastikas laikā iegūtajiem audiem.

RYK gēns ir būtisks sejas un mutes dobuma struktūru morfoģenēzi ietekmējošais faktors. *Watanabe* ar līdzautoriem norāda uz iespējamu *missense* mutāciju 1355G>A (Y452C) *RYK* gēnā un retu atsevišķu nukleotīda polimorfisma haplotipu saistību ar lūpas un/vai aukslēju šķeltnes attīstību Vjetnamas bērnu populācijā, un lūpas un/vai aukslēju, vai izolētu aukslēju šķeltnu attīstību Japānas bērnu populācijā (*Watanabe et al.*, 2006). *RYK* gēna proteīna lokalizācijas un *in situ* hibridizācijas pētījumi pierāda šī faktora ekspresiju ne tikai embrija kraniofaciālā reģiona audos, bet arī postnatāli. Turklāt tika pierādīts, ka *Ryk* gēna nepietiekama funkcionālā aktivitāte peļu embrijiem rada kraniofaciālā reģiona defektus, proti, caurejošas šķeltnes un arī skeleta defektus (*Halford et al.*, 2000).

Viens no svarīgiem sejas, skeleta un zobu attīstību ietekmējošiem faktoriem ir transkripcijas faktors *MSX1*, kas plaši ekspresējas kraniofaciālā rajona audos un veicina aukslēju priekšējās daļas attīstību (*Bush and Jiang*, 2012). Abi *MSX* saimes pārstāvji - *MSX1* un *MSX2* – atbild par sejas un mutes dobuma attīstību (*Dai et al.*, 2014). Pētījumos, kuros bija izmantoti dzīvnieki, tika atklāts, ka šis gēns regulē ETM un inducē apoptozi (*Hwang et al.*, 1998; *Lallemand et al.*, 2009). Turklāt *Nassif* ar kolēģiem pierādīja *MSX1* nozīmi peļu sejas audu remodelācijā (*Nassif et al.*, 2014). Arī nesen veiktos pētījumos tika parādīta iespējama saistība ar *MSX1* gēna ģenētiskām variācijām un nesidromālām lūpas un/vai aukslēju šķeltnēm (*Cardoso et al.*, 2013; *Ma et al.*, 2014; *Gurramkonda et al.*, 2015).

Pētījumā iegūtie rezultāti atklāja samazinātu *MSX1* pozitīvu epiteliocītu klātbūtni pacientiem ar abpusēju lūpas un aukslēju šķeltni pēc lūpas, mīksto un cieto aukslēju plastikas, salīdzinot ar pacientiem, kuriem bija vienpusēja lūpas un aukslēju šķeltne. Tas pats tika

novērots arī kontroles grupas pacientiem ($p < 0,05$). Interesanti, ka arī MSX1 pozitīvo saistaudu šūnu relatīvais daudzums materiālā, kas ņemts no pacientiem ar abpusēju šķeltni bija mazāks ($p < 0,001$), kamēr mīksto un cieto aukslēju plastikas laikā iegūtajos audu paraugos šūnu relatīvais daudzums pārliecinoši pieauga ($p < 0,001$). Tas liecina, ka MSX1 ir būtisks abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltnu skarto audu morfoloģiju raksturojošs transkripcijas faktors. Nenoliedzami, šis faktors ir iesaistīts smagākā šķeltnes veida audu remodelācijā. Izanalizējot četru gēnu proteīnu relatīvo daudzumu un sadalījumu vieniem un tiem pašiem pacientiem ontogēnētiskā aspektā, tika konstatēta tikai MSX1 pieaugoša klātbūtne atkārtoti paņemtajos audos ($p < 0,05$), kas liecina par vēl pārliecinošāku ticamību šī proteīna iesaistei smagākā šķeltnu veida šūnu proliferācijas, diferenciācijas un migrācijas regulēšanā.

Ģenētisko pētījumu rezultāti liecina par iespējamu PAX9 gēna saistību ar nesindromālām lūpas un/vai aukslēju šķeltnēm (*Sasaki et al.*, 2007; *Lee et al.*, 2012; *Küchler et al.*, 2014).

Abpusēju šķeltnu skartajos audos, kas iegūti pēc lūpas plastikas, PAX9 saturošus epiteliocītus un saistaudu šūnas redzējām nozīmīgi mazāk nekā vienpusēju šķeltnu skartajos audos ($p < 0,001$). Tika novērota pieaugoša PAX9 klātbūtne abpusēju šķeltnu mīksto un cieto aukslēju epitēlijā ($p < 0,001$). Interesanti, ka šajā pētījumā tika konstatēta asociācija starp PAX9 un MSX1 saturošām epitēlijšūnām un saistaudu šūnām, PAX9 saturošām epitēlijšūnām un saistaudu šūnām bērniem ar vienpusu caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni ($p < 0,05$). Turklāt PAX9 saturošas epitēlijšūnas korelēja ar PAX9 saturošām saistaudu šūnām bērniem ar abpusēju šķeltni cieto aukslēju plastikas laikā iegūtajā materiālā ($p < 0,05$). To varētu interpretēt kā varbūtēju apstiprinājumu *Nakatomi et al.* teorijai, apgalvojot, ka, savstarpēji mijiedarbojoties, PAX9 un MSX1 gēni regulē sejas audu morfoģenēzi, un reducēta šo gēnu proteīnu klātbūtne cilvēkam var palielināt sejas šķeltnu attīstības risku (*Nakatomi et al.*, 2010).

Izvērtējot savstarpējās asociācijas starp PAX9 un IRF6 gēnu proteīnu klātbūtni audos, tika konstatētas nozīmīgas gan ciešas, gan vidēji ciešas pozitīvas korelācijas šķeltnu skartajos audos. Šis fakts norāda uz *Song et al.* pieņēmumu, ka PAX9 un IRF6 gēnu mijiedarbībai ir potenciāli svarīga nozīme šķeltnu etioloģijā (*Song et al.*, 2013). Nobeigumā jāuzsver, ka šajā pētījumā kompleksi tika izvērtēti visu četru gēnu (PAX9, RYK, MSX1, IRF6) proteīnu savstarpējās korelācijas šķeltnu skartajos audos. Mēs atradām ciešu, pozitīvu korelāciju cieto aukslēju šķeltnu skartajos audos starp IRF6 un RYK saturošām struktūrām, kas liecina par iespējamu šo gēnu mijiedarbību aukslēju morfoģenēzē. Tā kā mums neizdevās atrast publicētus datus par šo pieņēmumu, tad šo savu atradi vērtējam kā novatorisku atklājumu.

Apoptoze un šūnu proliferācija šķeltnes mīkstajos audos. Šķeltnes skartos audus raksturo gan šūnu proliferācija, gan apoptoze. Apoptotisko šūnu relatīvais daudzums pacientiem ar vienpusēju šķeltni bija izteiktāks nekā pacientiem ar abpusēju šķeltni ($p < 0,001$). Kopumā apoptotisko šūnu relatīvais daudzums audos pacientiem ar abpusēju šķeltni bija mazāks nekā kontroles pacientiem, kaut gan statistiski ticamas atšķirības nekonstatējām. Šī atrade ir izskaidrojama ar šķeltnes smaguma pakāpi un abpusēju šķeltnu skarto audu homeostāzes īpatnībām. Šajā pētījumā redzējām arī pārliecinoši samazinātu šūnu proliferāciju bērniem ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni lūpas plastikas laikā iegūtajos audos, kamēr mīksto un cieto aukslēju plastikas laikā vizualizējām pieaugošu šūnu proliferāciju ($p < 0,05$). Iespējams, ka minētie rezultāti atspoguļo smagākā šķeltnes veida audu morfoloģiskās īpatnības. Līdz ar to šūnu proliferācijai un apoptozei ir svarīga nozīme ne tikai embrionālās attīstības laikā, bet arī postnatāli šķeltnu skarto audu homeostāzē.

Ir akceptēta pēdējo gadu publikācijās uzsvērtā programmētās šūnu nāves teorija lūpu un aukslēju aizmetņu attīstības un morfoģenēzes laikā, tomēr literatūrā ir atrodami pretrunīgi dati (*Novakovic et al.*, 2011). Pētījumā ar pelēm *Cuervo* un *Covarrubias* pierādīja apoptotisku šūnu klātbūtni, izmantojot *TUNEL* metodi priekšējā aukslēju mediālās malas epitēlija rajonā īsi pēc aukslēju aizmetņu saplūšanas, kamēr mugurējās malas epitēlija šūnu apoptoze tika saskatīta pirms aizmetņu saplūšanas. Abi zinātnieki secināja, ka mediālās malas epitēlija deģenerāciju nodrošina šūnu apoptoze un šis process aktivē bazālās membrānas degradāciju aukslēju aizmetņu saplūšanas laikā (*Cuervo and Covarrubias*, 2004). Līdzīgi rezultāti tika publicēti senākā pētījumā, kurā *Martínez-Alvarez* ar līdzautoriem vizualizēja apoptotiskas šūnas pirms aukslēju aizmetņu saplūšanas (*Martínez-Alvarez et al.*, 2000). Turpretī cita zinātnieku grupa no Japānas šim pētījumam oponentē. Tahakara ar kolektīvu *in vitro*, kultivējot peļu aukslējas un inhibējot šūnu nāvi, pierādīja, ka pilnīgs apoptozes trūkums neietekmē aukslēju saplūšanu. Šajā pētījumā šūnu nāve tika inhibēta ar kaspāzes-1, kaspāzes-3 inhibitoriem vai aurintrikarboksilskābi. Pat tad, kad šūnu nāve bija pilnīgi inhibēta, aukslēju aizmetņu saplūšana notika. Histoloģiski izmeklējot audus *in vivo*, pētnieki redzēja abu aukslēju aizmetņu malas epitēlija adhēziju, vidusšuves epitēlija izzušanu un mezenhīmas saplūšanu, keratīnu-pozitīvu epitēlijšūnu migrāciju uz deguna un mutes dobuma rajonu (*Takahara et al.*, 2004). Jāuzsver, ka abi iepriekš minētie pētījumi veikti, izmantojot eksperimenta dzīvniekus – peles. Turpretī pavisam nesenā Horvātijā veiktā pētījumā (*Vukojevic et al.*, 2012) cilvēka embrijiem un augļiem tika izvērtēta ne tikai šūnu apoptozes, bet arī šūnu proliferācija aukslēju aizmetņu audos. Šajā pētījumā, tāpat kā mūsu pētījumā, tika vizualizētas *Ki-67* pozitīvas epitēlijšūnas un apoptotiskas šūnas šķeltnes skartajos audos.

Tomēr nevar nepiebildst, ka starp mūsu pētījumu un Horvātijas pētījumu ir pētāmā audu materiāla atšķirības. Primāro aukslēju aizmetņu saplūšanas laikā *Vukojevic* ar līdzautoriem (2012) konstatēja proporcionāli samazinātu aukslēju mediālās malas epitēlija šūnu proliferāciju (no 42% līdz 32%) un šūnu apoptozi (no 11% līdz 7%) primāro aukslēju aizmetņu saplūšanas laikā, kamēr sekundāro aukslēju aizmetņu malas epitēlijā tika vizualizētas 28% proliferējošu šūnu un 5% apoptotisku šūnu. Imūnhistoķīmiski šūnu proliferācija, tāpat kā mūsu pētījumā tika vizualizēta, lietojot šūnu proliferācijas marķieri *Ki-67*, bet šūnu apoptoze tika identificēta, pielietojot *TUNEL* metodi. Šis pētījums ar cilvēka embrija audiem pierāda, ka šūnu proliferācijai un apoptozei ir būtiska nozīme ne tikai primāro un sekundāro aukslēju attīstībā, bet arī, iespējams, sejas šķeltņu etiopatogēnēzē (*Vukojevic et al.*, 2012).

Nestīna un *CD34* imūnhistoķīmiskais profils šķeltnes mīkstajos audos. Mūsu pētījumā vienaspusēju un abpusēju šķeltņu, kā arī bagātīgi kontroles pacientu gļotādā konstatējām nestīnu saturošas epitēlijšūnas un saistaudu šūnas. Salīdzinot nestīna klātbūtni materiālā, kas iegūts pēc lūpas plastikas pacientiem ar vienaspusēju šķeltni un pacientiem ar abpusēju šķeltni, tika novērotas nozīmīgas atšķirības. Abpusēju šķeltņu materiālā pozitīvu šūnu bija mazāk ($p < 0,05$). Kontroles pacientu audu paraugos tika konstatēta pārliecinoši bagātīga nestīna klātbūtne mutes dobuma gļotādā ($p < 0,001$). Šo atradi var skaidrot ar audu reģenerācijas potenciāla samazināšanos bērniem ar šķeltnēm un izteiktāk pacientiem ar abpusējām šķeltnēm.

Ir atklāts, ka nestīnu ekspresējošās šūnas spēj proliferēt, diferenciēties un migrēt. Pēc ievainojuma šūnas pastiprināti ekspresē nestīnu, un šis atklājums norāda uz būtisku šī proteīna lomu audu reģenerācijā, turklāt nestīna pieaugošu ekspresiju regulē dažādi augšanas faktori un citas signālmolekulas (*Wiese et al.*, 2004). Izmantojot dažādus cilmes šūnu marķierus, tajā skaitā nestīnu, nesenā pētījumā tika izvērtēta mutes dobuma gļotādas celmsūnu/multipotento cilmes šūnu klātbūtne, jo mutes dobuma gļotādas epitēlijā esošām celmsūnām/multipotentām cilmes šūnām ir svarīga nozīme audu homeostāzē un brūču dzīšanā. Šajā pētījumā, izmantojot imūnfluorescences metodi, netika identificēta nestīna klātbūtne gļotādā. Tajā pašā laikā *Jones* ar kolēģi apraksta nestīna ekspresiju vaigu un smaganu gļotādā (*Jones and Klein*, 2013). Interesanti, ka nestīna ekspresija tika pētīta arī normālos un patoloģiskos cilvēka zobu audos. Rezultāti pierādīja, ka nestīnam ir nozīme šūnu diferenciācijā ne tikai normālos, bet arī patoloģijas skartos audos. Interesanti, ka šī proteīna ekspresiju regulē *BMP-4* (*About et al.*, 2000).

Mūsu pētījumā visos šķeltņu gadījumos konstatējām bagātīgu *CD34* klātbūtni *lamina propria* asinsvadu sienīņās šūnās. Pārliecinoši vairāk *CD34* pozitīvu endotēlijšūnu tika

novērots šķeltņu pacientu lūpas plastikas laikā iegūtajos audos nekā kontroles pacientu audos ($p < 0,001$). Šī atrade vērtējama kā kompensatora reakcija audu pārmaiņām, stimulējot jaunu asinsvadu šūnu veidošanos.

Līdzīgu pētījumu ir veicis zinātnieku kolektīvs no Indijas. Šajā pētījumā tika izvērtēta vaskuloģenēze, kas saistīta ar mutes dobuma gļotādas fibrotiskām pārmaiņām un epitēlija atrofiju, lietojot *CD34* un *FGF* marķierus. Tika pierādīts, ka *CD34* ir tiešs mutes dobuma gļotādas vaskuloģenēzi raksturojošs faktors. Patoloģisku procesu skartajā mutes dobuma gļotādā tika atklāts statistiski ticami samazināts *CD34* pozitīvo struktūru daudzums saistībā ar mutes dobuma gļotādas atrofiju (Pandiar and Shameena, 2014). Otrs zinātnieku kolektīvs pierādīja, ka patoloģisku procesu skartajā mutes dobuma gļotādā ir palielināts *CD34* pozitīvo struktūru daudzums (Desai et al., 2010).

***TGFβ3* un *VEGF* imūnhistoķīmiskais profils šķeltnes mīkstajos audos.** Mūsu pētījumā konstatējām nozīmīgi samazinātu *TGFβ3* pozitīvu struktūru relatīvo daudzumu abpusēju šķeltņu lūpas materiālā, salīdzinot ar viensusēju šķeltņu un kontroles audu paraugiem ($p < 0,001$; $p < 0,005$). Salīdzinot osteoplastikas laikā iegūtos audu paraugus, redzējām samazinātu *TGFβ3* osteoblastu un osteocītu vidējo relatīvo daudzumu pacientiem ar abpusēju šķeltni un kontroles grupas pacientiem ($p < 0,001$). Šo faktu varētu izskaidrot ar nepietiekamu šūnu proliferāciju, diferenciāciju un apoptozi smagākā šķeltnes veida, t. i., abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņu gadījumos. Izvērtējot šī faktora klātbūtni atkārtoti paņemtos audu paraugos, vizualizējām pārliecinoši lielāku *TGFβ3* relatīvo struktūru daudzumu mīksto un cieto aukslēju plastikas laikā iegūtajos audu paraugos ($p < 0,05$). Šo atradi var skaidrot ar saglabātu pozitīvu audu kompensatoru reakciju. Turklāt tika konstatēta vidēja, pozitīva korelācija starp *TGFβ3* epitēlijā un saistaudos ($p < 0,05$). Ir zināms, ka *TGFβ3* regulē šūnu nāvi (Yu et al., 2009). Interesanti, ka šajā pētījumā atradām asociāciju starp *TGFβ3* pozitīvām struktūrām un apoptotiskām šūnām bērniem ar viensusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni ($p < 0,05$). Tā kā *TGFβ3* inducē *MMP-9* ekspresiju un aktivitāti (Hosokawa et al., 2003), tika pārbaudīts, vai starp šiem marķieriem pastāv saistība pacientiem ar šķeltnēm. Izvērtējot rezultātus, tika konstatēta vidēji cieša korelācija starp *TGFβ3* un *MMP-9* pozitīvām saistaudu šūnām un starp *MMP-9* pozitīvām saistaudu šūnām un *TGFβ3* epitēlijšūnām. Palielinoties viena faktora klātbūtnei, palielinās otra faktora klātbūtne audos, kas liecina par to, ka starp šiem diviem faktoriem pastāv cieša asociācija saistībā ar šķeltņu etiopatogēnēzi.

Tiek uzskatīts, ka *TGFβ3* signālceļš mijiedarbojas ar citu augšanas faktoru, transkripcijas faktoru vai enzīmu signālceļiem, kuri iesaistās šķeltņu patoģenēzē (Galloway et al., 2013). Piemēram, Xu ar līdzautoriem ir secinājis, ka transkripcijas faktoru

IRF6 kontrolē *TGFβ3* (Xu et al., 2006). Mūsu pētījumā bērniem ar šķeltnēm atklājām korelāciju starp *TGFβ3* un *IRF6* pozitīvām struktūrām saistaudos ($p = 0,001$). Tika izanalizētas arī citu gēnu proteīnu asociācijas ar *TGFβ3* un konstatētas vairākas gan ciešas pozitīvas, gan vidējas pozitīvas korelācijas (*MSX1*, *PAX9*, *RYK*), kas šķeltnu skartajos audos norāda uz *TGFβ3* lokālu mijiedarbību ar citiem faktoriem.

Mūsu pētījumam līdzīgi rezultāti tika iegūti 2006. gadā Itālijā. Šajā pētījumā tika izvērtēta *TGFβ3* ekspresija operācijas materiālā no bērniem ar izolētām aukslēju šķeltnēm un lūpas, alveolārā izauguma un/vai aukslēju šķeltnēm. *Rullo* ar kolēģiem bērniem ar šķeltnēm konstatēja pārliecinoši samazinātu *TGFβ3* ekspresiju epitēlijā, salīdzinot ar kontroles materiālu, kurš tika iegūts zoba ekstrakcijas laikā (*Rullo et al.*, 2006). Diemžēl pētījumā netika izvērtēta *TGFβ3* pozitivitāte saistaudos, bet mēs šī augšanas faktora klātbūtni izvērtējām saistībā ar šķeltnes smaguma pakāpi.

