



Mārtiņš Vaivads

## Gēni un gēnu proteīni dažādu sejas šķeltņu skartos audos

Promocijas darba kopsavilkums zinātnes doktora grāda  
“zinātnes doktors (*Ph. D.*)” iegūšanai

Nozaru grupa – medicīnas un veselības zinātnes  
Nozare – medicīnas bāzes zinātnes, tai skaitā farmācija  
Apakšnozare – histoloģija un citoloģija

Rīga, 2023



RĪGAS STRADIŅA  
UNIVERSITĀTE

Mārtiņš Vaivads

ORCID 0000-0001-8282-9733

Gēni un gēnu proteīni dažādu  
sejas šķeltņu skartos audos

Promocijas darba kopsavilkums zinātnes doktora grāda  
“zinātnes doktors (*Ph. D.*)” iegūšanai

Nozaru grupa – medicīnas un veselības zinātnes

Nozare – medicīnas bāzes zinātnes, tai skaitā farmācija

Apakšnozare – histoloģija un citoloģija

Rīga, 2023

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

Promocijas darba vadītājas:

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

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

Oficiālie recenzenti:

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

*Dr. med. vet.* profesors **Ilmārs Dūrītis**,  
Latvijas Biozinātņu un tehnoloģiju universitāte

*Dr. med.* profesore **Ingrīda Balnytė**,  
Lietuvas Veselības zinātņu universitāte

Promocijas darbs tiks aizstāvēts RSU Medicīnas bāzes zinātņu, tai skaitā farmācijas, promocijas padomes atklātā sēdē 2023. gada 14. decembrī plkst. 10.45 attālināti, tiešsaistes platformā *Zoom*

Ar promocijas darbu var iepazīties RSU bibliotēkā un RSU tīmekļa vietnē:  
<https://www.rsu.lv/promocijas-darbi>

Promocijas padomes sekretārs:

*Dr. med.* docenta p.i. **Ģirts Šalms**

## Satura rādītājs

Darbā izmantotie saīsinājumi.....	5
Ievads.....	6
Darba mērķis .....	9
Darba uzdevumi .....	9
Darba hipotēze .....	9
Darba novitāte .....	10
1. Materiāls un metodes .....	11
1.1. Morfoloģiski pētāmais materiāls un pacientu grupu raksturojums ...	11
1.2. Morfoloģiskās metodes .....	12
1.2.1. Audu materiāla fiksācija .....	12
1.2.2. Rutīnas histoloģijas krāsošanas metode.....	13
1.2.3. Imūnhistoķīmijas metodes raksturojums un reaģenti .....	14
1.3. Datu apstrādes metodes.....	17
1.3.1. Puskvantitatīvā skaitīšanas metode.....	18
1.3.2. Statistiskās metodes .....	18
2. Rezultāti .....	20
2.1. Morfoloģiskā atrade .....	20
2.2. Imūnhistoķīmiski noteikto šķeltņu kandidātģeņu proteīnu raksturojums.....	21
2.2.1. BARX1 gēna proteīns.....	21
2.2.2. DLX4 gēna proteīns.....	22
2.2.3. FOXE1 gēna proteīns .....	24
2.2.4. HOXB3 gēna proteīns .....	26
2.2.5. MSX2 gēna proteīns .....	28
2.2.6. PAX7 gēna proteīns.....	30
2.2.7. PAX9 gēna proteīns.....	32
2.2.8. RYK gēna proteīns .....	34
2.2.9. SHH gēna proteīns.....	36
2.2.10. SOX3 gēna proteīns.....	38
2.2.11. WNT3A gēna proteīns.....	40
2.2.12. WNT9B gēna proteīns.....	41
2.3. Imūnhistoķīmiski noteikto šķeltņu kandidātģeņu proteīnu savstarpējo korelāciju novērtējuma dati .....	43
3. Diskusija .....	47
Secinājumi .....	67
Priekšlikumi pētījumiem nākotnē .....	69

Publikāciju, ziņojumu un patentu saraksts par promocijas darba tēmu .....	70
Literatūras saraksts .....	72
Pateicības.....	80

## Darbā izmantotie saīsinājumi

AAI	Anatomijas un antropoloģijas institūts
BARX1	BarH-līdzīgais homeobokss-1
BMP	Kaulu ( <i>bone</i> ) morfoģenētiskie proteīni
DLX	Mazāk distālais ( <i>Distal-less</i> ) homeobokss
DLX4	Mazāk distālais ( <i>Distal-less</i> ) homeobokss-4
FOXE1	Dakšas galvas ( <i>Forkhead</i> ) bokss E1
HOX	Homeoboksa gēni
HOXB3	Homeobokss B3
IMH	Imunohistoķīmija
MSX1	Muskuļu segmentu homeobokss-1
MSX2	Muskuļu segmentu homeobokss-2
PAX3	Pāra boksa transkripcijas faktors-3
PAX7	Pāra boksa transkripcijas faktors-7
PAX9	Pāra boksa transkripcijas faktors-9
RYK	Receptoram līdzīgā tirozīnkināze
$r_s$	Spīrmena korelācijas koeficients
RSU	Rīgas Stradiņa universitāte
SHH	<i>Sonic hedgehog</i> gēns
SOX3	SRY boksa transkripcijas faktors-3
TGF $\beta$	Transformējošais augšanas faktors beta
WNT	Bezpārnu tipa ( <i>Wingless-type</i> ) signālceļš
WNT3A	Bezpārnu tipa ( <i>Wingless-type</i> ) MMTV integrācijas vietas proteīns-3A
WNT9B	Bezpārnu tipa ( <i>Wingless-type</i> ) MMTV integrācijas vietas proteīns-9B

## Ievads

Sejas šķeltnes ir iedzimti sejas attīstības defekti, kas rodas sejas kroku nepilnīgas saaugšanas rezultātā. Sejas šķeltnēm var būt dažādi fenotipi un variācijas, kas ietekmē to lokalizāciju un smaguma pakāpi (Dixon et al., 2011). Šo kraniofaciālo defektu kopums spēj radīt būtiskas klīniskas izpausmes, kas ietekmē turpmāko bērna attīstību, runas spēju izveidi, rada elpošanas un rīšanas funkcijas traucējumus, ietekmē dzirdes un ožas maņu veidošanos, kā arī rada estētisku defektu un palielina socioekonomisko slogu pacientu ģimenēm (Wehby and Cassell, 2010). Globāli sejas šķeltnes ir vienas no biežākajām iedzimtajām patoloģijām ar globālo izplatību 1/700 jaundzimušajiem (Dixon et al., 2011).

Korektam sejas attīstības procesam ir nepieciešama dažādu gēnu un to kodēto proteīnu savstarpējā mijiedarbība. Šo regulatoro faktoru dažādā atrašanās vieta, aktivācija un ietekmes novērtējums kraniofaciālā apvidus izveidē ir būtisks, lai pilnvērtīgi varētu izprast dažādu šķeltnu morfopatogēnēzi cilvēka audos.

BarH-līdzīgais homeobokss 1 (*BARX1*) ir gēns, kas tiek ekspresēts augšžokļa un apakšžokļa ektomezenhīmas šūnās sejas attīstības procesā, nodrošinot kaulaudu un skrimšļaudu šūnu priekšteču sakopšanās procesu (Welsh et al., 2018). Dzīvniekiem samazināta *BARX1* ekspresija rada defektus osteohondrogēnisko šūnu sakopšanās procesā un augšžokļa hipoplāziju (Shimomura et al., 2019).

Mazāk distālā homeoboksa (*DLX*) gēni tiek ekspresēti noteiktos organisma attīstības etapos, un tie nodrošina ķermeņa ass formāciju un gandrīz visu orgānu sistēmu attīstību (Trinh et al., 2015a). *DLX* gēnu klīniskās izpausmes cilvēkiem ir relatīvi maz pētītas, bet *DLX4* gēna variants ir ticis saistīts ar bilaterālu aukslēju un lūpu šķeltnes attīstību (Wu Q. et al., 2015). *DLX*

gēni ir nozīmīgi arī sejas attīstības procesā, un to proteīni ir atrodami augšžokļa un apakšžokļa pāra kroku ektomezenhīmā (Jeong et al., 2012).

Dakšas galvas boksa proteīns E1 (FOXE1) ir transkripcijas faktors, kas embriogēnēzē nodrošina vairāku orgānu un to struktūras izveidi, ieskaitot aukslēju attīstību, un iesaistās sekundāro aukslēju izveidē un augšžokļa un deguna krokas saplūšanas procesā (Dathan et al., 2002). Vairākas FOXE1 gēna mutācijas ir saistītas ar aukslēju un lūpas šķeltņu attīstību (Moreno et al., 2009).

*Homeobox* (HOX) gēni kodē transkripcijas faktoros, kas regulē šūnu diferenciāciju un proliferāciju embriogēnēzē, nodrošinot korektu orgānu sistēmu attīstību. Homeobokss B3 (*HOXB3*) gēns regulē nervu kores šūnu migrāciju, kas ir būtiska žaunu loku rajona attīstībai, ietverot arī sejas izveidi (Frisdal and Trainor, 2014).

Muskuļu segmentu homeobokss 2 (*MSX2*) ir iesaistīts galvas attīstības procesā, kur nodrošina galvas preosteoblastu proliferāciju, un šī gēna produkti ir atrodami orofaciālajā rajonā: apakšžoklī, Mekeļa skrimslī un zobu aizmetņos (Alappat et al., 2003). *MSX1* un *MSX2* gēnu mutācijas ir saistītas ar aukslēju un lūpas šķeltņu fenotipu attīstību (Dai et al., 2014).

Pāra boksa transkripcijas faktors-7 (*PAX7*) un pāra boksa transkripcijas faktors-9 (*PAX9*) ir transkripcijas faktori, kas ietekmē nervu kores šūnu un aukslēju attīstību (Sull et al., 2009). *PAX7* ir atrodams aukslēju velvēs, Mekeļa skrimslī un deguna dobuma epitēlijā (Leslie and Marazita, 2013). Pētījumos ar pelēm ir konstatēts, ka šī gēna mutācijas ir saistītas ar deguna un augšžokļa attīstības anomālijām, ieskaitot šķeltnes (Leslie and Marazita, 2013). Savukārt *PAX9* gēna delēcija pelēs izraisa pilnīgu aukslēju šķeltni, defektīvu zobu un rīkles kabatu attīstību (Li et al., 2017).

Receptoram līdzīgā tirozīnkināze (*RYK*) ir proteīns, kas ir iesaistīts kraniofaciālo struktūru attīstībā (sekundāro aukslēju) un neironu diferenciācijā (Halford et al., 2000). *RYK* gēna mutācijas pelēm izraisa specifiskas sejas



fenotipa izmaiņas, ekstremitāšu saīsināšanos, barošanās traucējumus un respiratoras komplikācijas (Halford et al., 2000).

*Sonic hedgehog* (SHH) gēns ir kritiski nepieciešams sejas un galvas attīstības procesam. Tas iesaistās aukslēju un deguna izveidē, un to pārsvarā var atrast zonās ar epitēlija-mezenhīmas mijiedarbību, kur tas inducē mezenhīmas šūnu proliferāciju (Hu et al., 2015).

SRY-boksa transkripcijas faktors-3 (SOX3) kavē proneirālo diferenciācijas faktoru darbību un ietekmē nervu caurules un plakožu attīstību galvas rajonā. Šis faktors ir relatīvi maz pētīts šķeltnu attīstības procesā (Bylund et al., 2003).

Bezspārņu tipa (*Wingless-type*) MMTV integrācijas vietas (*WNT*) saimes gēni kodē vairākus proteīnus, kas nodrošina autokrīno un parakrīno regulāciju sejas attīstības procesā ar *WNT* signālceļa starpniecību (Chiquet et al., 2008). *WNT3A* gēns attīstības procesā nodrošina sejas reģionālo specifiskāciju augšlūpā, primārajās un sekundārajās aukslējās un tiek uzskatīts par vienu no lūpu un aukslēju šķeltnes kandidātģēniem (Andrade Filho et al., 2011). Savukārt *WNT9B* gēna delēcija pelēm var izraisīt lūpas šķeltni ar aukslēju šķeltni vai bez tās (Juriloff et al., 2006).

Sejas šķeltnes var tikt koriģētas un ārstētas, veicot ķirurģisko iejaukšanos, bet tam var būt potenciāli traucējoša ietekme uz sejas un žokļu tālāko augšanas procesu, kas var nozīmēt vairāk nekā vienas operācijas nepieciešamību (Shi and Losee, 2015). Pašlaik pieejamā informācija par gēniem un gēnu produktiem šķeltnu izveides procesā ir ierobežota un pārsvarā izvērtēta dzīvnieku modeļos. Cilvēku šķeltnes skartajos audos esošo gēnu un gēnu produktu morfoloģiskā izpēte ir īstenota atsevišķiem augšanas faktoriem un gēniem, bet ne kombinētos pētījumos, izvērtējot vairākus gēnus un gēnu produktus šķeltnes skartajos audos. Pacientu materiāla sarežģītās ieguves un ētisko apsvērumu dēļ trūkst datu par genotipa noteikto audu endotipa pārmaiņām cilvēka šķeltnes skartajos audos, kas

potenciāli varētu sniegt labāku priekšstatu par šķeltņu morfopatoģenēzi un rast iespēju pilnveidot pastāvošās terapijas metodes.

## **Darba mērķis**

Noteikt kandidātģēnu un ģēnu proteīnu sadalījumu un relatīvo daudzumu dažādu sejas šķeltņu skartos audos.

## **Darba uzdevumi**

Promocijas darba mērķa sasniegšanai izvirzīti šādi uzdevumi:

1. Noteikt rutīnas histoloģisko atradi kontroles un šķeltnes pacientu audos.
2. Noteikt šķeltņu kandidātģēnu proteīnu (BARX1, DLX4, FOXE1, HOXB3, MSX2, PAX7, PAX9, RYK, SHH, SOX3, WNT3A un WNT9B) imūnhistoķīmisko atradi kontroles audiem un šķeltnes skartiem audiem.
3. Noteikt, kuru šķeltņu kandidātģēnu proteīnu atrades izmaiņas ir raksturīgas tieši vienpusējām šķeltnēm.
4. Noteikt, kuru šķeltņu kandidātģēnu proteīnu atrades izmaiņas ir raksturīgas tieši divpusējām šķeltnēm (klīniski smagākam fenotipam).
5. Noteikt, kuru šķeltņu kandidātģēnu proteīnu atrade ir raksturīga visiem izvērtētajiem šķeltņu fenotipiem.
6. Noteikt nozīmīgākās korelācijas šķeltnes skartajos audos starp izvērtētajiem ģēnu proteīniem.

## **Darba hipotēze**

Sejas šķeltņu skartu pacientu audos esošo ģēnu un ģēnu produktu atradne kvalitatīvi atšķiras no kontroles pacientu audiem.

## **Darba novitāte**

Šajā pētnieciskajā darbā pirmo reizi ir izpētīta dažādu šķeltnu kandidātgēnu proteīnu izdale cilvēku sejas šķeltnes skartos audos. Ar imūnhistoķīmijas metodi noteikts BARX1, DLX4, FOXE1, HOXB3, MSX2, PAX7, PAX9, RYK, SHH, SOX3, WNT3A un WNT9B imūnpozitīvo struktūru relatīvais daudzums dažādos šķeltnes skartos audos. Šāda kompleksa šķeltnu kandidātgēnu proteīnu izpēte šādā kombinācijā nav iepriekš veikta. Iepriekš īstenotajos pētījumos pārsvarā ir izmantoti dzīvnieku modeļi un dzīvnieku audi, kas ļauj šī pētījuma materiālu par cilvēku uzskatīt par unikālu devumu šķeltnu kandidātgēnu izpētē. Šajā pētījumā ir noteikti audu fenotipi un iespējamie diagnostiskie un prognostiskie gēnu proteīni, kas būtu lietderīgi klīniskajā praksē.

# 1. Materiāls un metodes

## 1.1. Morfoloģiski pētāmais materiāls un pacientu grupu raksturojums

Sejas šķeltņu audu materiāls tika iegūts Rīgas Stradiņa universitātes (RSU) Stomatoloģijas institūta Lūpu, aukslēju un sejas šķeltņu centrā laika periodā no 2003. līdz 2020. gadam. Mīkstie lūpas un aukslēju šķeltnes audi tika savākti primārās lūpu plastikas un mīksto aukslēju plastikas laikā. Vienpusējām lūpas caurejošām lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltnēm primārā lūpas plastika tika veikta atbilstoši Millarda metodei (Millard, 1964), bet abpusējām lūpas šķeltnēm – pēc *Veau* metodes modifikācijas (Lehman et al., 1990). Mīksto aukslēju plastika tika veikta ar mugurējā *vomer* lēvera metodi (Robin et al., 2006).

Ruīnas histoloģiskās un imūnhistokīmiskās metodes lietošanai pētāmais audu materiāls tika apstrādāts RSU Anatomijas un antropoloģijas institūta (AAI) Morfoloģijas laboratorijā. Pacienti ar nesindromisku caurejošu lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni tika sadalīti trijās grupās. Lūpas audi tika iegūti no 36 pacientiem ar vienpusēju lūpas šķeltni, veidojot pirmo pacientu grupu, vecumā no 3 mēnešiem līdz 1 gadam 5 mēnešiem. Otro grupu veidoja 13 pacienti ar divpusēju lūpas šķeltni vecumā no 4 mēnešiem līdz 1 gadam 5 mēnešiem. Trešo grupu veidoja mīksto aukslēju audi, kas tika iegūti no 26 pacientiem vecumā no 8 mēnešiem līdz 1 gadam 3 mēnešiem. Kopskaitā tika izvērtēti 75 šķeltņu audu paraugi.

Daļa kontroles audu materiāla tika iegūts augšējās lūpas saitītes plastikas operācijas laikā, kas tika ievākts 2013. gadā no bērniem SIA “RSU Stomatoloģijas institūts”, veidojot pirmo kontroles grupu. Šo kontroles grupu veidoja septiņi pacienti vecumā no 8 līdz 14 gadiem. Augšlūpas saitītes materiāls pirmajai kontroles grupai tika lietots, lai izvērtētu BARX1, DLX4, FOXE1,

HOXB3, MSX2, PAX7, PAX9 un RYK proteīnu imūnreaktivitāti un to salīdzinātu ar pacientu audu grupām. Audu materiāla ieguves procesā netika veikts kaitējums pacientu veselībai. Tā kā pieejamais mīksto kontroles audu materiāls bija ļoti ierobežots un nebija pietiekams visu gēnu proteīnu izvērtējumam, tad papildus tika ievākts lūpas audu materiāls no Rīgas Stradiņa universitātes Anatomijas un antropoloģijas institūta vēsturiskās kolekcijas, lai veidotu otro kontroles grupu. Otro kontroles grupu veidoja augļu un jaundzimušo lūpas audu materiāls, kas tika lietots SHH, SOX3, WNT3A un WNT9B imūnhistoķīmiskajam novērtējumam un salīdzinājumam ar pacientu grupām.

## **1.2. Morfoloģiskās metodes**

### **1.2.1. Audu materiāla fiksācija**

Audu fiksācija diennakti ilgi ar Stefanini šķīdumu (Stefanini et al., 1967) tika veikta RSU Stomatoloģijas institūta Lūpu, ausklēju un sejas šķeltņu centrā uzreiz pēc audu paraugu ievākšanas lūpas plastikas un mīksto ausklēju plastikas operāciju laikā. Audu materiāls pēc fiksācijas tika aizvests uz RSU AAI Morfoloģijas laboratoriju, kur tika veikta tālāka audu apstrāde.

Fiksētais audu materiāls tika atūdeņots, lietojot pieaugošas koncentrācijas spirta šķīdumus (70°–96°). Attaukošana veikta ksilola šķīdumā, bet pēc tam audus noturēja parafīnā I vienu stundu un parafīnā II divas stundas. Audus tad ieguldīja izkausētā parafīnā, izveidojot parafīna blokus speciālās kasetēs, kur parafīns bija ieliets ar dozatora palīdzību. Parafīna blokus izmantoja 3–4 μm plānu audu griezumam izgatavošanai, lietojot pusautomātisko rotācijas mikrotomu (*Leica RM2245, Leica Biosystems Richmond Inc., Amerikas Savienotās Valstis*). Sagatavotie audu griezumi tika novietoti uz priekšmetstikliņiem (*HistoBond®+*,

*Paul Marienfeld GmbH & Co. KG*, Vācija). Pēc tam priekšmetstikliņus ar audu griezumiem ievietoja termostatā žāvēšanai 20–60 minūtes 56 °C temperatūrā.

Tālākās darbības un apstrādes metodes tika veiktas atbilstoši rutīnas histoloģiskai krāsošanas un imūnhistoķīmijas metodei.

### **1.2.2. Rutīnas histoloģijas krāsošanas metode**

Lai iegūtu pārskata morfoloģisko ainu, tika īstenota rutīnas audu histoloģiskā krāsošana ar hemotoksilīnu un eozīnu. Audu griezumi, kuri bija izzāvēti termostatā un atradās uz priekšmetstikliņiem, tika deparafinizēti ksilolā. Tika veikta tālāka audu griezumu rehidratācija ar pakāpeniski zemākas koncentrācijas spirtiem. Pēc tam veikta audu griezumu krāsošana ar hemotoksilīnu (kods 05-M06002, *Mayer's Hematoxylin, Bio Optica Milano S.p.A.*, Itālija) un eozīnu (kods 05-B10003, *Eosin Y alcoholic solution, Bio Optica Milano S.p.A.*, Itālija). Pēc krāsošanas tika veikta skalošana ar tekošu ūdeni, tad tālāka dehidratācija ar pieaugošas koncentrācijas spirtiem un veikta dzidrināšana ar ksilolu un karboksiksilolu. Tad uz priekšmetstikliņiem tika uzlikta histoloģiskā līme (kods 6900002, *Paul Marienfeld GmbH & Co. KG*, Vācija) un paraugi pārklāti ar segstikliņiem (*Carl Roth GmbH + Co*, Vācija) (Lillie et al., 1976; Feldman and Wolfe, 2014).

Iegūtajos pārskata mikropreparātos bazofilās struktūras iekrāsojās zili violetas, bet acidofilās struktūras iekrāsojās sārtas. Hematoksilīnā un eozīnā krāsotos preparātus analizēja ar gaismas mikroskopu (*Leica DM500RB, Leica Biosystems Richmond Inc.*, Amerikas Savienotās Valstis), un tie apstrādāti ar datorprogrammu *Image-Pro Plus*. Audu paraugu mikrofotoģrāfijas tika fiksētas ar digitālo kameru (*Leica DC 300F, Leica Microsystem AG*, Vācija).

