Liene Smane-Filipova

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

Promocijas darba kopsavilkums
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 darba kopsavilkums
medicīnas doktora zinātniskā grāda iegūšanai

Specialitāte – morfoloģija

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

Rīga, 2016

Promocijas darbs izstrādāts: Rīgas Stradiņa universitātes Anatomijas un antropoloģijas institūtā, Morfoloģijas katedrā

Darba zinātniskā vadītāja:

Dr. med., Dr. habil. med. profesore **Māra Pilmane**,
Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

Oficiālie recenzenti:

Dr. med. profesore **Ilze Štrumfa**,
Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

Dr. med. vet. profesors **Arnis Mugurēvičs**,
Latvijas Lauksaimniecības universitāte

Dr. med. asociētā profesore **Renata Šimkūnaitė-Rizgeliene**,
Viļņas Universitāte, Lietuva

Promocijas darba aizstāvēšana notiks 2016. gada 9. decembrī plkst. 15.00 Rīgas Stradiņa universitātes Medicīnas promocijas padomes atklātā sēdē Rīgā, Dzirciema ielā 16, Hipokrāta auditorijā.

Ar promocijas darbu var iepazīties RSU bibliotēkā un RSU mājas lapā:
www.rsu.lv

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

Promocijas padomes sekretārs:

Dr. med. docents **Andrejs Vanags**

SATURS

Ievads	4
1. Materiāls un metodes	8
1.1. Morfoloģiski pētāmais materiāls	8
1.2. Morfoloģiskās metodes.....	9
1.2.1. Pētāmā audu materiāla fiksācija	9
1.2.2. Rutīnās histoloģijas krāsošanas metode	10
1.2.3. Imūnhistoķīmijas metode un reaģenti	10
1.2.4. <i>TUNEL</i> metode	13
1.3. Puskvantitatīvā skaitīšanas metode.....	14
1.4. Statistiskās metodes	14
2. Rezultāti	16
2.1. Morfoloģiskā atrade	16
2.1.1. Rutīnās histoloģijas dati kontroles grupas pacientiem	16
2.1.2. Rutīnās histoloģijas dati pacientiem ar šķeltni	16
2.2. Imūnhistoķīmisko pētījumu un apoptozes atrade	17
2.3. Statistiski apstrādāto datu analīze	30
3. Diskusija	33
4. Secinājumi	56
5. Izmantotā literatūra	59
6. Publikācijas un prezentācijas par pētījuma tēmu	67
Pateicības	71

IEVADS

Sejas šķeltnes ir viena no izplatītākajām iedzimtajām kraniofaciālajām displāzijām, kas bērnam izraisa estētiskus un funkcionālus traucējumus (Maclean *et al.*, 2009). No visiem šķeltņu gadījumiem nesindromālas šķeltnes ir 70 – 90%, savukārt sindromālas – 10 – 30% šķeltņu gadījumu (Jugessur *et al.*, 2009; Ray and Niswander, 2012). Šķeltnes, kas skar lūpu, alveolāro kaulu un aukslējas, var būt vienpusējas un abpusējas. 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).

Augšlūpas un sekundāro aukslēju saplūšanas morfopatogēnēzē ir ietverti vairāki precīzi koordinēti procesi: šūnu proliferācija, diferenciācija, migrācija, programmēta šūnu nāve, ekstracelulārās matricas (ECM) sintēze, vietējās audu aizsardzības faktoru bāzes veidošanās, kurus regulē dažādas signālmolekulas, un augšanas faktori. 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).

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

Mūsdienās, izmantojot morfoloģiskās un imūnhistoķīmiskās metodes, ir iespējams šūnu līmenī izpētīt morfopatogēnēzes procesus šīs embrionālās patoloģijas gadījumā.

Pētījuma mērķis bija specifisku signālmolekulu un šūnu nāves noteikšana šķeltnes skartajos audos, kā arī to faktoru noteikšana, kuri

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 uz dzīvnieku modeļiem un atsevišķi pētījumi uz cilvēka audiem, joprojām nav pilnībā skaidru datu par lokālu dažādu proteolītisku enzīmu, augšanas faktoru, transkripcijas faktoru, gēnu proteīnu, angiogēnēzi ietekmējošo faktoru, invāzijas, 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. Pārlicinoši 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.

Personīgais ieguldījums

Autore piedalījās visās pētījuma stadijās: pētījuma plānošanu, imūnhistoķīmisko marķieru izvēli, pētāmā materiāla vākšanu (t. sk. redzēja šķeltnu operācijas), zinātnisko datu ieguvu, 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.

Promocijas darba struktūra un apjoms

Promocijas darbs ir uzrakstīts latviešu valodā. Tam ir klasiska struktūra un tas sastāv no 8 daļām: ievads, literatūras apskats, materiāls un metodes, rezultāti, diskusija, secinājumi, literatūras saraksts un pielikumi. Promocijas darba apjoms ietver 211 lapaspuses, tai skaitā, 40 tabulas, 36 attēlus un 98 mikrofotogrāfijas. Literatūras saraksts sastāv no 321 avota.

