



RĪGAS STRADIŅA
UNIVERSITĀTE

Dace Buile

ORCID 0000-0002-0962-865X

Sejas šķeltnes skartu balstaudu
morfoloģiskās pārmaiņas
audu reģenerācijas gaitā

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, 2024

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. habil. med. profesors **Jānis Vētra**,
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 Medicīnas bāzes zinātņu, tai skaitā farmācijas promocijas padomes atklātā sēdē 2024. gada 16. septembrī plkst. 13.00 attālināti, tiešsaistes platformā *Zoom*.

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

Promocijas padomes sekretāre:

Dr. med. docente **Anna Junga**

Satura rādītājs

Darbā izmantotie saīsinājumi.....	5
Ievads.....	7
Darba mērķis.....	10
Darba uzdevumi.....	10
Darba hipotēzes.....	11
Darba novitāte.....	11
1. Materiāls un metodes.....	12
1.1. Morfoloģiski pētāmais materiāls un pacientu iedalījums grupās.....	12
1.2. Morfoloģiskās metodes.....	13
1.2.1. Pētāmā audu materiāla fiksācija.....	13
1.2.2. Rutīnās histoloģijas krāsošanas metode.....	14
1.2.3. Imūnhistoķīmijas metode un reaģenti.....	14
1.2.4. TUNEL metode.....	18
1.2.5. Puskvantitatīvā skaitīšanas metode.....	19
1.2.6. Statistiskās metodes.....	19
2. Rezultāti.....	21
2.1. Morfoloģiskā atrade kontroles grupas pacientiem un pacientiem ar šķeltņi.....	21
2.2. Imūnhistoķīmiski noteikto faktoru un apoptozes atrade.....	22
2.2.1. OPN.....	22
2.2.2. OC.....	24
2.2.3. OPG.....	27
2.2.4. BMP-2/4.....	29
2.2.5. bFGF.....	31
2.2.6. TGFβ1.....	34
2.2.7. MMP-2.....	36
2.2.8. MMP-8.....	38
2.2.9. MMP-9.....	41
2.2.10. TIMP-2.....	43
2.2.11. IL-1α.....	46
2.2.12. IL-10.....	48
2.2.13. HBD-2.....	50
2.2.14. HBD-3.....	53
2.2.15. Runx2.....	55
2.2.16. Wnt3a.....	57
2.2.17. Apoptoze.....	59

2.3. Imūnhistoķīmiski noteikto marķieru savstarpējo korelāciju izvērtēšanas dati pirmo reizi un atkārtoti operēto šķeltnes pacientu kaulaudos.....	62
2.4. Imūnhistoķīmiski noteikto marķieru savstarpējo korelāciju izvērtēšanas dati pirmo reizi un atkārtoti operēto šķeltnes pacientu skrimšļaudos	62
3. Diskusija	64
Secinājumi	86
Priekšlikumi pētījumiem nākotnē	88
Publikāciju, ziņojumu un patentu saraksts par promocijas darba tēmu.....	89
Literatūras un avotu saraksts	91
Pateicības	104

Darbā izmantotie saīsinājumi

AAI	Anatomijas un antropoloģijas institūts
bFGF	Bāziskais fibroblastu augšanas faktors
BMP	Kaulu morfoģenētiskais proteīns
BMP-2/4	Kaulu morfoģenētiskais proteīns 2/4
ECM	Ekstracelulārā matrice
HBD	Cilvēka beta defensīns
HBD-2	Cilvēka beta defensīns 2
HBD-3	Cilvēka beta defensīns 3
IL-10	Interleikīns 10
IL-1 α	Interleikīns 1 alfa
IL-1 β	Interleikīns 1 beta
IL-6	Interleikīns 6
IMH	Imūnhistoķīmija
MMP	Matrices metaloproteināze
MMP-2	Matrices metaloproteināze 2
MMP-8	Matrices metaloproteināze 8
MMP-9	Matrices metaloproteināze 9
OA	Osteoartrīts
OC	Osteokalcīns
OPG	Osteoproteģerīns
OPN	Osteopontīns
RANKL	Nukleāro kapa B faktora ligands
r_s	Spīrmena (<i>Spearman</i>) rangu secības korelācijas koeficients
RSU	Rīgas Stradiņa universitāte
Runx2	Runt radniecīgais transkripcijas faktors 2
TGF β	Transformējošais augšanas faktors beta

TGF β 1	Transformējošais augšanas faktors beta 1
TIMP	Matrices metaloproteināzes audu inhibitors
TIMP-2	Matrices metaloproteināzes audu inhibitors 2
TNF- α	Tumora nekrozes faktors alfa
TUNEL	Deoksinukleotidiltransferāzes mediēta DNS 3'-galu marķēšana ar deoksiuridinfosfātu
VEGF	Vaskulārais endotēlija augšanas faktors
Wnt	Bezspārnu tipa (<i>Wingless-type</i>) MMTV integrācijas vietas proteīns
Wnt3a	Bezspārnu tipa (<i>Wingless-type</i>) MMTV integrācijas vietas proteīns 3a

Ievads

Sejas attīstība sākas 4. embrionālās nedēļas laikā, kad ap primāro mutes dobumu izveidojas un to apņem piecas sejas krokas: pieres un deguna kroka, augšžokļa pāra kroka, apakšžokļa pāra kroka (Bhat, 2020). Embriogēnēzes laikā nervu kores šūnas migrē uz orofaciālo rajonu, kur tās veicina kaulu, skriemeļu un citu sejas saistaudu veidošanos (Rezzoug et al., 2011). Iedzimtu sejas defektu kopums, kas veidojas nepilnīgas sejas kroku saaugšanas rezultātā, tiek saukts par sejas šķeltnēm, pie kurām pieder arī alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne. Sejas šķeltnes ir klīnisks defekts, kas ietekmē runas veidošanos, elpošanas funkciju caur degunu, dzirdes attīstību, ožas funkciju un estētiku (Nasreddine et al., 2021). Pasaulē sejas šķeltnes ir sastopamas vienam uz 600–800 jaundzimušo, līdz ar to tās ir vienas no biežākajām iedzimtajām kraniofaciālajām patoloģijām (Vyas et al., 2020). Latvijā vidēji piedzimst viens bērns ar šķeltni uz 700–800 jaundzimušajiem (Akota et al., 2001).

Sejas šķeltnu korekcijas notiek ķirurģiskās iejaukšanās ceļā, un parasti ir nepieciešama vairāk nekā viena operācija, lai atjaunotu normālas fizioloģiskās funkcijas, īpaši gadījumos, kad tā ir skārusi balstaudus (Ha et al., 2015).

Sejas skeleta struktūra sastāv no divu veidu audiem – skrimšļaudiem un kaulaudiem, kuru sastāvdaļas ir hondroblasti un osteoblasti, kuri veidojas no viena priekšteča (Hartmann, 2006). Sejas šķeltnu attīstību ietekmē virkne signālfaktoru, citokīnu, audu šķelējenzīmu, to inhibitoru, augšanas faktoru, gēnu proteīnu, audu proliferācijas faktoru un audu apoptoze, kuru nozīme sejas šķeltnu attīstībā pasaulē joprojām ir izpētes stadijā. Ir svarīgi saprast, kuri audu faktori un signālmolekulu regulācijas ceļi varētu ietekmēt balstaudu atjaunošanos un to veiksmīgu sadzīšanu pēc ķirurģiskās operācijas.

Mineralizācijas faktori, kā osteokalcīns (OC) un osteopontīns (OPN), un osteoklastu ģenēzes nomācējs osteoproteģerīns (OPG), atrodami kaulā un ir proteīni, kas atbild par dažādām balstaudu funkcijām. Tiem ir nozīme kaulaudu

mineralizācijas procesā, tā regulēšanā, kā arī dažādos pretiekaisuma procesos (Bai et al., 2014; Lund et al., 2009), tomēr to nozīme saistībā ar sejas šķeltnu pacientu atkārtotām operācijām nav līdz galam izpētīta.