Turklāt tika atklāts, ka *TGFβ3* regulē osteoblastu diferenciāciju, tādējādi *TGFβ3* iesaistās kaula remodelācijā (*Bouletreau et al.*, 2000; *Chen et al.*, 2012). Kaula resorbcijas laikā osteoklasti aktivizē latentu *TGFβ3*, kas stimulē kaula formēšanos. Šis atklājums parāda, ka *TGFβ3* ir vadošais faktors kaula dzīšanas procesa fāzē - remodelācijā (*Silva et al.*, 2004). Ņemot vērā pētījuma rezultātus, tika secināts, ka *TGFβ3* ir būtisks angiogēnēzi ietekmējošais augšanas faktors lūpu un aukslēju attīstības laikā tieši vēlīnās attīstības stadijās, kad notiek peridermas šūnu izzušana un aizmetņu saplūšana (*Muraoka et al.*, 2005; *Jalali et al.*, 2012). Ir zināms, ka *TGFβ3* inducē *ETM*, regulējot šūnu proliferāciju, diferenciāciju, *ECM*, un, iespējams, arī *MEE* apoptozi (*Tian and Schiemann*, 2009; *Galloway et al.*, 2013). Pēdējo gadu publikācijās ir aprakstītas sejas aizmetņu peridermas slāņa šūnas, jo to izzušana nodrošina veiksmīgu lūpu un aukslēju aizmetņu saplūšanu. Izpētot peļu aukslēju aizmetņu audus, 2015. gada pētījumā ir pierādīts, ka *TGFβ3* regulē peridermas šūnu izzušanu, veicinot veiksmīgu aukslēju aizmetņu saplūšanu (*Hu et al.*, 2015). Japānas pētnieku grupa atklāja *TGFβ3* ekspresiju peļu lūpu aizmetņu epitēlijšūnās, savukārt *TGFβ3* trūkumu novēroja pelēm ar lūpas šķeltni. Tika atklāts interesants fakts, ka pelēm eksogēni ievadīts *TGFβ3* veicina lūpas aizmetņu saplūšanu, inducējot endotēlijšūnu diferenciāciju un veicinot mezenhīmas šūnu proliferāciju. *TGFβ3* inducē divu svarīgu angiogēnēzi veicinošo faktoru - *Flk-1* un *CD31* - ekspresiju (*Muraoka et al.*, 2005). Līdzīgi secinājumi bija publicēti 1998. gada pētījumā, kad tika novērots, ka eksogēni ievadīts *TGFβ3* vistām ar šķeltni veicina normālu aukslēju aizmetņu saplūšanu (*Sun et al.*, 1998). Ohno ar kolēģiem injicēja žurkām 0.5 ml *TGFβ3* vaigu zemgļotādā un secināja, ka šis faktors veicina epitēlizāciju un tādējādi samazina rētaudu veidošanos (*Ohno et al.*, 2011). Šī pētījuma rezultāti apstiprina faktu, ka *TGFβ3* veicina mutes dobuma gļotādas reģenerāciju. Izvērtējot *TGFβ3* funkcijas, daudzās populācijās tika

analizētas arī ģenētiskās variācijas šajā gēnā saistībā ar lūpas un aukslēju šķeltnes attīstību (Reutter et al., 2008; Suazo et al., 2010; Saleem et al., 2012; Tang et al., 2013; Mehrotra, 2015).

Mūsu iepriekšējā pētījumā (Smane et al., 2012) tika izvērtēta *IL-6* klātbūtne vienpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltnu mīkstajos un cietajos audos. Rezultātā tika saskatītas atsevišķas *IL-6* pozitīvas epitēlijšūnas un saistaudu šūnas, kā arī maz līdz vidēji daudz tika vizualizēti *IL-6* pozitīvi osteocīti un hondrocīti. Šī atrade, iespējams, parāda, ka *IL-6* ekspresiju šķeltnes skartajos audos regulē citi augšanas faktori vai signālmolekulas, kā norāda, piemēram, Baroni et al. *TGFβ3* pētījums (Baroni et al., 2003). Baroni ar kolēģiem pētīja *TGFβ3* ietekmi uz *IL-6* ekspresiju sejas šķeltnu fibroblastos. Šī pētījuma rezultāti rāda, ka *IL-6* inhibē šķeltnu fibroblastu funkciju sintezēt kolagēnu un glikoaminooglikānus, kā arī samazina tieši hialuronskābes un dermatānsulfāta sintēzi. *TGFβ3* pārliecinoši samazina fibroblastu funkciju sintezēt *IL-6*. Tātad *TGFβ3* un *IL-6* funkcionālā mijiedarbība ir iesaistīta aukslēju šķeltnes indukcijā (Baroni et al., 2003).

Savukārt Kohama ar kolēģiem demonstrēja, ka *TGFβ3* ir vadošs faktors brūces dzīšanā pēc lūpas plastikas, inducējot mezenhīmas šūnu proliferāciju un migrāciju ievainoto audu virzienā (Kohama et al., 2002). Eksperimentā ar pelēm, tika pierādīts, ka *TGFβ3* reducē rētaudu veidošanos *in vivo*. Pētījuma autori ķirurģiski izveidoja lūpas šķeltni, tad veica šķeltnes korekciju un analizēja iegūto materiālu. Trīsdesmit minūtes pēc lūpas plastikas audos tika identificēta palielināta *TGFβ3* klātbūtne, kas inducēja enzīma *MMP-9* ekspresiju un aktivitāti, kas savukārt reducēja pirmā tipa kolagēna akumulāciju un inhibēja gludo miofibrilāru aktīna ekspresiju šūnās. Pirmā tipa kolagēna akumulācija nenotiek, jo tiek inhibēta miofibroblastu diferenciācija un tādējādi arī attiecīgā kolagēna sintēze (Hosokawa et al., 2003).

Salīdzinot vienpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltnu audu paraugus, kas tika iegūti no pacientiem lūpas plastikas laikā, ar abpusēju šķeltnu audu paraugiem, atklājām, ka *VEGF* imūnreaktīvo struktūru vidējais relatīvais daudzums smagāko šķeltnu gadījumos bija samazināts ($p < 0,05$). Cieto aukslēju plastikas laikā iegūtajā materiālā *VEGF* pozitīvo struktūru daudzums bija mazāks nekā kontroles pacientiem ($p < 0,005$). Salīdzinot Sundeeps un viņa kolēģu veiktā pētījuma rezultātus, šī darba atradi var skaidrot ar, iespējams, traucētu neovaskularizāciju un reepitelizāciju lūpu un aukslēju gļotādas brūces dzīšanas procesā bērniem ar smagāko šķeltnes veidu, t.i., ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni. Tomēr atkārtotu operāciju laikā iegūtajos audu paraugos redzējām pieaugošu *VEGF* saturošo struktūru daudzumu, kas liecina par vēlīnu audu išēmiju, kas, acīmredzot, parādās ilgstošā reģenerācijas laikā.

Vaskulārais endotēlija augšanas faktors (*VEGF*) pieder pie signālmolekulu saimes, kas veido asinsvadus embrionālās attīstības un brūču dzīšanas laikā, kā arī nodrošina asinsvadu homeostāzi cilvēka organismā un spēj inhibēt apoptozi (*Ferrara et al.*, 2003; *Roy et al.*, 2006; *Andisheh-Tadbir et al.*, 2014). Pētījumos tika atklāts, ka *VEGF* un tā receptors *VEGFR-2* ekspresējas veselā cilvēka epidermā, matu folikulu ārējā epiteliālajā makstī, regulējot epiteliocītu proliferāciju un migrāciju, kā arī samazina šo šūnu adhēzijas kapacitāti (*Man et al.*, 2006; *Li et al.*, 2012). Literatūrā nav tiešu pētījumu datu par šī faktora nozīmi sejas šķeltņu attīstībā, tomēr dažu pētījumu rezultāti liek diskutēt par iespējamu šī faktora iesaistīšanos sejas šķeltņu patoģenēzē. Piemēram, *Patyna* ar kolēģiem savā pētījumā, ārstējot žurkas un trušus ar *VEGF* inhibitoru *SUTENT*® ≥ 1 mg/kg/dienā, aprakstīja lūpas un aukslēju šķeltnes attīstību trušiem (*Patyna et al.*, 2009). Savukārt citā pētījumā tika pierādīta iespējamā *TBX1* proteīna, kam ir nozīme sejas un kakla rajona asinsvadu attīstībā, loma mazo asinsvadu patoloģijā embrija audos. Mikrodelēcijas šī gēna noteiktos lokusus izraisa *Di Džordža* sindromu, kam klīniski raksturīga aukslēju šķeltne. Interesanti, ka *TBX1* proteīna ekspresija ir atkarīga no *VEGF* izoformas (*Yagi et al.*, 2003). Reducēts *VEGF* daudzums samazina *TBX1* funkciju, tāpēc var attīstīties asinsvadu malformācijas (*Stalmans et al.*, 2003). Asinsvadu veidošanās traucējumi lūpu un aukslēju aizmetņu mezenhīmā, iespējams, negatīvi ietekmē audu remodelāciju, tāpēc tiek izmainīta citu signālmolekulu ekspresija un audu saplūšana (*François-Fiquet et al.*, 2014). *Sundeep* pētījuma ietvaros tika analizēta siekalu *VEGF* saistība ar aukslēju gļotādas dzīšanas un neovaskularizācijas potenciālu pēc ievainojumiem. Tika atklāts, ka zems *VEGF* līmenis siekalās korelē ar traucētu neovaskularizāciju, reepitelizāciju un kolagēna akumulāciju, kas liecina par šī faktora nozīmi aukslēju gļotādas brūces dzīšanas procesā (*Keswani et al.*, 2013).

PGP 9.5 imūnhistoķīmiskais profils šķeltnes mīkstajos audos. Mūsu pētījumā *PGP 9.5* saturošas nervu šķiedras novērojām visos vienpusēju un abpusēju šķeltņu gadījumos. *PGP 9.5* saturēja atsevišķas nervu šķiedras epitēlijā un subepitēlijā, kā arī nervu šķiedras ap tauku dziedzeriem, matu folikuliem un asinsvadiem. Sīkas nervšķiedras tika vizualizētas tuvāk bazālajai membrānai. Arī asinsvadu sienīņās novērojām *PGP 9.5* pozitīvas nervu šķiedras. Dažos paraugos epitēlijā – *stratum basale* un *stratum spinosum* slāņos - tika konstatētas *PGP 9.5* saturošas neiroendokrīnās šūnas. Mūsu pētījuma rezultāti ir līdzīgi, tomēr nesakrīt ar pētījuma rezultātiem, kurus ieguva zinātnieki no Brazīlijas. Pēdējie izvērtēja mēles, vaigu un aukslēju gļotādas inervāciju žurkām, pielietojot imūnhistoķīmijas metodi un caurstarojošo elektronmikroskopijas analīzi. Līdzīgi mūsu pētījumam, arī *Watanabe et al.* atrada daudz *PGP 9.5* pozitīvas nervu šķiedras žurkas mutes dobuma gļotādas saistaudos (*Watanabe et al.*, 2013), lai gan kopumā tika atrasts maz līdz vidēji daudz (+/++) pozitīvu nervšķiedru. Līdzīgs,

bet senāks pētījums tika veikts 2000. gadā, analizējot žurkas cieto aukslēju gļotādas inervāciju ar *PGP 9.5*. Rezultātā tika secināts, ka cieto aukslēju gļotāda ir labi inervēta (*Mitsui et al.*, 2000). Šis fakts, iespējams, jāsaista ar atšķirībām izmeklējamajā materiālā. Abpusēju šķeltņu skartu audu materiālā saskatījām *PGP 9.5* sadalījuma atšķirības, proti, abpusēju šķeltņu materiālā *PGP 9.5* saturošo struktūru relatīvais daudzums bija samazināts, salīdzinot ar audu paraugiem no pacientiem ar vienpusēju šķeltni ($p < 0,05$), kas, iespējams, ir saistīts ar šķeltnes smaguma veidu. Turklāt ievērojām, ka mīksto aukslēju plastikas laikā iegūtajos audos *PGP 9.5* pozitīvo struktūru bija mazāk nekā lūpas un cieto aukslēju plastikas laikā iegūtajos audu paraugos ($p < 0,05$). Iespējams, mīksto aukslēju gļotāda šķeltņu pacietiem ir mazāk inervēta. *Kato et al.* veiktajā pētījumā ar dzīvnieku modeļiem tika secināts, ka cieto un mīksto aukslēju pārejas zona ir labi inervēta (*Kato et al.*, 1998), pie kam cita autora kolektīva pētījuma rezultāti liecina, ka ne tikai pārejas zona, bet arī mīksto aukslēju gļotādas rajons ir pietiekami labi inervēts (*Shimokawa et al.*, 2005). Iespējams, šie rezultāti ir saistāmi ar sugu atšķirībām.

***MMP* un *TIMP* imūnhistoķīmiskais profils šķeltnes skartajos audos.** Izvērtējot *MMP-2* un *TIMP-2* klātbūtni osteoplastikas laikā iegūtajā materiālā, pētījumā tika novērotas samazinātas šo proteīnu saturošas struktūras bērniem ar smagāko šķeltnes veidu, t.i., abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni ($p < 0,001$). Šī atrade, iespējams, skaidrojama ar to, ka pacientiem ar abpusēju šķeltni alveolārā kaula remodelācijas potenciāls ir mazāk izteikts nekā pacientiem ar vienpusēju šķeltni.

Alveolārā kaula remodelācijas molekulārie mehānismi saistībā ar sejas šķeltnēm un to ārstēšanā pielietoto osteoplastiku nav plaši pētīti. Nesenā pētījumā tika pierādīta *MMP-2* ekspresija un tā loma alveolārā kaula deģenerācijā žurkām pēc zoba ekstrakcijas (*Accorsi-Mendonça et al.*, 2008). Zinātnieki no Brazīlijas ziņoja, ka, stimulējot *MMP-2* ekspresiju, tiek sekmēta kaula remodelācija un veiksmīga brūces dzīšana (*Rocha et al.*, 2014). Turklāt tika atklāts, ka samazināta *MMP-2* funkcionālā aktivitāte negatīvi ietekmē kaula kvalitāti (*Nyman et al.*, 2011). *Kramer* ar līdzautoriem izpētīja, ka, injicējot *TIMP-2* galvaskausa kaulu defektu rajonos, tiek stimulēts dzīšanas process (*Kramer et al.*, 2008).

Alveolārā kaula šķeltne osteoplastikas laikā tiek koriģēta ar autotransplantātiem kaulaudiem no *tibia* vai *crista iliaca superior* rajona, kas mūsdienās tiek uzskatīts par zelta standartu caurejošu šķeltņu alveolārā kaula defekta ārstēšanai bērniem maiņas sakodiena vecumā (*Herford et al.*, 2007). Galvenais osteoplastikas mērķis ir piepildīt defekta vietu, stabilizēt augšžokli, aizvērt oronazālo fistulu, nodrošināt zoba erupciju un uzlabot deguna simetriju (*Bajaj et al.*, 2003). Ņemot vērā, ka alveolārā kaula dzīšana un remodelācija ir komplekss process, kuru koordinē šūnas, bioaktīvie faktori un *ECM*, stimulējot preosteoblastu

proliferāciju, diferenciāciju un migrāciju, tiek pētītas dažādu faktoru spējas ietekmēt kaula reģenerāciju. Reģenerācijas laikā tiek inducēta dažādu signālceļu kaskāde, tāpēc palielinās iekaisumu veicinošo citokīnu, angiogēnēzi un osteogēnēzi ietekmējošo augšanas faktoru ekspresija. Turklāt šiem faktoriem ir būtiska nozīme sejas kaulu un aukslēju attīstībā, kā arī skeletu veidojošo kaulu homeostāzē (Vo *et al.*, 2012).

BMP2/4 imūnhistoķīmiskais profils šķeltnes skartajos cietajos audos. Mūsu pētījumā saskatījām nozīmīgi samazinātu *BMP2/4* klātbūtni bērniem ar abpusēju šķeltni ($p < 0,001$). Samazinātu *BMP2/4* klātbūtni novērojām arī kontroles pacientu materiālā, salīdzinot ar materiālu, kas ņemts no pacientiem ar vienusēju šķeltni ($p < 0,001$). Kopumā bērniem ar vienusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni tika vizualizēta bagātīga *BMP2/4* klātbūtne kaulaudu šūnās. Tātad pacientiem ar vienusēju šķeltni kaula dzīšanas un reģenerācijas spējas pat pēc ķirurģiskas operācijas izraisītas traumas kaulā ir izteiktākas nekā pacientiem ar smagāko šķeltnes veidu un smagākos šķeltnes gadījumos kaula dzīšanas un augšanas potenciāls ir būtiski samazināts. Atrade kontroles pacientu materiālā liecina par *BMP2/4* nozīmi normālu audu funkciju regulēšanā. Šajā pētījumā veiktais atklājums parāda, ka bērniem ar abpusēju šķeltni ir samazināts kaula reģenerācijas potenciāls, tāpēc ir lielāka varbūtība, ka šiem bērniem brūce sadzīs ar paliekošu defektu. Līdzīgus rezultātus ieguva *Alarmo* un *Torrecillas-Martínez* ar kolēģiem (*Alarmo et al.*, 2013; *Torrecillas-Martínez et al.*, 2015).

Pamatojoties uz pētījumu rezultātiem, *ASV* ir apstiprināta cilvēka rekombinantā kaula morfoģenētiskā proteīna-2 (*rhBMP-2*) lietošana alveolārā kaula šķeltnes ārstēšanai (Woo, 2013). Šī augšanas faktora izmantošanai alveolārā kaula šķeltnes korekcijai ir vairākas priekšrocības: samazinās operācijas ilgums un stacionārā pavadīto dienu skaits, kā arī tiek reducēta rētaudu veidošanās. *ASV* pētnieki pierādīja, ka *rhBMP-2* lietošanas laikā kaula šķeltne tiek pilnīgi slēgta, un pieņēma, ka *rhBMP-2* var būt kā alternatīva kaula autotransplantācijai. Jāatzīmē gan, ka šajā pētījumā tika iekļauti tikai 12 bērni ar vienusēju alveolārā izauguma šķeltni, kas ir neliels pacientu skaits tik nopietnam secinājumam (*Herford et al.*, 2007).

Nesenos pētījumos ar dzīvnieku modeļiem tika pierādīts, ka arī *BMP-4* inducē cieto audu reģenerāciju (*Shi et al.*, 2013; *Shiozaki et al.*, 2013). *Torrecillas-Martínez* savā pētījumā uzsver, ka *BMP-4* veic būtisku nozīmi kaula homeostāzē un reģenerācijā pēc ķirurģiskas augšžokļa dobuma paplašināšanas (*Torrecillas-Martínez et al.*, 2015). Ir atrodami arī vairāki neseni pētījumi, kas liecina par *BMP-4* gēna pozitīvu saistību ar lūpas ar/bez aukslējas šķeltnēm dažādās populācijās (*Kempa et al.*, 2014; *Chen et al.*, 2014; *Hu et al.*, 2015). *Suzuki et al.*, pielietojot imūnhistoķīmijas metodi, identificēja *BMP-2* ekspresiju zoba

aizmetņos un žokļa rajona audos cilvēka embrijiem, kas liecina par šī proteīna nozīmi sejas un mutes dobuma audu morfoģenēzē (*Suzuki et al.*, 2001).

Alveolārā kaula pamatvielas nekologēno proteīnu un *OPG* imūnhistoķīmiskais profils. Kopumā *OC* saturošas šūnas pacientiem ar vienpusēju un abpusēju alveolārā kaula šķeltni tika konstatētas visos audu paraugos. Gan pacientiem ar šķeltni, gan kontroles pacientiem atrade bija līdzīga, kaut gan kontroles grupas pacientiem tika konstatēts statistiski ticami lielāks *OC* saturošo struktūru relatīvais daudzums ($p < 0,05$). Izvērtējot šo atradi, secinājām, ka pacientiem ar šķeltni alveolārā kaula mineralizācija noris aktīvi.