### 1.2.3. Imūnhistoķīmijas metodes raksturojums un reaģenti

Lietojot biotīna-streptavidīna imūnhistoķīmisko metodi (Hsu et al., 1981), audu paraugos tika noteikts:

- **BarH-līdzīgais homeobokss-1** (BARX1, kods LS-C29810, iegūts no truša, darba atšķaidījums 1:100, *LifeSpan BioSciences, Inc.*, Amerikas Savienotās Valstis);
- **mazāk distālais homeobokss-4** (DLX4, kods orb160775, iegūts no truša, darba atšķaidījums 1:100, *Biorbyt Ltd.*, Apvienotā Karaliste);
- **dakšas galvas bokss E1** (FOXE1, kods ab5080, iegūts no kazas, darba atšķaidījums 1:500, *Abcam*, Apvienotā Karaliste);
- **homeobokss B3** (HOXB3, kods sc28606, iegūts no truša, darba atšķaidījums 1:100, *Santa Cruz Biotechnology*, Amerikas Savienotās Valstis);
- **muskuļu segmentu homeobokss-2** (MSX2, kods ab223692, iegūts no truša, darba atšķaidījums 1:100, *Abcam*, Apvienotā Karaliste);
- **pāra boksa transkripcijas faktors-7** (PAX7, kods ab55494, iegūts no peles, darba atšķaidījums 1:100, *Abcam*, Apvienotā Karaliste);
- **pāra boksa transkripcijas faktors-9** (PAX9, kods orb11242, iegūts no truša, darba atšķaidījums 1:100, *Biorbyt Ltd.*, Apvienotā Karaliste);
- **receptoram līdzīgā tirozīnkināze** (RYK, kods orb38371, iegūts no truša, darba atšķaidījums 1:100, *Biorbyt Ltd.*, Apvienotā Karaliste);
- **sonic hedgehog proteīns** (SHH, kods LS-C49806, iegūts no truša, darba atšķaidījums 1:100, *LifeSpan BioSciences, Inc.*, Amerikas Savienotās Valstis);

- **SRY-boksa transkripcijas faktors-3** (SOX3, kods orb158460, iegūts no truša, darba atšķaidījums 1:100, *Biorbyt Ltd.*, Apvienotā Karaliste);
- **bezpārnu tipa MMTV integrācijas vietas proteīns-3A** (WNT3A, kods ab19925, iegūts no truša, darba atšķaidījums 1:800, *Abcam*, Apvienotā Karaliste);
- **bezpārnu tipa MMTV integrācijas vietas proteīns-9B** (WNT9B, kods ab151220, iegūts no truša, darba atšķaidījums 1:100, *Abcam*, Apvienotā Karaliste).

Paraugu fiksācija, audu materiāla sagatavošana ieguldīšanai parafīna blokos un tālāka audu griezumu sagatavošana uz priekšmetstikliņiem tika īstenota pēc iepriekšējā nodaļā (skatīt 1.2.1. nodaļu) paskaidrotās shēmas. Audu griezumi, kas atradās uz priekšmetstikliņiem un tika izžāvēti termostātā, tika deparafinizēti ksilolā. Tam sekoja dehidratācija pakāpeniski zemākas koncentrācijas spirtos. Audi pēc deparafinizācijas tika ievietoti turētājā, lai veiktu skalošanu ar TRIS bufera šķīdumu (kods 2017X12508, *Diapath S.p.A.*, Itālija) divas reizes pa piecām minūtēm, pēc tam veikta vārīšana EDTA buferī (kods 2017X02239, *Diapath S.p.A.*, Itālija) mikroviļņu krāsnī 20 minūtes. Paraugus pēc atdzišanas mazgāja divas reizes pa piecām minūtēm ar TRIS bufera šķīdumu. Lai bloķētu endogēnās peroksidāzes aktivitāti, audu paraugiem tika lietots 3 % peroksīda šķīdums 10 minūtes, pēc kā tika veikta skalošana ar TRIS bufera šķīdumu divas reizes pa piecām minūtēm. Lai mazinātu fona krāsojumu, audu paraugiem tika lietots bloķējošais serums 20 minūtes. Visi analizējamie audu paraugi tika inkubēti ar primāro antivielu vienu stundu. Visas pētījumā lietotās antivielas tika atšķaidītas ar *Antibody Diluent* (kods 938B-05, *Cell MarqueTM*, Amerikas Savienotās Valstis).



Antivielām, kas bija peles vai truša izcelsmes, tika lietota *HiDef Detection™ HRP Polymer* (kods 954D-30, *Cell Marque™*, Amerikas Savienotās Valstis) krāsošanas sistēma. Pēc primārās antivielas inkubācijas un trīskārtējas skalošanas TRIS buferī tika lietots *HiDef Detection™* reakcijas amplifikators (kods 954D-31, *Cell Marque™*, Amerikas Savienotās Valstis) istabas temperatūrā 10 minūtes. Preparātus pēc tam skaloja trīs reizes pa piecām minūtēm ar TRIS bufera šķīdumu, pēc kā tika pievienots *HiDef Detection™ HRP* polimēra iezīmētājs (kods 954D-32, *Cell Marque™*, Amerikas Savienotās Valstis) un veikta inkubācija istabas temperatūrā desmit minūtes. Pēc inkubācijas paraugi tika atkārtoti skaloti trīs reizes pa piecām minūtēm ar TRIS bufera šķīdumu. Pēc tam audus pārklāja ar *DAB Substrate Kit* hromogēno sistēmu (kods 957D-60, *Cell Marque™*, Amerikas Savienotās Valstis) un veica audu inkubāciju istabas temperatūrā līdz 10 minūtēm, lai iegūtu imūnpozitīvo struktūru brūno krāsojumu.

Antivielām, kas bija kazas izcelsmes, tika izmantota *ImmunoCruz™ ABC* (kods sc-2023, *Santa Cruz Biotechnology, Inc.*, Amerikas Savienotās Valstis) krāsošanas sistēma. Lietojot ABC krāsošanas sistēmu, preparāti tika inkubēti ar 1,5 % bloķēšanas serumu TRIS bufera šķīdumā istabas temperatūrā līdz vienai stundai. Pēc tam audu paraugiem veica inkubāciju ar primāro antivielu vienu stundu istabas temperatūrā, pēc kā tika veikta skalošana trīs reizes pa piecām minūtēm ar TRIS bufera šķīdumu. Audu paraugi pēc tam tika inkubēti ar biotinizētu kazas imunoglobulīnu (biotīnu saturošu sekundāro antivielu) 30 minūtes un pēc tam atkal skaloti trīs reizes pa piecām minūtēm ar TRIS bufera šķīdumu. Vēlāk tika pievienots avidīna un biotīna-mārrutku peroksidāzes komplekss un īstenota audu inkubācija 30 minūtes istabas temperatūrā, kam sekoja skalošana trīs reizes pa piecām minūtēm ar TRIS bufera šķīdumu. Pēc tam audus pārklāja ar *DAB Substrate Kit* hromogēno sistēmu un veica audu

inkubāciju istabas temperatūrā līdz 10 minūtēm, lai iegūtu imūnpozitīvo struktūru brūno krāsojumu.

Neatkarīgi no krāsošanas sistēmas veida pēc inkubācijas ar hromogēno substrātu paraugi tika skaloti tekošā ūdenī un veikta kontrastkrāsošana divas minūtes ar hematoksilīnu (kods 05-M06002, *Mayer's Hematoxylin, Bio Optica Milano S.p.A.*, Itālija). Noslēgumā visi sagatavotie preparāti tika dehidratēti ar pieaugošas koncentrācijas spirtu, bet dzidrināšana veikta ar ksilolu un karboksiksilolu. Nokrāsotos preparātus analizēja ar gaismas mikroskopu (*Leica DM500RB, Leica Biosystems Richmond Inc.*, Amerikas Savienotās Valstis), un tie tika apstrādāti ar datorprogrammu *Image-Pro Plus*. Audu paraugu mikrografijas tika fiksētas ar digitālo kameru (*Leica DC 300F, Leica Microsystem AG*, Vācija).

Visām preparātu sērijām tika pagatavotas pozitīvas kontroles antivielu ražotāju norādītajos audos, kur vienmēr iespējams novērot pozitīvu reakciju. Negatīvai kontrolei tika izmantoti preparātu griezumumi, kuros primārā antivielā tika aizvietota ar *Antibody Diluent* antivielu atšķaidītāju.

### **1.3. Datu apstrādes metodes**

Visu mikropreparātu pārskata griezumumos tika veikts novērtējums pēc šādiem kritērijiem:

- 1) pēc virsmas epitēlija morfoloģiskajām īpatnībām (vakuolizācija epitēlijšūnās, bazālā slāņa šūnu proliferācija, hiperplāzija, intraepitēliāla iekaisuma šūnu infiltrācija, pārragojuma pakāpe);
- 2) pēc subepitēliālā saistaudu šūnu un saistaudu šķiedru raksturojuma (fibroze);
- 3) ir vai nav iekaisuma šūnu infiltrācija.

### 1.3.1. Puskvantitatīvā skaitīšanas metode

Imūnhistokīmiski pozitīvo struktūru relatīvais daudzums tika noteikts atbilstoši puskvantitatīvajai skaitīšanas metodei (Pilmāne et al., 1998):

- 0 – redzes laukā nav nevienas imūnreaktīvas struktūras;
- 0/+ – redzes laukā retas imūnreaktīvas struktūras;
- + – redzes laukā maz imūnreaktīvu struktūru;
- +/++ – redzes laukā maz līdz vidēji daudz imūnreaktīvu struktūru;
- ++ – redzes laukā vidēji daudz imūnreaktīvu struktūru;
- ++/+++ – redzes laukā vidēji daudz līdz daudz imūnreaktīvu struktūru;
- +++ – redzes laukā daudz imūnreaktīvu struktūru;
- +++/++++ – redzes laukā daudz līdz ļoti daudz imūnreaktīvu struktūru;
- ++++ – redzes laukā ļoti daudz imūnreaktīvu struktūru.

Struktūru relatīvais daudzums tika izvērtēts piecos nejauši izvēlētos redzes laukos katrā griezumā. Tālākajai analīzei tika lietots mediānais struktūru daudzums katrā no šiem redzes laukiem.

### 1.3.2. Statistiskās metodes

Pētījuma dati tika raksturoti ar aprakstošās statistikas metodēm. Katra šķeltņu kandidātģeņu proteīna imūnreaktivitāte katrā no grupām tika aprakstīta, aprēķinot mediānu un starpkvartiļu amplitūdu. Statistiski nozīmīgas atšķirības starp vairākām nesaisītām pētījumā iekļautām grupām tika noteiktas ar Kraskela–Volisa (*Kruskal-Wallis*) H testu (Chan and Walmsley, 1997). Statistiski nozīmīgas atšķirības starp pētījuma grupām un kontroles grupas datiem tika noteiktas ar Manna–Vitnija (*Mann-Whitney*) U testu (Altman, 1990). Divu mainīgu lielumu savstarpējas korelācijas izvērtēšanai tika lietots Spīrmēna

(*Spearman*) rangų korelācijas koeficients (Forthofer et al., 2007). Aprēķinātās korelācijas tika interpretētas šādi: 0,0–0,2 tika vērtēta kā ļoti vāja korelācija, 0,2–0,4 – vāja korelācija, 0,4–0,6 – vidēji cieša korelācija, 0,6–0,8 – cieša korelācija, 0,8–1,0 – ļoti cieša korelācija. Rezultāti tika uzskatīti par statistiski nozīmīgiem, ja  $p$  vērtība bija  $< 0,05$ . Datu statistiskā analīze tika nodrošināta ar *Statistical Product and Service Solutions (SPSS) Statistics 25.0* versiju (*IBM Company, Chicago, Illinois, Amerikas Savienotās Valstis*).

## 2. Rezultāti

### 2.1. Morfoloģiskā atrade

Pirmās kontroles grupas (pacienti, kam veikta augšlūpas saitītes plastika) preparātos, kuri tika iegūti no septiņiem pacientiem augšlūpas saitītes plastikas laikā, tika noteikta vispārpieņemtajai normai atbilstoša histoloģiskā atrade. Otrās kontroles grupas (pacienti, kuru mutes dobuma audi iegūti no RSU AAI vēsturiskās kolekcijas) preparātos, kas tika iegūti no piecu pacientu augšlūpas audiem, arī tika konstatēta normai atbilstoša histoloģiskā atrade.

Lūpas šķeltņu audu paraugos, kuri tika iegūti lūpas primārās plastikas laikā, un aukslēju šķeltnes audos, kurus ieguva mīksto aukslēju plastikas laikā, tika konstatēts mutes dobuma epitēlijs un gļotādas saistaudi. Visās trijās šķeltņu pacientu grupās rutīnas histoloģiskā atrade bija līdzīga relatīvi veseliem mutes dobuma gļotādas audiem, bet tika noteiktas atsevišķas morfoloģiskās variācijas.

Dažos lūpas šķeltnes audu paraugos bija redzama neliela virsmas epitēlijšūnu vakuolizācija. Aukslēju šķeltnes pacientiem epitēlijšūnu vakuolizāciju nenovēroja. Dažos šķeltņu preparātos bija atrodama virsmas epitēlija bazālā slāņa šūnu nevienmērīga proliferācija.

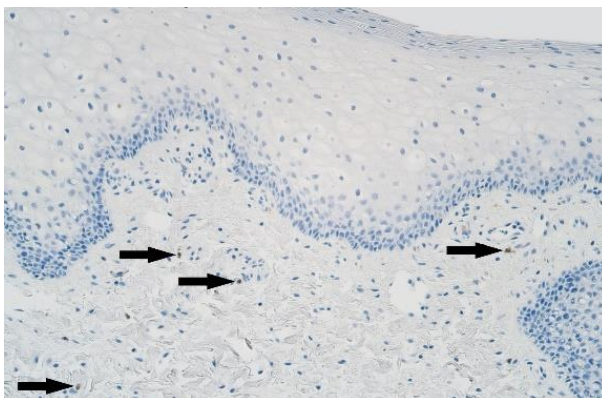
Atsevišķos mikropreparātos bija atrodams minimāls subepitēliāls iekaisuma šūnu infiltrāts, kas bija manāms daļā šķeltņu pacientu. Dažos aukslēju šķeltņu audu paraugos kopā ar subepitēliālu iekaisuma šūnu infiltrātu bija redzamas fibrotiskas izmaiņas gļotādas saistaudos.

## 2.2. Imūnhistoķīmiski noteikto šķeltņu kandidātģēnu proteīnu raksturojums

### 2.2.1. BARX1 gēna proteīns

BARX1 gēna proteīns netika konstatēts (0) kontroles grupas epitēlijā. Lielākajā daļā kontroles pacientu saistaudos nebija atrodamas BARX1 pozitīvas šūnas (0), bet viena kontroles pacienta saistaudos BARX1 pozitīvas šūnas bija novērotas reti (0/+).

BARX1 gēna proteīns vienpusējas lūpas šķeltnes grupas epitēlijā netika konstatēts (0), bet saistaudos kopumā BARX1 pozitīvās šūnas tika noteiktas reti (0/+) (skatīt 2.1. attēlu).



2.1. attēls. **Retas (0/+) BARX1 pozitīvas saistaudu šūnas (bultiņas) triju mēnešus vecam pacientam ar caurejošu vienpusēju lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni – lūpas plastika**

BARX1 IMH, × 200.

BARX1 gēna proteīns divpusējas lūpas šķeltnes grupas epitēlijā netika konstatēts (0), bet saistaudos BARX1 pozitīvas šūnas tika konstatētas reti (0/+).

BARX1 gēna proteīns aukslēju šķeltnes grupas epitēlijā netika konstatēts (0), bet saistaudos BARX1 pozitīvās šūnas pusē gadījumu tika konstatētas reti (0/+), bet otrā pusē gadījumu BARX1 pozitīvās šūnas netika konstatētas (0).

**Statistiski nozīmīgas atšķirības epitēlijā netika atrastas** starp šķeltnu pacientu grupām un kontroles grupu BARX1 gēna proteīna imūnreaktivitātē ar Kraskela–Volisa H testu, bet **statistiski nozīmīga atšķirība tika noteikta saistaudos** starp visām šķeltnu grupām un kontroles grupu ( $H = 27,921$ ,  $df = 3$ ,  $p < 0,001$ ).

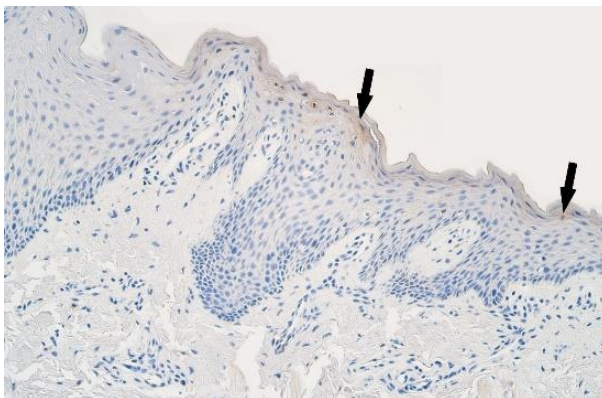
Veicot grupu savstarpēju salīdzinājumu ar Manna–Vitnija U testu, statistiski nozīmīgas atšķirības BARX1 gēna proteīna imūnreaktivitātē netika noteiktas epitēlijā, bet saistaudos statistiski nozīmīgas atšķirības tika aprēķinātas starp kontroles grupas saistaudiem un vienpusējas lūpas šķeltnes pacientu saistaudiem ( $U = 17,50$ ,  $p = 0,002$ ), starp vienpusējas lūpas šķeltnes un divpusējas lūpas šķeltnes saistaudiem ( $U = 146,00$ ,  $p = 0,035$ ) un starp vienpusējas lūpas šķeltnes un aukslēju šķeltnes saistaudiem ( $U = 149,50$ ,  $p = < 0,001$ ).

## 2.2.2. DLX4 gēna proteīns

DLX4 gēna proteīns kontroles grupas kopumā gan epitēlijā, gan saistaudos tika noteikts maz (+).

DLX4 gēna proteīns kopumā vienpusējas lūpas šķeltnes grupas gan epitēlijā, gan saistaudos tika noteikts maz (+).

DLX4 gēna proteīns divpusējas lūpas šķeltnes grupas epitēlijā kopumā tika konstatēts maz (+), bet saistaudos reti (0/+) (skatīt 2.2. attēlu).



2.2. attēls. Maz (+) DLX4 pozitīvu epitēlijšūnu un intraepitēliālu limfocītu (bultiņas) septiņus mēnešus vecam pacientam ar caurejošu divpusēju lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņi – lūpas plastika

DLX4 IMH,  $\times 200$ .

DLX4 gēna proteīns aukslēju šķeltnes grupas epitēlijā kopumā tika noteikts reti (0/+), bet saistaudos – reti līdz maz (0/+ līdz +).

**Statistiski nozīmīgas atšķirības tika atrastas gan epitēlijā** ( $H = 10,541$ ,  $df = 3$ ,  $p = 0,014$ ), **gan saistaudos** ( $H = 9,395$ ,  $df = 3$ ,  $p = 0,024$ ) starp šķeltņu pacientu grupām un kontroles grupu.

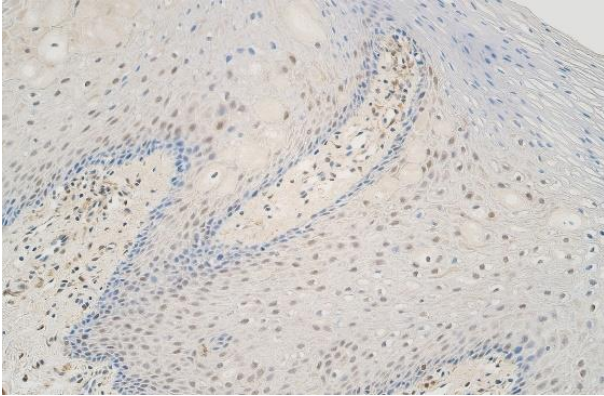
Veicot grupu savstarpēju salīdzinājumu ar Manna–Vitnija U testu, statistiski nozīmīgas atšķirības DLX4 gēna proteīna imūnreaktivitātē epitēlijā tika noteiktas starp vienpusējas lūpas šķeltnes grupu un aukslēju šķeltnes grupu ( $U = 264,50$ ,  $p = 0,003$ ) un starp divpusējas lūpas šķeltnes grupu un aukslēju šķeltnes grupu ( $U = 99,00$ ,  $p = 0,037$ ). Savukārt saistaudos statistiski nozīmīgās atšķirības tika noteiktas starp kontroles grupu un divpusējas lūpas šķeltnes grupu ( $U = 16,50$ ,  $p = 0,019$ ) un starp kontroles grupu un aukslēju šķeltnes grupu ( $U = 39,50$ ,  $p = 0,021$ ).



### 2.2.3. FOXE1 gēna proteīns

FOXE1 gēna proteīns kontroles grupas epitēlijā kopumā tika konstatēts maz līdz vidēji daudz (+/+), bet saistaudos – maz (+).

FOXE1 gēna proteīns kopumā vienpusējas lūpas šķeltnes grupas gan epitēlijā, gan saistaudos tika noteikts vidēji daudz (++) (skatīt 2.3. attēlu).

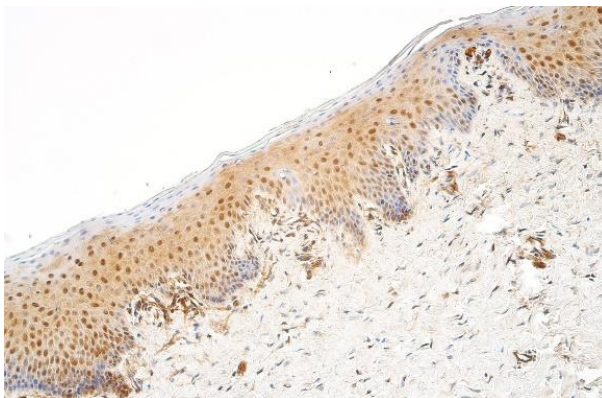


2.3. attēls. **Vidēji daudz līdz daudz (++/+++)** pozitīvu FOXE1 saturošu epitēlija un saistaudu šūnu septiņus mēnešus vecam pacientam ar caurejošu vienpusēju lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni – lūpas plastika

FOXE1 IMH, × 200.

FOXE1 gēna proteīns kopumā divpusējas lūpas šķeltnes grupas epitēlijā tika noteikts maz līdz vidēji daudz (+/+), bet saistaudos – maz (+).

FOXE1 gēna proteīns kopumā aukslēju šķeltnes grupas gan epitēlijā, gan saistaudos tika noteikts maz (+) (skatīt 2.4. attēlu).



2.4. attēls. Daudz (+++) FOXE1 pozitīvu epitēlijšūnu un vidēji daudz (++) subepitēliālu saistaudu šūnu četrus mēnešus vecam pacientam ar caurejošu vienpusēju lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņi – mīksto aukslēju plastika

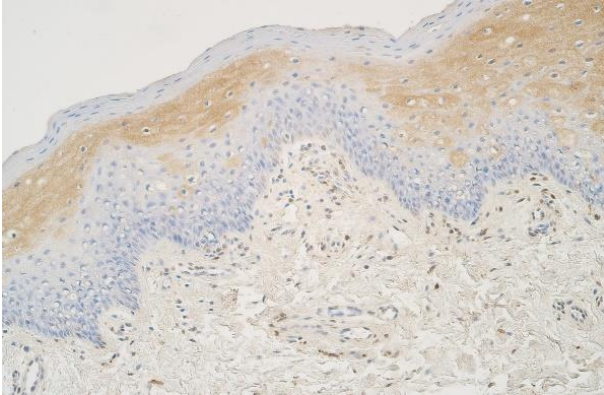
FOXE1 IMH,  $\times 200$ .

Statistiski nozīmīga atšķirība FOXE1 gēna proteīna imūnreaktivitātē starp šķeltņu pacientu grupām un kontroles grupu netika noteikta epitēlijā, bet **tika konstatēta statistiski nozīmīga atšķirība saistaudos** ( $H = 13,713$ ,  $df = 3$ ,  $p = 0,003$ ).