Arvien vairāk uzmanības tiek pievērsts dažādiem augšanas faktoriem – kaulu morfoģenētiskajam proteīnam (BMP-2/4), transformējošam augšanas faktoram beta 1 (TGFβ1) un bāziskajam fibroblastu augšanas faktoram (bFGF) – saistībā ar to spēju ietekmēt brūču dzīšanas iznākumu, kā arī to nepieciešamību normālai aukslēju attīstībai (Nakajima et al., 2014; Zhou et al., 2019). Pētījumos ar pelēm tika pierādīts, ka BMP receptoru inaktivācija augšžokļa kaula mezenhīmā un mutes epitēlijā var izraisīt aukslēju un lūpas šķeltni (Li et al., 2013), tomēr ir nepieciešami papildu pētījumi par šo faktoru ietekmi uz operācijas gaitā skartiem balstaudiem.

Audu šķēlējproteīniem un to inhibitoriem ir liela nozīme audu remodelēšanā kraniofaciālās attīstības laikā (Yoon et al., 2003). Matrices metaloproteināzes (MMP), kuras iedala vairākās apakšvienībās, kā, piemēram, matrices metaloproteināze 2 (MMP-2), matrices metaloproteināze 8 (MMP-8) un matrices metaloproteināze 9 (MMP-9), šķeļ audus un ekstracelulāro matrici (ECM) (Cowan et al., 2009; Yu et al., 2019). Matrices metaloproteināžu audu inhibitoriem (TIMP) piemīt spēja inhibēt MMP aktivitāti. Izmainītas MMP un TIMP attiecības ir atrastas lūpas un aukslēju šķeltnes skartos audos (Verstappen and Von den Hoff, 2006).

Citokīni, kā interleikīns 1 alfa (IL-1α) un interleikīns 10 (IL-10), mijiedarbojoties ar audu aizsargfaktoriem – cilvēka beta defensīniem (HBD), regulē iekaisuma procesus. IL-1α darbojas kā iekaisuma mediators un palielina osteoklastu veidošanos, to diferenciaciju un aktivitāti kaulā (Ji et al., 2002). IL-10 ir citokīns, kas regulē iekaisuma reakcijas, samazinot pretiekaisuma citokīnu un hemokīnu sintēzi (Zhang et al., 2014).

HBD ir mazi katjonu peptīdi ar plaša spektra antimikrobiālu efektu, it īpaši cilvēka beta defensīns 2 (HBD-2) un cilvēka beta defensīns 3 (HBD-3), kas var veicināt kaulaudu remodelāciju, samazinot bakteriālo kontaminēšanās risku un tai sekojošu organisma imūno reakciju (Warnke et al., 2013). Šie faktori ir plaši pētīti, tomēr trūkst pētījumu, kuri kompleksi parādītu to savstarpējo mijiedarbību šķeltņu skartos audos.

Gēnu proteīni ir nepieciešami sejas struktūru morfoģenēzē, un to nozīme sejas šķeltņu attīstībā tiek pētīta. Runt radniecīgā transkripcijas faktora 2 (Runx2) gēna proteīns ir transkripcijas faktors, kas nepieciešams pareizam osteoblastu izkārtojuma (Komori, 2010). Bezspārnu tipa (*Wingless-type*) MMTV integrācijas vietas olbaltumvielas (Wnt) gēna proteīna signālceļam ir regulējoša nozīme sejas morfoģenēzē, jo tā ligandu gēnu izdala ir atrasta sejas kroku audos un tā pārmaiņas saista ar sejas šķeltņu attīstību (Jin et al., 2012).

Apoptoze jeb programmēta šūnu nāve raksturo šūnu nāves procesu. Programmētai šūnu nāvei ir nozīme aukslēju attīstībā, tomēr molekulārie mehānismi, kas kontrolē orālās peridermas apoptozi, vēl nav līdz galam izpētīti (Li et al., 2017). Liela apoptozes nozīme varētu būt ne tikai embrionālajā aukslēju veidošanās un saplūšanas procesā, bet arī postnatālajā periodā pēc šķeltnes korekcijas veiksmīgai audu saaugšanai.

Tomēr, neskatoties uz vispārējām dažādu faktoru funkcijām, pasaulē nav pētījumu par audu faktoriem/gēniem šķeltnes attīstības laikā, kas apskatītu dažādu balstaudu kompleksu faktoru pārmaiņas sejas šķeltņu skartiem pacientiem pēc pirmo reizi veiktas sejas šķeltnes balstaudu operācijas un pēc atkārtoti veiktas plānveida šķeltnes balstaudu operācijas.

Darba mērķis

Šķeltnes skartu balstaudu (skrimšļaudu un kaulaudu) dažādu audu faktoru (mineralizācijas faktoru, augšanas faktoru, remodelācijas faktoru, aizsargfaktoru, citokīnu, gēnu proteīnu un apoptozes) relatīvā daudzuma noteikšana imūnhistoķīmiski (IMH) pirmo reizi un atkārtoti operētos balstaudos.

Darba uzdevumi

1. Noteikt audu šķēlējproteīnu (MMP-2, MMP-8, MMP-9) un to inhibitoru (TIMP-2), mineralizācijas faktoru (OC, OPN), osteoklastu ģenēzes nomācēja (OPG), augšanas faktoru (TGFβ1, BMP-2/4, bFGF), citokīnu (IL-1α), audu aizsargfaktoru (HBD-2, HBD-3, IL-10), gēnu proteīnu (Runx2, Wnt3a) un apoptotisko šūnu relatīvo daudzumu un sadalījumu veselos audos – kaulaudos un skrimšļaudos.
2. Noteikt visu iepriekš minēto faktoru (MMP-2, MMP-8, MMP-9, TIMP-2, OC, OPN, OPG, TGFβ1, BMP-2/4, bFGF, IL-1α, HBD-2, HBD-3, IL-10, Runx2, Wnt3a un apoptotiskās šūnas) relatīvo daudzumu un sadalījumu pirmreizēji operētos balstaudos.
3. Noteikt visu iepriekš minēto faktoru relatīvo daudzumu un sadalījumu plānveida atkārtoti operētos balstaudos.
4. Salīdzināt un konstatēt statistiski ticamas atšķirības kontroles, pirmreizēji operēto un plānveida atkārtoti operēto pacientu balstauiem.
5. Noteikt visu iepriekš minēto faktoru savstarpējās korelācijas kontroles, pirmreizēji operēto un plānveida atkārtoti operēto pacientu balstaudos.

Darba hipotēzes

1. Audu marķieru relatīvais daudzums un sadalījums atšķiras starp sejas šķeltņu skartu pacientu un kontroles pacientu balstaudiem.
2. Kvalitatīvi atšķirīgs ir pirmreizēji operēto un plānveidā atkārtoti operēto šķeltņu pacientu balstaudu audu marķieru relatīvais daudzums un atrade.

Darba novitāte

Kaut arī pasaulē tiek veikti atsevišķi pētījumi par sejas šķeltņu veidošanos ietekmējošiem faktoriem, tomēr materiāla komplicētas ieguves, ilgstošas ieguves un arī ētisku apsvērumu dēļ trūkst datu par šķeltnes skartu balstaudu (alveolārā kaula, deguna starpsienas, lemeša) tieši primārajām morfoloģiskajām pārmaiņām un tādām audu reģenerācijas gaitā pēc dažādām šķeltņi korigējošām operācijām.

Pirmo reizi tika veikti kompleksi audu marķieru pētījumi balstaudos pirmreizēji operēto pacientu grupā un plānveidā atkārtoti operēto pacientu grupā, kā arī tika noteikts dažādu audu marķieru relatīvais daudzums un sadalījums šķeltnes skartos balstaudos, kas tika salīdzināts ar tādiem pašiem audu marķieriem veselos audos.

1. Materiāls un metodes

1.1. Morfoloģiski pētāmais materiāls un pacientu iedalījums grupās

Balstaudu materiāls morfoloģiskajiem pētījumiem tika vākts RSU Stomatoloģijas institūta Lūpu, aukslēju un sejas šķeltņu centrā laika posmā no 2003. līdz 2018. gadam. Osteoplastikas laikā tika iegūti augšžokļa alveolārā izauguma šķeltņu skartie kaulaudi. Deguna korekcijas jeb rinoplastikas laikā tika iegūti šķeltņu skarti kaulaudi no alveolārā kaula priekšējās deguna smailes vai lemeša, kā arī šķeltņu skarti hialīnie skrimšļaudi no deguna starpsienas vai deguna spārna. RSU AAI Morfoloģijas laboratorijā pētāmais materiāls tika apstrādāts rutīnās histoloģiskās un imūnhistoķīmiskās metodes veikšanai.