1. MATERIĀLS UN METODES

1.1. Morfoloģiski pētāmais materiāls

Morfoloģiskajiem pētījumiem materiāls tika vākts RSU Stomatoloģijas institūta Lūpu, aukslēju un sejas šķeltnu centrā laika posmā no 2003. līdz 2015. gadam. Lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltnu skartie audi tika savākti primārās lūpas, mīksto un cieto aukslēju plastikas laikā, kā arī veicot alveolārā izauguma osteoplastiku ar kaula autotransplantāciju.

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 ar 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.

Kontroles materiāls tika iegūts augšlūpas saitītes plastikas laikā un zobu ekstrakcijas laikā. Mīksto audu materiāls tika ievākts SIA “RSU Stomatoloģijas institūta” 2013. gadā no bērniem ar augšlūpas saitītes hipertrofiju. Cietajiem audi tika izmantots RSU AAI arhīvā esošais 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 materiālas paņemšanas laikā bija vecumā no sešiem gadiem un deviņiem mēnešiem līdz 14 gadiem un pieciem mēnešiem.

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.

1.2. Morfoloģiskās metodes

1.2.1. Pētāmā audu materiāla fiksācija

Audu fiksācija 24 stundas tika veikta RSU Stomatoloģijas institūta Lūpu, aukslēju un sejas šķeltnu 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). Pēc fiksācijas pētāmais materiāls tika nogādāts RSU AAI Morfoloģijas laboratorijā skalošanai ar *Tyrode* šķīdumu 24 stundas, atūdeņošanai pieaugošas koncentrācijas spirta šķīdumos, 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.

1.2.2. Rutīnās histoloģijas krāsošanas metode

No katra zīdaiņa vai bērna operāciju laikā iegūtā audu materiāla bloka tika sagatavoti 3 mikrometri plāni audu griezumumi ar pusautomātiskā rotācijas mikrotoma (*Leica RM2245, Leica Biosystems Richmond Inc., ASV*) 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., ASV*).

1.2.3. Imūnhistoķīmijas metode un reaģenti

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

Imūnhistoķīmijā tika pielietotas sekojošas primārās antivielas: *MMP-2, MMP-8, MMP-9, TIMP-2, TIMP-4, MSX1, IRF6, PAX9, RYK, TGFβ3*, nestīns, *CD34, VEGF, PGP 9.5, OC, OPN, OPG, BMP2/4* un *Ki-67*.

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, ASV*);
5. HiDef Detection™ reakcijas amplifikators (*code-954D-31; Sigma-Aldrich, Rocklin, CA, ASV*);
6. HiDef Detection™ HRP polimēra iezīmētājs (*code-954D-32; Sigma-Aldrich, Rocklin, CA, ASV*);
7. Kazas *ImmunoCruz™ ABC* krāsošanas sistēma (*code-sc-2023; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, ASV*), tā ietver biotīnu saturošas sekundāras un terciālās antivielas, kas satur avidīnu un biotīna-mārrutku peroksidāzes šķīdumu;
8. *DAB Substrate Kit* (*code-957D-30; Cell Marque, Rocklin, CA, ASV*);
9. Hematoksilīns (*code-ab143166; Abcam, Burlingame, CA, ASV*);
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 griezumī 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 antiViela tika aizstāta ar antivielu atšķaidītāju *Antibody Diluent*. Šie griezumī tika lietoti kā negatīvā kontrole. Katrai preparātu sērijai tika pagatavotas arī pozitīvās kontroles (audos, kuros vienmēr ir pozitīva reakcija).

1.2.4. *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 dziedzerā, nukleotidu maisījums buferī, anti-fluorescēna antivielas un no aitam iegūts *Fab* fragments, kas konjugēts ar mārurtku peroksidāzi.

Pirmkārt, *TUNEL* reakcijas veikšanai audu paraugi tika deparafinizēti, izmantojot ksilolu un dīstošas 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 griezumā inkubēti ar mārurtku peroksidāzi saturošu reaģentu *Converte-POD solution* 30 min 37°C temperatūrā. Atkārtoti paraugi pa piecām minūtēm tika skaloti ar *TRIS* buferi, tad griezumā 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.

1.3. Puskvantitatīvā skaitīšanas metode

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 sekojoši:

- 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.

1.4. 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 $|r|$. 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, ASV*).

2. REZULTĀTI

2.1. Morfoloģiskā atrade

2.1.1. 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. Visu kontroles grupas pacientu zobu ekstrakciju laikā iegūtajos kaulaudos arī tika konstatēta vispārpieņemtajai normai atbilstoša balstaudu morfoloģiskā aina.

2.1.2. Rutīnās histoloģijas dati pacientiem ar šķeltņi

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. Turklāt, daļai bērnu ar šķeltņi epitēlijaudi garu izaugumu veidā iestiepās zemāk novietotajā *lamina propria*.

Pacientiem ar šķeltņi nereti vizualizējām *lamina propria* ar blīvi un dažkārt haotiski novietotiem kolagēno šķiedru kūlīšiem, starp kuriem bija atsevišķas saistaudu šūnas, galvenokārt, fibroblasti. 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.