Ir pierādīta *OC* nozīme kaula mineralizācijā, kaula formēšanās un resorbcijas procesā (*Murshed et al.*, 2004). Jau kopš 1996. gada pētījumos ar pelēm pierādīts, ka *OC* trūkums palielina kaulaudu masu un ietekmē tā kvalitāti (*Ducy et al.*, 1996). Turklāt tika atklāts, ka *OC* stimulē angiogēnēzi, kas vēl vairāk apstiprina tā nozīmi kaula dzīšanā un remodelācijā (*Cantatore et al.*, 2005). *OC* ekspresija tika izvērtēta peļu alveolārā kaula dzīšanas periodā, kur tika atklāta tā pieaugoša ekspresija periodā, kad notiek intensīva kaula mineralizācija (*Rodrigues Luvizuto et al.*, 2010).

Mēs izvērtējām *OPN* klātbūtni tieši audos, kas tika iegūti no alveolārā kaula šķeltnes rajona, un identificējām nozīmīgi samazinātu *OPN* klātbūtni kontroles grupas pacientiem un bērniem ar abpusēju alveolārā izauguma šķeltni, salīdzinot ar pacientiem, kuriem bija vienpusēja šķeltne ($p < 0,001$; $p < 0,003$). Mēs konstatējām, ka šie rezultāti, pirmkārt, parāda, kāda ir šķeltnes smaguma pakāpe. Otrkārt, izvērtējot šī faktora funkcijas audos, iespējams, *OPN* samazina šūnu mobilizāciju, migrāciju, rezistenci pret apoptozi, kā arī kavē angiogēnēzi alveolārā kaula dzīšanas un remodelācijas laikā.

OPN ir potenciāls aukslēju un alveolārā kaula attīstību veicinošs faktors (*Jono et al.*, 2000). Turklāt divos nesenos pētījumos tika uzsvērtā *OPN* loma peļu aukslēju attīstībā un tika konstatētas nozīmīgas *OPN* ekspresijas izmaiņas kraniofaciālā reģiona attīstības laikā (*Mukhopadhyay et al.*, 2004). Jakobsena ar līdzautoriem savā pētījumā publicēja interesantus rezultātus par *OPN* jeb sekretorā fosfoproteīna nozīmi cilvēka aukslēju attīstībā, kā arī lūpas un aukslēju šķeltnes iespējamajā etiopatoģenēzē (*Jakobsen et al.*, 2009). Šajā pētījumā tika pielietota *Gene Chip* analīzes un kvantitatīva reversās transkripcijas un polimerāzes ķēdes reakcijas analīze (*RT-PCR*). Tika analizēti audu paraugi no pacientiem izolētu lūpas, aukslēju šķeltnes un lūpas un aukslēju šķeltnu gadījumos, kā arī imūnhistoķīmiski izanalizēta *OPN* ekspresija cilvēka embriju kraniofaciālā reģiona audos. Izmantojot *Gene Chip* un *RT-PCR* analīzi, tika konstatēta statistiski ticami palielināta *OPN* ekspresija aukslēju materiālā no pacientiem ar lūpas un aukslēju šķeltni. Turklāt, lietojot imūnhistoķīmijas metodi, *OPN* tika identificēts cilvēka embrija aukslēju audos, lai gan pētījumā ar pelēm tika atklāts, ka *OPN*

trūkums nav saistīts ne ar lūpas un/vai aukslēju šķeltnes attīstību, ne ar kaula attīstības defektiem. *OPN* deficīts ietekmē osteoklastoģenēzi *in vitro* (Rittling et al., 1998). *OPN* regulē šūnu adhēziju, migrāciju un kaula remodelāciju, kā arī ir iekaisumu veicinošais citokīns, kas kontrolē imūnās sistēmas funkcijas (Standal et al., 2004). Izmantojot dzīvniekus eksperimentos, tika atklāts, ka izmainīta *OPN* ekspresija kavē agrīnu vaskularizāciju, pārmaina *ECM* organizāciju, kā arī kaula remodelāciju (Duvall et al., 2008). Interessants pētījums tika veikts 2002. gadā. Šī pētījuma ietvaros tika pierādīts, ka imūnās sistēmas stimulācija grūsnām pelēm pēc teratogēno faktoru ekspozīcijas samazina sejas šķeltnu incidenci (Holladay et al., 2002). 2015. gada pētījumā tika atklāts, ka kaula sialoproteīna trūkums pelēm rada smagus alveolārā kaula un apakšžokļa mineralizācijas traucējumus, bet citu kraniofaciālā rajona kaulu mineralizāciju ietekmē maz (Foster et al., 2015). Šie pētījumi atklāj iespējamu imūnās sistēmas un kaula metabolisma mijiedarbības lomu lūpas un aukslēju šķeltnes attīstībā.

OPG šajā pētījumā tika izvērtēts kā spēcīgs kaula remodelāciju inhibējošais faktors. Kopumā bērniem ar abpusēju alveolārā kaula šķeltni *OPG* klātbūtne bija pārliecinoši mazāka, salīdzinot ar pacientiem, kuriem bija vienaspusēja šķeltne, un kontroles grupas pacientiem ($p < 0,001$; $p < 0,05$).

Pētījumos ar pelēm tika atklāts, ka lokāla *OPG* nepietiekamības rezultātā tiek inhibēta kaula modelācija (Dunn et al., 2007; Meijome et al., 2015). *In vivo* pētījumā tika atklāts, ka *OPG* gēna terapija aizsargā alveolāro kaulu no pārmērīgas resorbcijas, kuru ierosina periodontīts (Tang et al., 2015). Izvērtējot veiktā darba rezultātus, *OPG* atrade rāda, ka bērniem ar abpusēju alveolārā izauguma šķeltni ir samazinātas kaula aizsargspējas, kas var negatīvi ietekmēt alveolārā kaula pēcoperācijas reģenerācijas procesu.

Analizējot iegūto rezultātu korelācijas, tika konstatēts, ka pastāv statistiski ticama cieša korelācija starp *OC*, *OP* un, *OPG* kaulaudos, kas iegūti no pacientiem ar vienaspusēju šķeltni. Proti, palielinoties *OC* ekspresijai, pieaug arī *OP* un *OPG* ekspresija, kā arī, palielinoties *OP* ekspresijai, pieaug *OPG* ekspresija. Tas liecina par līdzsvarotu alveolārā kaula remodelācijas procesu. Pacientiem ar smagākas pakāpes šķeltni, t.i., abpusēju alveolārā kaula šķeltni, šī korelācija bija vājāk izteikta.

Diskusijas nobeigumā jāmin, ka šī darba pētījumā pirmo reizi ar imūnhistoķīmijas metodi kompleksi ir izvērtētas smagākā šķeltnu veida – abpusējas caurejošas lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltnes audu morfoloģiskās pārmaiņas ontogēnētiskajā aspektā. Izvērtējot *MMP* un *TIMP* klātbūtni caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltnu skartajos audos, skaidri redzams, ka no audu deģenerācijas faktoriem abpusēju šķeltnu pacietu audos dominē *MMP-2*, bet kā inhibējošais faktors - *TIMP-2*. Interesanti, ka pacientiem ar

vienpusēju šķeltni pārliecinoši tika vizualizēta *MMP-9* un *TIMP-4* dominējoša klātbūtne. Tā kā ir pierādīts, ka paaugstināts *MMP-9* līmenis reducē rētaudu veidošanos, tad tiek secināts, ka pacientiem ar abpusēju šķeltni ir lielāka varbūtība, ka operācijas radītas gļotādas dzīšanas fāzes tiks negatīvi ietekmētas un brūce dzīs ar palielinātu rētaudu veidošanās risku. *MMP-2* loma rētaudu veidošanās procesā joprojām ir neskaidra. Bērniem ar abpusēju šķeltni mīksto un cieto aukslēju audos tika konstatēta palielināta *MMP-9* un *TIMP-4* klātbūtne, bet *MMP-2* un *MMP-8* klātbūtne bija samazināta. Tika atrastas arī nozīmīgas korelācijas starp *MMP* un *TIMP* pozitīvām šūnām kā epitēlijā, tā saistaudos. Identificētās korelācijas parāda *MMP* un *TIMP* savstarpējo kompensatoro mijiedarbību, proti, ja ir traucēta viena faktora funkcija, tiek ietekmēta cita enzīma funkcionālā aktivitāte.

Kopumā smagākajam šķeltnes veidam – abpusējai caurejošai lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltnei – tika konstatēta samazināta transkripcijas faktora *IRF6*, *MSX1* un *PAX9*, augšanas faktora *TGFβ3* un *VEGF* klātbūtne, kā arī samazināta šūnu proliferācija un apoptoze mīkstajos audos, bet balstaudos samazināta *OPN*, *OPG*, *MMP-2*, *TIMP-2*, *BMP2/4* un *TGFβ3* klātbūtne. Pārliecinoši identificējām, ka morfoloģiskās audu izmaiņas ir smagākas pacientiem ar abpusēju šķeltni. Atkārtotu operāciju laikā vieniem un tiem pašiem pacientiem darbā novērojām palielinātu *MSX1*, *MMP-9*, *TIMP-4*, *TGFβ3*, *Ki-67* un samazinātu *VEGF* ekspresiju.

5. SECINĀJUMI

1. Abpusēju lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņu pacientu audos raksturīgās galvenokārt nespecifiskās pārmaiņas ir mutes dobuma gļotādas epitēlija vakuolizācija un/vai bazālā slāņa šūnu hiperplāzija, epitēlija tīklveida izaugumu veidošanās, kā arī saistaudu fibroze un izteikta neovaskularizācija *lamina propria*, bet kaulaudos - neregulārs osteonu izvietojums kaulā ar perēkļveida saistaudu proliferāciju.
2. Abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņu pacientu lūpas plastikas laikā iegūtajā materiālā ir izteikta deģenerācijas enzīma *MMP-2* klātbūtne un tā inhibitora *TIMP-2* klātbūtne, kamēr vienpusēju šķeltņu materiālā dominē *MMP-8* un *MMP-9*, un *TIMP-4* ekspresija. *MMP-9* palielināta ekspresija liecina par pēcooperācijas audu dzīšanu bez nozīmīgi paliekošiem rētaudiem bērniem ar vienpusēju caurejošu šķeltņi. Abpusējas caurejošas šķeltnes skartajos audos deģenerācijas enzīma *MMP-8* ekspresija samazinās un to inhibitora *TIMP-4* ekspresija palielinās, pieaugot bērna vecumam.
3. Abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņu pacientiem mazā *MSX1*, *IRF6* un *PAX9* ekspresija mutes dobuma audos saistīta ar samazinātu šūnu proliferāciju, diferenciāciju, migrāciju, atjaunošanos, kā arī programmētās šūnu nāves kavēšanu, nosakot smagu šķeltnes veidu. Toties pieaugoša *IRF6*, *PAX9* ekspresija nosaka šūnu migrācijas funkcionālo aktivitāti un šūnu proliferāciju, diferenciāciju šķeltnes skartajos mīksto un cieto aukslēju audos. Būtiskā statistiski ticama korelācija starp *PAX9* un *IRF6*, kā arī starp *PAX9* un *MSX1*, *IRF6* un *RYK* ekspresiju mīkstajos audos norāda uz morfoģenētisku savstarpējo gēnu ietekmi šķeltnes gadījumos.
4. Abpusēju caurejošu šķeltņu skartos mīkstos audus raksturo izteikti nabadzīga transformējošā augšanas faktora beta-3 (*TGFβ3*) klātbūtne, kas liecina par nepietiekošu šūnu migrāciju, proliferāciju, diferenciāciju un apoptozi smagākam šķeltnes veidam, kamēr kaulaudus raksturo statistiski izteiktāka šī faktora ekspresija, liecinot par kompensatoru blakus novietoto audu reakciju un faktora būtisku nozīmi noteikta šķeltņu veida patoģenēzē.
5. Abpusēju šķeltņu skartos mīkstos audus raksturo samazināta vaskulārā endotēlija augšanas faktora (*VEGF*) klātbūtne, kas norāda uz sākotnēju išēmijas trūkumu audos un, iespējams, saistīta ar izmainītu neovaskularizāciju un reepitelizāciju. Vienpusēju un abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņu skartos mīkstos audus raksturo izteikta *CD34* ekspresija, kas norāda uz paaugstinātu asinsvadu šūnu veidošanās lokālo potenciālu.

6. Abpusējas caurejošas lūpas, alveolāra izauguma un aukslēju šķeltnes gadījumā statistiski samazināta nestīna saturošo šūnu klātbūtne lūpas plastikas laikā iegūtajos audos pamato neirālas izcelsmes šūnu diferenciācijas ierobežošanu.
7. Apoptotisko šūnu relatīvā daudzuma samazināšanās abpusēju šķeltnu pacientiem liecina par mīksto audu remodelācijas mazināšanos smagākam šķeltnes veidam.
8. Statistiski ticami kaula morfoģenētiskā proteīna 2/4 (*BMP2/4*), transformējošā augšanas faktora beta-3 (*TGFβ3*), matricas metaloproteināzes-2 (*MMP-2*), matricas metaloproteināzes-2 audu inhibitora (*TIMP-2*) saturošo struktūru relatīvā daudzuma samazināšanās abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltnu pacientiem liecina par alveolārā kaula reģenerācijas un remodelācijas procesu mazināšanos.
9. Statistiski ticama osteoproteģerīna (*OPG*) un osteopontīna (*OPN*) relatīvā daudzuma samazināšanās abpusēju alveolārā izauguma šķeltnu pacientiem pierāda kaulaudu šūnu funkcionālās aktivitātes, vienlaikus šūnu proliferācijas potenciāla samazināšanos un kaula rezorbcijas palielināšanos smagākam šķeltnes veidam, bet uz praktiski neizmainītas mineralizācijas fona (*OC*).
10. Abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltnu audiem raksturīga pieaugoša *MSX1*, *MMP-9*, *TIMP-4*, *TGFβ3*, *Ki-67* un samazināta *VEGF* ekspresija ontogēnēzē, kas norāda uz šo faktoru dominējošo lomu šķeltnes skarto audu kompensatoro iespēju regulēšanā pēc atkārtotām operācijām.
11. Abpusēju šķeltnu audus un īpaši, mīkstās aukslējas, raksturo samazināta neuropeptīdu saturošā inervācija. Šī īpatnība raksturo slimības smaguma pakāpi, kas tāda izveidojas, visticamāk, audu trūkuma dēļ un arī nestīna saturošo neirālo priekšteču deficīta dēļ.

6. LITERATŪRAS SARAKSTS

1. About I., Laurent-Maquin D., Lendahl U., Mitsiadis T. A. Nestin expression in embryonic and adult human teeth under normal and pathological conditions. *Am J Pathol.* 2000; 157(1): 287–295.
2. Accorsi-Mendonça T., Paiva K. B., Zambuzzi W. F., Cestari T. M., et al. Expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 and RECK during alveolar bone regeneration in rat. *J Mol Histol.* 2008; 39(2): 201–208.
3. Ahmed S., Liu C. C., Nawshad A. Mechanisms of palatal epithelial seam disintegration by transforming growth factor (TGF) beta3. *Dev Biol.* 2007; 309(2): 193–207.
4. Alappat S., Zhang Z. Y., Chen Y. P. Msx homeobox gene family and craniofacial development. *Cell Res.* 2003; 13(6): 429–442.
5. Alarmo E. L., Huhtala H., Korhonen T., Pylkkänen L., et al. Bone morphogenetic protein 4 expression in multiple normal and tumor tissues reveals its importance beyond development. *Mod Pathol.* 2013; 26(1):10–21.
6. Ali A. A., Hussien N. F., Samy R. M., Hussein K. A. Polymorphisms of Vascular Endothelial Growth Factor and Retinopathy of Prematurity. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus.* 2015; 14: 1–10.
7. Amoh Y., Aki R., Hamada Y., Niiyama S., et al. Nestin-positive hair follicle pluripotent stem cells can promote regeneration of impinged peripheral nerve injury. *J Dermatol.* 2012; 39(1): 33–38.
8. Amoh Y., Li L., Katsuoka K., Hoffman R. M. Multipotent nestin-expressing hair follicle stem cells. *J Dermatol.* 2009; 36(1): 1–9.
9. Andisheh-Tadbir A., Hamzavi M., Rezvani G., Ashraf M. J., et al. Tissue expression, serum and salivary levels of vascular endothelial growth factor in patients with HNSCC. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2014; 80(6): 503–507.
10. Anura A., Das R. K., Pal M., Paul R. R., et al. Correlated analysis of semi-quantitative immunohistochemical features of E-cadherin, VEGF and CD105 in assessing malignant potentiality of oral submucous fibrosis. *Pathol Res Pract.* 2014; 210(12): 1054–1063.
11. Aoki S., Honma M., Kariya Y., Nakamichi Y., et al. Function of OPG as a traffic regulator for RANKL is crucial for controlled osteoclastogenesis. *J Bone Miner Res.* 2010; 25(9): 1907–1921.
12. Apte S. S., Parks W. C. Metalloproteinases: A parade of functions in matrix biology and an outlook for the future. *Matrix Biol.* 2015; 44–46C:1–6.
13. Arosarena O. A. Cleft lip and palate. *Otolaryngol Clin North Am.* 2007; 40(1): 27–60.
14. Arpino V., Brock M., Gill S. E. The role of TIMPs in regulation of extracellular matrix proteolysis. *Matrix Biol.* 2015; 44–46C: 247–254.
15. Arya R., White K. Cell death in development: Signaling pathways and core mechanisms. *Semin Cell Dev Biol.* 2015; 39: 12–19.
16. Baek J. A., Lan Y., Liu H., Maltby K. M., et al. Bmpr1a signaling plays critical roles in palatal shelf growth and palatal bone formation. *Dev Biol.* 2011; 350(2): 520–531.
17. Bajaj A. K., Wongworawat A. A., Punjabi A. Management of alveolar clefts. *J Craniofac Surg.* 2003; 14(6): 840–6.
18. Baroni T., Carinci P., Bellucci C., Lilli C., et al. Cross-talk between interleukin-6 and transforming growth factor-beta3 regulates extracellular matrix production by human fibroblasts from subjects with non-syndromic cleft lip and palate. *J Periodontol.* 2003; 74(10): 1447–1453.
19. Baud'huin M., Duplomb L., Teletchea S., Lamoureux F., et al. Osteoprotegerin: multiple partners for multiple functions. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2013; 24(5): 401–409.
20. Beaty T. H., Murray J. C., Marazita M. L., Munger R. G., et al. A genome-wide association study of cleft lip with and without cleft palate identifies risk variants near MAFB and ABCA4. *Nat Genet.* 2010; 42(6): 525–529.