Pētījumā tika iekļauti 49 pacienti: 17 pacientiem bija abpusēja caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne, 31 pacientam – vienpusēja caurejoša lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltne. Vienam pacientam bija vienpusēja daļēja lūpas un aukslēju šķeltne. Kopējais kaula morfoloģiskā materiāla vienību skaits, kas tika iegūts no pacientiem, kuriem pirmo reizi tika veikta osteoplastika vai rinoplastika, bija 14. Atkārtoti operētu pacientu morfoloģiskā materiāla kaula vienību skaits bija 22. Skrimšļa morfoloģiskā materiāla skaits balstaudu operācijās, kur kā pirmo operāciju veica rinoplastiku, bija 17. Skrimšļaudu paraugi, kuri tika iegūti no rinoplastikas, kas tika veikta kā atkārtota balstaudu operācija, bija 21.

Atkarībā no balstaudu veida un operāciju secības pacienti tika dalīti četrās grupās, kā arī tika veidotas divas kontroles grupas:

1. grupa – kaula kontroles grupa, no kuras tika iegūti kaulaudi operācijās, kas nebija saistītas ar šķeltnēm.

2. grupa – skrimšļa kontroles grupa, no kuras tika iegūti skrimšļaudi operācijās, kas nebija saistītas ar šķeltnēm.

3. grupa – pacienti ar lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņi, kuriem pirmo reizi tika veikta augšžokļa kaula kaulaudu operācija.

4. grupa – pacienti ar lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņi, kuriem pirmo reizi tika veikta deguna korekcijas skrimšļaudu operācija.

5. grupa – pacienti ar lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņi ar kaulaudu paraugiem, kuriem atkārtoti tika veikta plānveida šķeltnes balstaudu operācija.

6. grupa – pacienti ar lūpas, alveolārā izauguma un aukslēju šķeltņi ar skrimšļaudu paraugiem, kuriem atkārtoti tika veikta plānveida šķeltnes balstaudu operācija.

1.2. Morfoloģiskās metodes

1.2.1. Pētāmā audu materiāla fiksācija

Audu paraugu fiksācija Stefanīni šķīdumā (Stefanini et al., 1967), kas ilga 24 stundas, tika veikta RSU Stomatoloģijas institūta Lūpu, aukslēju un sejas šķeltnu centrā uzreiz pēc rinoplastikas un osteoplastikas. Audu fiksējošā šķīduma pagatavošanai bija nepieciešami reaģenti: 150 ml pikrīnskābe, 20 g paraformaldehīds, 425 ml Sorensena buferis (pH 7,2) un 425 ml destilēts ūdens. Pēc fiksācijas pētāmais audu materiāls tika transportēts uz Rīgas Stradiņa universitātes Anatomijas un antropoloģijas institūta Morfoloģijas laboratoriju tālākai apstrādei. Fiksētais audu materiāls 24 stundas tika skalots tiroīda buferī ar 10 % saharozi. Tālāk audu materiāls tika dehidratēts ar atšķirīgas koncentrācijas spirta šķīdumiem – spirts 50°, 70°, 90°, 95° – un, visbeidzot, ar absolūto spirtu. Tad audu materiāls tika attaukots ksilolā 30 minūtes un vienu stundu izturēts parafīnā I un divas stundas parafīnā II. Parafīns ar dozatoru tika ieliets speciālās kasetēs, lai iegūtu parafīna blokus. No tiem ar pusautomātisko rotācijas mikrotomu (*Leica RM2245, Leica Biosystems Richmond Inc., Amerikas Savienotās Valstis*) izgatavoja 3 μm plānus audu griezumus. Tie pēc tam tika

pārnesti uz priekšmetstikliņiem (*HistoBond®+*, *Paul Marienfeld GmbH & Co. KG*, Vācija) un ievietoti žāvēšanai termostatā 56 °C 20–60 minūtes. Tālāk audi tika deparafinizēti ksilolā, atūdeņoti ar dažādas koncentrācijas spirtu un sagatavoti imūnhistoķīmijas un TUNEL metodēm.

1.2.2. Rutīnās histoloģijas krāsošanas metode

Kaulaudu un skrimšļaudu audu rutīnas histoloģiskā krāsošana ar hematoksilīnu un eozīnu tika veikta pārskata morfoloģiskās ainas iegūšanai (Fischer et al., 2008). Audu griezumi tika žāvēti termostatā, deparafinizēti ksilolā un atūdeņoti ar dažādas koncentrācijas spirtiem (spirts I 96° 3 minūtes; spirts II 96° 3 minūtes; spirts III 70° 3 minūtes), pēc tam tos krāsojot ar hematoksilīnu (ab143166, *Abcam*, Amerikas Savienotās Valstis) un eozīnu (kods 05-B10003, *Eosin Y alcoholic solution, Bio Optica Milano S.p.A.*, Itālija). Pēc tam audi vēlreiz tika skaloti tekošā ūdenī, dehidratēti ar augošas koncentrācijas spirta šķīdumu (spirts 70° – 3 minūtes, spirts 96° – 3 minūtes un spirts 96° vēl 3 minūtes) un pārklāti ar karboksilolu un ksilolu. Tālāk tika uzpilināta histoloģiskā līme (kods-H875.2; *Carl Roth GmbH + Co*, Vācija) un mikropreparāti tika apsegti ar priekšmetstikliņu. Gatavie nokrāsotie preparāti tika analizēti ar gaismas mikroskopu (*Leica DM500RB, Leica Biosystems Richmond Inc.*, Amerikas Savienotās Valstis).

1.2.3. Imūnhistoķīmijas metode un reaģenti

Izmantojot biotīna un streptavidīna imūnhistoķīmisko metodi (Hsu et al., 1981), kaulaudos un skrimšļaudos tika noteikti:

- **matrices metaloproteināze 2** (MMP-2, kods orb101049, iegūts no truša, poliklonāla, darba atšķaidījums 1:400, *Biorbyt*, Amerikas Savienotās Valstis);

- **matrices metaloproteināze 8** (MMP-8, kods orb18114, iegūts no truša, poliklonāla, darba atšķaidījums 1:100, *Biorbyt*, Amerikas Savienotās Valstis);
- **matrices metaloproteināze 9** (MMP-9, kods orb18114, iegūts no truša, monoklonāla, EP1254, darba atšķaidījums 1:100, *Biorbyt*, Amerikas Savienotās Valstis);
- **matrices metaloproteināzes 2 audu inhibitors** (TIMP-2, kods orb18114, iegūts no truša, monoklonāla, 3A4, darba atšķaidījums 1:100, *Biorbyt*, Amerikas Savienotās Valstis);
- **kaula morfoģenētiskais proteīns 2/4** (BMP-2/4, kods AF355, iegūts no kazas, poliklonāla, darba atšķaidījums 1:100, *R&D Systems*, Vācija);
- **bāziskais fibroblastu augšanas faktors** (bFGF, kods ab16828, iegūts no truša, poliklonāla, darba atšķaidījums 1:200, *Abcam*, Lielbritānija);
- **transformējošais augšanas faktors beta 1** (TGFβ1, kods orb7087, iegūts no truša, poliklonāla, darba atšķaidījums 1:200, *Biorbyt*, Amerikas Savienotās Valstis);
- **interleikīns 1 alfa** (IL-1α, kods orb308787, iegūts no peles, poliklonāla, darba atšķaidījums 1:100, *Biorbyt*, Amerikas Savienotās Valstis);
- **interleikīns 10** (IL-10, kods orb100193, iegūts no truša, poliklonāla, darba atšķaidījums 1:600, *Biorbyt*, Amerikas Savienotās Valstis);
- **cilvēka beta defensīns 2** (HBD-2, kods sc-20789, iegūts no truša, poliklonāla, darba atšķaidījums 1:100, *Biorbyt*, Amerikas Savienotās Valstis);
- **cilvēka beta defensīns 3** (HBD-3, kods orb183268, iegūts no truša, poliklonāla, darba atšķaidījums 1:100, *Biorbyt*, Amerikas Savienotās Valstis);

- **osteopontīns** (OPN, kods orb11191, iegūts no truša, poliklonāla, darba atšķaidījums 1:100, *Biorbyt*, Amerikas Savienotās Valstis);
- **osteoprotegerīns** (OPG, kods orb11189, iegūts no truša, poliklonāla, darba atšķaidījums 1:100, *The Orbit*, Amerikas Savienotās Valstis);
- **osteokalcīns** (OC, kods orb259644, iegūts no truša, poliklonāla, darba atšķaidījums 1:100, *Biorbyt*, Amerikas Savienotās Valstis);
- **runt radniecīgais transkripcijas faktors 2** (Runx2, kods ab192256, iegūts no truša, monoklonāla, ERP14334, darba atšķaidījums 1:250, *Abcam*, Lielbritānija);
- **bezpārnu tipa MMTV integrācijas saites 3a olbaltumviela** (Wnt3a, kods ab1992, iegūts no truša, poliklonāla, darba atšķaidījums 1:800, *Abcam*, Lielbritānija).