2.2. Imūnhistoķīmisko pētījumu un apoptozes atrade

Kontroles grupas pacienti

Epitēlijā **MMP-2** saturošu šūnu bija maz līdz vidēji daudz (+/++) redzes laukā. Tikai vienam no septiņiem pacientiem tika konstatēts vidēji daudz (++) **MMP-2** saturošu saistaudu šūnu.

Epitēlijā bija sastopamas retas (0/+) līdz vidēji daudz (++) **MMP-8** pozitīvas šūnas. Arī saistaudos atrade bija līdzīga, proti, **MMP-8** pozitīvas šūnas bija robežās no retām (0/+) līdz maz (+) redzes laukā.

Lielākajai daļai pacientu **MMP-9** pozitīvas epitēlijšūnas bija robežās no retām (0/+) līdz vidēji daudz (++) šūnām redzes laukā. Saistaudos konstatētas **MMP-9** pozitīvas šūnas bija robežās no retām (0/+) līdz vidēji daudz (++).

TIMP-2 saturošas epitēlijšūnas bija robežās no retām (0/+) līdz vidēji daudz (++) šūnām. Diviem pacientiem atradām retas (0/+) **TIMP-2** pozitīvas saistaudu šūnas.

Epitēlijā **TIMP-4** klātbūtne variēja no retām (0/+) līdz vidēji daudz (++) pozitīvām šūnām redzes laukā, savukārt saistaudos **TIMP-4** pozitīvu šūnu relatīvais daudzums redzes laukā bija robežās no retām (0/+) līdz maz (+).

Epitēlijā tika konstatētas maz (+) līdz daudz (+++) **MSX1** pozitīvas šūnas redzes laukā. **MSX1** saistaudos variēja no maz (+) līdz vidēji daudz (++) pozitīvām šūnām redzes laukā.

Epitēlijā **IRF6** pozitīvas šūnas tika redzētas robežās no maz (+) līdz vidēji daudz (++) , bet saistaudos – no retām (0/+) līdz daudz (+++) redzes laukā.

Kopumā epitēlijā pārliecinoši tika konstatēts vidēji daudz (++) **PAX9** pozitīvu šūnu. Trīs kontroles grupas pacientiem tika konstatētas retas (0/+) **PAX9** saturošas saistaudu šūnas.

Epitēlijā un saistaudos bija atrodamas **RYK** saturošas šūnas robežās no retām (0/+) līdz vidēji daudz (++) redzes laukā.

Epitēlijā un saistaudos **TGFβ3** saturošo šūnu redzeslaukā vidēji bija daudz (+++).

VEGF iezīmēja maz (+) līdz vidēji daudz (++) endoteliocītus.

Imūnhistoķīmiski noteikto **CD34** pozitīvo šūnu relatīvais daudzums variēja no vidēji daudz (++) līdz daudz (+++) redzes laukā.

Kopumā **PGP 9.5** saturošas struktūras bija retas (0/+) līdz daudz (+++) redzes laukā.

Epitēlijā tika konstatētas retas (0/+) līdz maz (+) **Ki-67** pozitīvas šūnas redzes laukā.

Mutes dobuma gļotādā daudz (+++) šūnu saturēja **nestīnu**.

Maz (+) līdz vidēji daudz (++) epitēlijšūnās novērojām **apoptozes** klātbūtni.

OC klātbūtne kontroles grupas pacientu audos tika konstatēta osteocītos un osteoblastos visos audu paraugos. Imūnhistoķīmiski noteikto šūnu relatīvais daudzums variēja no vidēji daudz un daudz (++) līdz ļoti daudz (+++++) pozitīvu struktūru redzes laukā.

OPN variēja no atsevišķām (0/+) līdz vidēji daudz līdz daudz (++) pozitīvām kaulaudu šūnām redzes laukā.

OPG pozitīvas kaulaudu šūnas variēja no retām (0/+) līdz ļoti daudz (+++++) redzes laukā.

BMP2/4 saturošo osteoblastu un osteocītu skaits variēja no maz (+) līdz daudz (+++) redzes laukā.

MMP-2, **TIMP-2** variēja no reti sastopamām (0/+) līdz daudz (++) pozitīvām kaulaudu šūnām redzes laukā.

TGFβ3 saturošas kaulaudu šūnas variēja robežās no maz (+) līdz daudz (+++) redzes laukā.

Šķeltnu pacienti

***MMP-2* atrade pacientiem ar abpusēju caurejošu šķeltni**

Augšlūpas gļotādas epitēlijā visos audu paraugos tika konstatēts vidēji daudz (++) līdz ļoti daudz (+++++) pozitīvu šūnu. *MMP-2* pozitīvas saistaudu šūnas variēja no retām (0/+) līdz daudz (+++) redzes laukā (2.1. mikrofotogrāfija).

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

***MMP-2* IMH, x 200**

Mīksto aukslēju epitēlijā bija reti (0/+) līdz vidēji daudz (++) *MMP-2* saturošu šūnu redzes laukā. Saistaudu *MMP-2* pozitīvās šūnas variēja no retām (0/+) līdz daudz (+++) redzes laukā.