21. Ben J., Jabs E. W., Chong S. S. Genomic, cDNA and embryonic expression analysis of zebrafish IRF6, the gene mutated in the human oral clefting disorders Van der Woude and popliteal pterygium syndromes. *Gene Expr Patterns*. 2005; 5(5): 629–638.
22. Berdal A., Molla M., Hotton D., Aïoub M., et al. Differential impact of MSX1 and MSX2 homeogenes on mouse maxillofacial skeleton. *Cells Tissues Organs*. 2009; 189(1-4): 126–132.
23. Berndt J. D., Aoyagi A., Yang P., Anastas J. N., et al. Mindbomb 1, an E3 ubiquitin ligase, forms a complex with RYK to activate Wnt/ β -catenin signaling. *J Cell Biol*. 2011; 194(5): 737–750.
24. Birnbaum S., Ludwig K. U., Reutter H., Herms S., et al. IRF6 gene variants in Central European patients with non-syndromic cleft lip with or without cleft palate. *Eur J Oral Sci*. 2009; 117(6): 766–769.
25. Blackburn J., Ohazama A., Kawasaki K., Otsuka-Tanaka Y., et al. The role of Irf6 in tooth epithelial invagination. *Dev Biol*. 2012; 365(1): 61–70.
26. Blaha K., Borsky J., Kasparova M., Steklacova A., et al. Concentrations of MMP-9 and TIMP-1 in lip tissue and their impact on cleft lip surgery healing. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2013; 157(4): 363–366.
27. Blavier L., Lazaryev A., Groffen J., Heisterkamp N., et al. TGF-beta3-induced palatogenesis requires matrix metalloproteinases. *Mol Biol Cell*. 2001; 12(5): 1457–1466.
28. Bodo M., Baroni T., Carinci F., Becchetti E., et al. TGFbeta isoforms and decorin gene expression are modified in fibroblasts obtained from non-syndromic cleft lip and palate subjects. *J Dent Res*. 1999; 78(12): 1783–1790.
29. Bonilla-Claudio M., Wang J., Bai Y., Klysik E., et al. Bmp signaling regulates a dose-dependent transcriptional program to control facial skeletal development. *Development*. 2012; 139(4): 709–719.
30. Boulais N., Misery L. The epidermis: a sensory tissue. *Eur J Dermatol*. 2008; 18(2): 119–127.
31. Bouletreau P. J., Steinbrech D., Spector J. A., Warren S. M., et al. Gene expression of transforming growth factor-beta 3 and tissue inhibitor of metalloproteinase type 1 during membranous bone healing in rats. *J Craniofac Surg*. 2000; 11(6): 521–526.
32. Bragdon B., Moseychuk O., Saldanha S., King D., et al. Bone morphogenetic proteins: a critical review. *Cell Signal*. 2011; 23(4): 609–620.
33. Brown G. D., Nazarali A. J. Matrix metalloproteinase-25 has a functional role in mouse secondary palate development and is a downstream target of TGF- β 3. *BMC Dev Biol*. 2010; 10: 93.
34. Brown N. L., Yarram S. J., Mansell J. P., Sandy J. R. Matrix metalloproteinases have a role in palatogenesis. *J Dent Res*. 2002; 81(12): 826–830.
35. Brunetti G., Oranger A., Mori G., Tamma R., et al. TRAIL is involved in human osteoclast apoptosis. *Ann N Y Acad Sci*. 2007; 1116: 316–322.
36. Buckley J. J., Jessen J. R. Matrix metalloproteinase function in non-mammalian model organisms. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2015; 7: 168–183.
37. Burdi A. R. Cleft lip and palate, 2nd ed. Berlin: Springer-Verlag, 2006, , 3. – 12. pp.
38. Bush J. O., Jiang R. Palatogenesis: morphogenetic and molecular mechanisms of secondary palate development. *Development*. 2012; 139(2): 231–243.
39. Cano A., Pérez-Moreno M. A., Rodrigo I., Locascio A., et al. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol*. 2000; 2(2): 76–83.
40. Cantatore F. P., Crivellato E., Nico B., Ribatti D. Osteocalcin is angiogenic in vivo. *Cell Biol Int*. 2005; 29(7): 583–585.
41. Cardoso M. L., Bezerra J. F., Oliveira G. H., Soares C. D., et al. MSX1 gene polymorphisms in non-syndromic cleft lip and/or palate. *Oral Dis*. 2013; 19(5): 507–512.
42. Carter T. C., Molloy A. M., Pangilinan F., Troendle J. F., et al. Testing reported associations of genetic risk factors for oral clefts in a large Irish study population. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2010; 88(2): 84–93.

43. Chai Y., Maxson R. E. Jr. Recent advances in craniofacial morphogenesis. *Dev Dyn.* 2006; 235(9): 2353–2375.
44. Chamoux E., Houde N., L'Eriger K., Roux S. Osteoprotegerin decreases human osteoclast apoptosis by inhibiting the TRAIL pathway. *J Cell Physiol.* 2008; 216(2): 536–542.
45. Che N., Li Y., Liu S., Pan W., et al. Investigation on association between five common polymorphisms in vascular endothelial growth factor and prototypes of autoimmune diseases. *Immunobiology.* 2015; 220(6): 722–733.
46. Chen D., Zhao M., Mundy G. R. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors.* 2004; 22(4): 233–241.
47. Chen G., Deng C., Li Y. P. TGF- β and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *Int J Biol Sci.* 2012; 8(2): 272–288.
48. Chen H. L., Yuh C. H., Wu K. K. Nestin is essential for zebrafish brain and eye development through control of progenitor cell apoptosis. *PLoS One.* 2010; 5(2): e9318.
49. Chen Q., Wang H., Schwender H., Zhang T., et al. Joint testing of genotypic and gene-environment interaction identified novel association for BMP4 with non-syndromic CL/P in an Asian population using data from an International Cleft Consortium. *PLoS One.* 2014; 9(10): e109038.
50. Chen W., Fu X., Ge S., Sun T., et al. Differential expression of matrix metalloproteinases and tissue-derived inhibitors of metalloproteinase in fetal and adult skins. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39(5): 997–1005.
51. Chi N., Epstein J. A. Getting your Pax straight: Pax proteins in development and disease. *Trends Genet.* 2002; 18(1): 41–47.
52. Chiquet B. T., Blanton S. H., Burt A., Ma D., et al. Variation in WNT genes is associated with non-syndromic cleft lip with or without cleft palate. *Hum Mol Genet.* 2008; 17(14): 2212–2218.
53. Choi S. J., Marazita M. L., Hart P. S., Sulima P. P., et al. The PDGF-C regulatory region SNP rs28999109 decreases promoter transcriptional activity and is associated with CL/P. *Eur J Hum Genet.* 2009; 17(6): 774–784.
54. Cuervo R., Covarrubias L. Death is the major fate of medial edge epithelial cells and the cause of basal lamina degradation during palatogenesis. *Development.* 2004; 131(1): 15–24.
55. Dai J., Mou Z., Shen S., Dong Y., et al. Bioinformatic analysis of Msx1 and Msx2 involved in craniofacial development. *J Craniofac Surg.* 2014; 25(1): 129–134.
56. Dang C. M., Beanes S. R., Lee H., Zhang X., et al. Scarless fetal wounds are associated with an increased matrix metalloproteinase-to-tissue-derived inhibitor of metalloproteinase ratio. *Plast Reconstr Surg.* 2003; 111(7): 2273–2285.
57. Day I. N., Thompson R. J. UCHL1 (PGP 9.5): neuronal biomarker and ubiquitin system protein. *Prog Neurobiol.* 2010; 90(3): 327–362.
58. De Coster P. J., Mortier G., Marks L. A., Martens L. C. Cranial suture biology and dental development: genetic and clinical perspectives. *J Oral Pathol Med.* 2007; 36(8): 447–455.
59. de Oliveira Demarchi A. C., Zambuzzi W. F., Paiva K. B., da Silva-Valenzuela Md., 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): 61–69.
60. Deary I. J., Bell P. J., Bell A. J., Campbell M. L., et al. Sensory discrimination and intelligence: testing Spearman's other hypothesis. *Am J Psychol.* 2004; 117(1): 1–18.
61. Del Barrio M. G., Nieto M. A. Relative expression of Slug, RhoB, and HNK-1 in the cranial neural crest of the early chicken embryo. *Dev Dyn.* 2004; 229(1): 136–139.
62. Desai R. S., Mamatha G. S., Khatri M. J., Shetty S. J. Immunohistochemical expression of CD34 for characterization and quantification of mucosal vasculature and its probable role in malignant transformation of atrophic epithelium in oral submucous fibrosis. *Oral Oncol.* 2010; 46(7): 553–558.
63. Dixon M. J., Marazita M. L., Beaty T. H., Murray J. C. Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences. *Nat Rev Genet.* 2011; 12(3): 167–178.

64. Dong R., Liu X., Fan M., Yang L., et al. Isolation and differentiation of nestin positive cells from rat oral mucosal lamina propria. *Differentiation*. 2010; 79(1): 9–14.
65. Dougherty M., Kamel G., Grimaldi M., Gfrerer L., et al. Distinct requirements for wnt9a and irf6 in extension and integration mechanisms during zebrafish palate morphogenesis. *Development*. 2013; 140(1): 76–81.
66. Ducy P., Desbois C., Boyce B., Pinero G., et al. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature*. 1996; 382(6590): 448–452.
67. Dudas M., Li W. Y., Kim J., Yang A., et al. Palatal fusion - where do the midline cells go? A review on cleft palate, a major human birth defect. *Acta Histochem*. 2007; 109(1): 1–14.
68. Dunn M. D., Park C. H., Kostenuik P. J., Kapila S., et al. Local delivery of osteoprotegerin inhibits mechanically mediated bone modeling in orthodontic tooth movement. *Bone*. 2007; 41(3): 446–455.
69. Duvall C. L., Weiss D., Robinson S. T., Alameddine F. M., et al. The role of osteopontin in recovery from hind limb ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008; 28(2): 290–295.
70. Eger A., Stockinger A., Schaffhauser B., Beug H., et al. Epithelial mesenchymal transition by c-Fos estrogen receptor activation involves nuclear translocation of beta-catenin and upregulation of beta-catenin/lymphoid enhancer binding factor-1 transcriptional activity. *J Cell Biol*. 2000; 148(1): 173–188.
71. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007; 35(4): 495–516.
72. Farronato G., Kairyte L., Giannini L., Galbiati G., et al. How various surgical protocols of the unilateral cleft lip and palate influence the facial growth and possible orthodontic problems? Which is the best timing of lip, palate and alveolus repair? literature review. *Stomatologija*. 2014; 16(2): 53–60.
73. Ferrara N., Gerber H. P., LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003; 9(6): 669–676.
74. Ferron M., Lacombe J. Regulation of energy metabolism by the skeleton: osteocalcin and beyond. *Arch Biochem Biophys*. 2014; 561: 137–146.
75. Finnerty J. R., Mazza M. E., Jezewski P. A. Domain duplication, divergence, and loss events in vertebrate Msx paralogs reveal phylogenomically informed disease markers. *BMC Evol Biol*. 2009; 9: 18.
76. Fleming J. A., Song G., Choi Y., Spencer T. E., et al. Interferon regulatory factor 6 (IRF6) is expressed in the ovine uterus and functions as a transcriptional activator. *Mol Cell Endocrinol*. 2009; 299(2): 252–260.
77. Foster B. L., Ao M., Willoughby C., Soenjaya Y., et al. Mineralization defects in cementum and craniofacial bone from loss of bone sialoprotein. *Bone*. 2015; 78: 150–164.
78. François-Fiquet C., Poli-Merol M. L., Nguyen P., Landais E., et al. Role of angiogenesis-related genes in cleft lip/palate: review of the literature. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2014; 78(10): 1579–1585.
79. Freitas J. A., Garib D. G., Trindade-Suedam I. K., Carvalho R. M., et al. Rehabilitative treatment of cleft lip and palate: experience of the Hospital for Rehabilitation of Craniofacial Anomalies-USP (HRAC-USP)—part 3: oral and maxillofacial surgery. *J Appl Oral Sci*. 2012; 20(6): 673–679.
80. Gaffney J., Solomonov I., Zehorai E., Sagi I. Multilevel regulation of matrix metalloproteinases in tissue homeostasis indicates their molecular specificity in vivo. *Matrix Biol*. 2015; 44–46C: 191–199.
81. Galloway J. L., Jones S. J., Mossey P. A., Ellis I. R. The control and importance of hyaluronan synthase expression in palatogenesis. *Front Physiol*. 2013; 4: 10.
82. Gawronska-Kozak B. Scarless skin wound healing in FOXN1 deficient (nude) mice is associated with distinctive matrix metalloproteinase expression. *Matrix Biol*. 2011; 30(4): 290–300.
83. Genç B., Lagrimas A. K., Kuru P., Hess R., et al. Visualization of Sensory Neurons and Their Projections in an Upper Motor Neuron Reporter Line. *PLoS One*. 2015; 10(7): e0132815.

84. Giambernardi T. A., Sakaguchi A. Y., Gluhak J., Pavlin D., et al. Neutrophil collagenase (MMP-8) is expressed during early development in neural crest cells as well as in adult melanoma cells. *Matrix Biol.* 2001; 20(8): 577–587.
85. Girardi A., Martinelli M., Cura F., Palmieri A., et al. RFC1 and non-syndromic cleft lip with or without cleft palate: an association based study in Italy. *J Craniomaxillofac Surg.* 2014; 42(7): 1503–1505.
86. Gong S. G., Guo C. Bmp4 gene is expressed at the putative site of fusion in the midfacial region. *Differentiation.* 2003; 71(3): 228–236.
87. Gonzalez D. M., Medici D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Sci Signal.* 2014; 7(344): re8.
88. Graham A., Begbie J., McGonnell I. Significance of the cranial neural crest. *Dev Dyn.* 2004; 229(1): 5–13.
89. Grzibovskis M., Urtane I., Pilmane M. Specific signaling molecule expression in periodontal ligaments in different age groups: pilot study. *Stomatologija.* 2011; 13(4): 117–122.
90. Gurramkonda V. B., Hussain Syed A., Murthy J., Lakkakula B. V. Evidence of the involvement of the polymorphisms near MSX1 gene in non-syndromic cleft lip with or without cleft palate. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2015; 79(7): 1081–1084.
91. Haigh J. J., Gerber H. P., Ferrara N., Wagner E. F. Conditional inactivation of VEGF-A in areas of collagen2a1 expression results in embryonic lethality in the heterozygous state. *Development.* 2000; 127(7): 1445–1453.
92. Halford M. M., Armes J., Buchert M., Meskenaitė V., et al. Ryk-deficient mice exhibit craniofacial defects associated with perturbed Eph receptor crosstalk. *Nat Genet.* 2000; 25(4): 414–418.
93. Halford M. M., Macheda M. L., Parish C. L., Takano E. A., et al. A fully human inhibitory monoclonal antibody to the Wnt receptor RYK. *PLoS One.* 2013; 8(9): e75447.
94. Halford M. M., Stacker S. A. Revelations of the RYK receptor. *Bioessays.* 2001; 23(1): 34–45.
95. Hankins H. M., Baldrige R. D., Xu P., Graham T. R. Role of flippases, scramblases and transfer proteins in phosphatidylserine subcellular distribution. *Traffic.* 2015; 16(1): 35–47.
96. Herford A. S., Boyne P. J., Rawson R., Williams R. P. Bone morphogenetic protein-induced repair of the premaxillary cleft. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007; 65(11): 2136–2141.
97. Hilliges M., Hellman M., Ahlström U., Johansson O. Immunohistochemical studies of neurochemical markers in normal human buccal mucosa. *Histochemistry.* 1994; 101(4): 235–244.
98. Hirata A., Katayama K., Tsuji T., Natsume N., et al. Heparanase localization during palatogenesis in mice. *Biomed Res Int.* 2013; 2013: 760236.
99. Holladay S. D., Sharova L. V., Punareewattana K., Hrubec T. C., et al. Maternal immune stimulation in mice decreases fetal malformations caused by teratogens. *Int Immunopharmacol.* 2002; 2(2-3): 325–332.
100. Hosokawa R., Nonaka K., Morifuji M., Shum L., et al. TGF-beta 3 decreases type I collagen and scarring after labioplasty. *J Dent Res.* 2003; 82(7): 558–564.
101. Hsu S. M., Raine L., Fanger H. The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase techniques. *Am J Clin Pathol.* 1981; 75(6): 816–821.
102. Hu L., Liu J., Li Z., Ozturk F., et al. TGFβ3 regulates periderm removal through ΔNp63 in the developing palate. *J Cell Physiol.* 2015; 230(6): 1212–1225.
103. Hwang S. J., Beaty T. H., McIntosh I., Hefferon T., et al. Association between homeobox-containing gene MSX1 and the occurrence of limb deficiency. *Am J Med Genet.* 1998; 75(4): 419–423.
104. Ibarra-Arce A., García-Álvarez M., Cortés-González D., Ortiz de Zarate-Alarcón G., et al. IRF6 polymorphisms in Mexican patients with non-syndromic cleft lip. *Meta Gene.* 2015; 4: 8–16.

105. Ingraham C. R., Kinoshita A., Kondo S., Yang B., et al. Abnormal skin, limb and craniofacial morphogenesis in mice deficient for interferon regulatory factor 6 (Irf6). *Nat Genet.* 2006; 38(11): 1335–1340.
106. Iseki S.. Disintegration of the medial epithelial seam: is cell death important in palatogenesis? *Dev Growth Differ.* 2011; 53(2): 259–268.
107. Iwata J., Hacia J. G., Suzuki A., Sanchez-Lara P. A., et al. Modulation of noncanonical TGF- β signaling prevents cleft palate in Tgfb β 2 mutant mice. *J Clin Invest.* 2012; 122(3): 873–885.
108. Iwata J., Suzuki A., Yokota T., Ho T. V., et al. TGF β regulates epithelial-mesenchymal interactions through WNT signaling activity to control muscle development in the soft palate. *Development.* 2014; 141(4): 909–917.
109. Iwata J., Tung L., Urata M., Hacia J. G., et al. Fibroblast growth factor 9 (FGF9)-pituitary homeobox 2 (PITX2) pathway mediates transforming growth factor β (TGF β) signaling to regulate cell proliferation in palatal mesenchyme during mouse palatogenesis. *J Biol Chem.* 2012; 287(4): 2353–2363.
110. Jakobsen L. P., Borup R., Vestergaard J., Larsen L. A., et al. Expression analyses of human cleft palate tissue suggest a role for osteopontin and immune related factors in palatal development. *Exp Mol Med.* 2009; 41(2): 77–85.
111. Jalali A., Zhu X., Liu C., Nawshad A. Induction of palate epithelial mesenchymal transition by transforming growth factor β 3 signaling. *Dev Growth Differ.* 2012; 54(6): 633–648.
112. Jang W. G., Kim E. J., Kim D. K., Ryoo H. M., et al. BMP2 protein regulates osteocalcin expression via Runx2-mediated Atf6 gene transcription. *J Biol Chem.* 2012; 287(2): 905–915.
113. Jaskoll T., Zhou Y. M., Chai Y., Makarenkova H. P., et al. Embryonic submandibular gland morphogenesis: stage-specific protein localization of FGFs, BMPs, Pax6 and Pax9 in normal mice and abnormal SMG phenotypes in Fgfr2-IIIc(+/ Δ), BMP7(-/-) and Pax6(-/-) mice. *Cells Tissues Organs.* 2002; 170(2-3): 83–98.
114. Jezewski P. A., Vieira A. R., Nishimura C., Ludwig B., et al. Complete sequencing shows a role for MSX1 in non-syndromic cleft lip and palate. *J Med Genet.* 2003; 40(6): 399–407.
115. Jiang R., Bush J. O., Lidral A. C. Development of the upper lip: morphogenetic and molecular mechanisms. *Dev Dyn.* 2006; 235(5): 1152–1166.
116. Jones K. B., Klein O. D. Oral epithelial stem cells in tissue maintenance and disease: the first steps in a long journey. *Int J Oral Sci.* 2013; 5(3): 121–129.
117. Jonker L., Kist R., Aw A., Wappler I., et al. Pax9 is required for filiform papilla development and suppresses skin-specific differentiation of the mammalian tongue epithelium. *Mech Dev.* 2004; 121(11): 1313–1322.
118. Jono S., Peinado C., Giachelli C. M. Phosphorylation of osteopontin is required for inhibition of vascular smooth muscle cell calcification. *J Biol Chem.* 2000; 275(26): 20197–20203.
119. Jugessur A., Farlie P. G., Kilpatrick N. The genetics of isolated orofacial clefts: from genotypes to subphenotypes. *Oral Dis.* 2009; 15(7): 437–453.
120. Kalibović Govorko D., Bečić T., Vukojević K., Mardešić-Brakus S., et al. Spatial and temporal distribution of Ki-67 proliferation marker, Bcl-2 and Bax proteins in the developing human tooth. *Arch Oral Biol.* 2010; 55(12): 1007–1016.
121. Kang P., Svoboda K. K. Epithelial-mesenchymal transformation during craniofacial development. *J Dent Res.* 2005; 84(8): 678–690.
122. Kang Y., Massagué J. Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell.* 2004; 118(3): 277–279.
123. Kato J., Uddman R., Sundler F., Kurisu K. Immunohistochemical study of the innervation of the boundary area of the hard and soft palates of the rat. *Acta Anat (Basel).* 1998; 163(2): 92–98.
124. Ke C. Y., Xiao W. L., Chen C. M., Lo L. J., et al. IRF6 is the mediator of TGF β 3 during regulation of the epithelial mesenchymal transition and palatal fusion. *Sci Rep.* 2015; 5: 12791.
125. Keeble T. R., Cooper H. M. Ryk: a novel Wnt receptor regulating axon pathfinding. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006; 38(12): 2011–2017.