Audu griezumi divas reizes tika deparafinizēti ksilolā (ksilols I – 5 minūtes; ksilols II – 5 minūtes) un dehidratēti ar dažādas koncentrācijas spirtiem (spirts 96° – 3 minūtes, spirts 96° – 3 minūtes, spirts 70° – 3 minūtes). Tālāk audus divas reizes pa 5 minūtēm skaloja ar TRIS bufera šķīdumu (kods 15-M106, *Bio-Optica*, Itālija) un arī divas reizes pa 5 minūtēm mikroviļņu krāsnī vārīja EDTA buferī (kods T0103, *Diapath*, Itālija). Tālāk 10 minūtes audu paraugi tika apstrādāti ar 3 % peroksīdu, lai bloķētu endogēno perkosidāzi, un divas reizes pa 5 minūtēm skaloti ar TRIS bufera šķīdumu. Pēc tam audi vienu stundu tika inkubēti ar primārām antivielām. Informācija par visām imūnhistoķīmijā lietotajām antivielām apkopota 2.8. tabulā. Visu antivielu atšķaidīšanai tika izmantots *Antobody Diluent* (kods ab6422, *Abcam*, Amerikas Savienotās Valstis).

Peles un truša izcelsmes antivielām tika izmantota *HiDef Detection™ HRP Polymer* (kods 954D-30, *Cell Marque™*, Amerikas Savienotās Valstis) sistēma. Pēc primāro antivielu inkubācijas un skalošanas TRIS buferī trīs reizes pa 5 minūtēm tika pielietots *HiDef Detection™* reakcijas amplifikators

(kods 954D-31, *Cell MarqueTM*, Amerikas Savienotās Valstis) 10 minūtes. Tālāk preparāti atkārtoti tika skaloti TRIS buferī trīs reizes pa 5 minūtēm un uz 10 minūtēm tika uzklāts *HiDef DetectionTM HRP* polimēra iezīmētājs (kods 954D-32, *Cell MarqueTM*, Amerikas Savienotās Valstis). Visbeidzot paraugus atkārtoti skaloja TRIS buferī 3 reizes pa 5 minūtēm, pārklāja ar *DAB Substrate Kit* hromogēno sistēmu (kods 957D-60, *Cell MarqueTM*, Amerikas Savienotās Valstis) un inkubēja uz 10 minūtēm, lai vizualizētu pozitīvās struktūras brūnā krāsā.

BMP-2/4 antivielai, kura tika iegūta no kazas, tika izmantota *ImmunoCruzTM ABC* (kods sc-2023, *Santa Cruz Biotechnology, Inc.*, Amerikas Savienotās Valstis) krāsošanas sistēma. Te līdz vienai stundai istabas temperatūrā mikropreparāti tika inkubēti ar 1,5 % bloķēšanas serumu TRIS bufera šķīdumā. Tad preparāti tika inkubēti ar primāro antivielu vienu stundu istabas temperatūrā un atkārtoti skaloti ar TRIS mazgāšanas buferi trīs reizes pa 5 minūtēm. Tālāk tie tika inkubēti ar biotīnu saturošu sekundāro antivielu (biotinizētu kazas imunoglobulīnu) uz 30 minūtēm un skaloti TRIS bufera šķīdumā trīs reizes pa 5 minūtēm. Pēc tam tika pievienots avidīna un biotīna mārurtku peroksidāzes komplekss un veikta preparātu inkubācija istabas temperatūrā 30 minūtes un skalošana ar TRIS bufera šķīdumu trīs reizes pa 5 minūtēm. Visbeidzot audu preparāti tika pārklāti ar *DAB Substrate Kit* hromogēno sistēmu un inkubēti uz 10 minūtēm, lai vizualizētu pozitīvās struktūras brūnā krāsā.

Pēc inkubācijas ar hromogēnu tika veikta audu paraugu skalošana tekošā ūdenī un kontrastkrāsošana ar šūnu kodolu krāsvielu – hematoksilīnu (kods 05- M06002, *Mayer's Hematoxylin, Bio Optica Milano S.p.A.*, Itālija). Pēc tam mikropreparāti tika skaloti destilētā ūdenī un dehidratēti augošas koncentrācijas spirtos, dzidrināti ksilolā un pārklāti ar histoloģisko līmi un segstikliņu. Audu griezumiem tika izgatavota arī negatīvā kontrole, kur primārā antivielas aizstāta ar *Antibody Diluent*, kā arī pozitīvā kontrole ar audiem, kuros vienmēr ir uzrādīta

pozitīva reakcija. Gatavie preparāti tika analizēti ar gaismas mikroskopu (*Leica DM500RB, Leica Biosystems Richmond Inc., Amerikas Savienotās Valstis*), apstrādāti ar programmu *Image Pro Plus* un fotografēti ar digitālo kameru (*Leica DC 300F, Leica Microsystem AG, Vācija*).

1.2.4. TUNEL metode

Apoptoze jeb programmēta šūnu nāve audos tika noteikta ar deoksinukleotidiltransferāzes dUTP iezīmētā gala marķēšanu jeb TUNEL metodi, kuru 1996. gadā aprakstīja *Negoescu* (Negoescu et al., 1996). Apoptozes izvērtēšanai tika lietots TUNEL kita standartizēts komplekts (kods 13799800, 1:10, *In Situ Cell Death Detection Kit, Roche Diagnostics, Vācija*). No sākuma audu preparātus deparafinizēja ar ksilolu un dilstošas etanola koncentrācijas šķīdumiem (99 % etanols, 95 % etanols un 70 % etanols). Tad aptuveni 10 minūtes skaloja destilētā ūdenī un TRIS šķīdumā. Tālāk 10 minūtes ar 3 % ūdeņraža peroksīdu tika bloķēta endogēnā peroksidāze un audu preparāti tika skaloti TRIS šķīdumā trīs reizes pa 5 minūtēm. Pēc tam audu preparātus ielika EDTA buferšķīdumā 10 minūtes un ievietoja uz 5 minūtēm mikroviļņu krāsnī, pēc tam atdzesēja līdz istabas temperatūrai, lai atkārtoti skalotu TRIS šķīdumā un ievietotu 0,1 % govu seruma albumīna fosfāta buferšķīdumā. Tad audu preparātus inkubēja ar TUNEL *mix* (*TUNEL Enzyme solution*) uz vienu stundu 37 °C temperatūrā. Pēc tam tie atkal tika skaloti TRIS bufera šķīdumā un divas reizes pa 5 minūtēm inkubēti ar mērutku peroksidāzes reaģentu (*Converte-POD solution*) 30 minūtes 37 °C temperatūrā. Tālāk paraugi tika skaloti TRIS buferī un uz septiņām minūtēm pārklāti ar *DAB* (diaminobenzidīna hromogēnu) šķīdumu peroksidāzes noteikšanai un atkārtoti noskaloti ar destilētu ūdeni. Nākamajā etapā veica kontrastkrāsošanu ar hematoksilīnu, iestrādāja polistirolu un apklāja ar segstikliņu. Gatavie audu preparāti tāpat tika analizēti ar gaismas mikroskopu (*Leica DM500RB, Leica Biosystems Richmond Inc., Amerikas*

Savienotās Valstis), apstrādāti ar programmu *Image Pro Plus* un fotografēti ar digitālo kameru (*Leica DC 300F*, *Leica Microsystem AG*, Vācija).