Veicot grupu savstarpēju salīdzinājumu ar Manna–Vitnija U testu, statistiski nozīmīga atšķirība FOXE1 gēna proteīna imūnreaktivitātē saistaudos tika noteikta starp kontroles pacientiem un vienpusējas lūpas šķeltnes pacientiem ( $U = 28,00$ ,  $p = 0,011$ ), starp vienpusējas lūpas šķeltnes pacientiem un divpusējas lūpas šķeltnes pacientiem ( $U = 148,50$ ,  $p = 0,050$ ) un starp vienpusējas lūpas šķeltnes pacientiem un aukslēju šķeltnes pacientiem ( $U = 252,50$ ,  $p = 0,002$ ).

#### 2.2.4. HOXB3 gēna proteīns

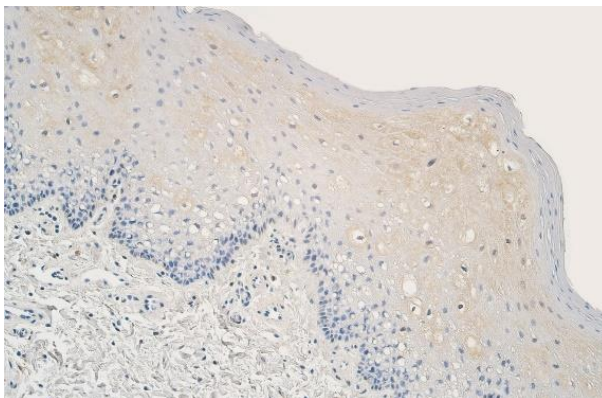
HOXB3 gēna proteīns kontroles grupas epitēlijā kopumā tika noteikts maz (+), bet saistaudos – vidēji daudz (++) . HOXB3 gēna proteīns kopumā vienpusējas lūpas šķeltnes grupas epitēlijā tika noteikts vidēji daudz līdz daudz (++/+++), bet saistaudos – vidēji daudz (++) (skatīt 2.5. attēlu).



2.5. attēls. **Vidēji daudz (++) HOXB3 pozitīvu epitēlija un saistaudu šūnu septiņus mēnešus vecam pacientam ar caurejošu vienpusēju lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni – lūpas plastika**

HOXB3 IMH, × 200.

HOXB3 gēna proteīns kopumā divpusējas lūpas šķeltnes grupas epitēlijā tika konstatēts vidēji daudz (++) , bet saistaudos – maz līdz vidēji daudz (+/++) (skatīt 2.6. attēlu).



2.6. attēls. Vidēji daudz līdz daudz (++/+++) vāji krāsotas HOXB3 pozitīvas epitēlijšūnas sešus mēnešus vecam pacientam ar caurejošu divpusēju lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņi – lūpas plastika

HOXB3 IMH,  $\times 200$ .

HOXB3 gēna proteīns aukslēju šķeltnes grupas epitēlijā kopumā tika konstatēts maz līdz vidēji daudz – vidēji daudz (+/++ līdz ++), bet saistaudos – maz līdz vidēji daudz.

Izvērtējot HOXB3 gēna proteīna imūnreaktivitātes atšķirības starp grupām ar Kraskela–Vollisa H testu, **tika noteiktas statistiski nozīmīgas atšķirības gan epitēlijā** ( $H = 20,137$ ,  $df = 3$ ,  $p < 0.001$ ), **gan saistaudos** ( $H = 8,419$ ,  $df = 3$ ,  $p < 0,038$ ) starp šķeltņu pacientu grupām un kontroles grupu.

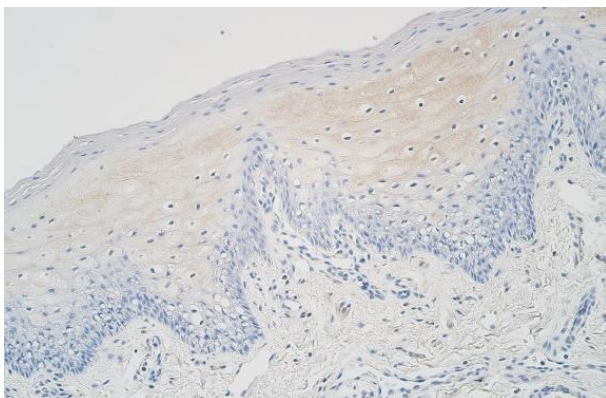
Veicot grupu savstarpēju salīdzinājumu ar Manna-Vitnija U testu, statistiski nozīmīgas atšķirības HOXB3 gēna proteīna imūnreaktivitātē epitēlijā tika konstatētas starp kontroles grupu un vienpusējas lūpas šķeltnes grupu ( $U = 23,00$ ,  $p = 0,005$ ), starp vienpusējas lūpas šķeltnes grupu un divpusējas lūpas šķeltnes grupu ( $U = 113,00$ ,  $p = 0,005$ ), starp vienpusējas lūpas šķeltnes grupu un aukslēju šķeltnes grupu ( $U = 212,50$ ,  $p < 0,001$ ). Saistaudos statistiski nozīmīgas atšķirības HOXB3 gēna proteīna imūnreaktivitātē tika noteiktas starp vienpusējas lūpas šķeltnes grupu un divpusējas lūpas šķeltnes grupu ( $U = 127,00$ ,

p = 0,011), starp vienpusējas lūpas šķeltnes grupu un aukslēju šķeltnes grupu (U = 324,00, p = 0,035).

### 2.2.5. MSX2 gēna proteīns

MSX2 gēna proteīns kontroles grupas epitēlijā kopumā netika konstatēts (0) nevienā paraugā, bet saistaudos netika konstatēts (0) trīs gadījumos, bet noteikts reti (0/+) – divos gadījumos.

MSX2 gēna proteīns vienpusējas lūpas šķeltnes grupas epitēlijā kopumā tika noteikts vidēji daudz (++), bet saistaudos – maz (+) (skatīt 2.7. attēlu).

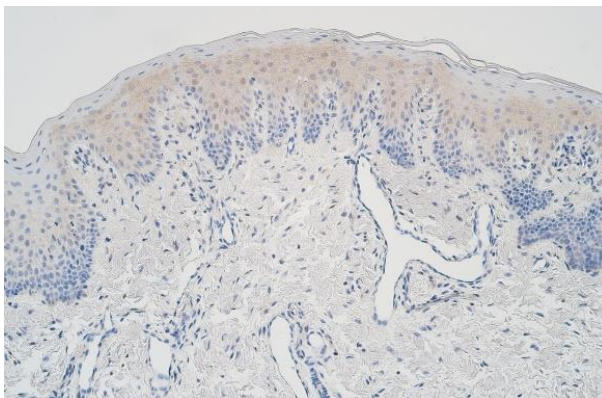


2.7. attēls. **Vidēji daudz (++) vāji pozitīvu MSX2 saturošu epitēlijšūnu septiņus mēnešus vecam pacientam ar caurejošu vienpusēju lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni – lūpas plastika**

MSX2 IMH, × 200.

MSX2 gēna proteīns divpusējas lūpas šķeltnes grupas epitēlijā kopumā tika konstatēts maz (+), bet saistaudos – reti (0/+).

MSX2 gēna proteīns aukslēju šķeltnes grupā kopumā gan epitēlijā, gan saistaudos tika noteikts reti (0/+) (skatīt 2.8. attēlu).



2.8. attēls. **Vidēji daudz (++) MSX2 pozitīvu epitēlijšūnu astoņus mēnešus vecam pacientam ar caurejošu vienusēju lūpas, alveolārā izauguma un auslēju šķeltni – mīksto auslēju plastika**

MSX2 IMH,  $\times 200$ .

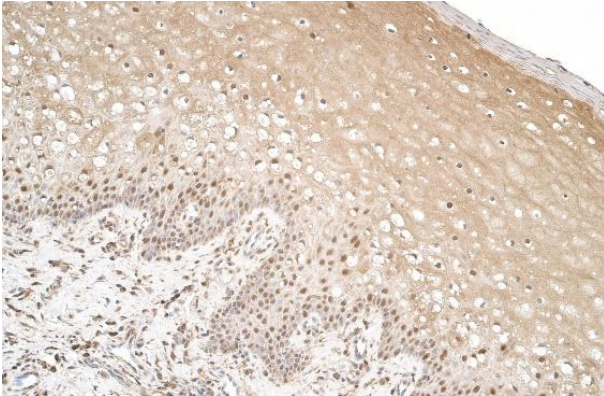
Izvērtējot MSX2 gēna proteīna imūnreaktivitātes atšķirības starp grupām ar Kraskela–Vollisa H testu, **tika noteiktas statistiski nozīmīgas atšķirības gan epitēlijā** ( $H = 32,722$ ,  $df = 3$ ,  $p < 0,001$ ), **gan saistaudos** ( $H = 15,167$ ,  $df = 3$ ,  $p = 0,002$ ) starp šķeltnu pacientu grupām un kontroles grupu.

Veicot grupu savstarpēju salīdzinājumu, statistiski nozīmīgas atšķirības MSX2 gēna proteīna imūnreaktivitātē epitēlijā tika konstatētas starp kontroles grupu un vienusējas lūpas šķeltnes grupu ( $U = 7,50$ ,  $p < 0,001$ ), starp kontroles grupu un divpusējas lūpas šķeltnes grupu ( $U = 10,00$ ,  $p = 0,026$ ), starp kontroles grupu un auslēju šķeltnes grupu ( $U = 27,50$ ,  $p = 0,041$ ), starp vienusējas lūpas šķeltnes grupu un divpusējas lūpas šķeltnes grupu ( $U = 107,00$ ,  $p = 0,003$ ), starp vienusējas lūpas šķeltnes grupu un auslēju šķeltnes grupu ( $U = 134,50$ ,  $p < 0,001$ ). Saistaudos statistiski nozīmīgas atšķirības MSX2 gēna proteīna imūnreaktivitātē tika noteiktas starp kontroles grupu un vienusējas lūpas šķeltnes grupu ( $U = 25,00$ ,  $p = 0,007$ ), starp vienusējas lūpas šķeltnes un divpusējas lūpas šķeltnes grupu ( $U = 124,00$ ,  $p = 0,010$ ) un starp vienusējas lūpas šķeltnes grupu un auslēju šķeltnes grupu ( $U = 274,00$ ,  $p = 0,008$ ).

## 2.2.6. PAX7 gēna proteīns

PAX7 gēna proteīns kopumā kontroles grupā gan epitēlijā, gan saistaudos tika noteikts maz līdz vidēji daudz (+/++).

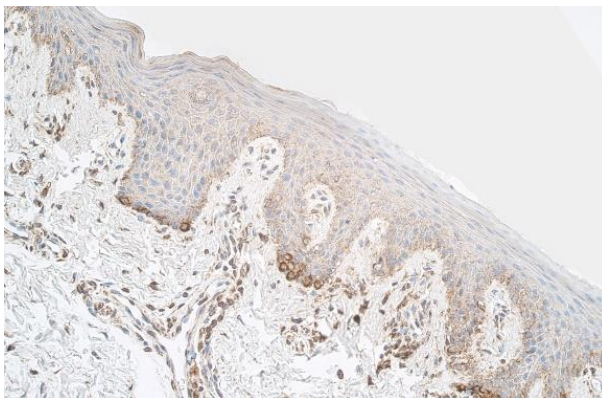
PAX7 gēna proteīns vienpusējas lūpas šķeltnes grupas epitēlijā kopumā tika konstatēts vidēji daudz līdz daudz (++/+++), bet saistaudos – daudz (+++) (skatīt 2.9. attēlu).



2.9. attēls. **Daudz līdz ļoti daudz (+++/++++) PAX7 pozitīvu epitēlija un daudz (++) saistaudu šūnu četrus mēnešus vecam pacientam ar caurejošu vienpusēju lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni – lūpas plastika**

PAX7 IMH, × 200.

PAX7 gēna proteīns divpusējas lūpas šķeltnes grupas epitēlijā kopumā tika konstatēts vidēji daudz (++) , bet saistaudos – maz līdz vidēji daudz (+/++) (skatīt 2.10. attēlu).



2.10. attēls. **Vidēji daudz (+/++) PAX7 pozitīvu epitēlija un saistaudu šūnu četrus mēnešus vecam pacientam ar caurejošu divpusēju lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņi – lūpas plastika**

PAX7 IMH,  $\times 200$ .

PAX7 gēna proteīns aukslēju šķeltnes grupas epitēlijā kopumā tika noteikts maz līdz vidēji daudz (+/++), bet saistaudos – vidēji daudz līdz daudz (++/+++).

Izvērtējot PAX7 gēna proteīna imūnreaktivitātes atšķirības starp grupām ar Kraskela–Volisa H testu, **tika noteiktas statistiski nozīmīgas atšķirības gan epitēlijā** ( $H = 31,195$ ,  $df = 3$ ,  $p < 0,001$ ), **gan saistaudos** ( $H = 29,976$ ,  $df = 3$ ,  $p < 0,001$ ) starp šķeltņu pacientu grupām un kontroles grupu.

Veicot grupu savstarpēju salīdzinājumu ar Manna–Vitnija U testu, statistiski nozīmīgas atšķirības PAX7 gēna proteīna imūnreaktivitātē epitēlijā tika konstatētas starp kontroles grupu un viensusējas lūpas šķeltnes grupu ( $U = 6,50$ ,  $p < 0,001$ ), starp viensusējas lūpas šķeltnes grupu un divpusējas lūpas šķeltnes grupu ( $U = 82,00$ ,  $p < 0,001$ ), starp viensusējas lūpas šķeltnes grupu un aukslēju šķeltnes grupu ( $U = 148,50$ ,  $p < 0,001$ ). Saistaudos statistiski nozīmīgas atšķirības PAX7 gēna proteīna imūnreaktivitātē tika noteiktas starp kontroles grupu un viensusējas lūpas šķeltnes grupu ( $U = 14,50$ ,  $p = 0,001$ ), starp viensusējas lūpas šķeltnes grupu un divpusējas lūpas šķeltnes grupu ( $U = 40,50$ ,

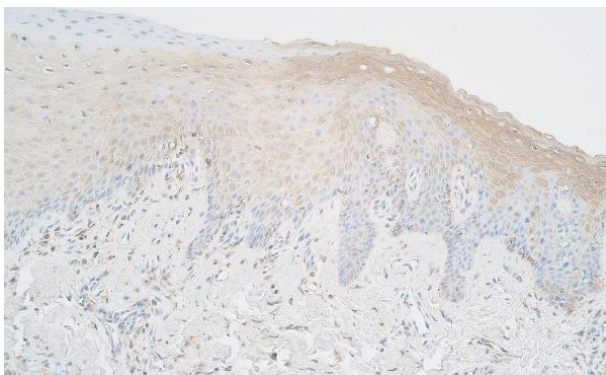


$p < 0,001$ ), starp viļpusējas lūpas ŗķeltņes grupu un aukslēju ŗķeltņes grupu ( $U = 226,00$ ,  $p < 0,001$ ) un starp divpusējas lūpas ŗķeltņes grupu un aukslēju ŗķeltņes grupu ( $U = 101,50$ ,  $p = 0,043$ ).

### 2.2.7. PAX9 gēna proteīns

PAX9 gēna proteīns kontroles grupas epitēlijā kopumā tika konstatēts vidēji daudz (++)**,** saistaudos netika konstatēts (0) četros gadījumos, bet trijos gadījumos reti (0/+).

PAX9 gēna proteīns viļpusējas lūpas ŗķeltņes grupas epitēlijā kopumā tika konstatēts maz līdz vidēji daudz (+/++), bet saistaudos vidēji daudz (++) (skatīt 2.11. attēlu).

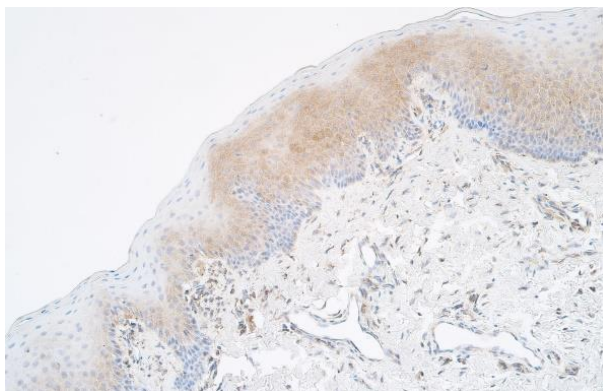


2.11. attēls. **Vidēji daudz līdz daudz (++/+++)** PAX9 pozitīvu epitēlija un saistaudu ŗūnu četrus mēnešus vecam pacientam ar caurejošu viļpusēju lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju ŗķeltņi – lūpas plastika

PAX9 IMH,  $\times 200$ .

PAX9 gēna proteīns divpusējas lūpas ŗķeltņes grupā kopumā gan epitēlijā, gan saistaudos tika noteikts reti (0/+).

PAX9 gēna proteīns aukslēju šķeltnes grupas epitēlijā kopumā tika konstatēts reti (0/+), bet saistaudos – maz (+) (skatīt 2.12. attēlu).



2.12. attēls. **Vidēji daudz līdz daudz (+/+++) PAX9 pozitīvu epitēlija un saistaudu šūnu astoņus mēnešus vecam pacientam ar caurejošu vienpusēju lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņi – mīksto aukslēju plastika**

PAX9 IMH,  $\times 200$ .

Izvērtējot PAX9 gēna proteīna imūnreaktivitātes atšķirības, **tika noteiktas statistiski nozīmīgas atšķirības gan epitēlijā** ( $H = 32,333$ ,  $df = 3$ ,  $p < 0,001$ ), **gan saistaudos** ( $H = 38,245$ ,  $df = 3$ ,  $p < 0,001$ ) starp šķeltņu pacientu grupām un kontroles grupu.

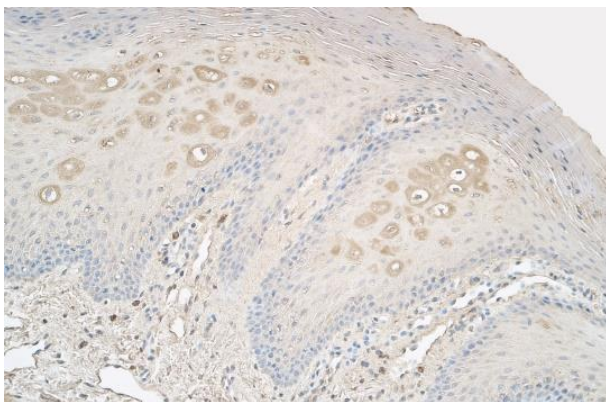
Veicot grupu savstarpēju salīdzinājumu, statistiski nozīmīgas atšķirības PAX9 gēna proteīna imūnreaktivitātē epitēlijā tika konstatētas starp kontroles grupu un divpusējas lūpas šķeltnes grupu ( $U = 5,00$ ,  $p < 0,001$ ), starp kontroles grupu un aukslēju šķeltnes grupu ( $U = 2,50$ ,  $p < 0,001$ ), starp vienpusējas lūpas šķeltnes grupu un divpusējas lūpas šķeltnes grupu ( $U = 102,50$ ,  $p = 0,003$ ), starp vienpusējas lūpas šķeltnes grupu un aukslēju šķeltnes grupu ( $U = 145,00$ ,  $p < 0,001$ ). Saistaudos statistiski nozīmīgas atšķirības PAX9 gēna proteīna imūnreaktivitātē tika noteiktas starp kontroles grupu un vienpusējas lūpas

šķēltnes grupu ( $U = 9,50$ ,  $p < 0,001$ ), starp kontroles grupu un aukslēju šķēltnes grupu ( $U = 18,50$ ,  $p = 0,001$ ), starp viļņpusējas lūpas šķēltnes grupu un divļņpusējas lūpas šķēltnes grupu ( $U = 48,00$ ,  $p < 0,001$ ), starp viļņpusējas lūpas šķēltnes grupu un aukslēju šķēltnes grupu ( $U = 188,50$ ,  $p < 0,001$ ) un starp divļņpusējas lūpas šķēltnes grupu un aukslēju šķēltnes grupu ( $U = 81,00$ ,  $p = 0,008$ ).

### 2.2.8. RYK gēna proteīns

RYK gēna proteīns kontroles grupā kopumā gan epitēlijā, gan saistaudos tika konstatēts reti (0/+).

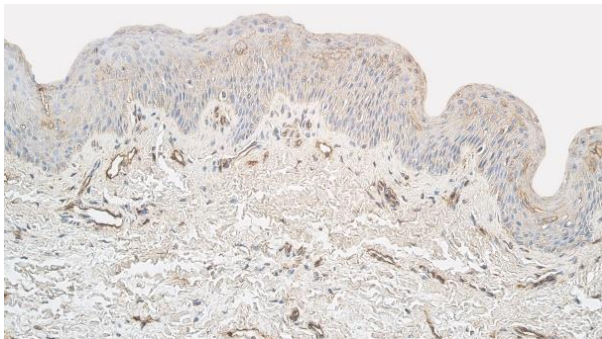
RYK gēna proteīns viļņpusējas lūpas šķēltnes grupā kopumā gan epitēlijā, gan saistaudos tika noteikts vidēji daudz līdz daudz (++) (skatīt 2.13. attēlu).



2.13. attēls. Vidēji daudz (++) RYK pozitīvu epitēlijšūnu un vidēji daudz (++) RYK pozitīvu saistaudu šūnu astoņus mēnešus vecam pacientam ar caurejošu viļņpusēju lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķēltni – lūpas plastika

RYK IMH,  $\times 200$ .

RYK gēna proteīns divpusējas lūpas šķeltnes grupā kopumā gan epitēlijā, gan saistaudos tika konstatēts vidēji daudz līdz daudz (++/+++) (skatīt 2.14. attēlu).



2.14. attēls. Vidēji daudz (++) RYK pozitīvu saistaudu un daudz (+++) endotēlija šūnu septiņus mēnešus vecam pacientam ar caurejošu divpusēju lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni – lūpas plastika

RYK IMH,  $\times 200$ .

RYK gēna proteīns aukslēju šķeltnes grupā kopumā gan epitēlijā, gan saistaudos tika konstatēts vidēji daudz līdz daudz (++/+++).

Izvērtējot RYK gēna proteīna imūnreaktivitātes atšķirības starp grupām, **tika noteiktas statistiski nozīmīgas atšķirības gan epitēlijā** ( $H = 22,932$ ,  $df = 3$ ,  $p < 0,001$ ), **gan saistaudos** ( $H = 18,443$ ,  $df = 3$ ,  $p < 0,001$ ) starp šķeltnu pacientu grupām un kontroles grupu.