Cieto aukslēju audos *MMP-2* saturošas morfoloģiskās struktūras variēja no retām (0/+) līdz daudz (+++) redzes laukā (2.2. mikrofotogrāfija).

2.2. mikrofotogrāfija. **Daudz (+++) *MMP-2* pozitīvu šūnu cieto aukslēju glotādā 3 gadus un 3 mēnešus vecam bērnam ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņi. *MMP-2* IMH, x 200**

***MMP-8* atrade pacientiem ar abpusēju caurejošu šķeltņi**

Augšlūpas glotādas epitēlijā *MMP-8* variēja no atsevišķām (0/+) līdz daudz (+++) pozitīvām šūnām redzes laukā, kamēr saistaudos no atsevišķām (0/+) līdz maz (+).

Trim pacientiem netika fiksētas *MMP-8* pozitīvas šūnas mīkstajās aukslējās. Vienam pacientam bija vidēji daudz (++) *MMP-8* saturošas šūnas epitēlijā un daudz (+++) pozitīvas šūnas saistaudos (2.3. mikrofotogrāfija). Citos audu paraugos *MMP-8* pozitīvo šūnu relatīvais daudzums bija no retām (0/+) līdz maz (+) šūnām gan mutes dobuma glotādas epitēlijā, gan saistaudos.

2.3. mikrofotogrāfija. **Vidēji daudz (++) *MMP-8* pozitīvu šūnu mīksto aukslēju glotādā 9 mēnešus vecam zīdaiņim ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņi. *MMP-8* IMH, x 200**

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

***MMP-9* atrade pacientiem ar abpusēju caurejošu šķeltni**

Augšlūpas gļotādas epitēlijā *MMP-9* pozitīvas šūnas netika saskatītas divu pacientu audu paraugos. Pacientiem ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni tika fiksētas tikai retas (0/+) *MMP-9* pozitīvas epitēlijšūnas un saistaudu šūnas.

Mīksto aukslēju plastikas laikā iegūtajā materiālā *MMP-9* pozitīvie epiteliocīti variēja no maz (+) līdz daudz (+++) redzes laukā. *MMP-9* pozitīvo saistaudu šūnu atrade bija līdzīga, kaut gan vidējais imūnreaktīvo struktūru daudzums saistaudos bija lielāks (2.4. mikrofotogrāfija).

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

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

***TIMP-2* atrade pacientiem ar abpusēju caurejošu šķeltni**

Augšlūpas gļotādas epitēlijā *TIMP-2* pozitīvas šūnas variēja no maz (+) līdz daudz (++++) redzes laukā. *TIMP-2* saturošas saistaudu šūnas variēja robežās no atsevišķām (0/+) līdz vidēji daudz (++) redzes laukā.

Trīs pacientu mīksto aukslēju audu paraugos *TIMP-2* saturošas šūnas netika vizualizētas. Cītu pacientu audu paraugos konstatētas atsevišķas (0/+) līdz vidēji daudz (++) pozitīvas epitēlijšūnas un saistaudu šūnas redzes laukā.

Cieto aukslēju plastikas laikā iegūtajos audos tika iegūti tādi paši rezultāti kā mīksto aukslēju materiālā.

***TIMP-4* atrade pacientiem ar abpusēju caurejošu šķeltni**

Kopumā augšlūpas gļotādā maz (+) epiteliocītu saturēja *TIMP-4*. Septiņos audu paraugos *lamina propria* netika konstatēta neviena *TIMP-4* saturoša šūna. Astoniem šķeltnu pacientiem *TIMP-4* pozitīvas saistaudu šūnas tika konstatētas robežās no retām (0/+) līdz maz (+) redzes laukā.

Mīksto aukslēju 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 leikocīti saturēja *TIMP-4* (2.5. mikrofotogrāfija).

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

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 (+++).

MSX1 atrade pacientiem ar abpusēju caurejošu šķeltni

MSX1 saturēja mutes dobuma gļotādas epiteliocīti, un vienam pacientam tika fiksētas atsevišķas pozitīvas saistaudu šūnas. MSX1 saturēja retas (0/+) līdz vidēji daudz (++) šūnas seggļotādas epitēlijā (2.6. mikrofotogrāfija).

2.6. 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*, x 200**

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.

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

IRF6 atrade pacientiem ar abpusēju caurejošu šķeltni

No 16 pacientiem ar abpusēju caurejošu 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.

Mīksto aukslēju gļotādas epitēlijā tika redzētas retas (0/+) līdz daudz (+++), savukārt saistaudos – maz (+) līdz ļoti daudz (++++). IRF6 pozitīvas šūnas redzes laukā.

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

PAX9 atrade pacientiem ar abpusēju caurejošu šķeltni

Kopumā epitēlijā bija maz (+) epiteliocītu, kas saturēja PAX9 (2.7. mikrofotogrāfija). Interesanti, ka nevienā no lūpas primārās plastikas laikā iegūtajiem audu paraugiem netika redzētas PAX9 pozitīvas saistaudu šūnas.