1.2.5. Puskvantitatīvā skaitīšanas metode

Imūnhistoķīmiski pozitīvo osteocītu un hondrocītu relatīvais daudzums tika izvērtēts atbilstoši puskvantitatīvai skaitīšanas metodei (Pilmāne et al., 1998):

- 0 – redzes laukā netika konstatēta neviena pozitīva struktūra;
- 0/+ – redzes laukā retas pozitīvas struktūras;
- + – redzes laukā maz pozitīvu struktūru;
- +/+ – redzes laukā maz līdz vidēji daudz pozitīvu struktūru;
- ++ – redzes laukā vidēji daudz pozitīvu struktūru;
- ++/+++ – redzes laukā vidēji daudz līdz daudz pozitīvu struktūru;
- +++ – redzes laukā daudz pozitīvu struktūru;
- +++/++++ – redzes laukā daudz līdz ļoti daudz pozitīvu struktūru;
- ++++ – redzes laukā ļoti daudz pozitīvu struktūru.

Pozitīvo struktūru relatīvais daudzums tika analizēts piecos nejauši izvēlētos redzes laukos katram audu griezuma preparātam. Pozitīvo struktūru turpmākai analīzei tika lietots vidējais pozitīvo struktūru daudzums.

1.2.6. Statistiskās metodes

Visu pētījuma datu statistiskā analīze tika veikta ar *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) 23. versiju (*IBM Corporations*, Amerikas Savienotās Valstis). Pētījuma datu apstrādei izmantotas aprakstošās statistiskās metodes. Pētījumā tika izmantoti neparametriskie testi, jo datu izlase neatbilda normālsadalījumam. Atšķirības starp kontroles un pētījuma grupu datiem tika analizētas ar Manna–Vitnija (*Mann–Whitney*) U testu (Riffenburgh, 2012a). Mainīgo lielumu savstarpējās sakarības izvērtēšanai tika izmantots Spīrmena (*Spearman*) rangu secības korelācijas koeficients (r_s), kuru iegūst no rangu pāru

starpības attiecības pret novērojumu skaitu (Riffenburgh, 2012b). Datu statistiskai apstrādei puskvantitatīvās metodes rezultāti tika pārveidoti par skaitliskām vērtībām. Datu pārveidošanas shēma aprakstīta 2.10. tabulā. Iegūtās korelācijas tika sarindotas šādi: 0–0,350 tika vērtēta kā vāja korelācija, 0,351– 0,700 – kā vidēji cieša, 0,701–1 – kā cieša. Rezultāti tika uzskatīti par statistiski nozīmīgiem, ja p vērtība bija $< 0,05$ (Andrade, 2019).

2. Rezultāti

2.1. Morfoloģiskā atrade kontroles grupas pacientiem un pacientiem ar šķeltņi

Rutinās histoloģijas atrade

Rutinā histoloģiskā analīze tika veikta kaulaudos, izvērtējot kaula krāsojuma izmaiņas, osteonus un caururbējkanālu caurejamību. Skrimšļaudi tika izvērtēti pēc skrimšļa plēves, šūnu zonām un pamatvielas krāsojuma.

Kaulaudu kontroles grupas pacientiem kaula morfoloģiskā uzbūve atbilda vispārīgai normai. Osteocīti tika vizualizēti ar saglabātu osteonu daudzumu, un caururbējkanālos netika novērota izteikta saistaudu proliferācija.

Skrimšļaudu kontroles grupas pacientiem skrimšļa morfoloģiskā uzbūve atbilda vispārīgai normai. Visos gadījumos tika skaidri izdalītas skrimšļa zonas, kā arī lielākajai daļai pacientu bija izteiktāka skrimšļa augšanas zona ar lielāku hondrocītu daudzumu, kamēr nobriedušo šūnu zonā hondrocītu skaits bija mazāks. Pārsvārā starpteritorija starp hondrocītu izogēno šūnu grupām nokrāsojās homogēni.

Šķeltnes skartu pacientu kaulaudos tika novēroti dažādu izmēru osteoni, to caururbējkanāli bija pildīti ar saistaudiem, kā arī kaulaudu plātnītes bija neviendabīga krāsojuma un neregulāra izmēra.

Šķeltnes skartu pacientu skrimšļaudos tika novērotas visas skrimšļa zonas. Lielākajai daļai pacientu izteiktāka bija nobriedušo šūnu zona, kur hondrocīti bija novietoti izogēno šūnu grupās, pārsvārā pa 2–4 šūnām grupā. Kopumā lielākā daļa skrimšļa paraugu vizuāli atbilda vispārpieņemtajai normai.

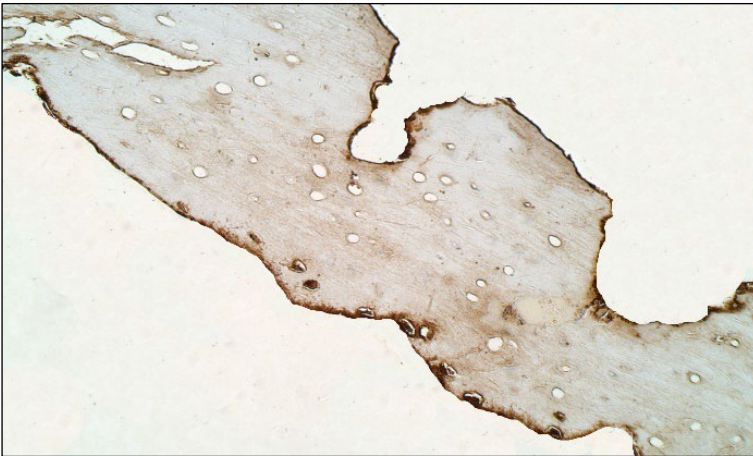
2.2. Imūnhistoķīmiski noteikto faktoru un apoptozes atrade

2.2.1. OPN

OPN netika novērots visos kontroles grupas pacientu kaulaudos. Kopumā kontroles grupas kaulaudos tika novēroti reti (0/+) OPN pozitīvie osteocīti.

OPN saturoši osteocīti tika novēroti visos pirmo reizi operēto šķeltnes pacientu kaulaudos. To daudzums variēja no reti (0/+) līdz vidēji daudz līdz daudz (++/+++). Kopumā pirmo reizi operēto šķeltnes pacientu kaulaudos OPN pozitīvie osteocīti tika novēroti maz (+) (skatīt 2.1. attēlu).

OPN tika novērots visos plānveidā atkārtoti operēto šķeltnes pacientu kaulaudos. To daudzums variēja no reti (0/+) līdz daudz (+++). Kopumā plānveidā atkārtoti operēto šķeltnes balstaudu pacientu kaulaudos OPN pozitīvo osteocītu bija maz (+).



2.1. attēls. **Reti (0/+) OPN pozitīvi osteocīti 8 gadus un 5 mēnešus veca pirmo reizi operēta šķeltnes skarta pacienta kaulaudos**
OPN IMH, $\times 200$

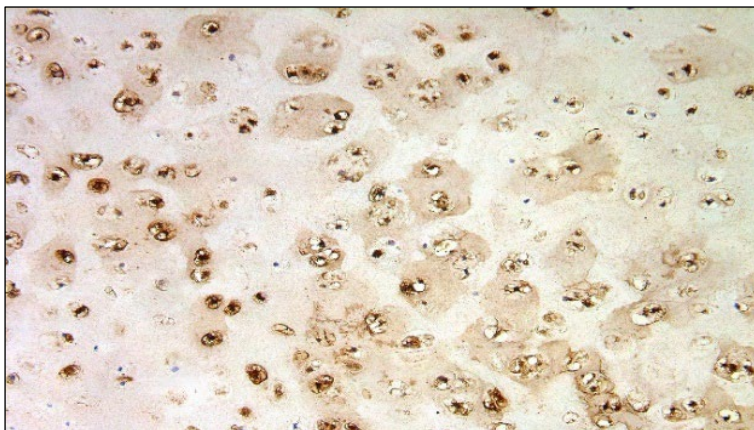
Statistikas dati. Šī faktora gadījumā netika konstatēta statistiski nozīmīga atšķirība starp pirmo reizi operētiem šķeltnes pacientu kaulaudiem un atkārtoti

operētiem šķeltņiem pacientu kaulaudiem. **Statistiski nozīmīga atšķirība tika konstatēta gan starp kontroles grupu un pirmo reizi operēto šķeltņiem pacientu grupu** ($U = 21,00$; $p = 0,028$), **gan starp atkārtoti operēto šķeltņiem pacientu grupu un kontroles grupu** ($U = 34,50$; $p = 0,025$). Tas nozīmēja, ka šķeltņiem skartu pacientu kaulaudos gan pēc pirmās, gan atkārtotās balstaudu operācijas bija ievērojami vairāk OPN pozitīvu osteocītu nekā kontroles grupā.