126. Keeble T. R., Halford M. M., Seaman C., Kee N., et al. The Wnt receptor Ryk is required for Wnt5a-mediated axon guidance on the contralateral side of the corpus callosum. *J Neurosci.* 2006; 26(21): 5840-5848.
127. Kempa I., Ambrozaitytė L., Stavusis J., Akota I., et al. Association of BMP4 polymorphisms with non-syndromic cleft lip with or without cleft palate and isolated cleft palate in Latvian and Lithuanian populations. *Stomatologija.* 2014; 16(3): 94-101.
128. Kerameddin S., Namipashaki A., Ebrahimi S., Ansari-Pour N. IRF6 Is a Marker of Severity in Nonsyndromic Cleft Lip/Palate. *J Dent Res.* 2015; 94(9 Suppl): 226S-232S.
129. Keswani S. G., Balaji S., Le L. D., Leung A., et al. Role of salivary vascular endothelial growth factor (VEGF) in palatal mucosal wound healing. *Wound Repair Regen.* 2013; 21(4): 554-562.
130. Kim K. H., Sederstrom J. M. Assaying Cell Cycle Status Using Flow Cytometry. *Curr Protoc Mol Biol.* 2015; 111: 28.6.1-28.6.11.
131. Kim N. Y., Kim Y. H., Park J. W., Baek S-H. Association between MSX1 SNPs and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in the Korean population. *J Korean Med Sci* 2013; 28(4): 522-526.
132. Kist R., Greally E., Peters H. Derivation of a mouse model for conditional inactivation of Pax9. *Genesis.* 2007; 45(7): 460-464.
133. Kohama K., Nonaka K., Hosokawa R., Shum L., et al. TGF-beta-3 promotes scarless repair of cleft lip in mouse fetuses. *J Dent Res.* 2002; 81(10): 688-694.
134. Koide M., Kobayashi Y., Ninomiya T., Nakamura M., et al. Osteoprotegerin-deficient male mice as a model for severe alveolar bone loss: comparison with RANKL-overexpressing transgenic male mice. *Endocrinology.* 2013; 154(2): 773-782.
135. Kondo S., Schutte B. C., Richardson R. J., Bjork B. C., et al. Mutations in IRF6 cause Van der Woude and popliteal pterygium syndromes. *Nat Genet.* 2002; 32(2): 285-289.
136. Korpi J. T., Aström P., Lehtonen N., Tjäderhane L., et al. Healing of extraction sockets in collagenase-2 (matrix metalloproteinase-8)-deficient mice. *Eur J Oral Sci.* 2009; 117(3): 248-254.
137. Korpi J. T., Kervinen V., Mäklin H., Väänänen A., et al. Collagenase-2 (matrix metalloproteinase-8) plays a protective role in tongue cancer. *Br J Cancer.* 2008; 98(4): 766-775.
138. Koskivirta I., Kassiri Z., Rahkonen O., Kiviranta R., et al. Mice with tissue inhibitor of metalloproteinases 4 (Timp4) deletion succumb to induced myocardial infarction but not to cardiac pressure overload. *J Biol Chem.* 2010; 285(32): 24487-24493.
139. Kouskoura T., Kozlova A., Alexiou M., Blumer S., et al. The etiology of cleft palate formation in BMP7-deficient mice. *PLoS One.* 2013;8(3):e59463.
140. Kramer F. J., Meyer M., Morgan D., Forssmann W. G., et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases II (TIMP-2) is an osteoanabolic factor in vitro and in vivo. *Eur J Med Res.* 2008; 13(6): 292-298.
141. Krasone K., Lāce B., Akota I., Care R., et al. IRF6 AP-2a binding site promoter polymorphism is associated with oral clefts in Latvia. *Stomatologija.* 2014; 16(4): 132-136.
142. Krivicka B., Pilmane M., Akota I. Expression of growth factors and growth factor receptors in human cleft-affected tissue. *Stomatologija.* 2013; 15(4): 111-118.
143. Krivicka-Uzkurele B., Pilmane M., Akota I. Barx1, growth factors and apoptosis in facial tissue of children with clefts. *Stomatologija.* 2008; 10(2): 62-66.
144. Ku K. T., Wan L., Peng H. C., Tsai M. H., et al. Vascular endothelial growth factor gene-460 C/T polymorphism is a biomarker for oral cancer. *Oral Oncol.* 2005; 41(5): 497-502.
145. Kubota T., Itagaki M., Hoshino C., Nagata M., et al. Altered gene expression levels of matrix metalloproteinases and their inhibitors in periodontitis-affected gingival tissue. *J Periodontol.* 2008; 79(1): 166-173.
146. Kückler E. C., Sabóia T. M., Vieira T. C., Lips A., et al. Studies of genes involved in craniofacial development and tumorigenesis: FGF3 contributes to isolated oral clefts and may interact with PAX9. *Acta Odontol Scand.* 2014; 72(8): 1070-1078.

147. Kwak I. S., Choi Y. H., Jang Y. C., Lee Y. K. Immunohistochemical analysis of neuropeptides (protein gene product 9.5, substance P and calcitonin gene-related peptide) in hypertrophic burn scar with pain and itching. *Burns*. 2014; 40(8): 1661–1667.
148. Lallemand Y., Bensoussan V., Cloment C. S., Robert B. Msx genes are important apoptosis effectors downstream of the Shh/Gli3 pathway in the limb. *Dev Biol*. 2009; 331(2): 189–198.
149. Lallemand Y., Nicola M. A., Ramos C., Bach A., et al. Analysis of Msx1; Msx2 double mutants reveals multiple roles for Msx genes in limb development. *Development*. 2005; 132(13): 3003–3014.
150. Lamouille S., Subramanyam D., Blelloch R., Derynck R. Regulation of epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions by microRNAs. *Curr Opin Cell Biol*. 2013; 25(2): 200–207.
151. Lamouille S., Xu J., Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014; 15(3): 178–196.
152. Lane J., Kaartinen V. Signaling networks in palate development. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2014; 6(3): 271–278.
153. Lane J., Yumoto K., Azhar M., Ninomiya-Tsuji J., et al. Tak1, Smad4 and Trim33 redundantly mediate TGF- β 3 signaling during palate development. *Dev Biol*. 2015; 398(2): 231–241.
154. Lao M., Marino V., Bartold PM. Immunohistochemical study of bone sialoprotein and osteopontin in healthy and diseased root surfaces. *J Periodontol*. 2006; 77(10): 1665–1673.
155. Larrabee Y. C., Birkeland A. C., Kent D. T., Flores C., et al. Association of common variants, not rare mutations, in IRF6 with nonsyndromic clefts in a Honduran population. *Laryngoscope*. 2011; 121(8): 1756–1759.
156. Lee J. K., Park J. W., Kim Y. H., Baek S. H. Association between PAX9 single-nucleotide polymorphisms and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *J Craniofac Surg*. 2012; 23(5): 1262–1266.
157. Lee J. M., Kim J. Y., Cho K. W., Lee M. J., et al. Wnt11/Fgfr1b cross-talk modulates the fate of cells in palate development. *Dev Biol*. 2008; 314(2): 341–350.
158. Lehman J. A. Jr., Douglas B. K., Ho W. C., Husami T. W. One-stage closure of the entire primary palate. *Plast Reconstr Surg*. 1990; 86(4): 675–681.
159. Leslie E. J., Taub M. A., Liu H., Steinberg K. M., et al. Identification of functional variants for cleft lip with or without cleft palate in or near PAX7, FGFR2, and NOG by targeted sequencing of GWAS loci. *Am J Hum Genet*. 2015; 96(3): 397–411.
160. Letra A., Bjork B., Cooper M. E., Szabo-Rogers H., et al. Association of AXIN2 with non-syndromic oral clefts in multiple populations. *J Dent Res*. 2012; 91(5): 473–478.
161. Letra A., da Silva R. A., Menezes R., de Souza A. P., et al. Studies with MMP9 gene promoter polymorphism and nonsyndromic cleft lip and palate. *Am J Med Genet A*. 2007; 143A(1): 89–91.
162. Letra A., Fakhouri W., Fonseca R. F., Menezes R., et al. Interaction between IRF6 and TGFA genes contribute to the risk of nonsyndromic cleft lip/palate. *PLoS One*. 2012; 7(9): e45441.
163. Letra A., Maili L., Mulliken J. B., Buchanan E., et al. Further evidence suggesting a role for variation in ARHGAP29 variants in nonsyndromic cleft lip/palate. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2014; 100(9): 679–685.
164. Letra A., Silva R. A., Menezes R., Astolfi C. M., et al. MMP gene polymorphisms as contributors for cleft lip/palate: association with MMP3 but not MMP1. *Arch Oral Biol*. 2007; 52(10): 954–960.
165. Letra A., Silva R. M., Motta L. G., Blanton S. H., et al. Association of MMP3 and TIMP2 promoter polymorphisms with nonsyndromic oral clefts. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2012; 94(7): 540–548.
166. Letra A., Zhao M., Silva R. M., Vieira A. R., et al. Functional Significance of MMP3 and TIMP2 Polymorphisms in Cleft Lip/Palate. *J Dent Res*. 2014; 93(7): 651–656.

167. Levi G., Mantero S., Barbieri O., Cantatore D., et al. *Msx1* and *Dlx5* act independently in development of craniofacial skeleton, but converge on the regulation of *Bmp* signaling in palate formation. *Mech Dev.* 2006; 123(1): 3–16.
168. Li Q., Kim Y., Suktitipat B., Hetmanski J. B., et al. Gene-Gene Interaction Among WNT Genes for Oral Cleft in Trios. *Genet Epidemiol.* 2015; 39(5): 385–394.
169. Li W., Lu Z. F., Man X. Y., Li C. M., et al. VEGF upregulates VEGF receptor-2 on human outer root sheath cells and stimulates proliferation through ERK pathway. *Mol Biol Rep.* 2012; 39(9): 8687–8694.
170. Lillie R. D., Pizzolato P., Donaldson P. T. Hematoxylin substitutes: a survey of mordant dyes tested and consideration of the relation of their structure to performance as nuclear stains. *Stain Technol.* 1976; 51(1): 25–41.
171. Liu F., Zhang C., Hoffman R. M. Nestin-expressing stem cells from the hair follicle can differentiate into motor neurons and reduce muscle atrophy after transplantation to injured nerves. *Tissue Eng Part A.* 2014; 20(3-4): 656–662.
172. Liu J., Ji X., Li Z., Zheng H., et al. Nestin overexpression promotes the embryonic development of heart and brain through the regulation of cell proliferation. *Brain Res.* 2015; 1610: 1–11.
173. Liu W., Sun X., Braut A., Mishina Y., et al. Distinct functions for *Bmp* signaling in lip and palate fusion in mice. *Development.* 2005; 132(6): 1453–1461.
174. Liu Y., Xu J., Fu W., Weng Z., et al. Tissues Expression, Polymorphisms of IFN Regulatory Factor 6 (IRF6) Gene and Their Associated with Immune Traits in Three Pig Populations. *Asian-Australas J Anim Sci.* 2012; 25(2): 163–169.
175. Loeffler M., Roeder I. Tissue stem cells: definition, plasticity, heterogeneity, self-organization and models--a conceptual approach. *Cells Tissues Organs.* 2002; 171(1): 8–26.
176. Loeys B. L., Chen J., Neptune E. R., Judge D. P., et al. A syndrome of altered cardiovascular, craniofacial, neurocognitive and skeletal development caused by mutations in *TGFBR1* or *TGFBR2*. *Nat Genet.* 2005; 37(3): 275–281.
177. Logan C. Y., Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2004; 20: 781–810.
178. Lopes M., Goupille O., Saint Clément C., Robert B. *Msx1* is expressed in retina endothelial cells at artery branching sites. *Biol Open.* 2012; 1(4): 376–384.
179. Lotz K., Proff P., Bienengraeber V., Fanghaenel J., et al. Apoptosis as a creative agent of embryonic development of bucca, mentum and nasolacrimal duct. An in vivo study in rats. *J Craniomaxillofac Surg.* 2006; 34(2): 8–13.
180. Lu P., Takai K., Weaver V. M., Werb Z. Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011; 3(12).
181. Lu X. C., Yu W., Tao Y., Zhao P. L., et al. Contribution of transforming growth factor α polymorphisms to nonsyndromic orofacial clefts: a HuGE review and meta-analysis. *Am J Epidemiol.* 2014; 179(3): 267–281.
182. Ma L., Xu M., Li D., Han Y., et al. A miRNA-binding-site SNP of *MSX1* is Associated with NSOC Susceptibility. *J Dent Res.* 2014; 93(6): 559–564.
183. Macheda M. L., Sun W. W., Kugathasan K., Hogan B. M., et al. The Wnt receptor Ryk plays a role in mammalian planar cell polarity signaling. *J Biol Chem.* 2012; 287(35): 29312–29323.
184. Maclean G., Dollé P., Petkovich M. Genetic disruption of *CYP26B1* severely affects development of neural crest derived head structures, but does not compromise hindbrain patterning. *Dev Dyn.* 2009; 238(3): 732–745.
185. Malik S., Kakar N., Hasnain S., Ahmad J., et al. Epidemiology of Van der Woude syndrome from mutational analyses in affected patients from Pakistan. *Clin Genet.* 2010; 78(3): 247–256.
186. Man X. Y., Yang X. H., Cai S. Q., Yao Y. G., et al. Immunolocalization and expression of vascular endothelial growth factor receptors (VEGFRs) and neuropilins (NRPs) on keratinocytes in human epidermis. *Mol Med.* 2006; 12(7-8): 127–136.

187. Mankarious L. A., Goudy S. L. Craniofacial and upper airway development. *Paediatr Respir Rev.* 2010; 11(4): 193–198.
188. Manuel J. A., Gawronska-Kozak B. Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) is upregulated during scarless wound healing in athymic nude mice. *Matrix Biol.* 2006; 25(8): 505–514.
189. Martínez-Alvarez C., Tudela C., Pérez-Miguelsanz J., O'Kane S., et al. Medial edge epithelial cell fate during palatal fusion. *Dev Biol.* 2000; 220(2): 343–357.
190. Mehrotra D. Genomic expression in non syndromic cleft lip and palate patients: A review. *J Oral Biol Craniofac Res.* 2015; 5(2): 86–91.
191. Meijome T. E., Hooker R. A., Cheng Y. H., Walker W., et al. GATA-1 deficiency rescues trabecular but not cortical bone in OPG deficient mice. *J Cell Physiol.* 2015; 230(4): 783–790.
192. Menezes R., Letra A., Kim A. H., Kuchler E. C., et al. Studies with Wnt genes and nonsyndromic cleft lip and palate. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2010; 88(11): 995–1000.
193. Meng L., Bian Z., Torensma R., Von den Hoff J. W. Biological mechanisms in palatogenesis and cleft palate. *J Dent Res.* 2009; 88(1): 22–33.
194. Mii S., Amoh Y., Katsuoka K., Hoffman R. M. Comparison of nestin-expressing multipotent stem cells in the tongue fungiform papilla and vibrissa hair follicle. *J Cell Biochem.* 2014; 115(6): 1070–1076.
195. Mijiti A., Ling W., Guli, Moming A. Association of single-nucleotide polymorphisms in the IRF6 gene with non-syndromic cleft lip with or without cleft palate in the Xinjiang Uyghur population. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2015; 53(3): 268–274.
196. Millard D. R. Jr. Rotation-advancement principle in cleft lip closure. *Cleft Palate J.* 1964; 12: 246–252.
197. Miller S. F., Weinberg S. M., Nidey N. L., Defay D. K., et al. Exploratory genotype-phenotype correlations of facial form and asymmetry in unaffected relatives of children with non-syndromic cleft lip and/or palate. *J Anat.* 2014; 224(6): 688–709.
198. Miragliotta V., Pirone A., Donadio E., Abramo F., et al. Osteopontin expression in healing wounds of horses and in human keloids. *Equine Vet J.* 2016; 48(1): 72–77.
199. Mitsui C., Iwanaga T., Yoshida S., Kawasaki T. Immunohistochemical demonstration of nerve terminals in the whole hard palate of rats by use of an antiserum against protein gene product 9.5 (PGP 9.5). *Arch Histol Cytol.* 2000; 63(5): 401–410.
200. Mohammad R. M., Muqbil I., Lowe L., Yedjou C., et al. Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer. *Semin Cancer Biol.* 2015; 35: S78–103.
201. Mohan R., Chintala S. K., Jung J. C., Villar W. V., et al. Matrix metalloproteinase gelatinase B (MMP-9) coordinates and effects epithelial regeneration. *J Biol Chem.* 2002; 277(3): 2065–2072.
202. Morris-Wiman J., Burch H., Basco E. Temporospacial distribution of matrix metalloproteinase and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases during murine secondary palate morphogenesis. *Anat Embryol (Berl).* 2000; 202(2): 129–141.
203. Morris-Wiman J., Burch H., Basco E. Temporospacial distribution of matrix metalloproteinase and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases during murine secondary palate morphogenesis. *Anat Embryol (Berl).* 2000; 202(2): 129–141.
204. Mossey P. A., Little J., Munger R. G., Dixon M. J., et al. Cleft lip and palate. *Lancet.* 2009; 374(9703): 1773–1785.
205. Mostowska A., Hozyasz K. K., Biedziak B., Wojcicki P., et al. Genotype and haplotype analysis of WNT genes in non-syndromic cleft lip with or without cleft palate. *Eur J Oral Sci.* 2012; 120(1): 1–8.
206. Mostowska A., Hozyasz K. K., Wojcicki P., Biedziak B., et al. 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): 538–545.
207. Mukhopadhyay P., Greene R. M., Zacharias W., Weinrich M. C., et al. Developmental gene expression profiling of mammalian, fetal orofacial tissue. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2004; 70(12): 912–926.