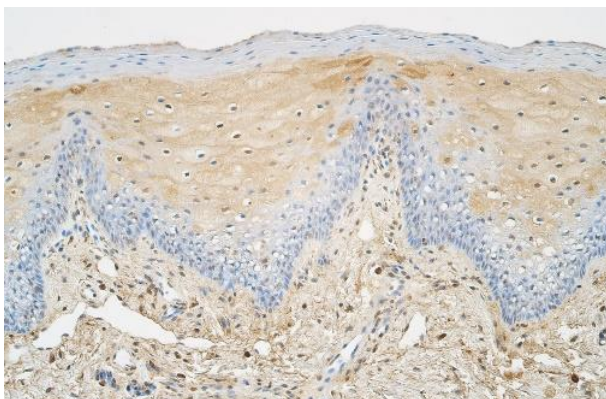
Veicot grupu savstarpēju salīdzinājumu, statistiski nozīmīgas atšķirības RYK gēna proteīna imūnreaktivitātē epitēlijā tika konstatētas starp kontroles grupu un viopusējas lūpas šķeltnes grupu ( $U = 5,50$ ,  $p < 0,001$ ), starp kontroles grupu un divpusējas lūpas šķeltnes grupu ( $U = 3,50$ ,  $p < 0,001$ ), starp kontroles grupu un aukslēju šķeltnes grupu ( $U = 9,50$ ,  $p < 0,001$ ), starp viopusējas lūpas šķeltnes grupu un aukslēju šķeltnes grupu ( $U = 321,50$ ,  $p = 0,030$ ). Saistaudos statistiski nozīmīgas atšķirības RYK gēna proteīna imūnreaktivitātē tika

noteiktas starp kontroles grupu un vienusējās lūpas šķeltnes grupu ( $U = 11,00$ ,  $p < 0,001$ ), starp kontroles grupu un divpusējās lūpas šķeltnes grupu ( $U = 2,50$ ,  $p < 0,001$ ) un starp kontroles grupu un aukslēju šķeltnes grupu ( $U = 5,00$ ,  $p < 0,001$ ).

### 2.2.9. SHH gēna proteīns

SHH gēna proteīns kontroles pacientu epitēlijā kopumā tika konstatēts vidēji daudz līdz daudz (++/+++), bet saistaudos – vidēji daudz (++).

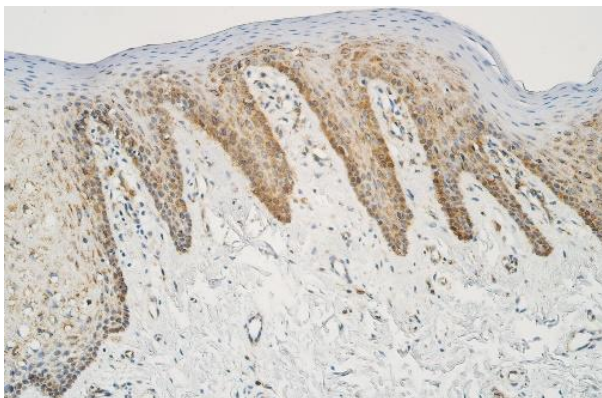
SHH gēna proteīns vienusējās lūpas šķeltnes grupā kopumā gan epitēlijā, gan saistaudos tika konstatēts vidēji daudz līdz daudz (++/+++) (skatīt 2.15. attēlu).



2.15. attēls. **Vidēji daudz līdz daudz (++/+++)** SHH pozitīvu epitēlija un saistaudu šūnu septiņus mēnešus vecam pacientam ar caurejošu vienusēju lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni – lūpas plastika

SHH IMH,  $\times 200$ .

SHH gēna proteīns divpusējās lūpas šķeltnes grupā kopumā gan epitēlijā, gan saistaudos tika noteikts maz līdz vidēji daudz (+/++) (skatīt 2.16 attēlu).



2.16. attēls. **Vidēji daudz līdz daudz (++)/+++)** SHH pozitīvu epitēlijšūnu sešus mēnešus vecam pacientam ar caurejošu divpusēju lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņi – lūpas plastika

SHH IMH,  $\times 200$ .

SHH gēna proteīns aukslēju šķeltnes pacientu epitēlijā kopumā tika konstatēts maz (+), bet saistaudos vidēji daudz līdz daudz – vidēji daudz (+/++ līdz ++).

Izvērtējot SHH gēna proteīna imūnreaktivitātes atšķirības starp grupām, **tika noteiktas statistiski nozīmīgas atšķirības gan epitēlijā** ( $H = 47,119$ ,  $df = 3$ ,  $p < 0,001$ ), **gan saistaudos** ( $H = 41,192$ ,  $df = 3$ ,  $p < 0,001$ ) starp šķeltņu pacientu grupām un kontroles grupu.

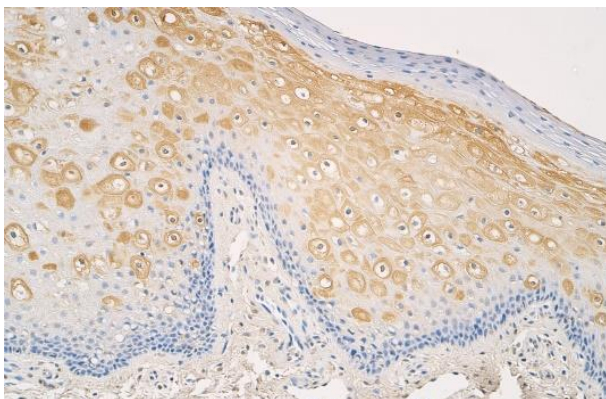
Veicot grupu savstarpēju salīdzinājumu, statistiski nozīmīgas atšķirības SHH gēna proteīna imūnreaktivitātē epitēlijā tika konstatētas starp kontroles grupu un divpusējas lūpas šķeltnes grupu ( $U = 9,00$ ,  $p = 0,019$ ), starp kontroles grupu un aukslēju šķeltnes grupu ( $U = 4,00$ ,  $p < 0,001$ ), starp vienusējas lūpas šķeltnes grupu un divpusējas lūpas šķeltnes grupu ( $U = 68,50$ ,  $p < 0,001$ ), starp vienusējas lūpas šķeltnes grupu un aukslēju šķeltnes grupu ( $U = 37,00$ ,  $p < 0,001$ ), starp divpusējas lūpas šķeltnes grupu un aukslēju šķeltnes grupu ( $U = 94,00$ ,  $p = 0,025$ ). Saistaudos statistiski nozīmīgas atšķirības SHH gēna proteīna imūnreaktivitātē tika noteiktas starp kontroles grupu un aukslēju

šķeltnes grupu ( $U = 14,00$ ,  $p = 0,004$ ), starp viopusējas lūpas šķeltnes grupu un divpusējas lūpas šķeltnes grupu ( $U = 72,50$ ,  $p < 0,001$ ) un starp viopusējas lūpas šķeltnes grupu un aukslēju šķeltnes grupu ( $U = 62,00$ ,  $p < 0,001$ ).

### 2.2.10. SOX3 gēna proteīns

SOX3 gēna proteīns kontroles pacientu epitēlijā kopumā tika konstatēts daudz līdz ļoti daudz (+++/++++), bet saistaudos – daudz (+++).

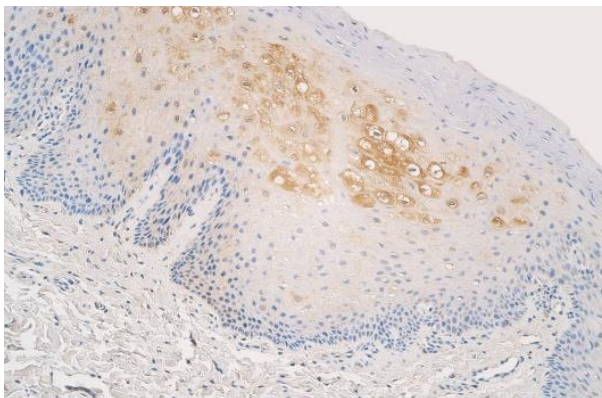
SOX3 gēna proteīns viopusējas lūpas šķeltnes pacientu epitēlijā kopumā tika konstatēts vidēji daudz līdz daudz (++/+++), bet saistaudos – vidēji daudz (++) (skatīt 2.17. attēlu).



2.17. attēls. **Daudz (+++) SOX3 pozitīvu epitēlijšūnu trīs mēnešus vecam pacientam ar caurejošu viopusēju lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņi – lūpas plastika**

SOX3 IMH,  $\times 200$ .

SOX3 gēna proteīns kopumā divpusējas lūpas šķeltnes pacientu grupā gan epitēlijā, gan saistaudos tika konstatēts vidēji daudz (++) (skatīt 2.18. attēlu).



2.18. attēls. **Vidēji daudz (++) SOX3 pozitīvu epitēlijšūnu sešus mēnešus vecam pacientam ar caurejošu divpusēju lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņi – lūpas plastika**

SOX3 IMH,  $\times 200$ .

SOX3 gēna proteīns aukslēju šķeltnes pacientu epitēlijā kopumā tika noteikts maz līdz vidēji daudz (+/+), bet saistaudos – vidēji daudz (++).

Izvērtējot SOX3 gēna proteīna imūnreaktivitātes atšķirības starp grupām, **tika noteiktas statistiski nozīmīgas atšķirības gan epitēlijā** ( $H = 34,856$ ,  $df = 3$ ,  $p = 0,005$ ), **gan saistaudos** ( $H = 12,838$ ,  $df = 3$ ,  $p < 0,001$ ) starp šķeltņu pacientu grupām un kontroles grupu.

Veicot grupu savstarpēju salīdzinājumu, statistiski nozīmīgas atšķirības SOX3 gēna proteīna imūnreaktivitātē epitēlijā tika konstatētas starp kontroles grupu un viensusējas lūpas šķeltnes grupu ( $U = 14,50$ ,  $p = 0,001$ ), starp kontroles grupu un divpusējas lūpas šķeltnes grupu ( $U = 9,00$ ,  $p = 0,019$ ), starp kontroles grupu un aukslēju šķeltnes grupu ( $U = 1,00$ ,  $p < 0,001$ ), starp viensusējas lūpas šķeltnes grupu un divpusējas lūpas šķeltnes grupu ( $U = 121,50$ ,  $p = 0,008$ ), starp viensusējas lūpas šķeltnes grupu un aukslēju šķeltnes grupu ( $U = 140,00$ ,  $p < 0,001$ ). Saistaudos statistiski nozīmīgas atšķirības SOX3 gēna proteīna imūnreaktivitātē tika noteiktas starp kontroles grupu un viensusējas lūpas šķeltnes grupu ( $U = 10,500$ ,  $p < 0,001$ ), starp kontroles grupu un divpusējas

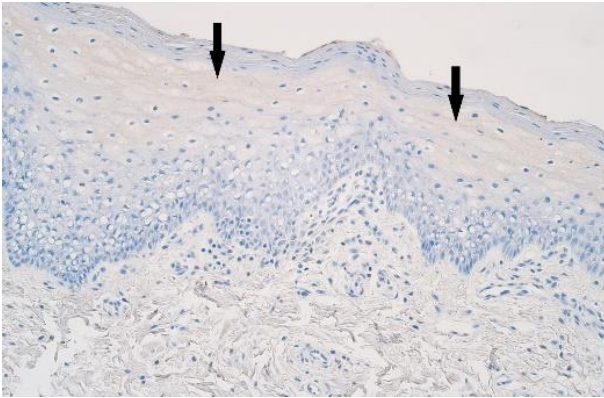


lūpas šķeltnes grupu ( $U = 4,50$ ,  $p = 0,003$ ), starp kontroles grupu un aukslēju šķeltnes grupu ( $U = 4,00$ ,  $p < 0,001$ ).

### 2.2.11. WNT3A gēna proteīns

WNT3A kontroles pacientu epitēlijā kopumā tika konstatēts vidēji daudz līdz daudz (++)/+++, bet saistaudos – daudz (+++).

WNT3A vienpusējas lūpas šķeltnes pacientos kopumā gan epitēlijā, gan saistaudos tika noteikts maz (+) (skatīt 2.19. attēlu).



2.19. attēls. **Maz līdz vidēji daudz (+/++) ļoti vāji pozitīvu WNT3A saturošu epitēlijšūnu (bultīņas) septiņus mēnešus vecam pacientam ar caurejošu vienpusēju lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni – lūpas plastika**

WNT3A IMH,  $\times 200$ .

WNT3A) divpusējas lūpas šķeltnes pacientu epitēlijā kopumā tika noteikts reti (0/+), bet saistaudos – maz (+).

WNT3A aukslēju šķeltnes pacientos kopumā gan epitēlijā, gan saistaudos tika noteikts reti (0/+).

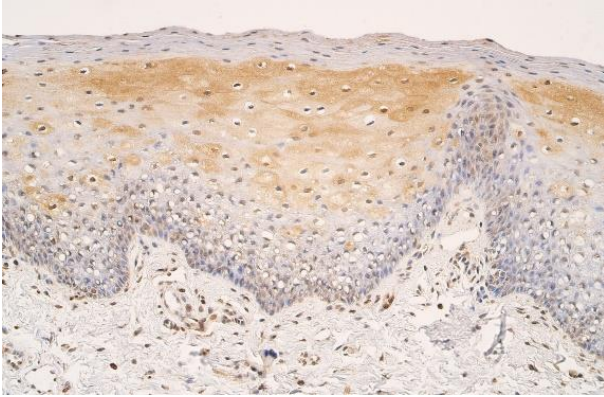
Izvērtējot WNT3A gēna proteīna imūnreaktivitātes atšķirības starp grupām, **tika noteiktas statistiski nozīmīgas atšķirības gan epitēlijā** ( $H = 24,529$ ,  $df = 3$ ,  $p < 0,001$ ), **gan saistaudos** ( $H = 19,326$ ,  $df = 3$ ,  $p < 0,001$ ) starp šķeltņu pacientu grupām un kontroles grupu.

Veicot grupu savstarpēju salīdzinājumu ar Manna–Vitnija U testu, statistiski nozīmīgas atšķirības WNT3A gēna proteīna imūnreaktivitātē epitēlijā tika konstatētas starp kontroles grupu un viensusēju lūpu šķeltnes grupu ( $U = 19,00$ ,  $p = 0,002$ ), starp kontroles grupu un divpusējas lūpas šķeltnes grupu ( $U = 1,00$ ,  $p < 0,001$ ), starp kontroles grupu un aukslēju šķeltnes grupu ( $U = 1,00$ ,  $p < 0,001$ ), starp viensusējas lūpas šķeltnes grupu un divpusējas lūpas šķeltnes grupu ( $U = 113,00$ ,  $p = 0,005$ ), starp viensusējas lūpas šķeltnes grupu un aukslēju šķeltnes grupu ( $U = 247,50$ ,  $p = 0,001$ ). Saistaudos statistiski nozīmīgas atšķirības WNT3A gēna proteīna imūnreaktivitātē tika noteiktas starp kontroles grupu un viensusējas lūpas šķeltnes grupu ( $U = 0,00$ ,  $p < 0,001$ ), starp kontroles grupu un divpusējas lūpas šķeltnes grupu ( $U = 0,00$ ,  $p = 0,003$ ), starp kontroles grupu un aukslēju šķeltnes grupu ( $U = 0,00$ ,  $p < 0,001$ ).

### **2.2.12. WNT9B gēna proteīns**

WNT9B kontroles pacientos kopumā gan epitēlijā, gan saistaudos tika konstatēts daudz līdz ļoti daudz (+++/++++).

WNT9B viensusējas lūpas šķeltnes pacientu epitēlijā kopumā tika konstatēts vidēji daudz līdz daudz (++/+++), bet saistaudos – daudz (+++) (skatīt 2.20. attēlu).



2.20. attēls. **Vidēji daudz līdz daudz (++/+++)** WNT9B pozitīvu epitēlija un saistaudu šūnu septiņus mēnešus vecam pacientam ar caurejošu viensusēju lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltni – lūpas plastika

WNT9B IMH,  $\times 200$ .

WNT9B divpusējas lūpas šķeltnes pacientu epitēlijā kopumā tika noteikts vidēji daudz (++), bet saistaudos – vidēji daudz līdz daudz (++/+++).

WNT9B aukslēju šķeltnes pacientu epitēlijā kopumā tika konstatēts vidēji daudz (++), bet saistaudos – vidēji daudz līdz daudz (++/+++).

Izvērtējot WNT9B gēna proteīna imūnreaktivitātes atšķirības starp grupām, **tika noteiktas statistiski nozīmīgas atšķirības gan epitēlijā** ( $H = 26,976$ ,  $df = 3$ ,  $p = 0,005$ ), **gan saistaudos** ( $H = 20,123$ ,  $df = 3$ ,  $p < 0,001$ ) starp šķeltnu pacientu grupām un kontroles grupu.

Veicot grupu savstarpēju salīdzinājumu, statistiski nozīmīgas atšķirības WNT9B gēna proteīna imūnreaktivitātē epitēlijā tika konstatētas starp kontroles grupu un viensusējas lūpas šķeltnes grupu ( $U = 14,00$ ,  $p = 0,001$ ), starp kontroles grupu un divpusējas lūpas šķeltnes grupu ( $U = 0,50$ ,  $p < 0,001$ ), starp kontroles grupu un aukslēju šķeltnes grupu ( $U = 1,00$ ,  $p < 0,001$ ), starp viensusējas lūpas šķeltnes grupu un divpusējas lūpas šķeltnes grupu ( $U = 143,50$ ,  $p = 0,033$ ), starp viensusējas lūpas šķeltnes grupu un aukslēju šķeltnes grupu ( $U = 204,00$ ,  $p < 0,001$ ). Saistaudos statistiski nozīmīgas atšķirības WNT9B gēna proteīna

imūnreaktivitātē tika noteiktas starp kontroles grupu un vienusējās lūpas šķeltnes grupu ( $U = 32,50$ ,  $p = 0,018$ ), starp kontroles grupu un divpusējās lūpas šķeltnes grupu ( $U = 4,50$ ,  $p = 0,003$ ), starp kontroles grupu un aukslēju šķeltnes grupu ( $U = 2,50$ ,  $p < 0,001$ ) un starp vienusējās lūpas šķeltnes grupu un aukslēju šķeltnes grupu ( $U = 246,50$ ,  $p = 0,001$ ).

### 2.3. Imūnhistokīmiski noteikto šķeltnu kandidātģeņu proteīnu savstarpējo korelāciju novērtējuma dati

Pirmajā kontroles grupā (pacienti, kam veikta augšlūpas saīfītes plastika) tika konstatēta **statistiski nozīmīga cieša pozitīva korelācija** starp pacientu vecumu un RYK relatīvo daudzumu saistaudos ( $r_s = 0,768$ ,  $p = 0,044$ ). Pirmajā kontroles grupā tika konstatētas **vairākas statistiski nozīmīgas ļoti ciešas korelācijas** starp šķeltnu kandidātģeņu proteīniem. Pozitīvās korelācijas galvenokārt tika iesaistītas DLX4 epitēlijā un saistaudos, kas tika konstatēts četrās statistiski nozīmīgās pozitīvās korelācijās. DLX4 tika arī konstatēts divās statistiski nozīmīgās negatīvās korelācijās. Statistiski nozīmīgās pozitīvās korelācijās trijos gadījumos tika konstatēta PAX7 iesaiste.

Otrajā kontroles grupā (pacienti, kuru mutes dobuma audi iegūti no RSU AAI vēsturiskās kolekcijas) tika noteikta viena **statistiski nozīmīga cieša korelācija** starp SHH epitēlijā un SHH saistaudos ( $r_s = 0,892$ ,  $p = 0,042$ ).

Vienusējās lūpu šķeltnes grupā tika noteiktas 104 statistiski nozīmīgas ciešas, vidēji ciešas un vājas korelācijas starp izvērtētajiem šķeltnu kandidātģeņiem. Ciešākās **statistiski nozīmīgās korelācijas** vienusējās lūpu šķeltnes grupā ir apkopotas 2.1. tabulā.

**Imūnhistokīmiski noteikto šķeltnu kandidātģēnu proteīnu statistiski nozīmīgas ciešas un vidēji ciešas pozitīvas korelācijas ( $p \leq 0,001$ ) vienpusējas lūpas šķeltnes audos**

<b>Gēnu proteīni, starp kuriem noteikta korelācija</b>	<b>Spīrmena korelācijas koeficients</b>	<b>p vērtība</b>
MSX2 epitēlijā un MSX2 saistaudos	0,710	< 0,001
HOXB3 epitēlijā un HOXB3 saistaudos	0,684	< 0,001
HOXB3 epitēlijā un PAX9 epitēlijā	0,663	< 0,001
WNT3A epitēlijā un WNT9B epitēlijā	0,662	< 0,001
WNT9B epitēlijā un WNT9B saistaudos	0,662	< 0,001
DLX4 epitēlijā un HOXB3 epitēlijā	0,632	< 0,001
PAX9 epitēlijā un PAX9 saistaudos	0,632	< 0,001
RYK epitēlijā un RYK saistaudos	0,604	< 0,001
SOX3 epitēlijā un SOX3 saistaudos	0,599	< 0,001
FOXE1 saistaudos un PAX9 saistaudos	0,596	< 0,001
WNT3A epitēlijā un WNT3A saistaudos	0,594	< 0,001
SHH epitēlijā un WNT9B epitēlijā	0,578	< 0,001
HOXB3 epitēlijā un WNT9B saistaudos	0,576	< 0,001
FOXE1 epitēlijā un FOXE1 saistaudos	0,561	< 0,001
PAX7 saistaudos un WNT9B saistaudos	0,561	< 0,001
FOXE1 saistaudos un HOXB3 saistaudos	0,552	< 0,001
HOXB3 saistaudos un SHH saistaudos	0,546	0,001
HOXB3 saistaudos un PAX9 saistaudos	0,543	0,001
WNT3A saistaudos un WNT9B epitēlijā	0,542	0,001
MSX2 epitēlijā un WNT3A epitēlijā	0,541	0,001
PAX7 epitēlijā un PAX7 saistaudos	0,541	0,001
FOXE1 saistaudos un SOX3 saistaudos	0,538	0,001
PAX9 saistaudos un SHH saistaudos	0,532	0,001
PAX7 saistaudos un SHH saistaudos	0,530	0,001
HOXB3 saistaudos un WNT9B saistaudos	0,524	0,001
PAX7 saistaudos un PAX9 saistaudos	0,524	0,001
SOX3 epitēlijā un WNT9B epitēlijā	0,524	0,001
FOXE1 saistaudos un PAX7 saistaudos	0,514	0,001
HOXB3 epitēlijā un WNT9B epitēlijā	0,513	0,001
SHH epitēlijā un WNT3A epitēlijā	0,512	0,001

Apzīmējumi: DLX4 – mazāk distālais homeobokss-4, FOXE1 – dakšas galvas bokss E1, HOXB3 – homeobokss B3, MSX2 – muskuļu segmentu homeobokss-2, PAX7 – pāra boksa transkripcijas faktors-7, PAX9 – pāra boksa transkripcijas faktors-9, RYK – receptoram līdzīgā tirozīnkināze, SHH – *Sonic hedgehog* ģēns, SOX3 – SRY boksa transkripcijas faktors-3, WNT3A – bezspārnu tipa MMTV integrācijas vietas proteīns-3A, WNT9B – bezspārnu tipa MMTV integrācijas vietas proteīns-9B.

Divpusējas lūpas šķeltņes grupā tika noteikta **statistiski nozīmīga cieša negatīva** korelācija starp pacientu vecumu un SOX3 relatīvo daudzumu saistaudos ( $r_s = -0,711$ ,  $p = 0,006$ ). Divpusējas lūpas šķeltņes grupā tika noteiktas 72 statistiski nozīmīgas ļoti ciešas, ciešas un vidēji ciešas pozitīvas korelācijas starp izvērtētajiem šķeltņu kandidātģēniem. Ciešākās **statistiski nozīmīgās korelācijas** divpusējās lūpu šķeltņes grupā ir apkopotas 2.2. tabulā.