OPN klātbūtne bija novērota visos kontroles grupas pacientu skrimšļaudos. Pozitīvo hondrocītu daudzums variēja no maz (+) līdz daudz līdz ļoti daudz (+++/++++). Kopumā kontroles grupas skrimšļaudos OPN pozitīvos hondrocītus novēroja vidēji daudz (++).

OPN tika novērots visos pirmo reizi operēto šķeltņu pacientu skrimšļaudos. Tā rezultāti variēja no vidēji daudz (++) līdz ļoti daudz (++++). Kopumā pirmo reizi operētajos skrimšļaudos OPN pozitīvie hondrocīti tika novēroti daudz līdz ļoti daudz (+++/++++) (skatīt 2.2. attēlu).

OPN klātbūtne tika novērota visos atkārtoti operēto šķeltņu pacientu skrimšļaudos. OPN pozitīvu hondrocītu daudzums variēja no vidēji daudz (++) līdz ļoti daudz (++++). Kopumā atkārtoti operēto šķeltņu pacientu skrimšļaudos OPN pozitīvus hondrocītus novēroja daudz (+++).



2.2. attēls. **Daudz līdz ļoti daudz (+++/++++) OPN pozitīvu hondrocītu 12 gadu un 8 mēnešus veca šķēltnes skarta pirmo reizi operēta pacienta skrimšļaudos**
OPN IMH, $\times 400$

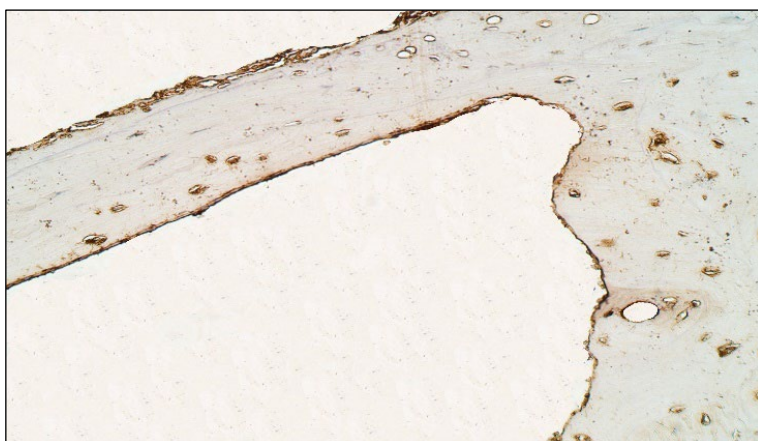
Statistikas dati. OPN gadījumā statistiski nozīmīga atšķirība starp pirmo reizi operētiem šķēltnes pacientu skrimšļaudiem un atkārtoti operētiem šķēltnes pacientu skrimšļaudiem netika konstatēta. **Statistiski nozīmīga atšķirība tika konstatēta gan starp kontroles grupu un pirmo reizi operēto šķēltnes pacientu grupu ($U = 22,50$; $p < 0,001$), gan starp atkārtoti operēto šķēltnes pacientu grupu un kontroles grupu ($U = 25,50$; $p < 0,001$).** Tas nozīmēja, ka šķēltnes skartu pacientu skrimšļaudos gan pēc pirmās, gan atkārtotās balstaudu operācijas bija ievērojami vairāk OPN pozitīvu hondrocītu nekā kontroles grupā.

2.2.2. OC

OC novēroja visos kontroles grupas pacientu kaulaudos. Tā rezultāti variēja no vidēji daudz līdz daudz (++/+++), līdz ļoti daudz (++++). OC pozitīvu osteocītu redzes laukā. Kopumā kontroles grupas pacientu kaulaudos OC pozitīvie osteocīti tika novēroti daudz (+++).

OC klātbūtne tika konstatēta visos pirmo reizi operēto šķeltnes pacientu kaulaudos. Tā variēja robežās no reti (0/+) līdz vidēji daudz līdz daudz (+++/+++)
(skatīt 2.3. attēlu). Kopumā pirmo reizi operēto šķeltnes pacientu kaulaudos OC pozitīvie osteocīti tika novēroti maz līdz vidēji daudz (+/++).

OC tika konstatēts visos atkārtoti operēto šķeltnes pacientu kaulaudos. Tā klātbūtne variēja no reti (0/+) līdz daudz (+++). Kopumā atkārtoti operēto šķeltnes pacientu kaulaudos OC pozitīvie osteocīti tika konstatēti maz līdz vidēji daudz līdz vidēji daudz (+/++ līdz ++).



2.3. attēls. **Maz līdz vidēji daudz (+/++) OC pozitīvu osteocītu 14 gadu un 5 mēnešus veca pirmo reizi operēta šķeltnes skarta pacienta kaulaudos**
OC IMH, × 200

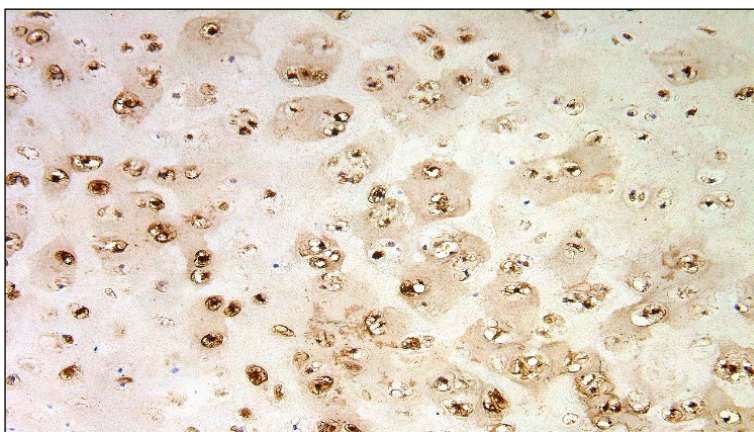
Statistikas dati. Statistiski nozīmīga atšķirība OC pozitīvu osteocītu relatīvajā daudzumā starp pirmo reizi operētiem šķeltnes pacientu kaulaudiem un atkārtoti operētiem šķeltnes pacientu kaulaudiem netika konstatēta. Tomēr iezīmējās statistiski nozīmīga atšķirība starp kontroles grupu un abām šķeltnes skartu pacientu grupām, kur **šķeltnes skartos kaulaudos pēc pirmās operācijas**

($U = 1,00$; $p < 0,001$) un atkārtotās operācijas ($U = 14,00$; $p = 0,001$) konstatēja mazāku OC pozitīvo osteocītu daudzumu, salīdzinot ar kontroles grupu.

OC konstatēja visos kontroles grupas pacientu skrimšļaudos. Tā daudzums variēja no vidēji daudz (++) līdz daudz līdz ļoti daudz (+++/++++). Kopumā kontroles grupas skrimšļaudos OC pozitīvie hondrocīti tika konstatēti daudz (+++).

OC tika konstatēts visos pirmo reizi operēto pacientu skrimšļaudos. Tas variēja no vidēji daudz (++) līdz ļoti daudz (++++) (skatīt 2.4. attēlu). Kopumā pirmo reizi operēto pacientu skrimšļaudos OC pozitīvus hondrocītus novēroja daudz (+++).

OC tika konstatēts visos atkārtoti operēto šķeltņu pacientu skrimšļaudos. Tas variēja no vidēji daudz (++) līdz ļoti daudz (++++). Kopumā atkārtoti operēto šķeltņu pacientu skrimšļaudos OC pozitīvie hondrocīti tika konstatēti daudz (+++).



2.4. attēls. Vidēji daudz līdz daudz (++) OC pozitīvu hondrocītu 8 gadus un 3 mēnešus veca šķeltnes skarta pirmo reizi operēta pacienta skrimšļaudos
OC IMH, $\times 200$

Statistikas dati. Izvērtējot imūnhistoķīmiski noteiktos OC pozitīvo hondrocītu relatīvā daudzuma vidējos rangus, statistiski ticama atšķirība starp pētījuma un kontroles grupām netika novērota.