2.7. mikrofotogrāfija. **Maz (+) PAX9 pozitīvu epitēlijšūnu 4 mēnešus vecam zīdaiņim ar abpusēju šķeltni - lūpas plastika. PAX9 IMH, x 200**

Mīksto aukslēju gļotādā tika novērotas retas (0/+) līdz daudz (+++) PAX9 pozitīvas epitēlijšūnas. Saistaudos netika vizualizētas PAX9 pozitīvas šūnas.

Cieto aukslēju gļotādas epitēlijā tika konstatētas vidēji daudz (++) līdz ļoti daudz (+++++) PAX9 pozitīvas šūnas redzes laukā. Cieto aukslēju lamina propria vienam pacientam saturēja daudz (++) PAX9 pozitīvas saistaudu šūnas.

RYK atrade pacientiem ar abpusēju caurejošu šķeltni

RYK klātbūtne augšlūpas gļotādas epitēlijā tika konstatēta tikai sešiem pacientiem ar abpusēju caurejošu šķeltni, turklāt nevienam pacientam netika redzēta RYK ekspresija lūpas lamina propria. Interesanti, ka visiem sešiem pacientiem tika atrasti reti (0/+) RYK saturoši epiteliocīti.

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.

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

***TGFβ3* atrade pacientiem ar abpusēju caurejošu šķeltni**

Kopumā pacientiem ar abpusēju caurejošu šķeltni augšlūpas gļotādas epitēlijā un saistaudos retas (0/+) šūnas saturēja *TGFβ3* (2.8. mikrofotogrāfija).

2.8. mikrofotogrāfija. **Retas (0/+) *TGFβ3* pozitīvas saistaudu šūnas 5 mēnešus vecam bērnam ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni - lūpas plastika. *TGFβ3* IMH, x 400**

Mīksto aukslēju plastikas laikā iegūtajā materiālā tika novērotas vidēji daudz (++) līdz ļoti daudz (+++++) *TGFβ3* saturošas epitēlijšūnas un saistaudu šūnas.

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

***VEGF* atrade pacientiem ar abpusēju caurejošu šķeltni**

Divpadsmit bērnu audu paraugi, kas tika iegūti lūpas plastikas laikā saturēja maz (+) līdz daudz (+++) pozitīvus endoteliocītus redzes laukā.

Mīksto aukslēju plastikas laikā iegūtajos audu paraugos tika konstatētas retas (0/+) līdz maz (+) *VEGF* saturošas endotēlijšūnas.

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

***CD34* atrade pacientiem ar abpusēju caurejošu šķeltni**

Kopumā *CD34* pozitīvo šūnu relatīvais daudzums bija ļoti daudz (++++)
redzes laukā.

Mīksto aukslēju plastikas laikā iegūtajos audu paraugos *CD34* pozitīvas
šūnas variēja no vidēji daudz (++) līdz ļoti daudz (++++)
redzes laukā.

Cieto aukslēju plastikas laikā iegūtajos audu paraugos *CD34* pozitīvas
šūnas bija robežās no vidēji daudz (++) līdz ļoti daudz (++++)
redzes laukā

***PGP 9.5* atrade pacientiem ar abpusēju caurejošu šķeltni**

Augšlūpas gļotādā vidēji tika konstatētas maz līdz vidēji daudz (+/++)
PGP 9.5 saturošas DNES struktūras, no retām (0/+) līdz vidēji daudz (++)
redzes laukā.

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 – (+).

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

***Ki-67* atrade pacientiem ar abpusēju caurejošu šķeltni**

Tikai vienam pacientam ar abpusēju caurejošu šķeltni 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.

Mīksto aukslēju plastikas laikā iegūtajos audu paraugos tika novēroti reti
(0/+) līdz maz (+) *Ki-67* pozitīvi epitēlijšūnu kodoli.

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.

Nestīna atrade pacientiem ar abpusēju caurejošu šķeltni

Kopumā tika konstatētas vidēji daudz (++) nestīnu pozitīvas epitēlijšūnas lūpas plastikas laikā iegūtajā materiālā.

Mīksto aukslēju audu paraugos bija maz (+) līdz daudz (+++) nestīnu pozitīvas šūnas redzes laukā.

Cieto aukslēju audu paraugos nestīnu saturošas šūnas tika redzētas robežās no vidēji daudz (++) līdz daudz (+++) redzes laukā.

Apoptozes atrade pacientiem ar abpusēju caurejošu šķeltni

Pacientiem ar abpusēju šķeltni visos audu paraugos apoptotiskās šūnas variēja no retām (0/+) līdz vidēji daudz (++) redzes laukā (2.9. mikrofotogrāfija).

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

OC atrade pacientiem ar abpusēju caurejošu šķeltņi

OC pozitīvie osteocīti abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltnu skartajos audos variēja no maz (+) līdz daudz (+++) redzes laukā (2.10. mikrofotogrāfija).