2.2. tabula

**Imūnhistoķīmiski noteikto šķeltņu kandidātģēnu proteīnu statistiski nozīmīgas ļoti ciešas un ciešas pozitīvas korelācijas ( $p \leq 0,001$ ) divpusējas lūpas šķeltņes audos**

Gēnu proteīni, starp kuriem noteikta korelācija	Spīrmena korelācijas koeficients	p vērtība
HOXB3 epitēlijā un WNT3A epitēlijā	0,940	< 0,001
PAX9 epitēlijā un WNT9B epitēlijā	0,909	< 0,001
FOXE1 epitēlijā un FOXE1 saistaudos	0,859	< 0,001
HOXB3 epitēlijā un SHH saistaudos	0,836	< 0,001
SHH epitēlijā un WNT9B epitēlijā	0,811	0,001
PAX9 epitēlijā un SHH epitēlijā	0,802	0,001
PAX9 epitēlijā un PAX9 saistaudos	0,788	0,001
MSX2 epitēlijā un SOX3 epitēlijā	0,786	0,001

Apzīmējumi: FOXE1 – dakšas galvas bokss E1, HOXB3 – homeobokss B3, MSX2 – muskuļu segmentu homeobokss-2, PAX7 – pāra boksa transkripcijas faktors-7, PAX9 – pāra boksa transkripcijas faktors-9, RYK – receptoram līdzīgā tirozīnkināze, SHH – *Sonic hedgehog* ģēns, SOX3 – SRY boksa transkripcijas faktors-3, WNT3A – bezspārnu tipa MMTV integrācijas vietas proteīns-3A, WNT9B – bezspārnu tipa MMTV integrācijas vietas proteīns-9B.

Aukslēju šķeltņes grupā tika noteikta 71 statistiski nozīmīga cieša, vidēji cieša un vāja korelācija starp izvērtētajiem šķeltņu kandidātģēniem. Ciešākās **statistiski nozīmīgās korelācijas** aukslēju šķeltņes grupā ir apkopotas 2.3. tabulā.

**Imūnhistoķīmiski noteikto šķeltnu kandidātģeņu proteīnu statistiski nozīmīgas ļoti ciešas, ciešas un vidēji ciešas pozitīvas korelācijas ( $p \leq 0,001$ ) aukslēju šķeltnes audos**

<b>Ģeņu proteīni, starp kuriem noteikta korelācija</b>	<b>Spīrmena korelācijas koeficients</b>	<b>p vērtība</b>
SOX3 epitēlijā un WNT9B epitēlijā	0,862	< 0,001
DLX4 epitēlijā un SOX3 epitēlijā	0,751	< 0,001
DLX4 epitēlijā un WNT9B epitēlijā	0,725	< 0,001
FOXE1 saistaudos un SOX3 saistaudos	0,686	< 0,001
PAX9 saistaudos un SHH saistaudos	0,668	< 0,001
PAX7 epitēlijā un PAX7 saistaudos	0,657	< 0,001
PAX9 epitēlijā un PAX9 saistaudos	0,653	< 0,001
HOXB3 epitēlijā un PAX9 epitēlijā	0,641	< 0,001
PAX7 saistaudos un PAX9 saistaudos	0,624	0,001
RYK epitēlijā un SHH epitēlijā	0,622	0,001
HOXB3 epitēlijā un PAX9 saistaudos	0,614	0,001
HOXB3 epitēlijā un PAX7 epitēlijā	0,611	0,001
PAX7 epitēlijā un RYK epitēlijā	0,608	0,001
PAX7 saistaudos un WNT3A saistaudos	0,606	0,001
PAX7 epitēlijā un SOX3 epitēlijā	0,599	0,001

Apzīmējumi: DLX4 – mazāk distālais homeobokss-4, FOXE1 – dakšas galvas bokss E1, HOXB3 – homeobokss B3, MSX2 – muskuļu segmentu homeobokss-2, PAX7 – pāra boksa transkripcijas faktors-7, PAX9 – pāra boksa transkripcijas faktors-9, RYK – receptoram līdzīgā tirozīnkināze, SHH – *Sonic hedgehog* ģēns, SOX3 – SRY boksa transkripcijas faktors-3, WNT3A – bezspārnu tipa MMTV integrācijas vietas proteīns- 3A, WNT9B – bezspārnu tipa MMTV integrācijas vietas proteīns-9B.

### 3. Diskusija

Pasaulē lielākā daļa šķeltnu kandidātģēnu pētījumu ir veikti dzīvniekiem, bet ir relatīvi maz pētījumu, kas veikti ar cilvēka audiem. Nesindromisku sejas šķeltnu morfofotoģēnēze ir relatīvi neskaidra, jo nav iespējams skaidri noteikt vienu konkrētu ģēnu vai morfofotoģenētisko mehānismu, kas varētu būt nozīmīgākais sejas šķeltnu audu morfoģenēzē.

Mūsu pētījumā ir noteikts BARX1, DLX4, FOXE1, HOXB3, MSX2, PAX7, PAX9, RYK, SHH, SOX3, WNT3A un WNT9B ģēnu kodēto proteīnu imūnpozitīvo šūnu relatīvais daudzums viopusējas lūpas šķeltnes, divpusējas lūpas šķeltnes un aukslēju šķeltnes audos bērniem pirms un līdz primārās dentīcijas vecumam.

Pārskata griezumos epitēlijšūnu vakuolizācija tika novērota dažiem pacientiem ar viopusēju lūpas šķeltni (četros gadījumos) un divpusēju lūpas šķeltni (vienā gadījumā), bet to nenovēroja pacientiem, kuru mutes dobuma audi tika iegūti mīksto aukslēju plastikas laikā. Mutes dobuma epitēlijšūnu citoplazmas vakuolizācija iepriekš ir aprakstīta pētījumos, kuros tika izvērtēta citu patoloģisku stāvokļu ietekme uz mutes dobuma epitēliju, piemēram, infekciju gadījumā (Kerge et al., 2018; Temple et al., 2014), cukura diabēta gadījumā (Seifi et al., 2014; Jajarm et al., 2008) vai saistībā ar pēcnāves izmaiņām mutes dobuma audos (Patro et al., 2021). Interesanti, bet vienā citā pētījumā par aukslēju šķeltnes audiem arī tika aprakstīta mutes dobuma epitēlijšūnu vakuolizācija (Tellerman et al., 2019), kas savukārt netika novērota mūsu pētījumā. Visticamāk, šī morfoloģiskā īpatnība varētu būt mutes dobuma epitēlijšūnu bojājuma un deģenerācijas nespecifiska pazīme, kas varētu būt saistīta ar šķeltnes esamību.

Dažos šķeltnu preparātos bija konstatēta epitēlija bazālā slāņa šūnu proliferācija. Šī morfoloģiskā īpatnība ir aprakstīta bazālo šūnu karcinomas gadījumā (Florescu et al., 2018), leikoplakijas un mutes dobuma plakanšūnu



karcinomas gadījumā (Thomson et al., 2002), bet tā ir arī iepriekš noteikta sejas šķeltnu audos (Tellerman et al., 2019). Sejas šķeltnu morfofpatogēnēze ir saistīta ar izmaiņām šūnu proliferācijā, bet šī morfoloģiskā iezīme epitēlijā tika aprakstīta tikai dažos šķeltnu preparātos, kas liecina, ka izmaiņas šūnu proliferācijā lielākajā daļā pacientu, visticamāk, ir notikusi jau prenatāli un ka epitēlija bazālo šūnu proliferācijas aktivitāte postnatāli ir līdzīga normai. Izmaiņas šajos atsevišķos paraugos varētu skaidrot kā lokālu morfoloģisko variāciju, kas varētu būt saistīta ar šķeltni vai kādu citu morfofpatogēnētisko procesu, piemēram, iekaisumu, kas šķeltnes skartos audos ir bieža parādība.

Atsevišķos preparātu pārskata griezumos tika noteikts minimāls subepitēliāls iekaisuma šūnu infiltrāts, kas bija atrodams septiņiem aukslēju šķeltnes pacientiem, pieciem vienpusējas lūpas šķeltnes pacientiem un diviem divpusējas lūpu šķeltnes pacientiem. Sejas šķeltnu audu saistība ar iekaisuma procesu ir iepriekš aprakstīta citos pētījumos (Seidel et al., 2022). Kaut arī tika atlasīti paraugi, kuriem nevajadzētu būt ar izteiktu iekaisuma infiltrātu, šajos paraugos tika atrasts minimāls iekaisuma šūnu infiltrāts. Tas liecina, ka iekaisums ir nozīmīgs un relatīvi bieži sastopams morfofpatogēnētiskais faktors sejas šķeltnu audos, kas, mijiedarbojoties ar citiem faktoriem, piemēram, šķeltnu kandidātģēniem, var apgrūtināt sejas šķeltnu postnatālās morfofpatogēnēzes izvērtēšanu.

BARX1 gēna proteīns nebija atrodams epitēlijā nevienam pacientam ne kontroles grupā, ne visās trijās šķeltnu audu grupās, bet statistiski nozīmīgas atšķirības tika noteiktas saistaudos. Vienpusējas lūpas šķeltnes saistaudos BARX1 kopumā tika konstatētas reti, divpusējas lūpas šķeltnes saistaudos – reti līdz maz, bet aukslēju šķeltnes saistaudos – lielākoties reti vai nemaz. Saistaudos statistiski nozīmīga atšķirība BARX1 imūnreaktivitātē bija atrodama starp kontroles grupu un vienpusējas lūpas šķeltnes grupu, starp vienpusējas lūpas šķeltnes grupu un divpusējas lūpas šķeltnes grupu, starp vienpusējas lūpas

šķeltnes grupu un aukslēju šķeltnes grupu. Mūsu pētījuma rezultāti liecina, ka *BARX1* saistaudos varētu būt postnatāli iesaistīts tieši vienpusējas lūpas šķeltnes morfopatoģenēzē, jo tieši šajā pacientu grupā noteiktais *BARX1* pozitīvo saistaudu šūnu relatīvais daudzums statistiski nozīmīgi atšķirās salīdzinājumā gan ar kontroles grupu, gan divpusējas lūpas šķeltnes un aukslēju šķeltnes grupām. *BARX1* gēns dzīvniekiem regulē mezenhimālas izcelsmes šūnu sablīvēšanos galvas apvidū (Paudel et al., 2022), tāpēc, iespējams, cilvēkiem izmaiņas *BARX1* gēna kodētā proteīna darbībā varētu radīt traucējumus saistaudu augšanā un reģenerācijā, kas varētu būt iesaistīta nesindromiskas vienpusējas lūpas šķeltnes morfopatoģenēzē.

Statistiski nozīmīgas atšķirības *DLX4* gēna proteīna imūnreaktivitātē starp visām pētījuma grupām tika konstatētas gan epitēlijā, gan saistaudos. Veselos audos *DLX4* gan epitēlijā, gan saistaudos kopumā tika noteikts maz. Vienpusējas lūpas šķeltnes audos *DLX4* gan epitēlijā, gan saistaudos tika konstatēti reti, divpusējas lūpas šķeltnes epitēlijā *DLX4* tika noteikts maz, bet saistaudos – reti, savukārt aukslēju šķeltnes audos *DLX4* epitēlijā kopumā tika konstatēti reti, bet saistaudos – reti vai nemaz. Statistiski nozīmīgas atšķirības *DLX4* proteīna imūnreaktivitātē epitēlijā tika konstatētas starp vienpusējas lūpas šķeltnes grupu un aukslēju šķeltnes grupu un starp divpusējas lūpas šķeltnes grupu un aukslēju šķeltnes grupu. Tomēr statistiski nozīmīgas atšķirības epitēlijā netika atrastas starp kontroles grupu un kādu no šķeltnu pacientu grupām. Atšķirības *DLX4* imūnreaktivitātē epitēlijā starp šķeltnu pacientu grupām liecina, ka *DLX4* gēna kodētais proteīns varētu būt potenciāli iesaistīts tieši aukslēju šķeltnes morfopatoģenēzē. Tomēr literatūrā ir pretrunīgi dati. Pētījumā ar pelēm, kurām bija *DLX4* gēna funkcijas zudums, secināts, ka *DLX4* gēns nav nepieciešams epitēlija, piemēram, epidermas, augšanai un funkcionēšanai un *DLX4* gēna trūkums neizraisīja citas nozīmīgas patoloģijas pelēm, ko varētu izskaidrot ar pārējo *DLX* gēnu spēju nosegt *DLX4* funkcionālo lomu

(Bhattacharya et al., 2018). Savukārt pārāk liela DLX4 aktivitāte ir saistīta ar paātrinātu epitēlijšūnu proliferāciju, šūnu cikla darbības traucējumiem un audzēju šūnu invāziju, piemēram, nazofaringeālas karcinomas gadījumā (Ling et al., 2020). Mūsu pētījumā statistiski nozīmīgas atšķirības trūkums salīdzinājumā ar kontroles grupas epitēliju varētu nozīmēt to, ka DLX4 proteīns epitēlijā tomēr nav pats nozīmīgākais faktors sejas šķeltnu morfoģenēzē, lai gan nav izslēdzams, ka pastāv nelielas atšķirības DLX4 imunreaktivitātē mutes dobuma epitēlijā atkarībā no iegūto audu lokācijas (lūpas audi vai mīksto aukslēju audi).

Saistaudos statistiski nozīmīgas atšķirības DLX4 proteīna imūnreaktivitātē tika konstatētas starp kontroles grupu un divpusējas lūpas šķeltnes grupu un starp kontroles grupu un aukslēju šķeltnes grupu. Pētījuma rezultāti liecina, ka DLX4 proteīns saistaudos varētu būt potenciāli selektīvi iesaistīts aukslēju šķeltnes un divpusējas lūpas šķeltnes morfoģenēzē, bet ne vienpusējas lūpas šķeltnes gadījumā. DLX4 proteīna ietekme uz saistaudiem postnatāli nav plaši pētīta, bet ir iepriekš konstatēts, ka DLX4 audzēju audos sekmē slāpekļa oksīda veidošanos, kas veicina endotēlijšūnu augšanu un angiogēnēzi audzēja audos (Trinh et al., 2015). Iespējams, ka DLX4 divpusējas lūpas šķeltnes un aukslēju šķeltnu audos varētu potenciāli regulēt audu apasiņošanu, netiešā veidā ietekmējot sejas audu augšanu un sejas šķeltnu audu formēšanos.

FOXE1 gēna proteīna relatīvā daudzuma mediāna veselos audos bija maz līdz vidēji daudz epitēlijā un maz saistaudos. Vienpusējas lūpas šķeltnes audos FOXE1 gan epitēlijā, gan saistaudos tika noteikts vidēji daudz. Divpusējas lūpas šķeltnes audos FOXE1 tika konstatēts maz līdz vidēji daudz, bet saistaudos – maz. Savukārt aukslēju šķeltnes audos FOXE1 gan epitēlijā, gan saistaudos tika noteikts maz. Statistiski nozīmīgas atšķirības FOXE1 gēna proteīna imūnreaktivitātē starp kontroles un pacientu grupām netika atrastas epitēlijā, bet

tika noteiktas saistaudos. Saistaudos statistiski nozīmīga atšķirības FOXE1 imūnreaktivitātē tika noteiktas starp kontroles grupu un viopusējas lūpas šķeltnes pacientu grupu, starp viopusējas lūpas šķeltnes grupu un divpusējas lūpas šķeltnes grupu un starp viopusējas lūpas šķeltnes grupu un aukslēju šķeltnes grupu. Pētījuma rezultāti liecina, ka FOXE1 saistaudos varētu būt potenciāli saistīts ar viopusējas lūpas šķeltnes morfopatogēnēzi, jo tika konstatētas būtiskas atšķirības salīdzinājumā ar kontroles grupu un pārējām šķeltnu audu grupām. Dzīvniekiem *FOXE1* gēns regulē galvas un kakla reģiona attīstību, mijiedarbojoties ar SHH signālceļu (Raterman et al., 2023), un ļoti ticams, ka FOXE1 darbības traucējumi cilvēkiem var veicināt sejas šķeltnu morfopatogēnēzi, mijiedarbojoties vairākiem signālceļiem.

HOXB3 gēna proteīna relatīvā daudzuma mediāna veselos audos bija maz epitēlijā un vidēji daudz saistaudos. Vienpusējas lūpas šķeltnes audos HOXB3 epitēlijā tika konstatēts vidēji daudz līdz daudz, bet saistaudos – vidēji daudz. Divpusējas lūpas šķeltnes audos HOXB3 tika noteikts vidēji daudz epitēlijā un maz līdz vidēji daudz saistaudos. Savukārt aukslēju šķeltnes audos HOXB3 kopumā tika konstatēts maz līdz vidēji daudz epitēlijā un vidēji daudz saistaudos. Statistiski nozīmīgas atšķirības HOXB3 gēna proteīna imūnreaktivitātē starp kontroles un pacientu grupām tika konstatētas gan epitēlijā, gan saistaudos. Epitēlijā statistiski nozīmīgas atšķirības HOXB3 proteīna imūnreaktivitātē tika konstatētas starp kontroles grupu un viopusējas lūpas šķeltnes grupu, starp viopusējas lūpas šķeltnes grupu un divpusējas lūpas šķeltnes grupu un starp viopusējas lūpas šķeltnes grupu un aukslēju šķeltnes grupu. Saistaudos statistiski nozīmīgas atšķirības HOXB3 proteīna imūnreaktivitātē tika konstatētas starp viopusējas lūpas šķeltnes grupu un divpusējas lūpas šķeltnes grupu un starp viopusējas lūpas šķeltnes grupu un aukslēju šķeltnes grupu. Pētījuma rezultāti ļauj secināt, ka HOXB3 epitēlijā un saistaudos postnatāli varētu būt nozīmīgs faktors tieši viopusējas lūpas šķeltnes

morfopatogēnēzē. HOXB3 funkcionālā nozīme ir vairāk pētīta ļaundabīgo audzēju gadījumā (Zhu et al., 2023; Xu et al., 2018), jo HOXB3 regulē šūnu proliferāciju. Ir noskaidrots, ka HOXB3 spēj mijiedarboties ar WNT signālceļu (Zhu et al., 2023; Yu et al., 2022), kas arī ir nozīmīgs sejas apvidus attīstībai un varētu būt viens no iespējamiem skaidrojumiem, kāpēc HOXB3 varētu iesaistīties vienpusējas lūpas šķeltnes morfopatogēnēzē. HOXB3 ietekme uz audu augšanu ir vairāk pētīta audzējos. *HOXB3* gēns spēj ietekmēt sūnas ciklu un veicināt nekontrolētu šūnu dalīšanos, kas ir novērots prostatas vēža gadījumā (Chen et al., 2013). Ir arī pētījumi, kuros secināts tieši pretējais, ka *HOXB3* gēnam ir tumoru supresoru gēnu aktivitāte aizkuņģa dziedzera vēža audos, kavējot audzēju šūnu dalīšanos un migrāciju (Yang et al., 2016). Šāda pretrunīga informācija literatūras datos kopā ar mūsu pētījumā iegūtajiem rezultātiem varētu liecināt, ka HOXB3 gēna proteīna ietekme uz audu augšanu un formēšanos ir atkarīga no konkrētā audu veida, audu lokācijas un citiem faktoriem, piemēram, noteiktu signālceļu darbības, kas varētu būt atšķirīga dažādu sejas šķeltnu audos.

MSX2 gēna proteīns nebija atrodams veselos mutes dobuma audos, bet vienpusējas lūpas šķeltnes audos MSX2 tika noteikts vidēji daudz epitēlijā un maz saistaudos, divpusējas lūpas šķeltnes audos – maz epitēlijā un reti saistaudos, savukārt aukslēju šķeltnes audos – vidēji daudz epitēlijā un reti saistaudos. Statistiski nozīmīgas atšķirības MSX2 gēna proteīna imūnreaktivitātē starp kontroles un pacientu grupām tika atrastas gan epitēlijā, gan saistaudos. Epitēlijā statistiski nozīmīgas atšķirības MSX2 proteīna imūnreaktivitātē tika konstatētas starp kontroles grupu un vienpusējas lūpas šķeltnes grupu, starp kontroles grupu un divpusējas lūpas šķeltnes grupu, starp kontroles grupu un aukslēju šķeltnes grupu, starp vienpusējas lūpas šķeltnes grupu un divpusējas lūpas šķeltnes grupu un starp vienpusējas lūpas šķeltnes grupu un aukslēju šķeltnes grupu. Saistaudos statistiski nozīmīgas atšķirības

MSX2 proteīna imūnreaktivitātē tika konstatētas starp viopusējas lūpas šķeltnes grupu un divpusējas lūpas šķeltnes grupu un starp viopusējas lūpas šķeltnes grupu un aukslēju šķeltnes grupu. Pētījuma rezultāti liecina, ka MSX2 epitēlijā postnatāli ir iesaistītas gan viopusējas lūpas šķeltnes, gan divpusējas lūpas šķeltnes, gan aukslēju šķeltnes morfofotogēnēzē, bet visizteiktākā MSX2 ietekme varētu būt tieši viopusējas lūpas šķeltnes audos, jo tajos MSX2 imūnreaktīvo šūnu relatīvais daudzums epitēlijā un saistaudos statistiski nozīmīgi atšķirās arī no pārējām šķeltnu grupām. Pelēm *MSX2* gēns regulē galvaskausa pamatnes veidošanos (Nie, 2006). *MSX2* gēna trūkums vai darbības traucējumi pelēm rada osifikācijas traucējumus un galvas reģiona attīstības anomālijas, ieskaitot sejas šķeltnes (Satokata et al., 2000). Cilvēkiem MSX2 potenciāli varētu būt iesaistīts dažādu sejas šķeltnu morfofotogēnēzē kā nozīmīgs kraniofaciālā apvidus augšanas un formēšanās regulators. *MSX2* gēns ietekmē mutes dobuma epitēlija formēšanos un diferenciāciju. *MSX2* gēns pelēm ietekmē zobu emaljas orgāna attīstību, neļaujot ārējam emaljas epitēlijam transformēties daudzkārtu plakanā mutes dobuma epitēlijā (Nakatomi et al., 2018). Iespējams, *MSX2* gēna darbības izmaiņas varētu būt raksturīgas cilvēkiem sejas šķeltnes skartā epitēlijā, par ko liecina mūsu pētījuma rezultāti. Izteiktāka MSX2 atrade bija redzama tieši šķeltnes skartajā epitēlijā visās trijās sejas šķeltnu audu grupās un mazāk izteikti saistaudos. *MSX2* gēns arī ietekmē audu augšanu un šūnu dalīšanos. MSX2 ietekme uz audu augšanu ir pētīta kolorektālā vēža audos (Liu et al., 2017), kuros paaugstināta *MSX2* gēna aktivitāte veicina audzēja šūnu augšanu un invāziju, bet *MSX2* gēna aktivitātes trūkums ir ar pretēju iedarbību, veicinot šūnu apoptozi un šūnas cikla apstāšanos. *MSX2* gēns pelēm regulē mezenhīmas šūnu diferenciāciju noteiktos galvas un kakla apvidos, kas iesaistās mutes dobuma saistaudu izveidē, mijiedarbojoties ar kaulu morfoģenētisko proteīnu (BMP) signālceļu (Sakagami et al., 2018). Iespējams, mūsu pētījumā noteiktās MSX2 proteīna atrades izmaiņas šķeltnes

skartos mutes dobuma saistaudos, salīdzinot ar veselīgiem audiem, varētu arī iesaistīties šķeltnu morfoģenēzē, ietekmējot šķeltnes skarto saistaudu formēšanos un augšanu.