2.2.3. OPG

OPG klātbūtne tika konstatēta visos kontroles grupas pacientu kaulaudos. OPG daudzums osteocītos variēja no retiem (0/+) līdz daudz (+++). Kopumā kontroles grupas pacientu kaulaudos tika konstatēti reti (0/+) OPG pozitīvi osteocīti.

OPG pozitīvie osteocīti tika novēroti visos pirmo reizi operēto šķeltnes pacientu kaulaudos. OPG saturošo osteocītu daudzums redzes laukā variēja no retiem (0/+) līdz daudz (+++) (skatīt 2.5. attēlu). Kopumā pirmo reizi operēto šķeltnes pacientu kaulaudos OPG pozitīvie osteocīti tika novēroti maz (+).

OPG klātbūtne tika novērota visos atkārtoti operēto šķeltnes pacientu kaulaudos. Tā rezultāti variēja no reti (0/+) līdz daudz (+++). Kopumā plānveidā atkārtoti operēto šķeltnes pacientu kaulaudos OPG pozitīvie osteocīti tika novēroti maz (+).



2.5. attēls. Vidēji daudz (++) OPG pozitīvu osteocītu 8 gadus un 1 mēneša veca pirmo reizi operēta šķeltnes skarta pacienta kaulaudos
OPG IMH, × 200

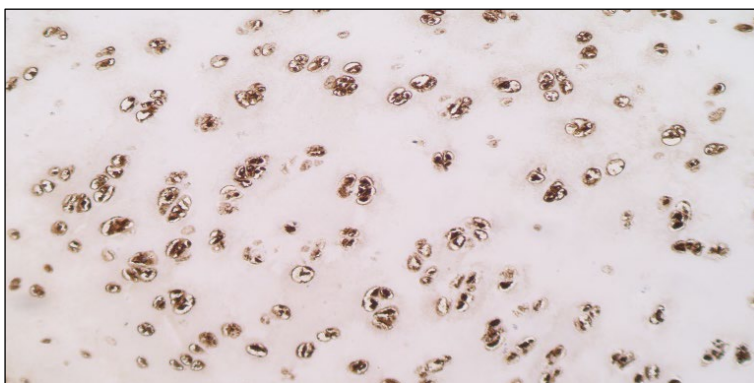
Statistikas dati. Statistiski nozīmīga atšķirība starp OPG pozitīviem osteocītiem pirmo reizi operētos šķeltnes pacientu kaulaudos un atkārtoti operētos

šķēlnes pacientu kaulaudos netika konstatēta. Tāpat arī netika atrasta statistiski nozīmīga atšķirība starp kontroles grupu un šķēlnes skartu pacientu grupām.

OPG klātbūtne tika novērota visos kontroles grupas pacientu skrimšļaudos. Tā variēja no vidēji daudz līdz daudz (++/+++) līdz ļoti daudz (++++). Kopumā kontroles grupas skrimšļaudos OPG pozitīvie hondrocīti tika novēroti daudz līdz ļoti daudz (+++/+).

OPG klātbūtne tika novērota visos pirmo reizi operēto pacientu skrimšļaudos. Tā daudzums variēja no maz (+) līdz ļoti daudz (++++) (skatīt 2.6. attēlu). Kopumā pirmo reizi operēto pacientu skrimšļaudos OPG pozitīvie hondrocīti tika novēroti daudz (+++).

OPG klātbūtne tika novērota visos atkārtoti operēto šķēlnu pacientu skrimšļaudos. Tā daudzums variēja no maz (+) līdz ļoti daudz (++++). Kopumā atkārtoti operēto šķēlnu pacientu skrimšļaudos OPG pozitīvie hondrocīti tika novēroti daudz (+++).



2.6. attēls. Daudz līdz ļoti daudz (+++/+) OPG pozitīvu hondrocītu
7 gadus un 7 mēnešus veca šķēlnes skarta pirmo reizi operēta
pacienta skrimšļaudos
OPG IMH, × 200

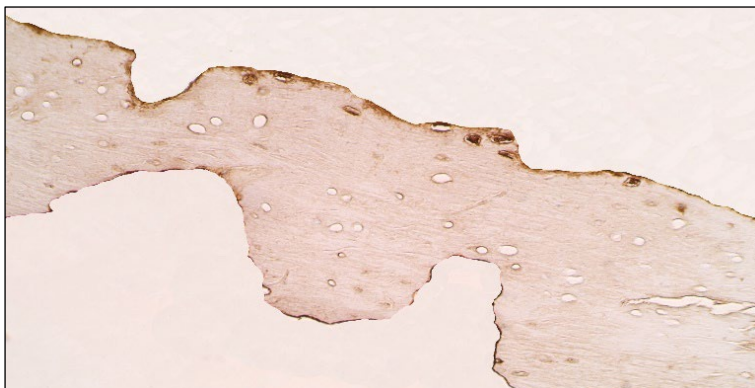
Statistikas dati. Tika konstatēts, ka vidējais imūnhistoķīmiski noteikto OPG pozitīvo hondrocītu relatīvais daudzums skrimšļaudos statistiski ticami neatšķīrās starp pētījuma un kontroles grupām.

2.2.4. BMP-2/4

BMP-2/4 klātbūtne tika novērota visos kontroles grupas pacientu kaulaudos. Tā variēja no maz (+) līdz vidēji daudz līdz daudz (++/+++). Kopumā kontroles grupas kaulaudos BMP-2/4 pozitīvi osteocīti tika novēroti maz līdz vidēji daudz (+/+++).

BMP-2/4 pozitīvie osteocīti tika novēroti visos pirmo reizi operēto šķeltnes pacientu kaulaudos. BMP-2/4 saturošo osteocītu daudzums redzes laukā variēja no reti (0/+) līdz vidēji daudz (++) (skatīt 2.7. attēlu). Kopumā pirmo reizi operēto šķeltnes pacientu kaulaudos BMP-2/4 pozitīvie osteocīti tika novēroti reti līdz maz (0/+ līdz +).

BMP-2/4 klātbūtne tika novērota visos atkārtoti operēto šķeltnes pacientu kaulaudos. BMP-2/4 pozitīvo osteocītu daudzums variēja no reti (0/+) līdz daudz (+++). Kopumā atkārtoti operēto šķeltnes pacientu kaulaudos BMP-2/4 pozitīvie osteocīti tika konstatēti maz līdz maz līdz vidēji daudz (+ līdz +/+++).



2.7. attēls. Reti (0/+) BMP-2/4 pozitīvi osteocīti 8 gadus un 11 mēnešu veca pirmo reizi operēta šķeltnes skarta pacienta kaulaudos
BMP-2/4 IMH, $\times 200$

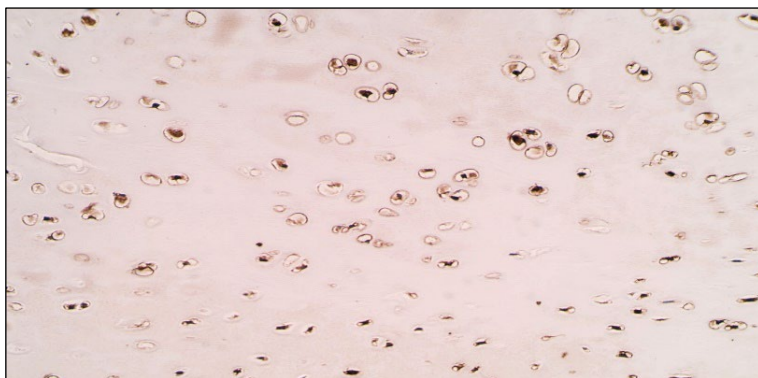
Statistikas dati. Šī faktora gadījumā netika konstatēta statistiski nozīmīga atšķirība starp pirmo reizi un atkārtoti operētiem šķeltnes pacientu kaulaudiem. Ar Manna–Vitnija U testu tika konstatēta **statistiski nozīmīga atšķirība starp kontroles grupu un pirmo reizi operēto šķeltnes pacientu grupu** ($U = 22,00$; $p = 0,036$), kur šķeltnes pacientiem tika novērots mazāks daudzums BMP-2/4 pozitīvu osteocītu nekā kontroles grupai.