2.10. mikrofotogrāfija. **Daudz (+++) *OC* saturošu osteocītu 9 gadus un 2 mēnešus vecam bērnam ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņi – osteoplastika. *OC IMH*, x 250**

OPN atrade pacientiem ar abpusēju caurejošu šķeltņi

OPN pozitīvi osteocīti un osteoblasti variēja robežās no retiem (0/+) līdz maz (+) redzes laukā.

OPG atrade pacientiem ar abpusēju caurejošu šķeltņi

Pacientiem ar abpusēju šķeltņi audos *OPG* pozitīvās šūnas variēja no retām (0/+) līdz daudz (+++) redzes laukā.

MMP-2 atrade pacientiem ar abpusēju caurejošu šķeltņi

Bērniem ar abpusēju šķeltņi *MMP-2* pozitīvās šūnas variēja no retām (0/+) līdz daudz (+++) redzes laukā.

***TIMP-2* atrade pacientiem ar abpusēju caurejošu šķeltņi**

Abpusēju šķeltņņu pacientiem *TIMP-2* pozitīvas kaulaudu šūnas variēja robežās no retām (0/+) līdz daudz (+++) redzes laukā (2.11. mikrofotogrāfija).

2.11. mikrofotogrāfija. Daudz (+++) *TIMP-2* saturošu osteocītu 7 gadus un 8 mēnešus vecam bērnam ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņi – osteoplastika. *TIMP-2 IMH*, x 100

***BMP2/4* atrade pacientiem ar abpusēju caurejošu šķeltņi**

Pacientiem ar abpusēju šķeltņi audos tika atrastas retas (0/+) līdz daudz (+++) *BMP2/4* pozitīvas šūnas redzes laukā (2.12. mikrofotogrāfija).

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

***TGFβ3* atrade pacientiem ar abpusēju caurejošu šķeltni**

Kopumā tika konstatēti vidēji daudz (++) *TGFβ3* pozitīvi osteocīti bērniem ar abpusēju šķeltni (2.13. mikrofotogrāfija).

2.13. mikrofotogrāfija. Vidēji daudz (++) *TGFβ3* saturošu osteocītu 8 gadus un 6 mēnešus vecam bērnam ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni – osteoplastika. *TGFβ3* IMH, x 100

2.3. Statistiski apstrādāto datu analīze

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.

Šķeltņu skartu audu faktoru atrades statistiskie dati:

Kopumā smagākajam šķeltnes veidam – abpusējai caurejošai lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltnei – tika konstatēta statistiski ticami 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 ($p < 0,05$). Pārliecinoši identificējām, ka morfoloģiskās audu izmaiņas ir smagākas pacientiem ar abpusēju šķeltni. Atkārtotu operāciju laikā vieniem un tiem pašiem pacientiem darbā novērojām statistiski ticami palielinātu *MSX1*, *MMP-9*, *TIMP-4*, *TGFβ3*, *Ki-67* un statistiski ticami samazinātu *VEGF* ekspresiju ($p < 0,05$).

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

Audu materiālā, kas tika iegūts lūpas plastikas laikā no zīdaiņiem ar abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni tika konstatēta statistiski nozīmīga cieša, pozitīva korelācija starp *MMP-8* un *TIMP-4* epitēlijā, kā arī starp *TIMP-4* epitēlijā un *TIMP-4* saistaudos. Visvairāk ciešas, pozitīvas korelācijas tika konstatētas mīksto un cieto aukslēju plastikas laikā iegūtajos audu paraugos. Abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņu pacientu audos, kas iegūti osteoplastikas laikā, tika konstatēta cieša, pozitīva korelācija starp *BMP2/4* un *MMP-2* kaulu šūnās.

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

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.

3. DISKUSIJA

Kopumā pacientiem ar vienpusēju un abpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni 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 šķeltnu 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 embrijiem saistībā ar sejas un mutes dobuma attīstības morfoģenēzes mehānismiem, kā arī nav daudz dažādu audu faktoru imūnhistoķīmisku pētījumu par postnatāli operāciju laikā iegūtu zīdaiņu un bērnu sejas šķeltnu skarto audu morfoloģiju ontogēnētiskā 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 šķeltnu skarto audu šūnu fenotips atšķiras no normālu audu šūnu fenotipa (*Bodo et al.*, 1999). Šī iemesla dēļ pētījumi ar šķeltnu skarto audu paraugiem, kas iegūti postnatāli, var tikt uzskatīti par piemērotiem šķeltnu etiopatoģenēzes izpētei pat tad, ja šķeltne ir embrionālas izcelsmes audu attīstības traucējums.

Lūpu un aukslēju morfoģenēze ietver šūnu proliferāciju, diferenciāciju, migrāciju, programmēto šūnu nāvi, ekstracelulārās matricēs 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 šķeltni (*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 šķeltnu 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 šķeltņēm ($p < 0,05$). Tādējādi uzskatām, ka *MMP-2* šūnu membrānas asociētajam *MMP (MT1-MMP)/TIMP-2* signālceļam nenoliedzami ir nozīme sejas šķeltņu 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. 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 šķeltņu 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).