208. Muraoka N., Shum L., Fukumoto S., Nomura T., et al. Transforming growth factor-beta3 promotes mesenchymal cell proliferation and angiogenesis mediated by the enhancement of cyclin D1, Flk-1, and CD31 gene expression during CL/Fr mouse lip fusion. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2005; 73(12): 956–965.
209. Murshed M., Schinke T., McKee M. D., Karsenty G. Extracellular matrix mineralization is regulated locally; different roles of two gla-containing proteins. *J Cell Biol.* 2004; 165(5): 625–630.
210. Musiał K., Bargenda A., Zwolińska D. Urine matrix metalloproteinases and their extracellular inducer EMMPRIN in children with chronic kidney disease. *Ren Fail.* 2015; 37(6): 980–984.
211. Nagase H., Visse R., Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res.* 2006; 69(3): 562–573.
212. Nagel S., Rohr F., Weber C., Kier J., et al. Multipotent nestin-positive stem cells reside in the stroma of human eccrine and apocrine sweat glands and can be propagated robustly in vitro. *PLoS One.* 2013; 8(10): e78365.
213. Nakajima A., Ito Y., Tanaka E., Sano R., et al. Functional role of TGF- β receptors during palatal fusion in vitro. *Arch Oral Biol.* 2014; 59(11): 1192–1204.
214. Nakasone N., Kubota T., Hoshino C., Nohno K., et al. Differential gene and protein expression of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP)-3 and TIMP-4 in gingival tissues from drug induced gingival overgrowth. *Arch Oral Biol.* 2009; 54(7): 634–641.
215. Nakatomi M., Wang X. P., Key D., Lund J. J., et al. Genetic interactions between Pax9 and Msx1 regulate lip development and several stages of tooth morphogenesis. *Dev Biol.* 2010; 340(2): 438–449.
216. Nassif A., Senussi I., Meary F., Loiodice S., et al. Msx1 role in craniofacial bone morphogenesis. *Bone.* 2014; 66: 96–104.
217. Nawshad A. Palatal seam disintegration: to die or not to die? that is no longer the question. *Dev Dyn.* 2008; 237(10): 2643–2656.
218. Nie X., Luukko K., Kettunen P. BMP signalling in craniofacial development. *Int J Dev Biol.* 2006; 50(6): 511–521.
219. Nikopousios T., Kempa I., Ambrozaitytė L., Jagomägi T., 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): 218–225.
220. Nouri N., Memarzadeh M., Carinci F., Cura F., et al. Family-based association analysis between nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate and IRF6 polymorphism in an Iranian population. *Clin Oral Investig.* 2015; 19(4): 891–894.
221. Novakovic J., Mardesic-Brakus S., Vukojevic K., Saraga-Babic M. Developmental patterns of Ki-67, bcl-2 and caspase-3 proteins expression in the human upper jaw. *Acta Histochem.* 2011; 113(5): 519–526.
222. Nyman J. S., Lynch C. C., Perrien D. S., Thiolloy S., et al. Differential effects between the loss of MMP-2 and MMP-9 on structural and tissue-level properties of bone. *J Bone Miner Res.* 2011; 26(6): 1252–1260.
223. Ohno S., Hirano S., Kanemaru S., Tateya I., et al. Prevention of buccal mucosa scarring with transforming growth factor β 3. *Laryngoscope.* 2011; 121(7): 1404–1409.
224. Ouyang L., Shi Z., Zhao S., Wang F. T., et al. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif.* 2012; 45(6): 487–498.
225. Paiva K. B., Granjeiro J. M. Bone tissue remodeling and development: focus on matrix metalloproteinase functions. *Arch Biochem Biophys.* 2014; 561: 74–87.
226. Pandiar D., Shameena P. Immunohistochemical expression of CD34 and basic fibroblast growth factor (bFGF) in oral submucous fibrosis. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2014; 18(2): 155–161.
227. Patyna S., Haznedar J., Morris D., Freshwater K., et al. Evaluation of the safety and pharmacokinetics of the multi-targeted receptor tyrosine kinase inhibitor sunitinib during embryo-fetal development in rats and rabbits. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.* 2009; 86(3): 204–213.

228. Pianka A., Knösel T., Probst F. A., Troeltzsch M., et al. Vascular endothelial growth factor receptor isoforms: are they present in oral squamous cell carcinoma? *J Oral Maxillofac Surg.* 2015; 73(5): 897–904.
229. Pilmane M., Rumba I., Sundler F., Luts A. Patterns of distribution and occurrence of neuroendocrine elements in lungs of humans with chronic lung disease. *Proc Latv Acad Sci.* 1998; 52: 144–152.
230. Poniatowski Ł. A., Wojdasiewicz P., Gasik R., Szukiewicz D. Transforming growth factor Beta family: insight into the role of growth factors in regulation of fracture healing biology and potential clinical applications. *Mediators Inflamm.* 2015; 2015: 137823.
231. Puente X. S., Sánchez L. M., Overall C. M., López-Otín C. Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nat Rev Genet.* 2003; 4(7): 544–558.
232. Rafiqdoost Z., Rafiqdoost A., Rafiqdoost H., Hashemi M., et al. Investigation of FGF1 and FGFR gene polymorphisms in a group of Iranian patients with nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2014; 78(5): 731–736.
233. Ravanti L., Kähäri V. M. Matrix metalloproteinases in wound repair (review). *Int J Mol Med.* 2000; 6(4): 391–407.
234. Ray H. J., Niswander L. Mechanisms of tissue fusion during development. *Development.* 2012; 139(10): 1701–1711.
235. Reutter H., Birnbaum S., Mende M., Lauster C., et al. TGFB3 displays parent-of-origin effects among central Europeans with nonsyndromic cleft lip and palate. *J Hum Genet.* 2008; 53(7): 656–661.
236. Richardson R. J., Dixon J., Malhotra S., Hardman M. J., et al. Irf6 is a key determinant of the keratinocyte proliferation-differentiation switch. *Nat Genet.* 2006; 38(11): 1329–1334.
237. Rieger A. M., Nelson K. L., Konowalchuk J. D., Barreda D. R. Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. *J Vis Exp.* 2011; (50). pii: 2597.
238. Riley B. M., Murray J. C. 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): 3228–3234.
239. Rittling S. R., Matsumoto H. N., McKee M. D., Nanci A., et al. Mice lacking osteopontin show normal development and bone structure but display altered osteoclast formation in vitro. *J Bone Miner Res.* 1998; 13(7): 1101–1111.
240. Robin N. H., Baty H., Franklin J., Guyton F. C., et al. The multidisciplinary evaluation and management of cleft lip and palate. *South Med J.* 2006; 99(10): 1111–1120.
241. Rocha C. A., Cestari T. M., Vidotti H. A., de Assis G. F., et al. Sintered anorganic bone graft increases autocrine expression of VEGF, MMP-2 and MMP-9 during repair of critical-size bone defects. *J Mol Histol.* 2014; 45(4): 447–461.
242. Rodrigues Luvizuto E., Mônica Dias S., Chiantelli Cláudio-Coutinho C., Alves Machado L., et al. Temporal localization of osteocalcin protein during healing of tooth extraction sockets in rats. *Minerva Stomatol.* 2010; 59(6): 355–361.
243. Rohani M. G., Parks W. C. Matrix remodeling by MMPs during wound repair. *Matrix Biol.* 2015; 44–46C: 113–121.
244. Roy H., Bhardwaj S., Babu M., Kokina I., et al. VEGF-A, VEGF-D, VEGF receptor-1, VEGF receptor-2, NF-kappaB, and RAGE in atherosclerotic lesions of diabetic Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *FASEB J.* 2006; 20(12): 2159–2161.
245. Rullo R., Gombos F., Ferraraccio F., Farina A., et al. TGFbeta3 expression in non-syndromic orofacial clefts. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2006; 70(10): 1759–1764.
246. Sabet M. N., Rakhshan A., Erfani E., Madjd Z. Co-expression of putative cancer stem cell markers, CD133 and Nestin, in skin tumors. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014; 15(19): 8161–8169.
247. Saleem S., Rajendran R., Moinak B., Anna J., et al. Evidence for transforming growth factor-beta 3 gene polymorphism in non-syndromic cleft lip and palate patients from Indian sub-continent. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2012; 17(2): e197–200.

248. Sasaki Y., O'Kane S., Dixon J., Dixon M. J., et al. Temporal and spatial expression of Pax9 and Sonic hedgehog during development of normal mouse palates and cleft palates in TGF-beta3 null embryos. *Arch Oral Biol.* 2007; 52(3): 260–267.
249. Satokata I., Ma L., Ohshima H., Bei M., et al. Msx2 deficiency in mice causes pleiotropic defects in bone growth and ectodermal organ formation. *Nat Genet.* 2000; 24(4): 391–395.
250. Sekiguchi S., Yoshikawa Y., Tanaka S., Kwon J., et al. Immunohistochemical analysis of protein gene product 9.5, a ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase, during placental and embryonic development in the mouse. *Exp Anim.* 2003; 52(4): 365–369.
251. Serrano M. J., Liu J., Svoboda K. K., Nawshad A., et al. Ephrin reverse signaling mediates palatal fusion and epithelial-to-mesenchymal transition independently of Tgfb3. *J Cell Physiol.* 2015; 230(12): 2961–2972.
252. Shi J., Song T., Jiao X., Qin C., et al. Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) of the IRF6 and TFAP2A in non-syndromic cleft lip with or without cleft palate (NSCLP) in a northern Chinese population. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011; 410(4): 732–736.
253. Shi J., Zhang X., Zhu J., Pi Y., et al. Nanoparticle delivery of the bone morphogenetic protein 4 gene to adipose-derived stem cells promotes articular cartilage repair in vitro and in vivo. *Arthroscopy.* 2013; 29(12): 2001–2011.e2.
254. Shiba H., Uchida Y., Kamihagi K., Sakata M., et al. Transforming growth factor-beta1 and basic fibroblast growth factor modulate osteocalcin and osteonectin/SPARC syntheses in vitamin-D-activated pulp cells. *J Dent Res.* 2001; 80(7): 1653–1659.
255. Shimokawa T., Yi S., Tanaka S. Nerve supply to the soft palate muscles with special reference to the distribution of the lesser palatine nerve. *Cleft Palate Craniofac J.* 2005; 42(5): 495–500.
256. Shin J. O., Nakagawa E., Kim E. J., Cho K. W., et al. miR-200b regulates cell migration via Zeb family during mouse palate development. *Histochem Cell Biol.* 2012; 137(4): 459–470.
257. Shiozaki Y., Kitajima T., Mazaki T., Yoshida A., et al. Enhanced in vivo osteogenesis by nanocarrier-fused bone morphogenetic protein-4. *Int J Nanomedicine.* 2013; 8: 1349–1360.
258. Shuler C. F. Programmed cell death and cell transformation in craniofacial development. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1995; 6(3): 202–217.
259. Silva T. A., Rosa A. L., Lara V. S. Dentin matrix proteins and soluble factors: intrinsic regulatory signals for healing and resorption of dental and periodontal tissues? *Oral Dis.* 2004; 10(2): 63–74.
260. Singh D., Srivastava S. K., Chaudhuri T. K., Upadhyay G. Multifaceted role of matrix metalloproteinases (MMPs). *Front Mol Biosci.* 2015; 2: 19.
261. Smane L., Pilmane M., Akota I. Apoptosis and MMP-2, TIMP-2 expression in cleft lip and palate. *Stomatologija.* 2013; 15(4): 129–134.
262. Sodek J., Batista Da Silva A. P., Zohar R. Osteopontin and mucosal protection. *J Dent Res.* 2006; 85(5): 404–415.
263. Sodek J., Ganss B., McKee M. D. Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000; 11(3): 279–303.
264. Sodek J., McKee M. D. Molecular and cellular biology of alveolar bone. *Periodontol* 2000. 2000; 24: 99–126.
265. Sohn W. J., Ji Y. R., Kim H. S., Gwon G. J., et al. Rgs19 regulates mouse palatal fusion by modulating cell proliferation and apoptosis in the MEE. *Mech Dev.* 2012; 129(9-12): 244–254.
266. Song T., Wu D., Wang Y., Li H., et al. SNPs and interaction analyses of IRF6, MSX1 and PAX9 genes in patients with non-syndromic cleft lip with or without palate. *Mol Med Rep.* 2013; 8(4): 1228–1234.
267. Souza L. T., Kowalski T. W., Collares M. V., Félix T. M. MSX1 gene and nonsyndromic oral clefts in a Southern Brazilian population. *Braz J Med Biol Res.* 2013; 46(7): 555–558.
268. Stalmans I. Role of the vascular endothelial growth factor isoforms in retinal angiogenesis and DiGeorge syndrome. *Verh K Acad Geneeskd Belg.* 2005; 67(4): 229–276.
269. Stalmans I., Lambrechts D., De Smet F., Jansen S., et al. VEGF: a modifier of the del22q11 (DiGeorge) syndrome? *Nat Med.* 2003; 9(2): 173–182.

270. Standal T., Borset M., Sundan A. Role of osteopontin in adhesion, migration, cell survival and bone remodeling. *Exp Oncol.* 2004; 26(3): 179–184.
271. Stănescu R., Didilescu A. C., Jianu A. M., Rusu M. C. Angiogenesis in the reparatory mucosa of the mandibular edentulous ridge is driven by endothelial tip cells. *Rom J Morphol Embryol.* 2012; 53(2): 375–378.
272. Stanier P., Pauws E. Development of the lip and palate: FGF signalling. *Front Oral Biol.* 2012; 16: 71–80.
273. Stefanini M., De Martino C., Zamboni L. Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature.* 1967; 216(5111): 173–174.
274. Suazo J., Santos J. L., Scapoli L., Jara L., et al. Association between TGFB3 and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in a Chilean population. *Cleft Palate Craniofac J.* 2010; 47(5): 513–517.
275. Sun D., Baur S., Hay E. D. Epithelial-mesenchymal transformation is the mechanism for fusion of the craniofacial primordia involved in morphogenesis of the chicken lip. *Dev Biol.* 2000; 228(2): 337–349.
276. Sun D., Vanderburg C. R., Odierna G. S., Hay E. D. TGFbeta3 promotes transformation of chicken palate medial edge epithelium to mesenchyme in vitro. *Development.* 1998; 125(1): 95–105.
277. Suzuki T., Bessho K., Segami N., Iizuka T., et al. Immunohistochemical localization of bone morphogenetic protein-2 in the oral and maxillofacial area of the human embryo. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2001; 39(4): 289–293.
278. Takahara S., Takigawa T., Shiota K. Programmed cell death is not a necessary prerequisite for fusion of the fetal mouse palate. *Int. J. Dev. Biol.* 2004; 48: 39–46.
279. Tang H., Mattheos N., Yao Y., Jia Y., et al. In vivo osteoprotegerin gene therapy preventing bone loss induced by periodontitis. *J Periodontal Res.* 2015; 50(4): 434–443.
280. Tang M., Wang Y., Han S., Guo S., et al. Transforming growth factor-beta3 gene polymorphisms and nonsyndromic cleft lip and palate risk: a meta-analysis. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2013; 17(12): 881–889.
281. Teng X., Hardwick J. M. Cell death in genome evolution. *Semin Cell Dev Biol.* 2015; 39: 3–11.
282. Thiery J. P., Acloque H., Huang R. Y., Nieto M. A. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell.* 2009; 139(5): 871–890.
283. Tian M., Schiemann W. P. The TGF-beta paradox in human cancer: an update. *Future Oncol.* 2009; 5(2): 259–271.
284. Tian Y., Li J. L., Hao L., Yue Y., et al. Association of cytokines, high sensitive C-reactive protein, VEGF and beta-defensin-1 gene polymorphisms and their protein expressions with chronic periodontitis in the Chinese population. *Int J Biol Markers.* 2013; 28(1): 100–107.
285. Torrecillas-Martínez L., Galindo-Moreno P., Ávila-Ortiz G., Ortega-Oller I., et al. Significance of the Immunohistochemical Expression of Bone Morphogenetic Protein-4 in Bone Maturation after Maxillary Sinus Grafting in Humans. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2015; May 12. [Epub ahead of print].
286. Tower J. Programmed cell death in aging. *Ageing Res Rev.* 2015; 23(Pt A): 90–100.
287. Udagawa N., Takahashi N., Yasuda H., Mizuno A., et al. Osteoprotegerin produced by osteoblasts is an important regulator in osteoclast development and function. *Endocrinology.* 2000; 141(9): 3478–3484.
288. Van Lint P., Libert C. Matrix metalloproteinase-8: cleavage can be decisive. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2006; 17(4): 217–223.
289. Verstappen J., Von den Hoff J. W. Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): their biological functions and involvement in oral disease. *J Dent Res.* 2006; 85(12): 1074–1084.
290. Vieira A. R., Orioli I. M., Castilla E. E., Cooper M. E., et al. MSX1 and TGFB3 contribute to clefting in South America. *J Dent Res.* 2003; 82(4): 289–292.
291. Vo T. N., Kasper F. K., Mikos A. G. Strategies for controlled delivery of growth factors and cells for bone regeneration. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012; 64(12): 1292–1309.

292. Vukojevic K., Kero D., Novakovic J., Kalibovic Govorko D., et al. Cell proliferation and apoptosis in the fusion of human primary and secondary palates. *Eur J Oral Sci.* 2012; 120(4): 283–291.
293. Wang R. N., Green J., Wang Z., Deng Y., et al. Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases. *Genes Dis.* 2014; 1(1): 87–105.
294. Wang Z., Juttermann R., Soloway P. D. TIMP-2 is required for efficient activation of proMMP-2 in vivo. *J Biol Chem.* 2000; 275(34): 26411–26415.
295. Washbourne B. J., Cox T. C. Expression profiles of cIRF6, cLHX6 and cLHX7 in the facial primordia suggest specific roles during primary palatogenesis. *BMC Dev Biol.* 2006; 6: 18.
296. Watanabe A., Akita S., Tin N. T., Natsume N., et al. A mutation in RYK is a genetic factor for nonsyndromic cleft lip and palate. *Cleft Palate Craniofac J.* 2006; 43(3): 310–316.
297. Watanabe I. S., Dias F. J., Mardegan Issa J. P., dos Santos Haemmerle C. A., et al. Immunohistochemistry and ultrastructural characteristics of nerve endings in the oral mucosa of rat. *Microscopy (Oxf).* 2013; 62(2): 259–270.
298. Webber D. M., MacLeod S. L., Bamshad M. J., Shaw G. M., et al. Developments in our understanding of the genetic basis of birth defects. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2015; 103(8): 680–689.
299. Wiese C., Rolletschek A., Kania G., Blyszczuk P., et al. Nestin expression--a property of multi-lineage progenitor cells? *Cell Mol Life Sci.* 2004; 61(19-20): 2510–2522.
300. Woo E. J. Adverse events after recombinant human BMP2 in nonspinal orthopaedic procedures. *Clin Orthop Relat Res.* 2013; 471(5): 1707–1711.
301. Xu X., Han J., Ito Y., Bringas P. Jr., et al. Cell autonomous requirement for Tgfb β 2 in the disappearance of medial edge epithelium during palatal fusion. *Dev Biol.* 2006; 297(1): 238–248.
302. Yagi H., Furutani Y., Hamada H., Sasaki T., et al. Role of TBX1 in human del22q11.2 syndrome. *Lancet.* 2003; 362(9393): 1366–1373.
303. Yanai H., Sato Y., Nagatsuka H., Yoshino T. Nestin is a wide-spectrum abluminal cell marker of salivary gland tumors. *Pathol Int.* 2013; 63(10): 496–501.
304. Yang J., Mani S. A., Donaher J. L., Ramaswamy S., et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell.* 2004; 117(7):927–939.
305. Yang Y., Jiang G., Zhang P., Fan J. Programmed cell death and its role in inflammation. *Mil Med Res.* 2015; 2: 12.
306. Yu F., Chou C. W., Chen C. C. TNF- α suppressed TGF- β -induced CTGF expression by switching the binding preference of p300 from Smad4 to p65. *Cell Signal.* 2009 Jun; 21(6): 867–872.
307. Yumoto K., Thomas P. S., Lane J., Matsuzaki K., et al. TGF- β -activated kinase 1 (Tak1) mediates agonist-induced Smad activation and linker region phosphorylation in embryonic craniofacial neural crest-derived cells. *J Biol Chem.* 2013; 288(19): 13467–13480.
308. Zarella B. L., Cardoso C. A., Pelá V. T., Kato M. T., et al. The role of matrix metalloproteinases and cysteine-cathepsins on the progression of dentine erosion. *Arch Oral Biol.* 2015; 60(9): 1340–1345.
309. Zauli G., Rimondi E., Nicolini V., Melloni E., et al. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) blocks osteoclastic differentiation induced by RANKL plus M-CSF. *Blood.* 2004; 104(7): 2044–2050.
310. Zawislak A., Woźniak K., Jakubowska A., Lubiński J., et al. Polymorphic variants in VAX1 gene (rs7078160) and BMP4 gene (rs762642) and the risk of non-syndromic orofacial clefts in the Polish population. *Dev Period Med.* 2014; 18(1): 16–22.
311. Zcharia E., Jia J., Zhang X., Baraz L., et al. Newly generated heparanase knock-out mice unravel co-regulation of heparanase and matrix metalloproteinases. *PLoS One.* 2009; 4(4): e5181.
312. Zeng W., Wang X., Xu P., Liu G., et al. Molecular imaging of apoptosis: from micro to macro. *Theranostics.* 2015; 5(6): 559–582.