PAX7 gēna proteīns veselos mutes dobuma audos kopumā tika noteikts maz līdz vidēji daudz gan epitēlijā, gan saistaudos. Vienpusējas lūpas šķeltnes audos PAX7 tika konstatēts vidēji daudz līdz daudz epitēlijā un daudz saistaudos, divpusējas lūpas šķeltnes audos – vidēji daudz epitēlijā un maz līdz vidēji daudz saistaudos, savukārt aukslēju šķeltnes audos – maz līdz vidēji daudz epitēlijā un vidēji daudz līdz daudz saistaudos. Statistiski nozīmīgas atšķirības PAX7 gēna proteīna imūnreaktivitātē starp kontroles un pacientu grupām tika atrastas gan epitēlijā, gan saistaudos. Epitēlijā statistiski nozīmīgas atšķirības PAX7 proteīna imūnreaktivitātē tika konstatētas starp kontroles grupu un vienpusējas lūpas šķeltnes grupu, vienpusējas lūpas šķeltnes grupu un divpusējas lūpas šķeltnes grupu, starp vienpusējas lūpas šķeltnes grupu un aukslēju šķeltnes grupu. Saistaudos statistiski nozīmīgas atšķirības PAX7 proteīna imūnreaktivitātē tika konstatētas starp kontroles grupu un vienpusējas lūpas šķeltnes grupu, starp vienpusējas lūpas šķeltnes grupu un divpusējas lūpas šķeltnes grupu, starp vienpusējas lūpas šķeltnes grupu un aukslēju šķeltnes grupu, starp divpusējas lūpas šķeltnes grupu un aukslēju šķeltnes grupu. Pētījuma rezultāti ļauj secināt, ka PAX7 postnatāli varētu būt iesaistīts galvenokārt vienpusējas lūpas šķeltnes morfoģenēzē gan epitēlijā, gan saistaudos. PAX7 ir galvenokārt aprakstīts kā mioģenēzes regulators, kas mijiedarbojas ar WNT signālceļu sejas attīstības procesā (Zhu et al., 2017; Nogueira et al., 2015). Ja pelēm PAX7 funkcionē korekti, tad PAX7 kopā ar PAX3 spēj mazināt teratogēnu negatīvo ietekmi un novērst sejas apvidus anomāliju attīstību (Zalc et al., 2015). Nesindromiskas vienpusējas lūpas šķeltnes gadījumā PAX7 cilvēkiem postnatāli varētu būt viens no iespējamiem morfoģenētiskajiem faktoriem, tā funkcionālie traucējumi teorētiski varētu

palielināt citu faktoru, piemēram, teratogēnu, ietekmi uz lūpas šķeltnes audu formēšanos.

PAX9 gēna proteīna relatīvā daudzuma mediāna veselos mutes dobuma audos bija vidēji daudz epitēlijā, bet PAX9 gēna proteīns netika atrasts veselos mutes dobuma saistaudos. Vienpusējas lūpas šķeltnes audos PAX9 kopumā tika konstatēts maz līdz vidēji daudz epitēlijā un vidēji daudz saistaudos. Divpusējas lūpas šķeltnes audos PAX9 tika noteikts reti gan epitēlijā, gan saistaudos, savukārt aukslēju šķeltnes audos – reti epitēlijā un maz saistaudos. Statistiski nozīmīgas atšķirības PAX9 gēna proteīna imūnreaktivitātē starp kontroles un pacientu grupām tika atrastas gan epitēlijā, gan saistaudos. Epitēlijā statistiski nozīmīgas atšķirības PAX9 proteīna imūnreaktivitātē tika konstatētas starp kontroles grupu un divpusējas lūpas šķeltnes grupu, starp kontroles grupu un aukslēju šķeltnes grupu, starp vienpusējas lūpas šķeltnes grupu un divpusējas lūpas šķeltnes grupu, starp vienpusējas lūpas šķeltnes grupu un aukslēju šķeltnes grupu. Saistaudos statistiski nozīmīgas atšķirības PAX9 proteīna imūnreaktivitātē tika konstatētas starp kontroles grupu un vienpusējas lūpas šķeltnes grupu, starp kontroles grupu un aukslēju šķeltnes grupu, starp vienpusējas lūpas šķeltnes grupu un divpusējas lūpas šķeltnes grupu, starp vienpusējas lūpas šķeltnes grupu un aukslēju šķeltnes grupu, starp divpusējas lūpas šķeltnes grupu un aukslēju šķeltnes grupu. Pētījuma rezultāti liecina, ka PAX9 epitēlijā varētu būt vairāk saistīts ar divpusēju lūpas šķeltnes un aukslēju šķeltnes morfoģenēzi, bet PAX9 saistaudos varētu būt vairāk saistīts ar vienpusēju lūpas šķeltni un aukslēju šķeltni. PAX9 mutes dobumā regulē epitēlija diferenciāciju (Jonker et al., 2004) un sekundāro aukslēju morfoģenēzi (Jia et al., 2020), regulējot BMP un SHH signālceļu darbību (Zhou et al., 2013). Mūsu pētījuma rezultāti liecina, ka PAX9 gēna proteīna atšķirīgā atrade dažādu šķeltnu skartajā epitēlijā un saistaudos cilvēkiem varētu būt saistīta ar atsevišķu sejas šķeltnu fenotipu izveidi, piemēram, PAX9 samazinājums audos, iespējams,



varētu veicināt klīniski smagāka divpusējas lūpas šķeltnes fenotipa morfofotoģenēzi. Ir arī noskaidrots, ka PAX9 ir iesaistīts audu augšanas regulācijā, jo tas spēj ierobežot šūnu dalīšanos audzējos un veicināt apoptozi (Liu et al., 2022). Tas arī varētu liecināt par to, ka PAX9 aktivitātes izmaiņas var potenciāli traucēt arī mutes dobuma audu augšanu un formēšanos sejas šķeltņu gadījumā.

RYK gēna proteīns veselos mutes dobuma audos tika noteikts reti gan epitēlijā, gan saistaudos. Gan viopusējas lūpas šķeltnes, gan divpusējas lūpas šķeltnes un aukslēju šķeltnes audos RYK kopumā tika konstatēts vidēji daudz līdz daudz gan epitēlijā, gan saistaudos. Statistiski nozīmīgas atšķirības RYK gēna proteīna imūnreaktivitātē starp kontroles un pacientu grupām tika atrastas gan epitēlijā, gan saistaudos. Epitēlijā statistiski nozīmīgas atšķirības RYK proteīna imūnreaktivitātē tika konstatētas starp kontroles grupu un viopusējas lūpas šķeltnes grupu, starp kontroles grupu un divpusējas lūpas šķeltnes grupu, starp kontroles grupu un aukslēju šķeltnes grupu, starp viopusējas lūpas šķeltnes grupu un aukslēju šķeltnes grupu. Saistaudos statistiski nozīmīgas atšķirības RYK proteīna imūnreaktivitātē tika konstatētas starp kontroles grupu un viopusējas lūpas šķeltnes grupu, starp kontroles grupu un divpusējas lūpas šķeltnes grupu un starp kontroles grupu un aukslēju šķeltnes grupu. Pētījuma rezultāti liecina, ka RYK gan epitēlijā, gan saistaudos varētu būt iesaistīts šķeltņu morfofotoģenēzē visās trijās šķeltņu pacientu grupās. Ir labi zināms, ka RYK mijiedarbojas ar WNT signālceļu un ka tas regulē epitēlijšūnu polaritāti (Macheda et al., 2012). RYK kopā ar WNT signālceļu var regulēt arī citus morfofotoģenētiskos procesus, piemēram, iekaisumu, kas ir aprakstīts plaušu attīstības procesā pelēm (Kim et al., 2022). Iespējams, RYK loma nesindromisku sejas šķeltņu morfofotoģenēzē varētu būt saistīta ar traucējumiem WNT signālceļā, paralēli ietekmējot arī citus potenciālos morfofotoģenētiskos procesus postnatāli, piemēram, iekaisumu.

SHH gēna proteīns veselos mutēs dobuma audos tika noteikts vidēji daudz līdz daudz epitēlijā un maz līdz vidēji daudz saistaudos. Vienpusējas lūpas šķeltnes audos SHH kopumā tika konstatēts maz līdz vidēji daudz gan epitēlijā, gan saistaudos. Divpusējas lūpas šķeltnes audos SHH tika konstatēts maz līdz vidēji gan epitēlijā, gan saistaudos, savukārt aukslēju šķeltnes audos SHH tika noteikts maz epitēlijā un maz līdz vidēji daudz saistaudos. Statistiski nozīmīgas atšķirības SHH gēna proteīna imūnreaktivitātē starp kontroles un pacientu grupām tika atrastas gan epitēlijā, gan saistaudos. Epitēlijā statistiski nozīmīgas atšķirības SHH proteīna imūnreaktivitātē tika konstatētas starp kontroles grupu un divpusējas lūpas šķeltnes grupu, starp kontroles grupu un aukslēju šķeltnes grupu, starp vienpusējas lūpas šķeltnes grupu un divpusējas lūpas šķeltnes grupu, starp vienpusējas lūpas šķeltnes grupu un aukslēju šķeltnes grupu, starp divpusējas lūpas šķeltnes grupu un aukslēju šķeltnes grupu. Pētījuma rezultāti liecina, ka SHH epitēlijā varētu būt vairāk saistīts ar divpusēju lūpas šķeltni un aukslēju šķeltni. SHH saistība ar divpusēju lūpas šķeltni varētu liecināt par šī proteīna iesaisti klīniski smagāka fenotipa attīstībā cilvēkiem. SHH ir iepriekš aprakstīts kā augšlūpas morfoģenēzes regulatorais faktors (Everson et al., 2017). SHH iesaiste aukslēju šķeltnes morfoģenēzē dzīvniekiem ir jau iepriekš aprakstīta (Shin et al., 2019).

Saistaudos statistiski nozīmīgas atšķirības SHH proteīna imūnreaktivitātē tika konstatētas starp kontroles grupu un aukslēju šķeltnes grupu, starp vienpusējas lūpas šķeltnes grupu un divpusējas lūpas šķeltnes grupu un starp vienpusējas lūpas šķeltnes grupu un aukslēju šķeltnes grupu. Pētījuma rezultāti liecina, ka SHH saistaudos varētu būt vairāk saistīts ar aukslēju šķeltni, bet arī pastāv statistiski nozīmīgas atšķirības starp vienpusēju un divpusēju lūpas šķeltni SHH imūnreaktivitātē saistaudos. SHH loma aukslēju šķeltnes morfoģenēzē ir jau iepriekš aprakstīta pelēm, kur palielināta SHH signāleļa aktivitāte ir saistīta ar aukslēju šķeltnes formēšanos (Hammond et al., 2018), bet

mūsu pētījuma rezultāti liecina, ka cilvēka aukslēju šķeltnes audos ir samazināts SHH relatīvais daudzums. Samazināta SHH signālceļa aktivitāte pelēm augšžokļa mezenhīmā parasti pastiprina BMP signālceļa darbību, kas savukārt palielina saistaudu veidošanos mutes dobuma apvidū, īpaši augšžoklī un aukslējās (Xu et al., 2019). Tā kā mūsu pētījumā tika analizēti dažādu sejas šķeltņu skarti audi jau pēc mezenhīmas diferencēšanās un šķeltnes audu veidošanās procesa noslēguma, iespējams, SHH relatīvā daudzuma izmaiņas šķeltnes audos postnatāli varētu ietekmēt citi faktori, piemēram, citu signālceļu aktivitātes izmaiņas mutes dobuma saistaudos. Ir noteikts, ka pelēm SHH signālceļš varētu mijiedarboties ar TGF $\beta$  signālceļu vēlākos sekundāro aukslēju attīstības etapos, kad mezenhimocīti ir jau diferencējušies fibroblastiem līdzīgās šūnās, parakrīnā ceļā ietekmējot saistaudu augšanu aukslējās (Ohki et al., 2020). Līdzīga mijiedarbība, kas būtu atkarīga no audu diferenciācijas un brieduma pakāpes, varētu eksistēt arī cilvēka sejas šķeltņu skartajos audos, bet būtu nepieciešami pētījumi, kas izvērtētu tieši SHH un citu signālceļu darbības izmaiņas mutes dobuma audos atkarībā no indivīdu vecuma, kas varētu būt problemātiski ētisku apsvērumu dēļ.

SOX3 gēna proteīns veselos mutes dobuma audos tika noteikts daudz līdz ļoti daudz epitēlijā un daudz saistaudos. Vienpusējas lūpas šķeltnes audos kopumā SOX3 tika konstatēts vidēji daudz līdz daudz epitēlijā un vidēji daudz saistaudos, divpusējas lūpas šķeltnes audos – vidēji daudz gan epitēlijā, gan saistaudos, savukārt aukslēju šķeltnes audos – maz līdz vidēji daudz epitēlijā un vidēji daudz saistaudos. Statistiski nozīmīgas atšķirības SOX3 gēna proteīna imūnreaktivitātē starp kontroles un pacientu grupām tika atrastas gan epitēlijā, gan saistaudos. Epitēlijā statistiski nozīmīgas atšķirības SOX3 proteīna imūnreaktivitātē tika konstatētas starp kontroles grupu un vienpusējas lūpas šķeltnes grupu, starp kontroles grupu un divpusējas lūpas šķeltnes grupu, starp kontroles grupu un aukslēju šķeltnes grupu, starp vienpusējas lūpas šķeltnes

grupu un divpusējas lūpas šķeltnes grupu, starp vienpusējas lūpas šķeltnes grupu un aukslēju šķeltnes grupu. Saistaudos statistiski nozīmīgas atšķirības SOX3 proteīna imūnreaktivitātē tika konstatētas starp kontroles grupu un vienpusējas lūpas šķeltnes grupu, starp kontroles grupu un divpusējas lūpas šķeltnes grupu, starp kontroles grupu un aukslēju šķeltnes grupu. Pētījuma rezultāti liecina, ka SOX3 postnatāli gan epitēlijā, gan saistaudos varētu būt iesaistīts gan vienpusējas lūpas šķeltnes, gan divpusējas lūpas šķeltnes, gan aukslēju šķeltnes morfopatogēnēzē. Vērā ņemama ir arī statistiski nozīmīgā atšķirība SOX3 imūnreaktivitātē epitēlijā vienpusējas lūpas šķeltnes audos salīdzinājumā ar pārējām sejas šķeltnu grupām, kas varētu saistīt SOX3 epitēlijā vairāk ar vienpusēju lūpas šķeltni. SOX3 gēna nozīme šķeltnu morfopatogēnēzē ir relatīvi neskaidra. SOX3 gēns ir pētīts audzējos, kur pastiprināta SOX3 gēna ekspresija veicina epitēlija transformāciju mezenhīmā, šūnu migrāciju un audzēju šūnu invāziju (Qiu et al., 2017). SOX3 funkcionalitāte ir pētīta dzīvniekos, un tas ir nepieciešams spermatogoniju diferenciacijai pelēm pirms pubertātes periodā, bet ne pieaugušās pelēs (Laronda and Jameson, 2011). SOX3, iespējams, varētu būt iesaistīts šķeltnu morfopatogēnēzē, ietekmējot šķeltnes audu formēšanos. Iespējams, SOX3 funkcionalitāte varētu būt vecuma atkarīga arī cilvēka sejas šķeltnu audos, bet būtu nepieciešams izvērtēt SOX3 imūnreaktivitāti dažāda vecuma grupās, kas ir problemātiski ētisku apsvērumu dēļ.

WNT3A gēna proteīns veselos mutes dobuma audos tika konstatēts vidēji daudz līdz daudz epitēlijā un daudz saistaudos, vienpusējas lūpas šķeltnes audos – maz gan epitēlijā, gan saistaudos, divpusējas lūpas šķeltnes audos – reti epitēlijā un maz saistaudos, savukārt aukslēju šķeltnes audos – reti gan epitēlijā, gan saistaudos. Statistiski nozīmīgas atšķirības WNT3A gēna proteīna imūnreaktivitātē starp kontroles un pacientu grupām tika atrastas gan epitēlijā, gan saistaudos. Epitēlijā statistiski nozīmīgas atšķirības WNT3A proteīna imūnreaktivitātē tika konstatētas starp kontroles grupu un vienpusēju lūpu

šķeltnes grupu, starp kontroles grupu un divpusējas lūpas šķeltnes grupu, starp kontroles grupu un aukslēju šķeltnes grupu, starp viopusējas lūpas šķeltnes grupu un divpusējas lūpas šķeltnes grupu, starp viopusējas lūpas šķeltnes grupu un aukslēju šķeltnes grupu. Saistaudos statistiski nozīmīgas atšķirības WNT3A proteīna imūnreaktivitātē tika konstatētas starp kontroles grupu un viopusējas lūpas šķeltnes grupu, starp kontroles grupu un divpusējas lūpas šķeltnes grupu, starp kontroles grupu un aukslēju šķeltnes grupu. Pētījuma rezultāti ļauj secināt, ka, tāpat kā SOX3 gadījumā, arī WNT3A gan saistaudos, gan epitēlijā postnatāli varētu būt saistīts ar sejas šķeltņu morfopatoģenēzi visās trijās pacientu grupās, bet, iespējams, nozīmīgāka loma varētu būt tieši viopusējas lūpas šķeltnes gadījumā. Paaugstināta WNT3A aktivitāte ir saistīta ar patoloģijām, kurās ir pastiprināta mutes dobuma keratinocītu dalīšanās aktivitāte, piemēram, mutes dobuma epitēlija displāzija vai mutes dobuma plakanšūnu vēzis, jo tiek pastiprināta WNT signālceļa darbība (Reyes et al., 2019). Pētījuma rezultāti ļauj secināt, ka samazināta WNT3A aktivitāte sejas šķeltņu audos postnatāli varētu ietekmēt epiteliocītu augšanu un līdz ar to arī šķeltņu morfopatoģenēzi.

WNT9B gēna proteīns veselos mutes dobuma audos tika konstatēts daudz līdz ļoti daudz gan epitēlijā, gan saistaudos, viopusējas lūpas šķeltnes audos – vidēji daudz līdz daudz epitēlijā un daudz saistaudos, divpusējas lūpas šķeltnes audos – vidēji daudz epitēlijā un vidēji daudz līdz daudz saistaudos, savukārt aukslēju šķeltnes audos – vidēji daudz epitēlijā un vidēji daudz līdz daudz saistaudos. Statistiski nozīmīgas atšķirības WNT9B gēna proteīna imūnreaktivitātē starp kontroles un pacientu grupām tika atrastas gan epitēlijā, gan saistaudos. Epitēlijā statistiski nozīmīgas atšķirības WNT9B proteīna imūnreaktivitātē tika konstatētas starp kontroles grupu un viopusējas lūpas šķeltnes grupu, starp kontroles grupu un divpusējas lūpas šķeltnes grupu, starp kontroles grupu un aukslēju šķeltnes grupu, starp viopusējas lūpas šķeltnes grupu un divpusējas lūpas šķeltnes grupu, starp viopusējas lūpas šķeltnes grupu

un aukslēju šķeltnes grupu. Saistaudos statistiski nozīmīgas atšķirības WNT9B proteīna imūnreaktivitātē tika konstatētas starp kontroles grupu un viensusējas lūpas šķeltnes grupu, starp kontroles grupu un divpusējas lūpas šķeltnes grupu, starp kontroles grupu un aukslēju šķeltnes grupu un starp viensusējas lūpas šķeltnes grupu un aukslēju šķeltnes grupu. Pētījuma rezultāti liecina, ka WNT9B gan epitēlijā, gan saistaudos varētu būt nozīmīgs morfopatoģenētiskais faktors gan viensusējas lūpas šķeltnes, gan divpusējas lūpas šķeltnes, gan aukslēju šķeltnes audos. Izteiktāka atšķirība WNT9B epitēlijā un saistaudos varētu būt tieši viensusējas lūpas šķeltnes audos, kas statistiski nozīmīgi atšķirās no pārējām sejas šķeltnu grupām. Pelēm *WNT9B* gēns iesaistās klasiskajā WNT signālceļā un regulē augšlūpas saplūšanas procesu (Lan et al., 2006). Līdzīga WNT9B mijiedarbība varētu būt raksturīga arī cilvēkam, kas varētu būt relatīvi nozīmīgs sejas šķeltnu morfopatoģenēzes mehānisms.

Veicot korelāciju analīzi starp izvērtēto šķeltnu kandidātģēnu proteīniem kontroles un šķeltnu pacientu grupās, tika konstatētas vairākas statistiski nozīmīgas korelācijas. Abās kontroles grupās tika noteiktas vairākas statistiski nozīmīgas korelācijas starp izvērtētajiem šķeltnu kandidātģēniem, bet tās ir jāizvērtē uzmanīgi mazā pacientu skaita dēļ katrā kontroles grupā, kas var palielināt statistiskās nejaušības iespējamību.

Pirmajā kontroles grupā (pacienti, kam veikta augšlūpas saitītes plastika) tika konstatēta statistiski nozīmīga cieša pozitīva korelācija starp pacientu vecumu un RYK relatīvo daudzumu saistaudos. Šī korelācija var būt nejauša relatīvi mazā kontroles pacientu skaita dēļ, bet, iespējams, varētu pastāvēt saistība starp RYK pozitīvo šūnu relatīvo skaitu un vecumu relatīvi veselos mutes dobuma audos. Pašlaik nav veiktu pētījumu par RYK proteīna relatīva daudzuma izmaiņām mutes dobuma audos atkarībā no indivīdu vecuma. RYK proteīna funkcionalitāte ir pētīta onkoloģijā, jo RYK proteīna palielināts daudzums tiek saistīts ar palielinātu WNT signālceļa aktivitāti, kas audzējos var

veicināt aktīvāku šūnu augšanu un invāziju (Kim et al., 2015; Habu et al., 2014). RYK potenciāli varētu būt iesaistīts normālā mutes dobuma gļotādas saistaudu augšanas procesā.

Pirmajā kontroles grupā tika aprēķinātas vairākas statistiski nozīmīgas ļoti ciešas korelācijas starp šķeltņu kandidātģēnu proteīniem. Četrās pozitīvās korelācijās galvenokārt tika iesaistīts DLX4 epitēlijā un saistaudos. DLX4 tika arī konstatēts divās statistiski nozīmīgās negatīvās korelācijās. Statistiski nozīmīgās pozitīvās korelācijās trijos gadījumos tika konstatēta PAX7 iesaiste. Pētījuma rezultāti liecina, ka DLX4 un PAX7 varētu būt aktīvi faktori relatīvi veselos mutes dobuma audos, kas iesaistās mutes dobuma gļotādas audu uzturēšanā un formēšanā. DLX4 ir iesaistīts galvas apvidus epitēlijaudu augšanas regulācijā un ir pētīts saistībā ar onkoloģiskām slimībām (Ling et al., 2020), savukārt PAX7 ir vairāk pētīts saistībā ar tā funkcionālo nozīmi mioģenēzē (Collins et al., 2009). Protams, pirmās kontroles grupas audi nav pilnīgi veseli, jo nav izslēdzamas izmaiņas, ko varētu radīt augšlūpas saitītes hipertrofija, kas bija nepieciešamā indikācija, lai iegūtu relatīvi veselus mutes dobuma gļotādas audus.

Otrajā kontroles grupā (pacienti, kuru mutes dobuma audi iegūti no RSU AAI vēsturiskās kolekcijas) tika konstatēta viena statistiski nozīmīga cieša korelācija starp SHH epitēlijā un SHH saistaudos. Tas liecina, ka SHH ir relatīvi aktīvs faktors patoloģijas neizmainītos jaundzimušo mutes dobuma gļotādas audos. SHH signālceļš ir nepieciešams mutes dobuma gļotādas un zobu attīstības procesam, regulējot mijiedarbību starp mutes dobuma epitēliju un saistaudiem (Sagai et al., 2017).