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 šķeltni ($p < 0,05$). *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 šķeltni, savukārt *TIMP-4* bagātīgi saturēja vienpusēju caurejošu 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 pārlicecinoši 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 šķeltni ($p < 0,001$), 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 šķeltni ($r_s = 0,802$; $p < 0,05$; $r_s = 0,818$; $p < 0,05$). 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 vienaspusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni ($p < 0,001$). 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 šķeltni attīstību Japānas bērnu populācijā (*Watanabe et al.*, 2006). 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). *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 (*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 vienaspusēju 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 vienaspusu 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. Takahara ar kolektīvu *in vitro*, kultivējot peļu aukslējas un inhibējot šūnu nāvi, pierādīja, ka pilnīgs apoptozes trūkums neietekmē aukslēju saplūšanu (*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 epitēlijsūnas 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 šķeltnu etiopatogēnēzē (*Vukojevic et al.*, 2012).

Nestīna un CD34 imūnhistoķīmiskais profils šķeltnes mīkstajos audos. Mūsu pētījumā vienpusēju un abpusēju šķeltni, kā arī bagātīgi kontroles pacientu gļotādā konstatējām nestīnu saturošas epitēlijšūnas un saistaudu šūnas. Salīdzinot nestīna klātbūtni materiālā, kas iegūts pēc lūpas plastikas pacientiem ar vienpusēju šķeltni un pacientiem ar abpusēju šķeltni, tika novērotas nozīmīgas atšķirības. Abpusēju šķeltni 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.

Mūsu pētījumā visos šķeltnu gadījumos konstatējām bagātīgu CD34 klātbūtni *lamina propria* asinsvadu sienīgas šūnās. Pārliecinoši vairāk CD34 pozitīvu endotēlijšūnu tika novērots šķeltnu 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 šķeltnu lūpas materiālā, salīdzinot ar vienpusēju šķeltnu 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 šķeltnu gadījumos. Izvērtējot šī faktora klātbūtni atkārtoti paņemtos audu paraugos, vizualizējām pārlicinoši 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 vienpusēju 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 šķeltnu etiopatoģenēzi.

Tiek uzskatīts, ka *TGFβ3* signālceļš mijiedarbojas ar citu augšanas faktoru, transkripcijas faktoru vai enzīmu signālceļiem, kuri iesaistās šķeltnu 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 izvērtējam 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 (*Saleem et al.*, 2012; *Tang et al.*, 2013; *Mehrotra*, 2015).

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* (Hosokawa *et al.*, 2003).

Salīdzinot vienpusēju caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņu audu paraugus, kas tika iegūti no pacientiem lūpas plastikas laikā, ar abpusēju šķeltņu audu paraugiem, atklājām, ka *VEGF* imūnreaktīvo struktūru vidējais relatīvais daudzums smagāko šķeltņu 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 šķeltņi. 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 (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 lokusos izraisa *Di Džordža* sindromu, kam klīniski raksturīga aukslēju šķeltne. 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).

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 elketronmikroskopijas 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 intervēta (*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 šķeltņi ($p < 0,05$), 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 šķeltni pacientiem 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 šķeltņi ($p < 0,001$). Šī atrade, iespējams, skaidrojama ar to, ka pacientiem ar abpusēju šķeltņi alveolārā kaula remodelācijas potenciāls ir mazāk izteikts nekā pacientiem ar vienpusēju šķeltņi.

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 šķeltnu alveolārā kaula defekta ārstēšanai bērniem maiņas sakodiena vecumā (*Herford et al.*, 2007). 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.

***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).

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 angioģenēzi, 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 angioģenēzi 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 pelu 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, 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. Izmantojot dzīvniekus eksperimentos, tika atklāts, ka izmainīta *OPN* ekspresija kavē agrīnu vaskularizāciju, pārmaina *ECM* organizāciju, kā arī kaula remodelāciju (Duvall *et al.*, 2008).

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 vienpusēja 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 pēcooperācijas 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 vienpusēju 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 šķeltņi, t.i., abpusēju alveolārā kaula šķeltņi, šī korelācija bija vājāk izteikta.

Diskusijas nobeigumā jāmin, ka šī darba pētījumā pirmo reizi ar imūnhistoķīmijas metodi kompleksi ir izvērtētas smagākā šķeltņu 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 šķeltņu skartajos audos, skaidri redzams, ka no audu deģenerācijas faktoriem abpusēju šķeltņu pacietu audos dominē *MMP-2*, bet kā inhibējošais faktors - *TIMP-2*. Bērniem ar abpusēju šķeltņi 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 šķeltņi. Atkārtotu operāciju laikā vieniem un tiem pašiem pacientiem darbā novērojām palielinātu *MSX1*, *MMP-9*, *TIMP-4*, *TGFβ3*, *Ki-67* un samazinātu *VEGF* ekspresiju.

4. 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 pēcoperācijas audu dzīšanu bez nozīmīgi paliekošiem rētaudiem bērniem ar vienpusēju caurejošu šķeltni. 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 *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 šķeltnu veida patoģenēzē.

5. Abpusēju šķeltnu skartos mīkstos audus raksturo samazināta *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 šķeltnu skartos mīkstos audus raksturo izteikta *CD34* ekspresija, kas norāda uz paaugstinātu asinsvadu šūnu veidošanās lokālo potenciālu.