313. Zhang B., Henney A., Eriksson P., Hamsten A., et al. Genetic variation at the matrix metalloproteinase-9 locus on chromosome 20q12.2-13.1. *Hum Genet.* 1999; 105(5): 418–423.
314. Zhang J., Zhao Y. G., Cao Y. J., Sang Q. X., et al. Expression and implications of tissue inhibitor of metalloproteinases-4 in mouse embryo. *Mol Hum Reprod.* 2003; 9(3): 143–149.
315. Zhang X., Chen X., Hong Q., Lin H., et al. TIMP-1 promotes age-related renal fibrosis through upregulating ICAM-1 in human TIMP-1 transgenic mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2006; 61(11): 1130–1143.
316. Zhou J., Gao Y., Lan Y., Jia S., et al. Pax9 regulates a molecular network involving Bmp4, Fgf10, Shh signaling and the Osr2 transcription factor to control palate morphogenesis. *Development.* 2013; 140(23): 4709–4718.
317. Zhou J., Gao Y., Zhang Z., Zhang Y., et al. Osr2 acts downstream of Pax9 and interacts with both Msx1 and Pax9 to pattern the tooth developmental field. *Dev Biol.* 2011; 353(2): 344–353.
318. Zhu X., Ozturk F., Pandey S., Guda C. B., et al. Implications of TGFβ on Transcriptome and Cellular Biofunctions of Palatal Mesenchyme. *Front Physiol.* 2012; 3: 85.

Latviešu valodā

1. Akota I., Barkāne B., Grasmane N. Iedzimto sejas šķeltņu biežuma rādītāji Latvijā no 1960. līdz 1997. gadam. // *AML/RSU Zinātniskie raksti 2000.* – Rīga: AML/RSU, 2001, 166.–170. lpp.
2. Pilmane M., Šūmahers G. H. Medicīniskā embrioloģija. Rīga: Rīgas Stradiņa universitāte, 2006, 164.–172. lpp.
3. Teibe U. Bioloģiskā statistika. Rīga: LU Akadēmiskais apgāds, 2007, 49.–58. lpp.

PUBLIKĀCIJAS UN PREZENTĀCIJAS PAR PĒTĪJUMA TĒMU

Zinātniskie raksti (5)

1. **Smane L.**, Pilmane M., Akota I. Local expression of inflammatory cytokines in the facial tissue of children with a cleft lip and palate. *Papers on Anthropology* XXI. 2012: 264-275.
2. **Smane L.**, Pilmane M., Akota I. Apoptosis and MMP-2, TIMP-2 expression in cleft lip and palate. *Stomatologija*. 2013; 15(4): 129–134.
3. **Smane L.**, Pilmane M. IRF6, RYK, and PAX9 expression in facial tissue of children with cleft palate. *Int. J. Morphol.* 2015; 33(2): 647–652.
4. **Smane L.**, Pilmane M. Osteopontin, osteocalcin, and osteoprotegerin expression in human cleft lip and palate affected tissue. *SHS Web of Conferences* 30. 2016: 1-9. doi: 10.1051/shsconf/20163000008.
5. **Smane-Filipova L.**, Pilmane M., Akota I. MMPs and TIMPs expression in facial tissue of children with cleft lip and palate – pieņemts publicēšanai *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2016; 160: XX.

Tēzes un prezentācijas starptautiskās konferencēs (13)

1. **Smane L.**, Pilmane M., Akota I. “Local expression of inflammatory cytokines in facial tissue of children with clefts lip and palate”, 11. Joint Symposium der Universitäten Riga und Rostock tēzes, Rostoka 2012, publicēts simpozija mājaslapā. (Mutisks ziņojums).
2. **Smane L.**, Pilmane M., Akota I. “Immunohistochemical detection of growth factors, protein gene product 9.5 (PGP 9.5) in cleft lip and palate”, 7. Baltijas Morfoloģijas konferences tēzes, Rīga 2013, Tēžu grāmata 51. lpp. (Stenda referāts).
3. **Smane L.**, Pilmane M., Akota I. “Analysis of apoptosis and expression of specific signaling proteins in facial tissue of children with clefts lip and palate”, 21st International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery tēzes, Barselona 2013, Tēžu grāmata 183. lpp. (Stenda referāts).
4. **Smane L.**, Pilmane M., Akota I. “IRF6, RYK and PAX9 role in facial tissue of children with clefts”, 18th Congress of the International Federation of Associations of Anatomists tēzes, Beidžinga 2013, *Annals of Anatomy* 2014; 196(S1): 86. (Stenda referāts).

5. **Smane L.**, Pilmane M., Akota I. "Immunohistochemical analysis of nestin, CD34 and TGFβ3 in cleft lip and palate", XXIV European Congress of Perinatal Medicine tēzes, Florence 2014, J Matern Fetal Neonatal Med. 2014; 27(1): 275. (Stenda referāts).
6. Pilmane M., **Smane L.**, Akota I. "Degeneration and remodeling potential in hyaline cartilage and bone of complete cleft lip palate affected facial tissue in children", International Conference REDEOR tēzes, Venēcija 2015. (Stenda referāts).
7. **Smane L.**, Pilmane M., Akota I. "Expression of transcription factors MSX1 and PAX9 in a group of Latvian patients with complete unilateral and bilateral cleft lip and palate", Baltic Paediatric Congress tēzes, Rīga 2015, Tēžu grāmata 70. lpp. (Stenda referāts).
8. **Smane L.**, Pilmane M., Akota I. "Association of gene proteins with cleft lip and palate in the Latvian population", 2nd World Congress on Controversies in Pediatrics tēzes, Budapešta 2015, Tēžu grāmata 64. lpp. (Stenda referāts).
9. **Smane L.**, Pilmane M., Akota I. "Osteopontin, osteocalcin, osteoprotegerin expression in facial tissue of children with cleft lip and palate", 5th International Interdisciplinary Scientific Conference "SOCIETY. HEALTH. WELFARE" tēzes, Rīga 2015, Tēžu grāmata 68. lpp. (Stenda referāts).
10. **Smane L.**, Pilmane M., Akota I. "Expression of non-collagenous proteins in facial tissue of children with cleft lip and palate" Experimental Biology tēzes, Bostona 2015, FASEB J. 2015; 29: 765.2. (Stenda referāts).
11. **Smane L.**, Pilmane M., Akota I. "Patterns of MMP-2, TIMP-2, BMP2/4, and TGFβ3 expression in alveolar bone tissue of children with orofacial clefts" 8. Baltijas Morfoloģijas konferences tēzes, Viļņa 2015, Tēžu grāmata 65. lpp. (Mutisks ziņojums).
12. **Smane-Filipova L.**, Pilmane M. "Functional morphology of tissues in children with complete bilateral cleft lip and palate" 6th International Congress of UENPS tēzes, Valensija 2016. (Stenda referāts).
13. **Smane-Filipova L.**, Pilmane M., Akota I. "Evaluation of VEGF and CD34 protein expression in facial tissue of children with cleft" 6th International Interdisciplinary Scientific Conference "SOCIETY. HEALTH. WELFARE" tēzes, Rīga 2016. (Stenda referāts).

Tēzes un prezentācijas vietēja mēroga konferencēs Latvijā (7)

1. **Smane L.**, Pilmane M., Akota I. "Iekaisuma signālmolekulu izpēte bērniem ar lūpu un aukslēju šķeltnēm", Rīgas Stradiņa universitātes 2012. gada Zinātniskā konference. Tēzes, 316. lpp. (Stenda referāts).

2. **Smane L.**, Pilmane M., Akota I. “Cilmes šūnu marķieru CD34 un nestīna izvērtējums bērniem ar abpusējām lūpas un aukslēju šķeltnēm”, Latvijas Ārstu 7. kongress, tēzes publicētas kongresa mājaslapā:

<http://www.arstukongress.lv/?&s=1361881321&fu=read&id=16> (Stenda referāts).

3. **Smane L.**, Pilmane M., Akota I. “Audu faktoru un šūnu apoptozes izvērtējums bērniem ar abpusējām lūpas un aukslēju šķeltnēm”, Rīgas Stradiņa universitātes 2013. gada Zinātniskā konference. Tēzes, 290. lpp. (Stenda referāts).
4. **Smane L.**, Pilmane M., Akota I. “Matrices metaloproteināžu un to inhibitoru izvērtējums lūpas šķeltnes zonas audos”, Rīgas Stradiņa universitātes 2014. gada Zinātniskā konference. Tēzes, 332. lpp. (Stenda referāts).
5. **Smane L.**, Pilmane M. “MSX1, IRF6 un PAX9 izvērtējums bērniem ar abpusējām lūpas un aukslēju šķeltnēm”, Bērnu klīniskās universitātes slimnīcas 2014. gada Zinātniskā konference “Jaunas diagnostikas un ārstēšanas metodes Latvijas bērnu veselības uzlabošanai”. Tēzes, 48. lpp. (Stenda referāts).
6. **Smane L.**, Pilmane M., Akota I. “Audu remodelāciju ietekmējošo enzīmu un ar tiem saistīto endogēno inhibitoru izvērtējums šķeltnes zonas audos”, Rīgas Stradiņa universitātes 2015. gada Zinātniskā konference. Tēzes, 294. lpp. (Stenda referāts).
7. **Smane L.**, Pilmane M., Akota I. “Alveolārā kaula reģenerāciju un remodelāciju ietekmējošo faktoru izvērtējums šķeltnes zonas audos”, Rīgas Stradiņa universitātes 2016. gada Zinātniskā konference. Tēzes, 222. lpp. (Stenda referāts).

PATEICĪBAS

Vēlos pateikties mana promocijas darba vadītājai *Dr. habil. med.* profesorei Mārai Pilmanei par pacietību, atbalstu, ieguldīto darbu un laiku, dotajiem vērtīgiem padomiem gan doktorantūras studiju laikā, gan promocijas darba izstrādāšanas gaitā.

Pateicos *DDS, Dr.med., MSc* (Oslo universitāte), *MRCSEd* (Edinburga) profesorei Ilzei Akotai par palīdzību audu materiāla iegūšanā.

Paldies Rīgas Stradiņa universitātes Anatomijas un antropoloģijas institūta darbiniekiem, it īpaši Morfoloģijas laboratorijas laborantei Natālijai Morozai, par palīdzību histoloģisko preparātu sagatavošanā un inženierim Jānim Krievam par palīdzību mikrofotogrāfiju uzņemšanā.

Liels paldies Rīgas Stradiņa universitātes Fizikas katedras docentam Renāram Ertam un Rīgas Stradiņa universitātes Statistiskās laboratorijas vadītājam Andrejam Ivanovam par palīdzību un konsultācijām statistisko metožu izvēlē un statistiskos aprēķinos.

Pateicos savai *Alma mater* Rīgas Stradiņa universitātei par doto iespēju studēt doktorantūrā, iegūstot izcilas zināšanas, un sniegto finansiālo atbalstu, piešķirot ESF stipendiju.

Vislielākais paldies manai mīļajai mammai Tatjanai, mīļajam tētim Mārim un mīļajiem dēliem Robertam un Ričardam par neatsveramu mīlestību, palīdzību, atbalstu un sapratni visā darba tapšanas laikā. Vissirsnīgākais paldies manām mīļajām vecmāmiņām un vīram par sapratni, atbalstu un rūpēm, īpaši pētniecisko darbu nobeidzot.

PIELIKUMI

Mikrofotogrāfijas

3.1. mikrofotogrāfija. Piecus gadus veca bērna mutes dobuma gļotādas audu griezums ar neizmainītu daudzkārtainu plakanu epitēliju un *lamina propria*. Hematoksilīns un eozīns, $\times 200$

3.2. mikrofotogrāfija. Sešus gadus un 9 mēnešus veca bērna praktiski neizmainīta alveolārā kaula morfoloģiskā aina. Hematoksilīns un eozīns, $\times 200$

3.3. mikrofotogrāfija. Trīs mēnešus veca zīdaiņa lūpas plastikas laikā iegūta lūpas ārējās virsmas āda ar tauku dziedzeriem, matu folikuliem un perivaskulāru šūnu infiltrāciju, iekaisuma šūnu infiltrāciju. Hematoksilīns un eozīns, $\times 100$

3.4. mikrofotogrāfija. Desmit mēnešus veca zīdaiņa mīksto aukslēju audos lokalizēti jauktie siekalu dziedzeri ar izvadu epitēlija perēklveida šūnu hiperplāziju (bultiņas). Hematoksilīns un eozīns, $\times 100$

3.5. mikrofotogrāfija. Četrus mēnešus veca zīdaiņa lūpas plastikas laikā iegūts audu materiāls, kurā redzams biezs epitēlijs ar bazālā slāņa šūnu izteiktu hiperplāziju un polimorfo šūnu vakuolizāciju. Hematoksilīns un eozīns, $\times 100$

3.6. mikrofotogrāfija. Sešus mēnešus veca zīdaiņa lūpas plastikas laikā iegūts audu materiāls, kurā redzama augšanas slāņa šūnu izaugumu iestiepšanās *lamina propria*. Hematoksilīns un eozīns, $\times 100$

3.7. mikrofotogrāfija. Trīs gadus un 2 mēnešus veca bērna cieto aukslēju plastikas laikā iegūts audu materiāls, kurā redzama *lamina propria* ar blīviem haotiski novietotiem saistaudu šķiedru kūlišiem. Hematoksilīns un eozīns, $\times 100$

3.8. mikrofotogrāfija. Četrpadsmit gadus un 6 mēnešus veca bērna osteoplastikas laikā iegūts vispārpieņemtajai normai atbilstošs alveolārais kauls ar periostu. Hematoksilīns un eozīns, $\times 100$

3.9. mikrofotogrāfija. **Maz (+) *MMP-2* pozitīvu epiteliocītu 7 gadus veca kontroles pacienta mutes dobuma gļotādā. *MMP-2* IMH, × 200**

3.10. mikrofotogrāfija. **Reti (0/+) *MMP-8* pozitīvi epiteliocīti un saistaudu šūnas 7 gadus veca kontroles pacienta mutes dobuma gļotādā (bultiņa). *MMP-8* IMH, × 200**

3.11. mikrofotogrāfija. **Maz līdz vidēji daudz (+/++) perēkļveidīgu novietotu *MMP-9* pozitīvu epiteliocītu 5 gadus veca kontroles pacienta mutes dobuma gļotādā. *MMP-9 IMH*, × 200**

3.12. mikrofotogrāfija. **Retas (0/+) *TIMP-2* pozitīvas epitelijsūnas 9 gadus veca kontroles pacienta mutes dobuma gļotādā. *TIMP-2 IMH*, × 200**

3.13. mikrofotogrāfija. Maz (+) *TIMP-4* pozitīvu epitēlijšūnu 9 gadus veca kontroles pacienta mutes dobuma gļotādā. *TIMP-4 IMH*, × 200

3.14. mikrofotogrāfija. Vidēji daudz (++) *MSX1* pozitīvu epitēlijšūnu un saistaudu šūnu 8 gadus veca kontroles pacienta mutes dobuma gļotādā. *MSX1 IMH*, × 100

3.15. mikrofotogrāfija. Vidēji daudz (++) IRF6 vāju pozitīvu saistaudu šūnu 10 gadus veca kontroles pacienta mutes dobuma gļotādā. IRF6 *IMH*, × 200

3.16. mikrofotogrāfija. Vidēji daudz (++) PAX9 saturošu bazālā un poligonālā slāņa šūnu 13 gadus veca kontroles pacienta mutes dobuma gļotādā. PAX9 *IMH*, × 200

3.17. mikrofotogrāfija. Vidēji daudz (++) vāju un intensīvi krāsotu RYK saturošu epitēlijšūnu 5 gadus veca kontroles pacienta mutes dobuma gļotādā. RYK *IMH*, × 200

3.18. mikrofotogrāfija. Ļoti daudz (++++), *TGFβ3* pozitīvu epitēlijšūnu 9 gadus veca kontroles pacienta mutes dobuma gļotādā. *TGFβ3 IMH*, × 200

3.19. mikrofotogrāfija. Maz (+) vāju krāsotu *VEGF* saturošu endotēlijšūnu 7 gadus veca kontroles pacienta mutes dobuma gļotādā (bultiņas). *VEGF IMH*, $\times 200$

3.20. mikrofotogrāfija. Daudz (++++) *CD34* pozitīvu šūnu 9 gadus veca kontroles pacienta mutes dobuma gļotādas asinsvadu sienīnā. *CD34 IMH*, $\times 100$

3.21. mikrofotogrāfija. Maz (+) *PGP 9.5* pozitīvu nervšķiedru *lamina propria* 9 gadus veca kontroles pacienta mutes dobuma gļotādā (bultiņas). *PGP 9.5 IMH*, × 200

3.22. mikrofotogrāfija. Maz (+) *Ki-67* pozitīvu epitēlijšūnu 14 gadus veca kontroles pacienta mutes dobuma gļotādā. *Ki-67 IMH*, × 200

3.23. mikrofotogrāfija. Vidēji daudz (++) nestīna pozitīvu epitēlijšūnu 8 gadus veca kontroles pacienta mutes dobuma gļotādā. Nestīns *IMH*, × 200

3.24. mikrofotogrāfija. Maz līdz vidēji daudz (+/++) apoptotisku šūnu 9 gadus veca kontroles pacienta mutes dobuma gļotādas epitēlijā. *TUNEL*, × 200

3.25. mikrofotogrāfija. Vidēji daudz (++) *OC* pozitīvu osteocītu 10 gadus un 5 mēnešus veca kontroles pacienta kaulaudos. *OC IMH*, $\times 100$

3.26. mikrofotogrāfija. Vidēji daudz (++) *OPN* pozitīvu osteocītu 10 gadus un 2 mēnešus veca kontroles pacienta kaulaudos. *OPN IMH*, $\times 200$

3.27. mikrofotogrāfija. **Vidēji daudz (++) *OPG* pozitīvu osteocītu 6 gadus un 9 mēnešus veca kontroles pacienta kaulaudos. *OPN IMH*, × 100**

3.28. mikrofotogrāfija. **Daudz (+++) *BMP2/4* pozitīvu osteocītu 11 gadus un 7 mēnešus veca kontroles pacienta audos. *BMP2/4 IMH*, × 200**

3.29. mikrofotogrāfija. Maz (+) *MMP-2* pozitīvu osteocītu 10 gadus un 2 mēnešus veca kontroles pacienta kaulaudos. *MMP-2 IMH*, $\times 200$

3.30. mikrofotogrāfija. Maz (+) *TIMP-2* pozitīvu osteocītu 10 gadus un 2 mēnešus veca kontroles pacienta kaulaudos. *MMP-2 IMH*, $\times 200$

3.31. mikrofotogrāfija. Vidēji daudz (++) *TGFβ3* pozitīvu osteocītu 10 gadus un 2 mēnešus veca kontrolas pacienta kaulaudos. *TGFβ3 IMH*, × 100

3.32. mikrofotogrāfija. Vidēji daudz (++) *MMP-2* pozitīvu epitēlijšūnu un saistaudu šūnu mutes dobuma subepitēlijā 3 mēnešus vecam zīdānim ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni pēc lūpas plastikas. *MMP-2 IMH*, × 200

3.33. mikrofotogrāfija. Vidēji daudz (++) *MMP-2* pozitīvu šūnu mutes dobuma saistaudos 3 mēnešus vecam zīdainim ar vienaspusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni pēc lūpas plastikas. *MMP-2* *IMH*, $\times 100$

3.34. mikrofotogrāfija. Vidēji daudz (++) *MMP-2* pozitīvu epitēlijšūnu mīksto aukslēju gļotādā 9 mēnešus vecam bērnam ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni. *MMP-2* *IMH*, $\times 200$

3.35. mikrofotogrāfija. Daudz (+++) *MMP-2* pozitīvu šūnu cieta aukslēju gļotādā 3 gadus un 3 mēnešus vecam bērnam ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni. *MMP-2* *IMH*, $\times 200$

3.36. mikrofotogrāfija. Maz līdz vidēji daudz (+/++) *MMP-8* pozitīvu mutes dobuma gļotādas epitēlijšūnu 3 mēnešus vecam zīdānim ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni pēc lūpas plastikas. *MMP-8* *IMH*, $\times 200$

3.37. mikrofotogrāfija. **Daudz (+++) *MMP-8* pozitīvu epitēlijšūnu un maz (+) *MMP-8* saturošu saistaudu šūnu** 4 mēnešus vecam zīdainim ar vienaspusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni pēc lūpas plastikas. *MMP-8 IMH*, × 100