Visās trijās šķeltņu pacientu grupās tika konstatēts daudz statistiski nozīmīgu korelāciju. Lielais korelāciju skaits liecina par komplicētu mijiedarbību starp izvērtētajiem šķeltņu kandidātģēniem sejas šķeltņu morfoģenēzē postnatāli.

Vienpusējas lūpu šķeltnes grupā tika konstatētas 104 statistiski nozīmīgas pozitīvas korelācijas starp gandrīz visiem izvērtētajiem šķeltnu kandidātgēniem gan epitēlijā, gan saistaudos, izņemot BARX1. Vienpusējas lūpu šķeltnes grupā statistiski nozīmīgās ciešās pozitīvās korelācijās ( $r_s = 0,6-0,8$ ) visbiežāk bija iesaistīts HOXB3 epitēlijā (trīs reizes) un WNT9B epitēlijā (divas reizes). Tas liecina, ka HOXB3 un WNT9B epitēlijā varētu būt nozīmīgāki faktori vienpusējas lūpas šķeltnes morfofotoģenēzē nekā citi pētītie šķeltnu kandidātgēni. HOXB3 ir pētīts kā faktors, kas ietekmē galvas apvidus epitēlija un saistaudu augšanu (Zhang et al., 2021), bet WNT9B pelēm ir tieši iesaistīts augšlūpas veidošanās procesā (Lan et al., 2006). Vienpusējas lūpu šķeltnes grupā statistiski nozīmīgās vidēji ciešās pozitīvās korelācijās ( $r_s = 0,4-0,6$ ) visbiežāk bija iesaistīts HOXB3 epitēlijā (desmit reizes), PAX9 epitēlijā (deviņas reizes), PAX7 saistaudos, PAX9 saistaudos un SOX3 epitēlijā (katrs astoņas reizes). Tas vēl vairāk apliecina, kas HOXB3 varētu būt nozīmīgs vienpusējas lūpas šķeltnes morfofotoģenētiskais faktors postnatāli. PAX9 ir pētīts kā faktors, kas regulē mutes dobuma epitēlija un gļotādas diferenciaciju (Jonker et al., 2004), tāpēc tas varētu arī iesaistīties vienpusējas lūpas šķeltnes fotoģenēzē. SOX3 mutes dobuma epitēlijā nav plaši pētīts, bet pelēm tas regulē galvas smadzeņu un galvas struktūru attīstību (Adikusuma et al., 2017). Iespējams, SOX3 varētu būt iesaistīts vienpusējas lūpas šķeltnes morfofotoģenēzē postnatāli. Vienpusējas lūpu šķeltnes grupā statistiski nozīmīgās vājās pozitīvās korelācijās ( $r_s = 0,2-0,4$ ) visbiežāk bija iesaistīts HOXB3 epitēlijā, MSX2 saistaudos un SHH saistaudos (sešās korelācijās katrs). MSX2 ir iesaistīts mutes dobuma gļotādas audu augšanas regulācijā, piemēram, nomācot audzēju cilmes šūnu veidošanos plakanšūnu vēža gadījumā (Keyimu et al., 2021). MSX2 varētu arī iesaistīties vienpusējas lūpas šķeltnes morfofotoģenēzē, iespējams, kavējot gļotādas audu augšanu un veicinot šķeltnes fenotipa izveidi. Savukārt SHH darbības traucējumi



ir iepriekš saistīti ar lūpas šķeltnes attīstību (Everson et al., 2017), kas arī atbilst mūsu pētījuma rezultātiem.

Divpusējas lūpas šķeltnes grupā tika aprēķinātas 72 statistiski nozīmīgas pozitīvas korelācijas starp izvērtētajiem šķeltnu kandidātģēniem. Divpusējas lūpas šķeltnes grupā statistiski nozīmīgās ļoti ciešās pozitīvās korelācijās ( $r_s = 0,8-1,0$ ) divas reizes bija iesaistīts HOXB3 epitēlijā, PAX9 epitēlijā, SHH epitēlijā un WNT9B epitēlijā katrs, kas ir līdzīgi vienpusējas lūpas šķeltnes grupai. Tas liecina, ka morfofotoģenētiskie mehānismi gan vienpusējas, gan divpusējas lūpas šķeltnes audos varētu būt līdzīgi, ko varētu saistīt ar to, ka abas šķeltnes skar augšlūpas audus. Statistiski nozīmīgās ļoti ciešās pozitīvās korelācijās divpusējas lūpas šķeltnes grupā bija iesaistīts FOXE1 epitēlijā, FOXE1 saistaudos, SHH saistaudos un WNT3A epitēlijā (katrs vienu reizi). FOXE1 epitēlijā ļoti cieši korelēja ar FOXE1 saistaudos, kas liecina, ka šis proteīns aktīvi iesaistās mutes dobuma epitēlija un saistaudu formēšanā divpusējas lūpas šķeltnēs, kas ir klīniski smagāka lūpas šķeltnes forma par vienpusēju lūpas šķeltni. FOXE1 tiek uzskatīts par nozīmīgu šķeltnu kandidātģēnu gan lūpas, gan aukslēju šķeltnes morfofotoģenēzē (Moreno et al., 2009). WNT3A, visticamāk, iesaistās WNT signālceļā, lai regulētu gļotādas audu homeostāzi šķeltnes skartos audos. Pētījumi liecina, ka mutes dobuma epitēlijšūnas pēc bojājuma reaģē uz WNT signālceļu, kas veicina bazālo šūnu proliferāciju un epitēlija atjaunošanos (Yuan et al., 2019). Divpusējas lūpu šķeltnes grupā statistiski nozīmīgās ciešās pozitīvās korelācijās ( $r_s = 0,6-0,8$ ) visbiežāk bija iesaistīts FOXE1 saistaudos (11 reizes), kā arī FOXE1 epitēlijā, MSX2 epitēlijā, MSX2 saistaudos, SOX3 epitēlijā (deviņas reizes katrs). Tas liecina, ka FOXE1 gan epitēlijā, gan saistaudos varētu būt aktīvs morfofotoģenētiskais faktors tieši divpusējas lūpas šķeltnes audos postnatāli. FOXE1 regulē pareizu epitēlijaudu augšanu, kas ir aprakstīts pētījumos, kuros vērtēta FOXE1 ietekme uz matu folikulu augšanu (Brancaccio et al., 2004), kas

liecina, ka FOXE1 varētu radīt traucējumus epitēlija augšanā arī divpusējas lūpas šķeltnes gadījumā. MSX2 un SOX3 iesaiste korelācijās divpusējas lūpas šķeltnes grupā ir līdzīga vienpusējas lūpas šķeltnes grupai, bet MSX2 un SOX3 ir iesaistīti ciešākās korelācijās nekā vienpusējas lūpas šķeltnu pacientu grupā, kas liecina par morfofotoģenētiskajām atšķirībām abu lūpas šķeltnu audos. Divpusējas lūpu šķeltnes grupā statistiski nozīmīgās vidēji ciešās pozitīvās korelācijās ( $r_s = 0,4-0,6$ ) visbiežāk bija iesaistīts SHH epitēlijā (trīs reizes), DLX4 epitēlijā, FOXE1 epitēlijā, SOX3 saistaudos, WNT3A epitēlijā (katrs divas reizes), kas ir līdzīgi vienpusējas lūpas šķeltnes grupai, vēl vairāk apliecinot morfofotoģenētiskās līdzības starp abiem lūpas šķeltnes fenotipiem.

Aukslēju šķeltnes grupā tika aprēķināta 71 statistiski nozīmīga pozitīva korelācija starp izvērtētajiem šķeltnu kandidātģenēm. Aukslēju šķeltnes grupā tika noteikta viena statistiski nozīmīga ļoti cieša pozitīva korelācija ( $r_s = 0,8-1,0$ ) starp SOX3 epitēlijā un WNT9B epitēlijā ( $r_s = 0,862$ ,  $p = < 0,001$ ). Mijiedarbība starp SOX3 un WNT signālceļu ir iepriekš aprakstīta pētījumos ar dzīvniekiem (Zhang et al., 2003; Zorn et al., 1999), kuros tika konstatēts, ka SOX3 spēj saistīties ar  $\beta$ -katenīnu, kas savukārt regulē WNT signālceļa aktivitāti. Iespējams, aukslēju šķeltnes audos SOX3 un WNT9B mijiedarbības traucējumi varētu būt viens no morfofotoģenētiskajiem mehānismiem, kas raksturīgi tieši šim šķeltnes tipam. Aukslēju šķeltnes grupā statistiski nozīmīgās ciešās pozitīvās korelācijās ( $r_s = 0,6-0,8$ ) visbiežāk tika noteikts PAX9 saistaudos (četras reizes), HOXB3 epitēlijā, PAX7 epitēlijā, PAX7 saistaudos (trijās korelācijās katrs), savukārt statistiski nozīmīgās vidēji ciešās pozitīvās korelācijās ( $r_s = 0,4-0,6$ ) visbiežāk bija iesaistīts SHH saistaudos (12 reizes), PAX9 epitēlijā (deviņas reizes), PAX7 saistaudos (astoņas reizes) un WNT3A saistaudos (astoņas reizes). Tas ir līdzīgi gan vienpusējas lūpas šķeltnes, gan divpusējas lūpas šķeltnes grupai. Līdzīgu šķeltnu kandidātģeņu iesaiste visās trijās šķeltnu kandidātģeņu grupās liecina par to, ka gan lūpas, gan aukslēju

šķeltnes audos pastāv relatīvi līdzīgi morfopatoģenētiskie procesi. Aukslēju šķeltnes grupā statistiski nozīmīgās vājās pozitīvās korelācijās ( $r_s = 0,2-0,4$ ) visbiežāk bija iesaistīts RYK (divas reizes saistaudos un vienu reizi epitēlijā). Mutācijas RYK gēnā ir iepriekš saistītas ar lūpu un aukslēju šķeltni (Watanabe et al., 2006), kas apliecina, ka RYK proteīna darbības traucējumi varētu būt daļa no aukslēju šķeltnes morfopatoģenētiskajiem mehānismiem, visticamāk, mijiedarbojoties ar WNT signālceļu (Macheda et al., 2012).

Kaut arī visi šķeltnu kandidātģēni uzrādīja statistiski nozīmīgas atšķirības imūnreaktivitātē starp kontroles grupu un šķeltnu pacientu grupām, atsevišķi šķeltnu kandidātģēni ir vairāk saistīti ar noteiktiem šķeltnu fenotipiem. Vienpusējas lūpas šķeltnes audos ir izteiktāka HOXB3, FOXE1, BARX1 un PAX7 iesaiste, divpusējas lūpas šķeltnes un aukslēju šķeltnes audos – DLX4, PAX9, SHH, bet ar visiem trim šķeltnu fenotipiem – MSX2, RYK, SOX3, WNT3A un WNT9B.

## Secinājumi

1. Mutes dobuma epitēlija vakuolizācija un bazālo šūnu proliferācija uzskatāmas par nespecifiskām kompensatorām audu pārmaiņām šķeltnes gadījumā. Relatīvi biežais iekaisums ir pavadošs faktors šķeltnu morfopatoģenēzē.
2. No izvērtētajiem gēnu proteīnu relatīvā daudzuma izmaiņas selektīvi raksturo vai nu veselus, vai šķeltnes skartus mutes dobuma audus. Veselos mutes dobuma audos atrodami DLX4, FOXE1, HOXB3, PAX7, RYK, SHH, SOX3, WNT3A un WNT9B gēnu proteīni: visvairāk atrodami WNT9B, WNT3A, SOX3 gēnu proteīni, vidēji daudz – SHH, PAX7, HOXB3, FOXE1, mazāk – PAX9, DLX4, RYK, savukārt gandrīz nemaz – BARX1 un MSX2 gēnu proteīni. BARX1 un MSX2 trūkums veselos, bet ne šķeltnes skartos audos liecina par šo gēnu proteīnu palielināšanos tikai šķeltnu morfopatoģenēzē. SOX3, WNT3A un WNT9B statistiski mazāka ekspresija tikai šķeltnu audos norāda šo gēnu ekspresijas samazināšanos arī kā raksturīgu kopējai šķeltnu morfopatoģenēzei. Visbeidzot, bez statistiski nozīmīgas atšķirības, bet ar tendenci samazināties šķeltnu skartos audos uzrāda arī PAX9 un RYK.
3. Daļai gēnu proteīnu trūkst selektīva palielināšanās noteiktu šķeltnu veida gadījumā. Tā tieši vienpusēju šķeltni raksturo BARX1, FOXE1, HOXB3 un PAX7 intensīva ekspresija, norādot uz audu, īpaši saistaudu, šūnu reģenerācijas un proliferācijas potenciālu intensificēšanos, ko pamato statistiski ticamu atšķirību virkne starp šiem faktoriem.
4. Divpusēju šķeltnu fenotipu raksturo DLX4, PAX9 un SHH ekspresijas pārmaiņas, pirmajiem diviem uzrādot palielinātu, bet SHH – samazinātu izdali. Šo faktoru selektīva izdala ne tikai pamato to iesaisti divpusējas šķeltnes morfopatoģenēzē, bet arī akcentē galvenās kompensatori stimulētās funkcijas audos – saistaudu apasiņošanu DLX4 gadījumā,

augšanas regulācijas PAX9 gadījumā un tieši smagākās šķeltnes veidošanos SHH gadījumā.

5. Visus šķeltnu fenotipus raksturo MSX2 un RYK pieaugums, bet SOX3, WNT3A un WNT9B samazinājums audos. Bez kombinētās universālās ietekmes MSX2 pārmaiņas selektīvi varētu traucēt saistaudu augšanu un diferenciaciju, RYK pārmaiņas – WNT signālceļa darbību, SOX3, WNT3A un WNT9B – visu šķeltnes audu augšanu un diferenciaciju.
6. Līdzīgās korelācijas starp izvēlēto gēnu proteīnu ekspresiju visos šķeltnu fenotipos liecina par līdzīgiem morfopatoģenēzes mehānismiem, nosakot tikai šķeltnēm raksturīgo gēnu proteīnu fenotipu. Īpaši svarīgas ir ciešās pozitīvās korelācijas starp HOXB3 un WNT9B iesaisti vienpusējas lūpas šķeltnes grupā, starp HOXB3, PAX9, SHH un WNT9B epitēlijā divpusējas lūpas šķeltnes grupā un starp SOX3 un WNT9B epitēlijā aukslēju šķeltnes grupā.

## Priekšlikumi pētījumiem nākotnē

Šķeltņu kandidātģēni ir ļoti plaša šķeltņu morfopatoģenētisko faktoru grupa, kas iesaistās sejas reģiona audu attīstības un nobriešanas regulācijā. Šajā pētījumā ir apskatīta **tikai daļa no zināmajiem šķeltņu kandidātģēniem un to kodētajiem proteīniem**, tāpēc tālāka citu šo ģēnu un to proteīnu izpēte varētu būt nozīmīgs pētniecības virziens šķeltņu morfopatoģenēzē.

Šķeltņu morfopatoģenēze ir komplekss process, kurā ir iesaistīti ne tikai šķeltņu kandidātģēni, bet arī iekaisums, augšanas un audu remodelācijas faktori. Šo faktoru savstarpējā mijiedarbība rada sarežģītumus atrast vienotus šķeltņu morfopatoģenēzes mehānismus. **Salīdzinājums starp faktoru grupām, piemēram, šķeltņu kandidātģēniem un iekaisuma marķieriem šķeltnes skartos audos**, varētu papildināt zināšanas par sejas šķeltnes audu augšanu un formēšanos cilvēkiem. Tas varētu rast iespēju attīstīt mazāk invazīvas terapijas vai pat šķeltņu profilakses metodes, kas pielāgotas atbilstoši zināšanām par sejas šķeltņu morfopatoģenēzi.

Nemot vērā komplicēto faktoru mijiedarbību sejas šķeltņu skartajos audos, turpmākie morfoloģiskie pētījumi šķeltņu morfopatoģenēzes novērtējumā varētu ietvert ne tikai imūnhistoķīmiju, bet papildinoši arī citas pētniecības metodes, piemēram, *in situ* hibridizāciju. Tas varētu uzlabot zināšanas ne tikai par šķeltņu kandidātģēnu proteīnu izdali audos, bet arī **par transkriptomu vai par genoma īpatnībām nesindromisku sejas šķeltņu gadījumā**.

## Publikāciju, ziņojumu un patentu saraksts par promocijas darba tēmu

### Publikācijas, kas iekļautas datu bāzēs *Scopus*, *Web of Science*, *Pubmed*:

1. **Vaivads, M.**, Akota, I., Pilmane, M. 2023. Characterization of SHH, SOX3, WNT3A and WNT9B Proteins in Human Non-syndromic Cleft Lip and Palate Tissue. *Dentistry Journal*, 11(6), 151. <https://doi.org/10.3390/dj11060151>
2. **Vaivads, M.**, Akota, I., Pilmane, M. 2022. Immunohistochemical Evaluation of BARX1, DLX4, FOXE1, HOXB3, and MSX2 in Nonsyndromic Cleft Affected Tissue. *Acta medica Lituanica*, 29(2), 216–239. <https://doi.org/10.15388/Amed.2022.29.2.13>
3. **Vaivads, M.**, Akota, I., Pilmane, M. 2021. PAX7, PAX9 and RYK expression in cleft affected tissue. *Medicina (Lithuania)*, 57(10), 1075. <https://doi.org/10.3390/medicina57101075>
4. **Vaivads, M.**, Akota, I., Pilmane, M. 2021. Cleft Candidate Genes and Their Products in Human Unilateral Cleft Lip Tissue. *Diseases*, 9(2), 26. <https://doi.org/10.3390/diseases9020026>

### Publikācijas, kas pieejamas starptautiskos citējamos izdevumos, tostarp universitāšu rakstu krājumos:

1. **Vaivads, M.**, Balode, E., Pilmane, M. 2020. Factors affecting facial development and formation of cleft lip and palate: a literature review. *Papers on Anthropology*, 29(2), 22–35. <https://doi.org/10.12697/poa.2020.29.2.02>

### Referāti un tēzes starptautiskos kongresos un konferencēs:

1. **Vaivads, M.**, Akota, I., Pilmane, M. 2023. Cleft Candidate Gene Immunoreactivity in Human Non\_Syndromic Cleft Affected Tissue. Rīga Stradiņš University International Research Conference on Medical and Health Care Sciences “Knowledge for Use in Practice” 29.–31.03.2023. Oral presentation.
2. **Vaivads, M.**, Akota, I., Pilmane, M. 2023. Evaluation of sonic hedgehog, sex-determining region Y-box transcription factor 3 and wingless-type family member 3A and 9B in different cleft tissue. Practical Ophthalmology. Medical and Environmental Problems of our Days: Collection of Works International Scientific and Practical Interdisciplinary Conference. State Institution “National Research Center for Radiation medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine”, 12–13. Oral presentation.

3. **Vaivads, M.**, Akota, I., & Pilmane, M. 2022. PAX7, PAX9 and RYK expression in cleft affected tissue. 10th Congress of Baltic Association for Maxillofacial and Plastic Surgery and 16th Joint Symposium Riga–Rostock, Rīga, Latvia, 30. Poster presentation.
4. **Vaivads, M.**, Pilmane, M., Akota, I. 2021. Cleft candidate genes and their products in human unilateral cleft lip tissue. Rīga Stradiņš University International Research Conference on Medical and Health Care Sciences “Knowledge for Use in Practice”: Abstracts, 24.–26.03.2021, 405. Poster presentation.
5. Goida, J., **Vaivads, M.**, Pilmane, M. 2021. Tissue indicators of inflammation in the cleft affected tissue. Rīga Stradiņš University International Research Conference on Medical and Health Care Sciences “Knowledge for Use in Practice”: Abstracts, 24.–26.03.2021, 429. Poster presentation.



## Literatūras saraksts

1. Adikusuma, F., Pederick, D., McAninch, D., Hughes, J. and Thomas, P. 2017. Functional Equivalence of the SOX2 and SOX3 Transcription Factors in the Developing Mouse Brain and Testes. *Genetics*, 206(3), 1495–1503.
2. Alappat, S., Zhang, Z.Y., Chen, Y.P. 2003. Msx homeobox gene family and craniofacial development. *Cell Research*, 13(6), 429–442.
3. Altman, D. G. 1990. Chapter 8 – Principles of statistical analysis. In: *Practical statistics for medical research*. London: Chapman and Hall, 152–177.
4. Andrade Filho, P.A., Letra, A., Cramer, A., Prasad, J.L., Garlet, G.P., Vieira, A.R., Ferris, R.L. and Menezes, R. 2011. Insights from studies with oral cleft genes suggest associations between WNT-pathway genes and risk of oral cancer. *Journal of Dental Research*, 90(6), 740–746.
5. Bhattacharya, S., Duverger, O., Brooks, S.R. and Morasso, M.I. 2018. Homeobox transcription factor DLX4 is not necessary for skin development and homeostasis. *Experimental dermatology*, 27(3), 289–292.
6. Bylund, M., Andersson, E., Novitch, B.G. and Muhr, J. 2003. Vertebrate neurogenesis is counteracted by Sox1-3 activity. *Nature Neuroscience*, 6(11), 1162–1168.
7. Brancaccio, A., Minichiello, A., Grachtchouk, M., Antonini, D., Sheng, H., Parlato, R., Dathan, N., Dlugosz, A.A. and Missero, C. 2004. Requirement of the forkhead gene Foxe1, a target of sonic hedgehog signaling, in hair follicle morphogenesis. *Human molecular genetics*, 13(21), 2595–2606.
8. Chan, Y. and Walmsley, R.P. 1997. Learning and understanding the Kruskal-Wallis one-way analysis-of-variance-by-ranks test for differences among three or more independent groups. *Physical therapy*, 77(12), 1755–1762.
9. Chen, J., Zhu, S., Jiang, N., Shang, Z., Quan, C. and Niu, Y. 2013. HoxB3 promotes prostate cancer cell progression by transactivating CDCA3. *Cancer Letters*, 330(2), 217–224.
10. Chiquet, B.T., Blanton, S.H., Burt, A., Ma, D., Stal, S., Mulliken, J.B. and Hecht, J.T. 2008. Variation in WNT genes is associated with non-syndromic cleft lip with or without cleft palate. *Human molecular genetics*, 17(14), 2212–2218.
11. Collins, C. A., Gnocchi, V.F., White, R.B., Boldrin, L., Perez-Ruiz, A., Relaix, F., Morgan, J.E. and Zammit, P.S. 2009. Integrated functions of Pax3 and Pax7 in the regulation of proliferation, cell size and myogenic differentiation. *PLoS one*, 4(2), e4475. Iegūts no: doi: 10.1371/journal.pone.0004475 [skatīts 14.08.2023.].
12. Dai, J., Mou, Z., Shen, S., Dong, Y., Yang, T. and Shen, S.G. 2014. Bioinformatic analysis of Msx1 and Msx2 involved in craniofacial development. *The Journal of Craniofacial Surgery*, 25(1), 129–134.