6. Abpusējas caurejošas lūpas, alveolārā 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 *BMP2/4*, *TGFβ3*, *MMP-2*, *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 *OPG* un *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 ontoģenēzē, 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.

5. IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. Bodo M., Baroni T., Carinci F., Becchetti E., et al. TGFβ 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.
6. 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.
7. 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-β3. *BMC Dev Biol.* 2010; 10: 93.
8. 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.
9. Bush J. O., Jiang R. Palatogenesis: morphogenetic and molecular mechanisms of secondary palate development. *Development.* 2012; 139(2): 231–243.
10. Cantatore F. P., Crivellato E., Nico B., Ribatti D. Osteocalcin is angiogenic in vivo. *Cell Biol Int.* 2005; 29(7): 583–585.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.

17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. Ducy P., Desbois C., Boyce B., Pinero G., et al. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature.* 1996; 382(6590): 448–452.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. Halford M. M., Armes J., Buchert M., Meskenaite V., et al. *Ryk*-deficient mice exhibit craniofacial defects associated with perturbed *Eph* receptor crosstalk. *Nat Genet.* 2000; 25(4): 414–418.
29. 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.
30. 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.
31. Hsu S. M., Raine L., Fanger H. The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics. *Am J Clin Pathol.* 1981; 75(6): 816–821.
32. 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.

33. 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.
34. 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.
35. 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.
36. 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.
37. Jugessur A., Farlie P. G., Kilpatrick N. The genetics of isolated orofacial clefts: from genotypes to subphenotypes. *Oral Dis*. 2009; 15(7): 437–453.
38. 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.
39. 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.
40. 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.
41. 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.
42. 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.
43. 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.
44. 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.
45. 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.
46. 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.
47. 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.
48. Küchler 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.

49. 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.
50. 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.
51. 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.
52. 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.
53. 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.
54. 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.
55. 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.
56. 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.
57. 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.
58. 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.
59. 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.
60. 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.
61. 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.
62. Mehrotra D. Genomic expression in non syndromic cleft lip and palate patients: A review. *J Oral Biol Craniofac Res*. 2015; 5(2): 86–91.
63. 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.
64. 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.
65. 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.
66. 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.
 67. 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.
 68. 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.
 69. 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.
 70. 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.
 71. 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.
 72. 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.
 73. 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.
 74. Nassif A., Senussi I., Meary F., Loiodice S., et al. Msx1 role in craniofacial bone morphogenesis. *Bone.* 2014; 66: 96–104.
 75. Nikopensius 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.
 76. 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.
 77. 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.
 78. 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.
 79. 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.

80. 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.
81. 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.
82. Ravanti L., Kähäri V. M. Matrix metalloproteinases in wound repair (review). *Int J Mol Med.* 2000; 6(4): 391–407.
83. Ray H. J., Niswander L. Mechanisms of tissue fusion during development. *Development.* 2012; 139(10): 1701–1711.
84. 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.
85. 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.
86. 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.
87. 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.
88. 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.
89. 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.
90. 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.
91. 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.
92. 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.
93. 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.
94. 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.
95. Stefanini M., De Martino C., Zamboni L. Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature.* 1967; 216(5111): 173–174.

96. 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.
97. 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.
98. 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.
99. 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.
100. Tian M., Schiemann W. P. The TGF-beta paradox in human cancer: an update. *Future Oncol.* 2009; 5(2): 259–271.
101. Tian M., Schiemann W. P. The TGF-beta paradox in human cancer: an update. *Future Oncol.* 2009; 5(2): 259–271.
102. 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]
103. Van Lint P., Libert C. Matrix metalloproteinase-8: cleavage can be decisive. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2006; 17(4): 217–223.
104. 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.
105. 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.
106. 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.
107. 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.
108. 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.
109. 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.
110. 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.
111. 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.
112. 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.

113. 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.
114. 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.
115. 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.

Latviešu valodā

1. Akota I., Barkāne B., Grasmane N. Iedzimto sejas šķeltnu biežuma rādītāji Latvijā no 1960. līdz 1997. gadam. // *AML/RSU Zinātniskie raksti 2000.* – Rīga: AML/RSU, 2001, 166.–170. lpp.
2. Teibe U. *Bioloģiskā statistika.* Rīga: LU Akadēmiskais apgāds, 2007, 49.–58. lpp.

6. 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. **Smāne 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. **Smāne 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. **Smāne 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., **Smāne 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. **Smāne 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. **Smāne 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. **Smāne 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. **Smāne 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. **Smāne L.**, Pilmane M. “MSX1, IRF6 un PAX9 izvērtējums bērniem ar abpusējām lūpas un aukslēju šķeltnēm”, Bērnu klīniskās universitātes slimnīcas 2014. gada Zinātniskās konferences “Jaunas diagnostikas un ārstēšanas metodes Latvijas bērnu veselības uzlabošanai” Tēžu grāmata 48. lpp. (Stenda referāts).
6. **Smāne 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. **Smāne 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.