3.38. mikrofotogrāfija. **Vidēji daudz (++) *MMP-8* pozitīvu šūnu** miksto aukslēju glotādā 9 mēnešus vecam zīdainim ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni. *MMP-8 IMH*, × 200

3.39. mikrofotogrāfija. Maz līdz vidēji daudz (+/++) *MMP-8* pozitīvu šūnu cieto aukslāju glotādā 3 gadus un 4 mēnešus vecam bērnam ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslāju šķeltni. *MMP-8 IMH*, × 200

3.40. mikrofotogrāfija. Retas (0/+) *MMP-9* pozitīvas epitēlijšūnas 4 mēnešus vecam zīdaiņim ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslāju šķeltni pēc lūpas plastikas. *MMP-9 IMH*, × 200

3.41. mikrofotogrāfija. Vidēji daudz (++) *MMP-9* pozitīvu epitēlijšūnu un daudz (+++) *MMP-9* saturošu saistaudu šūnu 3 mēnešus vecam zīdainim ar vienaspusēju šķeltni pēc lūpas plastikas. *MMP-9 IMH*, $\times 100$

3.42. mikrofotogrāfija. Vidēji daudz (++) *MMP-9* pozitīvu epitēlijšūnu un daudz (+++) *MMP-9* saturošu saistaudu šūnu mīksto aukslēju gļotādā 9 mēnešus vecam zīdainim ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni. *MMP-9 IMH*, $\times 200$

3.43. mikrofotogrāfija. Vidēji daudz līdz daudz (++)/+++ *TIMP-2* pozitīvu polimorfā slāņa epitēlijšūnu lūpas plastikas laikā iegūtajā gļotādā 3 mēnešus vecam zīdainim ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni. *TIMP-2* *IMH*, $\times 250$

3.44. mikrofotogrāfija. Vidēji daudz (++) *TIMP-2* vāji pozitīvas bazālā un polimorfā slāņa epitēlijšūnas un vidēji daudz līdz daudz (++)/+++ *TIMP-2* saturošas saistaudu šūnas lūpas plastikas laikā iegūtajā gļotādā 3 mēnešus vecam zīdainim ar vienas pusē caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni. *TIMP-2* *IMH*, $\times 200$

3.45. mikrofotogrāfija. Maz (+) *TIMP-2* pozitīvu epitēlijšūnu un retas (0/+) *TIMP-2* saturošas saistaudu šūnas mīksto aukušļu gļotādā 9 mēnešus vecam zīdainim ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukušļu šķeltni. *TIMP-2* IMH, × 200

3.46. mikrofotogrāfija. Retas (0/+) *TIMP-4* pozitīvas epitēlijšūnas un maz (+) *TIMP-4* saturošu saistaudu šūnu 4 mēnešus vecam zīdainim ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukušļu šķeltni pēc lūpas plastikas. *TIMP-4* IMH, × 400

3.47. mikrofotogrāfija. Vidēji daudz (++) *TIMP-4* pozitīvu poligonālā slāņa epitēlijšūnu, bagātīga *TIMP-4* ekspresija bazālās šūnās un daudz (+++) faktoru saturošu saistaudu šūnu 3 mēnešus vecam zīdānim ar viļņusēju šķeltni pēc lūpas plastikas.
TIMP-4 IMH, $\times 100$

3.48. mikrofotogrāfija. Vidēji daudz (++) *TIMP-4* pozitīvu epitēlijšūnu un vidēji daudz (++) *TIMP-4* saturošu saistaudu šūnu 3 gadus, 3 mēnešus vecam zīdānim ar abpusēju šķeltni pēc mīksto aukslēju plastikas. *TIMP-4* IMH, $\times 250$

3.49. mikrofotogrāfija. Vidēji daudz līdz daudz (++)/+++ *TIMP-4* pozitīvu epitēlijšūnu un saistaudu šūnu 3 gadus, 3 mēnešus vecam zīdainim ar abpusēju šķeltni pēc cieto aukslēju plastikas. *TIMP-4 IMH*, × 200

3.50. mikrofotogrāfija. Maz (+) *MSX1* saturošu epitēlijšūnu lūpas plastikas laikā iegūtajā materiālā 3 mēnešus vecam pacientam ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni. *MSX1 IMH*, × 200

3.51. mikrofotogrāfija. **Vidēji daudz līdz daudz (++/+++)** perēklļveidīgu izvietotu MSX1 saturošu epitēlijšūnu un saistaudu šūnu lūpas plastikas laikā iegūtajā materiālā 4 mēnešus vecam pacientam ar vienaspusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni. MSX1 *IMH*, × 100

3.52. mikrofotogrāfija. **Daudz līdz ļoti daudz (+++/++++)** MSX1 saturošu epitēlijšūnu un vidēji daudz (++) saistaudu šūnu cieto aukslēju plastikas laikā iegūtajā materiālā 3 gadus vecam pacientam ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni. MSX1 *IMH*, × 100

3.53. mikrofotogrāfija. **Maz (+) IRF6 pozitīvu epitēlijšūnu un vidēji daudz (++) saistaudu šūnu 4 mēnešus vecam zīdainim ar abpusēju šķeltņi - lūpas plastika.**
IRF6 IMH, × 200

3.54. mikrofotogrāfija. **Vidēji daudz (++) IRF6 pozitīvu saistaudu šūnu subepitēlijā 3 mēnešus vecam zīdainim ar vienaspusēju šķeltņi - lūpas plastika.** IRF6 IMH, × 200

3.55. mikrofotogrāfija. Vidēji daudz (++) IRF6 pozitīvu epitēlijšūnu un saistaudu šūnu 10 mēnešus vecam bērnam ar abpusēju šķeltni – mīksto aukslēju plastika.
IRF6 *IMH*, × 200

3.56. mikrofotogrāfija. Daudz (+++) vāju un intensīvi krāsotu IRF6 pozitīvu epitēlijšūnu un saistaudu šūnu 3 gadus un 6 mēnešus vecam bērnam ar abpusēju šķeltni - cieto aukslēju plastika. IRF6 *IMH*, × 200

3.57. mikrofotogrāfija. **Daudz (+++) PAX9 pozitīvu šūnu siekalu dziedzeru izvados 3 mēnešus vecam zīdainim ar abpusēju šķeltņi - lūpas plastika. PAX9 *IMH*, × 200**

3.58. mikrofotogrāfija. **Maz (+) PAX9 pozitīvu epitēlijsūnu 4 mēnešus vecam zīdainim ar abpusēju šķeltņi - lūpas plastika. PAX9 *IMH*, × 200**

3.59. mikrofotogrāfija. Vidēji daudz līdz daudz (++)/+++ PAX9 pozitīvu epitēlijšūnu un maz (+) saistaudu šūnu 4 mēnešus vecam zīdainim ar vienaspusēju šķeltni - lūpas plastika. PAX9 *IMH*, × 200

3.60. mikrofotogrāfija. Ļoti daudz (+++++) PAX9 pozitīvu epitēlijšūnu 3 gadus un 2 mēnešus vecam bērnam ar abpusēju šķeltni - cieto aukslēju plastika. PAX9 *IMH*, × 200

3.61. mikrofotogrāfija. Retas (0/+) RYK pozitīvas epitēlijšūnas 3 mēnešus vecam zīdainim ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni - lūpas plastika. RYK *IMH*, × 200

3.62. mikrofotogrāfija. Vidēji daudz (++) RYK pozitīvu epitēlijšūnu 3 mēnešus vecam zīdainim ar vienaspusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni - lūpas plastika. RYK *IMH*, × 100

3.63. mikrofotogrāfija. Vidēji daudz līdz daudz (++) RYK pozitīvu epitēlijšūnu 3 gadus un 4 mēnešus vecam bērnam ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņi – cieto aukslēju plastika. RYK IMH, $\times 200$

3.64. mikrofotogrāfija. Retas (0/+) $TGF\beta 3$ pozitīvas saistaudu šūnas 5 mēnešus vecam bērnam ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņi - lūpas plastika. $TGF\beta 3$ IMH, $\times 400$

3.65. mikrofotogrāfija. Daudz (+++) *TGFβ3* pozitīvu šūnu epitēlijā 4 mēnešus vecam zīdainim ar vienaspusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni - lūpas plastika. *TGFβ3* IMH, × 100

3.66. mikrofotogrāfija. Vidēji daudz (++) *TGFβ3* pozitīvu šūnu epitēlijā 9 mēnešus vecam bērnam ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni – mīksto aukslēju plastika. *TGFβ3* IMH, × 250

3.67. mikrofotogrāfija. **Maz (+) VEGF** pozitīvu endotēliju 3 mēnešus vecam zīdainim ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni - lūpas plastika. **VEGF IMH, × 200**

3.68. mikrofotogrāfija. **Retas (0/+) VEGF** saturošas šūnas asinsvadu sienās 6 mēnešus vecam zīdainim ar vienaspusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni – lūpas plastika. **VEGF IMH, × 250**

3.69. mikrofotogrāfija. Maz (+) *VEGF* pozitīvu endotēlijsūnu 10 mēnešus vecam zīdaiņim ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni – mīksto aukslēju plastika. *VEGF IMH*, × 400

3.70. mikrofotogrāfija. Ļoti daudz (+++++) *CD34* pozitīvu endotēlijsūnu 3 mēnešus vecam bērnam ar vienpusēju lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni lūpas plastikas laikā paņemtajā mutes dobuma gļotādā. *CD34 IMH*, × 200

3.71. mikrofotogrāfija. Ļoti daudz (++++ *CD34* pozitīvu endotēlijšūnu 3 gadus 2 mēnešus vecam bērnam ar abpusēju lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni cieto aukslēju plastikas laikā paņemtajā mutes dobuma gļotādā. *CD34 IMH*, $\times 200$

3.72. mikrofotogrāfija. Retas (0/+) *PGP 9.5* saturošas nervšķiedras epitēlijā un subepitēlijā, kā arī asinsvadu sienā 3 mēnešus vecam bērnam ar abpusēju šķeltni – lūpas plastika. *PGP 9.5 IMH*, $\times 100$

3.73. mikrofotogrāfija. **Daudz (+++) *PGP 9.5* saturošu nervšķiedru ap un asinsvadu sieniņā 3 mēnešus vecam bērnam ar vienaspusēju šķeltni – lūpas plastika.**
PGP 9.5 IMH, × 200

3.74. mikrofotogrāfija. **Vidēji daudz (++) *PGP 9.5* saturošu nervšķiedru ap mata folikuliem 4 mēnešus vecam bērnam ar vienaspusēju šķeltni – lūpas plastika.** *PGP 9.5 IMH, × 100*

3.75. mikrofotogrāfija. Maz (+) *PGP 9.5* saturošu nervšķiedru ap siekalu dziedzeriem 3 mēnešus vecam bērnam ar viopusēju šķeltni – lūpas plastika. *PGP 9.5 IMH*, $\times 200$

3.76. mikrofotogrāfija. *PGP 9.5* saturošs nervu šķiedru kūlītis 3 mēnešus vecam bērnam ar viopusēju šķeltni – lūpas plastika. *PGP 9.5 IMH*, $\times 200$

3.77. mikrofotogrāfija. **Reti (0/+) PGP 9.5 saturoši neuroendokrīni epiteliocīti 3 mēnešus vecam bērnam ar vienkāršu caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un auslēju šķeltni – lūpas plastika. PGP 9.5 IMH, $\times 100$**

3.78. mikrofotogrāfija. **Maz (+) līdz vidēji daudz (++) PGP 9.5 saturošu nervu šķiedru stratum basale 9 mēnešus vecam bērnam ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un auslēju šķeltni – mīksto auslēju plastika. PGP 9.5 IMH, $\times 250$**

3.79. mikrofotogrāfija. **Daudz (+++) sīku *PGP 9.5* saturošu nervšķiedru epitēlijā un subepitēlijā 3 gadus un 5 mēnešus vecam bērnam ar abpusēju šķeltni – cieto aukslēju plastika. *PGP 9.5 IMH*, × 100**

3.80. mikrofotogrāfija. **Reti (0/+) *Ki-67* pozitīvi epitelociāti 3 mēnešus vecam bērnam ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni – lūpas plastika. *Ki-67 IMH*, × 200**

3.81. mikrofotogrāfija. Maz (+) perēkļveidā lokalizētu *Ki-67* pozitīvu epiteliocītu 4 mēnešus vecam bērnam ar vienaspusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni – lūpas plastika. *Ki-67 IMH*, $\times 100$

3.82. mikrofotogrāfija. Maz (+) vāju krāsotu *Ki-67* pozitīvu epiteliocītu 9 mēnešus vecam zīdainim ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni – mīksto aukslēju plastika. *Ki-67 IMH*, $\times 100$

3.83. mikrofotogrāfija. Daudz (+++) nestīnu pozitīvu bazālā slāņa šūnu 6 mēnešus vecam bērnam ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņi – lūpas plastika. Nestīna *IMH*, × 200

3.84. mikrofotogrāfija. Ļoti daudz (++++), nestīnu saturošu epitēlijsūnu *stratum basale* 3 mēnešus vecam bērnam ar vienaspusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņi – lūpas plastika. Nestīna *IMH*, × 200

3.85. mikrofotogrāfija. Vidēji daudz (++) nestīnu saturošu šūnu 3 gadus un 4 mēnešus vecam bērnam ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni – cieto aukslēju plastika. Nestīna *IMH*, $\times 250$

3.86. mikrofotogrāfija. Vidēji daudz (++) apoptotisku šūnu 4 mēnešus vecam bērnam ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni – lūpas plastika. *TUNEL*, $\times 250$

3.87. mikrofotogrāfija. **Daudz (+++)** apoptotisku šūnu 3 mēnešus vecam bērnam ar vienas pusē caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni – lūpas plastika. *TUNEL*, $\times 200$

3.88. mikrofotogrāfija. **Daudz (+++)** OC saturošu osteocītu 9 gadus un 2 mēnešus vecam bērnam ar abpusēji caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni – osteoplastika. *OC IMH*, $\times 250$

3.89. mikrofotogrāfija. Reti (0/+) *OPN* saturoši osteocīti 8 gadus un 11 mēnešus vecam bērnam ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni – osteoplastika (bultiņas). *OPN IMH*, $\times 200$

3.90. mikrofotogrāfija. Daudz (+++) *OPN* pozitīvu osteocītu 7 gadus un 2 mēnešus vecam bērnam ar vienaspusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni – osteoplastika. *OPN IMH*, $\times 100$

3.91. mikrofotogrāfija. **Daudz (+++) *OPG* saturošu osteocītu 9 gadus un 6 mēnešus vecam bērnam ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni – osteoplastika. *OPG IMH*, × 250**

3.92. mikrofotogrāfija. **Maz (+) *MMP-2* saturošu osteocītu 9 gadus un 6 mēnešus vecam bērnam ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni – osteoplastika. *MMP-2 IMH*, × 200**

3.93. mikrofotogrāfija. Vidēji daudz (++) *MMP-2* saturošu osteocītu 7 gadus un 1 mēnesi vecam bērnam ar viļņveidīgu caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni – osteoplastika. *MMP-2 IMH*, × 200

3.94. mikrofotogrāfija. Daudz (+++) *TIMP-2* saturošu osteocītu 7 gadus un 8 mēnešus vecam bērnam ar abpusēji caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni – osteoplastika. *TIMP-2 IMH*, × 100

3.95. mikrofotogrāfija. Daudz (+++) *BMP2/4* saturošu osteocītu 8 gadus un 6 mēnešus vecam bērnam ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni – osteoplastika. *BMP2/4 IMH*, × 200

3.96. mikrofotogrāfija. Daudz (+++) *BMP2/4* saturošu osteocītu 6 gadus un 8 mēnešus vecam bērnam ar vienaspusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni – osteoplastika. *BMP2/4 IMH*, × 100

3.97. mikrofotogrāfija. **Daudz (+++) $TGF\beta 3$ saturošu osteocītu 8 gadus un 5 mēnešus vecam bērnam ar vienpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni – osteoplastika. $TGF\beta 3$ IMH, $\times 100$**

3.98. mikrofotogrāfija. **Vidēji daudz (++) $TGF\beta 3$ saturošu osteocītu 8 gadus un 6 mēnešus vecam bērnam ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni – osteoplastika. $TGF\beta 3$ IMH, $\times 100$**

RSU Ētikas komitejas lēmumi

RSU ĒTIKAS KOMITEJAS LĒMUMS

Rīga, Dzirciema iela 16, LV-1007
Tel.409173

Komitejas sastāvs	Kvalifikācija	Nodarbošanās
1. Prof. L. Feldmane	Dr. habil. med.	patologs
2. Prof. J. Baltkājs	Dr.habil.med.	farmakologs
3. Prof. L.AberbergaAugškalne	Dr. habil.med.	fiziologs
4. Doc. E.Daugulis	Dr. med.	anesteziologs
5. Doc. I Bārene	Dr.pharm.	farmaceits
6. Asoc.prof. U.Teibe	Dr. biol.	fiziķis
7. Doc. M.Pūce	Dr.med.	ķirurgs

Pieteikuma iesniedzējs: M.Pilmane
RSU Anatomijas un antropoloģijas institūts

Pētījuma nosaukums: Augšanas reģenerācijas un kvalitātes marķieri iedzimto šķeltnu patpēģinēzē, diagnostikā un terapijas prognozē.

Iesniegšanas datums: 7.05.2003.

Izskatītie dokumenti :

- (X) Pētījuma protokols:
- (X) Pētījuma veids: operatīvā materiāla fiksēto audu morfoloģiska izpēte
- (X) Pētījuma populācija: Lūpu, aukslēju un iedzimtu sejas šķautņu centra pacienti
- (X) Informācija par pētījumu
- (X) Piekrišana piedalīties pētījumā:

Citi dokumenti: SIA RSU Stomatoloģijas institūta direktores, Lūpu, aukslēju un iedzimtu sejas šķautņu centra vadītājas piekrišana

Lēmums: pozitīvs - piekrist biomedicīniskajam pētījumam.

Vārds, uzvārds: Līga AberbergaAugškalne Tituls: Dr.habil. med. prof.
priekšsēdētājs

Paraksts

Ētikas komitejas sēdes datums: 22.05.2003.

RSU ĒTIKAS KOMITEJAS LĒMUMS

Rīga, Dzirciema iela 16, LV-1007
Tel. 67409089

Komitejas sastāvs	Kvalifikācija	Nodarbošanās
1. Asoc. prof. Olafs Brūvers	Dr.theo.	teologs
2. Professore Vija Sīle	Dr.phil.	filozofs
3. Docente Santa Purviņa	Dr.med.	farmakologs
4. Asoc. prof. Voldemārs Arnis	Dr.biol.	rehabilitologs
5. Professore Regīna Kleina	Dr.med.	patalogs
6. Asoc. prof. Guntars Pupelis	Dr.med.	ķirurgs
7. Asoc. prof. Viesturs Līguts	Dr.med.	toksikologs

Pieteikuma iesniedzējs:

Liene Smane
AAI Morfoloģijas katedra

Pētījuma nosaukums:

„Audu funkcionālā morfoloģija bērniem ar abpusējām
caurejošām lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju
šķeltnēm”

Iesniegšanas datums:

17.01.2013.

Pētījuma protokols:

Minētā pētījuma mērķis tiek sasniegts izmantojot RSU
Anatomijas un antropoloģijas institūta arhīva kontroles materiālu, kā arī RSU Stomatoloģijas
institūta operācijas materiālu izpēti, iegūto datu apstrādi un analīzi, kā arī izsakot secinājumus un
priekšlikumus. Minētais pētījums nerada nekādas ētiska rakstura problēmas. Personu datu
aizsardzība un konfidencialitāte nodrošināta.

Pētījuma populācija:

nav norādīta

Komitejas lēmums:

piekrist pētījumam

Komitejas priekšsēdētājs Olafs Brūvers

Tituls: Dr. miss., asoc. prof.

Paraksts _____

Ētikas komitejas sēdes datums: 17.01.2013.