13. Dathan, N., Parlato, R., Rosica, A., De Felice, M. and Di Lauro, R. 2002. Distribution of the *tif2/foxe1* gene product is consistent with an important role in the development of foregut endoderm, palate, and hair. *Developmental Dynamics*, 224(4), 450–456.
14. Dixon, M.J., Marazita, M.L., Beaty, T.H. and Murray, J. C. 2011. Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences. *Nature reviews. Genetics*, 12(3), 167–178.
15. Everson, J.L., Fink, D.M., Yoon, J.W., Leslie, E.J., Kietzman, H.W., Ansen-Wilson, L.J., Chung, H.M., Walterhouse, D.O., Marazita, M.L. and Lipinski, R.J. 2017. Sonic Hedgehog Regulation of *Foxf2* Promotes Cranial Neural Crest Mesenchyme Proliferation and Is Disrupted in Cleft Lip Morphogenesis. *Development*, 144, 2082–2091.
16. Florescu, D., Stepan, A.E., Mărgăritescu, C., Stepan, D. and Simionescu, C.E. 2018. Proliferative Activity in Basal Cell Carcinomas. *Current health sciences journal*, 44(1), 55–60.
17. Forthofer, R.N., Lee, E.S. and Hernandez, M. 2007. Descriptive Methods. In *Biostatistics*. Elsevier, 21–69.
18. Frisdal, A. and Trainor, P.A. 2014. Development and evolution of the pharyngeal apparatus. Wiley interdisciplinary reviews. *Developmental Biology*, 3(6), 403–418.
19. Habu, M., Koyama, H., Kishida, M., Kamino, M., Iijima, M., Fuchigami, T., Tokimura, H., Ueda, M., Tokudome, M., Koriyama, C., Hirano, H., Arita, K. and Kishida, S. 2014. *Ryk* is essential for Wnt-5a-dependent invasiveness in human glioma. *Journal of biochemistry*, 156(1), 29–38.
20. Halford, M.M., Armes, J., Buchert, M., Meskenaitė, V., Grail, D., Hibbs, M.L., Wilks, A.F., Farlie, P.G., Newgreen, D.F., Hovens, C.M. and Stacker, S.A. 2000. *Ryk*-deficient mice exhibit craniofacial defects associated with perturbed Eph receptor crosstalk. *Nature Genetics*, 25(4), 414–418.
21. Hammond, N.L., Brookes, K.J. and Dixon, M. J. 2018. Ectopic Hedgehog Signaling Causes Cleft Palate and Defective Osteogenesis. *Journal of dental research*, 97(13), 1485–1493.
22. Hsu, S.M., Raine, L. and Fanger, H. 1981. The use of antiavidin antibody and avidin-biotinperoxidase complex in immunoperoxidase technics. *American Journal of Clinical Pathology*. 75(6), 816–821.
23. Hu, D., Young, N.M., Li, X., Xu, Y., Hallgrímsson, B. and Marcucio, R.S. 2015. A dynamic *Shh* expression pattern, regulated by *SHH* and *BMP* signaling, coordinates fusion of primordia in the amniote face. *Development (Cambridge, England)*, 142(3), 567–574.
24. Jajarm, H.H., Mohtasham, N., Moshaverinia, M. and Rangiani, A. 2008. Evaluation of oral mucosa epithelium in type II diabetic patients by an exfoliative cytology method. *Journal of oral science*, 50(3), 335–340.

25. Jeong, J., Cesario, J., Zhao, Y., Burns, L., Westphal, H. and Rubenstein, J.L. 2012. Cleft palate defect of *Dlx1/2*<sup>-/-</sup> mutant mice is caused by lack of vertical outgrowth in the posterior palate. *Developmental Dynamics*, 241(11), 1757–1769.
26. Jia, S., Zhou, J. and D'Souza, R. N. 2020. Pax9's dual roles in modulating Wnt signaling during murine palatogenesis. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 249(10), 1274–1284.
27. Jonker, L., Kist, R., Aw, A., Wappler, I. and Peters, H. 2004. Pax9 is required for filiform papilla development and suppresses skin-specific differentiation of the mammalian tongue epithelium. *Mechanisms of Development*, 121(11), 1313–1322.
28. Juriloff, D.M., Harris, M.J., McMahon, A.P., Carroll, T.J. and Lidral, A.C. 2006. WNT9b is the mutated gene involved in multifactorial nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in *A/WySn* mice, as confirmed by a genetic complementation test. *Birth Defects Research. Part A, Clinical and Molecular Teratology*, 76(8), 574–579.
29. Keyimu, R., Tuerdi, M. and Zhao, Z. 2021. MSX2 represses tumor stem cell phenotypes within oral squamous cell carcinomas via SOX2 degradation. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*, 246(24), 2660–2670.
30. Kerge, S., Vuorinen, J., Hurme, S., Soukka, T., Gheit, T., Tommasino, M., Syrjänen, S. and Rautava, J. 2018. Benign proliferative epithelial lesions of oral mucosa are infrequently associated with  $\alpha$ -,  $\beta$ -, or  $\gamma$  human papillomaviruses. *Laryngoscope investigative otolaryngology*, 4(1), 43–48.
31. Kim, H.T., Panza, P., Kikhi, K., Nakamichi, Y., Atzberger, A., Guenther, S., Ruppert, C., Guenther, A. and Stainier, D.Y.R. 2022. WNT/RYK signaling functions as an antiinflammatory modulator in the lung mesenchyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119(24), e2201707119. Iegüts no: doi.org/10.1073/pnas.2201707119 [skatīts: 08.08.2023.].
32. Kim, Y., Hong, M., Do, I. G., Ha, S. Y., Lee, D. and Suh, Y. L. 2015. Wnt5a, Ryk and Ror2 expression in glioblastoma subgroups. *Pathology, research and practice*, 211(12), 963–972.
33. Lan, Y., Ryan, R.C., Zhang, Z., Bullard, S.A., Bush, J.O., Maltby, K.M., Lidral, A.C. and Jiang, R. 2006. Expression of WNT9b and activation of canonical WNT signaling during midfacial morphogenesis in mice. *Developmental Dynamics*, 235(5), 1448–1454.
34. Laronda, M. M. and Jameson, J. L. 2011. Sox3 functions in a cell-autonomous manner to regulate spermatogonial differentiation in mice. *Endocrinology*, 152(4), 1606–1615.
35. Lehman J.A. Jr., Douglas B.K., Ho W.C. and Husami T.W. 1990. One-stage closure of the entire primary palate. *Plastic Reconstructive Surgery*, 86(4): 675–681.

36. Leslie, E.J., and Marazita, M.L. 2013. Genetics of cleft lip and cleft palate. *American journal of medical genetics. Part C, Seminars in medical genetics*, 163C(4), 246–258.
37. Li C., Lan Y., Krumlauf R. and Jiang R. 2017. Modulating WNT Signaling Rescue Palate Morphogenesis in Pax9 Mutant Mice. *Journal of Dental Research*, 96(11), 1273–1281.
38. Ling, Z., Long, X., Li, J. and Feng, M. 2020. Homeodomain protein DLX4 facilitates nasopharyngeal carcinoma progression via up-regulation of YB-1. *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, 25(7), 466–474.
39. Liu, J., An, H., Yuan, W., Feng, Q., Chen, L. and Ma, J. 2017. Prognostic Relevance and Function of MSX2 in Colorectal Cancer. *Journal of diabetes research*, 2017, 1–10.
40. Liu, J., Wang, Y.-Q., Niu, H.-B. and Zhang, C.-X. 2022. PAX9 functions as a tumor suppressor gene for cervical cancer via modulating cell proliferation and apoptosis. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 38(4), 357–366.
41. Macheda, M.L., Sun, W.W., Kugathasan, K., Hogan, B.M., Bower, N.I., Halford, M.M., Zhang, Y.F., Jacques, B.E., Lieschke, G.J., Dabdoub, A. and Stacker, S.A. 2012. The Wnt receptor Ryk plays a role in mammalian planar cell polarity signaling. *The Journal of biological chemistry*, 287(35), 29312–29323.
42. Millard D. R. Jr. Rotation-advancement principle in cleft lip closure. 1964. *Cleft Palate Journal*, 12: 246–252.
43. Moreno, L.M., Mansilla, M.A., Bullard, S.A., Cooper, M.E., Busch, T.D., Machida, J., Johnson, M.K., Brauer, D., Krahn, K., Daack-Hirsch, S., L'Heureux, J., Valencia-Ramirez, C., Rivera, D., López, A.M., Moreno, M.A., Hing, A., Lammer, E.J., Jones, M., Christensen, K., Lie R.T., Jugessur, A., Wilcox, A.J., Chines, P., Pugh, E., Doheny, K., Arcos-Burgos, M., Marazita, M.L., Murray, J.C. and Lidral A.C. 2009. FOXE1 association with both isolated cleft lip with or without cleft palate, and isolated cleft palate. *Human Molecular Genetics*, 18(24), 4879–4896.
44. Nakatomi, M., Ida-Yonemochi, H., Nakatomi, C., Saito, K., Kenmotsu, S., Maas, R.L. and Ohshima, H. 2018. Msx2 Prevents Stratified Squamous Epithelium Formation in the Enamel Organ. *Journal of dental research*, 97(12), 1355–1364.
45. Nie, X. 2006. Developmentally regulated expression of Msx1, Msx2 and fgfs in the developing mouse cranial base. *The Angle Orthodontist*, 76(6), 990–995.
46. Nogueira, J.M., Hawrot, K., Sharpe, C., Noble, A., Wood, W.M., Jorge, E.C., Goldhamer, D.J., Kardon, G. and Dietrich, S. 2015. The emergence of Pax7-expressing muscle stem cells during vertebrate head muscle development. *Frontiers in aging neuroscience*, 7, 62. Iegüts no: doi.org/10.3389/fnagi.2015.00062 [skatüts: 08.08.2023.].

47. Ohki, S., Oka, K., Ogata, K., Okuhara, S., Rikitake, M., Toda-Nakamura, M., Tamura, S., Ozaki, M., Iseki, S. and Sakai, T. 2020. Transforming Growth Factor-Beta and Sonic Hedgehog Signaling in Palatal Epithelium Regulate Tenascin-C Expression in Palatal Mesenchyme During Soft Palate Development. *Frontiers in physiology*, 11, 532. Iegūts no: doi.org/10.3389/fphys.2020.00532 [skatīts: 25.09.2023.].
48. Patro, J., Panda, S., Mohanty, N. and Mishra, U.S. 2021. The Potential of Light Microscopic Features of the Oral Mucosa in Predicting Post-mortem Interval. *Sultan Qaboos University medical journal*, 21(1), e34–e41. Iegūts no: doi.org/10.18295/squmj.2021.21.01.005 [skatīts: 07.08.2023.].
49. Paudel, S., Gjorcheska, S., Bump, P. and Barske, L. 2022. Patterning of cartilaginous condensations in the developing facial skeleton. *Developmental Biology*, 486, 44–55.
50. Pilmane, M., Shine, J. and Iismaa, T.P. 1998. Distribution of galanin immunoreactivity in the bronchi of humans with tuberculosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 863, 445–449.
51. Qiu, M., Chen, D., Shen, C., Shen, J., Zhao, H. and He, Y. 2017. Sex-determining region Y-box protein 3 induces epithelial-mesenchymal transition in osteosarcoma cells via transcriptional activation of Snail1. *Journal of experimental & clinical cancer research: CR*, 36(1), 46. Iegūts no: doi.org/10.1186/s13046-017-0515-3 [skatīts: 09.08.2023.].
52. Raterman, S.T., Von Den Hoff, J.W., Dijkstra, S., De Vriend, C., Te Morsche, T., Broekman, S., Zethof, J., De Vrieze, E., Wagener, F.A.D.T.G. and Metz, J.R. 2023. Disruption of the *foxe1* gene in zebrafish reveals conserved functions in development of the craniofacial skeleton and the thyroid. *Frontiers in cell and developmental biology*, 11, 1143844. Iegūts no: doi.org/10.3389/fcell.2023.1143844 [skatīts: 08.08.2023.].
53. Reyes, M., Peña-Oyarzun, D., Maturana, A. and Torres, V. A. 2019. Nuclear localization of  $\beta$ -catenin and expression of target genes are associated with increased Wnt secretion in oral dysplasia. *Oral oncology*, 94, 58–67.
54. Robin, N.H., Baty, H., Franklin, J., Guyton, F.C., Mann, J., Woolley, A.L., Waite, P.D. and Grant, J. 2006. The multidisciplinary evaluation and management of cleft lip and palate. *Southern Medical Journal*, 99(10), 1111–1120.
55. Sagai, T., Amano, T., Maeno, A., Kiyonari, H., Seo, H., Cho, S.W. and Shiroishi, T. 2017. SHH signaling directed by two oral epithelium-specific enhancers controls tooth and oral development. *Scientific reports*, 7(1), 13004. Iegūts no: doi.org/10.1038/s41598-017-12532-y [skatīts: 14.08.2023.].
56. Sakagami, N., Matsushita, Y., Syklawer-Howle, S., Kronenberg, H.M., Ono, W. and Ono, N. 2018. Msx2 Marks Spatially Restricted Populations of Mesenchymal Precursors. *Journal of dental research*, 97(11), 1260–1267.

57. Satokata, I., Ma, L., Ohshima, H., Bei, M., Woo, I., Nishizawa, K., Maeda, T., Takano, Y., Uchiyama, M., Heaney, S., Peters, H., Tang, Z., Maxson, R. and Maas, R. 2000. Msx2 deficiency in mice causes pleiotropic defects in bone growth and ectodermal organ formation. *Nature genetics*, 24(4), 391–395.
58. Seidel, C.L., Percivalle, E., Tschafitari, M., Weider, M., Strobel, K., Willershäusen, I., Unertl, C., Schmetzer, H.M., Weber, M., Schneider, M., Frey, B., Gaippl, U.S., Beckmann, M.W. and Gözl, L. 2022. Orofacial clefts lead to increased pro-inflammatory cytokine levels on neonatal oral mucosa. *Frontiers in immunology*, 13, 1044249. Iegüts no: doi.org/10.3389/fimmu.2022.1044249 [skafits: 07.08.2023.].
59. Seifi, S., Feizi, F., Moazzezi, Z., Mehdizadeh, M., and Zamani, B. 2014. Evaluation of oral mucosal epithelium in diabetic male patients by exfoliative cytology method. *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders*, 13(1), 77. Iegüts no: doi.org/10.1186/2251-6581-13-77 [skafits: 07.08.2023.].
60. Shi, B. and Losee, J.E. 2015. The impact of cleft lip and palate repair on maxillofacial growth. *International Journal of Oral Science*, 7(1), 14–17.
61. Shimomura, T., Kawakami, M., Tatsumi, K., Tanaka, T., Morita-Takemura, S., Kiritä, T. and Wanaka, A. 2019. The Role of the WNT Signaling Pathway in Upper Jaw Development of Chick Embryo. *Acta Histochemica et Cytochemica*, 52(1), 19–26.
62. Shin, J.O., Song, J., Choi, H.S., Lee, J., Lee, K., Ko, H.W. and Bok, J. 2019. Activation of sonic hedgehog signaling by a Smoothened agonist restores congenital defects in mouse models of endocrine-cerebro-osteodysplasia syndrome. *EBioMedicine*, 49, 305–317.
63. Stefanini, M., De Martino, C. and Zamboni, L. 1967. Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature*. 216 (5111), 173–174.
64. Sull, J.W., Liang, K.Y., Hetmanski, J.B., Fallin, M.D., Ingersoll, R.G., Park, J., Wu-Chou, Y.H., Chen, P.K., Chong, S.S., Cheah, F., Yeow, V., Park, B.Y., Jee, S.H., Jabs, E.W., Redett, R., Scott, A.F. and Beaty, T.H. 2009. Maternal transmission effects of the PAX genes among cleft case-parent trios from four populations. *European Journal of Human Genetics*, 17(6), 831–839.
65. Tellermann, J., Reiser, S.C. and Pilmane, M. 2019. Prevalence of Egfr, Ki-67, Nf-Kb, Ma-1 marker in cleft affected tissue of soft palate. *Papers on anthropology*, 28(1), 126–139.
66. Temple, R.M., Zhu, J., Budgeon, L., Christensen, N.D., Meyers, C. and Sample, C.E. 2014. Efficient replication of Epstein–Barr virus in stratified epithelium in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(46), 16544–16549.
67. Thomson, P.J., Soames, J.V., Booth, C. and O’Shea, J.A. 2002. Epithelial cell proliferative activity and oral cancer progression. *Cell proliferation*, 35 Suppl 1(Suppl 1), 110–120.

68. Trinh, B.Q., Barengo, N., Kim, S.B., Lee, J.S., Zweidler-McKay, P.A. and Naora H. 2015a. The homeobox gene DLX4 regulates erythro-megakaryocytic differentiation by stimulating IL-1 $\beta$  and NF- $\kappa$ B signaling. *Journal of Cell Science*, 128(16), 3055–3067.
69. Trinh, B., Ko, S.Y., Haria, D., Barengo, N. and Naora, H. 2015b. The homeoprotein DLX4 controls inducible nitric oxide synthase-mediated angiogenesis in ovarian cancer. *Molecular Cancer*, 14(1), 97. Iegüts no: doi.org/10.1186/s12943-015-0368-3 [skatīts: 08.08.2023.].
70. Watanabe, A., Akita, S., Tin, N. T. D., Natsume, N., Nakano, Y., Niikawa, N., Uchiyama, T. and Yoshiura, K.-I. 2006. A Mutation in RYK Is a Genetic Factor for Nonsyndromic Cleft Lip and Palate. *Cleft Palate Craniofacial Journal*, 43, 310–316.
71. Wehby, G.L. and Cassell, C.H. 2010. The impact of orofacial clefts on quality of life and healthcare use and costs. *Oral Diseases*, 16(1), 3–10.
72. Welsh, I.C., Hart, J., Brown, J.M., Hansen, K., Rocha Marques, M., Aho, R.J., Grishina, I., Hurtado, R., Herzlinger, D., Ferretti, E., Garcia-Garcia, M.J. and Selleri, L. 2018. Pbx loss in cranial neural crest, unlike in epithelium, results in cleft palate only and a broader midface. *Journal of Anatomy*, 233(2), 222–242.
73. Wu, Q., Zhang, L., Su, P., Lei, X., Liu, X., Wang, H., Lu, L., Bai, Y., Xiong, T., Li, D., Zhu, Z., Duan, E., Jiang, E., Feng, S., Han, M., Xu, Y., Wang, F., and Zhou, J. 2015. MSX2 mediates entry of human pluripotent stem cells into mesendoderm by simultaneously suppressing SOX2 and activating NODAL signaling. *Cell research*, 25(12), 1314–1332.
74. Xu, J., Liu, H., Lan, Y., Adam, M., Clouthier, D.E., Potter, S. and Jiang, R. 2019. Hedgehog signaling patterns the oral-aboral axis of the mandibular arch. *eLife*, 8, e40315. Iegüts no: doi.org/10.7554/eLife.40315 [skatīts: 25.09.2023.].
75. Xu, K., Qiu, C., Pei, H., Mehmood, M., Wang, H., Li, L. and Xia, Q. 2018. Homeobox B3 promotes tumor cell proliferation and invasion in glioblastoma. *Oncology Letters*. 15(3), 3712–3718.
76. Yang, D., Yan, R., Zhang, X., Zhu, Z., Wang, C., Liang, C. and Zhang, X. 2016. Dereglulation of MicroRNA-375 inhibits cancer proliferation migration and chemosensitivity in pancreatic cancer through the association of HOXB3. *American journal of translational research*, 8(3), 1551–1559.
77. Yu, Z., Liu, J., Fan, Q., Yu, J., Ren, X., and Wang, X. 2022. Extracellular Vesicle-Encapsulated MicroRNA-375 from Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Inhibits Hepatocellular Carcinoma Progression through Regulating HOXB3-Mediated Wnt/ $\beta$ -Catenin Pathway. *Analytical cellular pathology (Amsterdam)*, 2022, 1–19.
78. Yuan, X., Xu, Q., Zhang, X., Van Brunt, L.A., Ticha, P. and Helms, J.A. 2019. Wnt-Responsive Stem Cell Fates in the Oral Mucosa. *iScience*, 21, 84–94.

79. Zalc, A., Rattenbach, R., Auradé, F., Cadot, B. and Relaix, F. 2015. Pax3 and Pax7 play essential safeguard functions against environmental stress-induced birth defects. *Developmental Cell*, 33(1), 56–66.
80. Zhang, C., Basta, T., Jensen, E.D. and Klymkowsky, M.W. 2003. The beta-catenin/VegT-regulated early zygotic gene *Xnr5* is a direct target of SOX3 regulation. *Development (Cambridge, England)*, 130(23), 5609–5624.
81. Zhang, H., Xie, J., So, K.K.H., Tong, K.K., Sae-Pang, J.J., Wang, L., Tsang, S.L., Chan, W.Y., Wong, E.Y.M., and Sham, M.H. 2021. *Hoxb3* Regulates *Jag1* Expression in Pharyngeal Epithelium and Affects Interaction With Neural Crest Cells. *Frontiers in Physiology*, 11, 612230. Iegūts no: doi.org/10.3389/fphys.2020.612230 [skatīts: 14.08.2023.].
82. Zhou, J., Gao, Y., Lan, Y., Jia, S. and Jiang, R. 2013. Pax9 regulates a molecular network involving Bmp4, Fgf10, Shh signaling and the Osr2 transcription factor to control palate morphogenesis. *Development (Cambridge, England)*, 140(23), 4709–4718.
83. Zhu, S., Yang, Z., Zhang, Z., Zhang, H., Li, S., Wu, T., Chen, X., Guo, J., Wang, A., Tian, H., Yu, J., Zhang, C., Su, L., Shang, Z., Quan, C. and Niu, Y. 2023. HOXB3 drives WNT-activation associated progression in castration-resistant prostate cancer. *Cell death & disease*, 14(3), 215. Iegūts no: doi.org/10.1038/s41419-023-05742-y [skatīts: 08.08.2023.].
84. Zhu, X. J., Yuan, X., Wang, M., Fang, Y., Liu, Y., Zhang, X., Yang, X., Li, Y., Li, J., Li, F., Dai, Z. M., Qiu, M., Zhang, Z. and Zhang, Z. 2017. A Wnt/Notch/Pax7 Signaling Network Supports Tissue Integrity in Tongue Development. *The Journal of Biological Chemistry*, 292, 9409–9419.
85. Zorn, A.M., Barish, G.D., Williams, B.O., Lavender, P., Klymkowsky, M.W. and Varmus, H.E. 1999. Regulation of Wnt signaling by Sox proteins: XSox17 alpha/beta and XSox3 physically interact with beta-catenin. *Molecular cell*, 4(4), 487–498.



## Pateicības

Izsaku vislielāko pateicību sava promocijas darba vadītājai *Dr. habil. med.* profesorei Mārai Pilmanei par nenovērtējamo atbalstu, sniegtajiem padomiem un ieguldījumu šī darba tapšanas laikā.

Izsaku lielu pateicību otrai promocijas darba vadītājai *Dr. med.* profesorei Ilzei Akotai par nozīmīgo morālo atbalstu, ieguldījumu un palīdzību pētījuma materiāla ieguvē.

Pateicos par sniegto atbalstu visiem kolēģiem Rīgas Stradiņa universitātes Anatomijas un antropoloģijas institūtā. Īpašs paldies RSU AAI Morfoloģijas laboratorijas laborantei Natālijai Morozai par sniegto palīdzību un darbu preparātu tapšanā.

Vissirsnīgākais paldies manai ģimenei, īpaši sievai Marijai, manai mammai un brāļiem, par nenogurdināmo atbalstu, sapratni un pacietību.