BMP-2/4 klātbūtne tika konstatēta visos kontroles grupas pacientu skrimšļaudos. Tā rezultāti variēja no maz līdz vidēji daudz (+/++) līdz daudz (+++). Kopumā kontroles grupas skrimšļaudos BMP-2/4 pozitīvie hondrocīti tika novēroti vidēji daudz (++).

BMP-2/4 konstatēja visos pirmo reizi operēto pacientu skrimšļaudos. Tas variēja no maz līdz vidēji daudz (+/++) līdz ļoti daudz (++++) (skatīt 2.8. attēlu). Kopumā pirmo reizi operēto pacientu skrimšļaudos BMP-2/4 pozitīvo hondrocītu bija daudz (+++).

BMP-2/4 klātbūtne tika konstatēta visos atkārtoti operēto šķeltņu pacientu skrimšļaudos. Tā rezultāti variēja no maz (+) līdz ļoti daudz (++++). Kopumā

atkārtoti operēto šķeltņu pacientu skrimšļaudos BMP-2/4 pozitīvos hondrocītus konstatēja daudz (+++).



2.8. attēls. Vidēji daudz (++) BMP-2/4 pozitīvu hondrocītu 11 gadu un 9 mēnešus veca šķeltnes skarta pirmo reizi operēta pacienta skrimšļaudos
BMP-2/4 IMH, $\times 200$

Statistikas dati. Tika atklāta **statistiski nozīmīga atšķirība starp kontroles grupu un atkārtoti operēto šķeltnes pacientu skrimšļaudu grupu**. Tas nozīmē, ka BMP-2/4 pozitīvie hondrocīti bija pārliecinošā vairākumā atkārtoti operēto šķeltnes pacientu skrimšļaudos ($U = 60,50$; $p = 0,025$), salīdzinot ar kontroles grupu. Statistiski nozīmīga atšķirība starp pārējām grupām ar Manna–Vitnija U testu netika konstatēta.

2.2.5. bFGF

bFGF tika konstatēts visos kontroles grupas pacientu kaulaudos. Tā daudzums osteocītos variēja no maz (+) līdz daudz (+++). Kopumā kontroles grupas kaulaudos bFGF pozitīvie osteocīti tika novēroti maz (+).

bFGF tika konstatēts visos pirmo reizi operēto šķeltnes pacientu kaulaudos. Tā klātbūtne variēja robežās no reti (0/+) līdz vidēji daudz (++)

Kopumā pirmo reizi operēto šķeltnes pacientu kaulaudos bFGF pozitīvie osteocīti tika novēroti reti (0/+) (skatīt 2.9. attēlu).

bFGF klātbūtne tika konstatēta visos atkārtoti operēto šķeltnes pacientu kaulaudos. Tā klātbūtne variēja no reti (0/+) līdz daudz (+++). Kopumā plānveidā atkārtoti operēto šķeltnes balstaudu pacientu kaulaudos bFGF pozitīvie osteocīti bija reti (0/+).



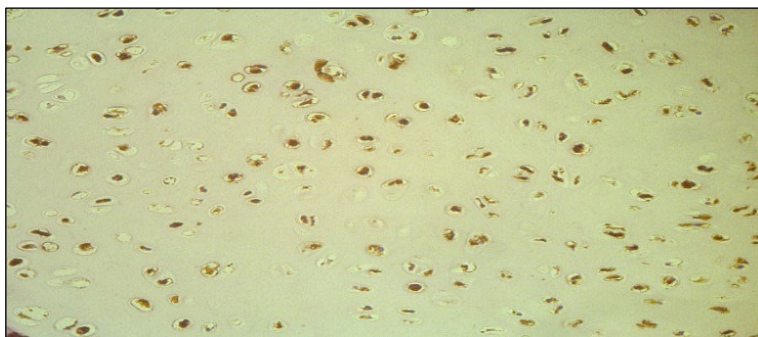
2.9. attēls. **Reti (0/+) bFGF pozitīvi osteocīti 8 gadus un 11 mēnešu veca pirmo reizi operēta šķeltnes skarta pacienta kaulaudos**
bFGF IMH, $\times 200$

Statistikas dati. Imūnhistoķīmiski noteikto bFGF pozitīvo osteocītu vidējais relatīvais daudzums statistiski ticami neatšķirās starp operēto šķeltnu pacientu grupām. Salīdzinot imūnhistoķīmiski noteiktos vidējos rangus, novērota **statistiski ticama atšķirība starp pirmo reizi operēto šķeltnes pacientu kaulaudiem un kontroles grupu** ($U = 26,00$; $p = 0,004$), **kā arī starp atkārtoti operēto šķeltnes pacientu grupu un kontroles grupu** ($U = 65,50$; $p = 0,029$). Šķeltnes skartos kaulaudos pēc pirmās un atkārtotās balstaudu operācijas konstatēts mazāks skaits bFGF pozitīvo osteocītu nekā kontroles grupā.

bFGF tika novērots visos kontroles grupas pacientu skrimšļaudos. Tā klātbūtne variēja no maz līdz vidēji daudz (+/++) līdz daudz (+++). Kopumā kontroles grupas skrimšļaudos bFGF pozitīvie hondrocīti bija vidēji daudz (++)

bFGF tika novērots visos pirmo reizi operēto pacientu skrimšļaudos. Tā daudzums variēja no maz līdz vidēji daudz (+/++) līdz ļoti daudz (++++). Kopumā pirmo reizi operēto pacientu skrimšļaudos bFGF pozitīvie hondrocīti tika konstatēti daudz līdz ļoti daudz (+++/++++) (skatīt 2.10. attēlu).

bFGF bija novērots visos atkārtoti operēto šķeltņu pacientu skrimšļaudos. bFGF pozitīvo hondrocītu daudzums variēja no vidēji daudz (++) līdz ļoti daudz (++++). Kopumā atkārtoti operēto šķeltņu pacientu skrimšļaudos bFGF pozitīvie hondrocīti tika novēroti daudz (+++).



2.10. attēls. **Daudz līdz ļoti daudz (+++/++++) bFGF pozitīvu hondrocītu 6 gadus un 7 mēnešus veca šķeltnes skarta pirmo reizi operēta pacienta skrimšļaudos**
bFGF IMH, $\times 200$

Statistikas dati. bFGF gadījumā statistiski nozīmīga atšķirība starp pirmo reizi operētiem šķeltnes pacientu skrimšļaudiem un atkārtoti operētiem šķeltnes pacientu skrimšļaudiem netika konstatēta. **Statistiski nozīmīga atšķirība konstatēta gan starp kontroles grupu un pirmo reizi operēto šķeltnes pacientu grupu ($U = 37,50$; $p = 0,007$), gan starp atkārtoti operēto šķeltnes pacientu grupu un kontroles grupu ($U = 35,50$; $p = 0,001$).** Tas nozīmēja, ka šķeltnes skartu pacientu skrimšļaudos gan pēc pirmās, gan atkārtotās balstaudu operācijas bija ievērojami vairāk bFGF pozitīvu hondrocītu nekā kontroles grupā.

2.2.6. TGFβ1

TGFβ1 klātbūtne tika novērota visos kontroles grupas pacientu kaulaudos. TGFβ1 pozitīvie osteocīti redzes laukā variēja no maz (+) līdz daudz (+++). Kopumā kontroles grupas kaulaudos TGFβ1 pozitīvie osteocīti tika novēroti maz (+).

TGFβ1 klātbūtne novērota visos pirmo reizi operēto šķeltnes pacientu kaulaudos. Tā variēja no reti (0/+) līdz daudz (+++) (skatīt 2.11. attēlu). Kopumā pirmo reizi operēto šķeltnes pacientu kaulaudos TGFβ1 pozitīvie osteocīti tika novēroti maz (+).

TGFβ1 novēroja visos atkārtoti operēto šķeltnes pacientu kaulaudos. Tā rezultāti variēja no reti (0/+) līdz daudz (+++). Kopumā plānveidā atkārtoti operēto šķeltnes balstaudu pacientu kaulaudos TGFβ1 pozitīvie osteocīti tika konstatēti maz līdz maz līdz vidēji daudz (+ līdz +/+).



2.11. attēls. **Reti (0/+) TGFβ1 pozitīvi osteocīti 21 gada un 1 mēneša veca pirmo reizi operēta šķeltnes skarta pacienta kaulaudos**
TGFβ1 IMH, × 200

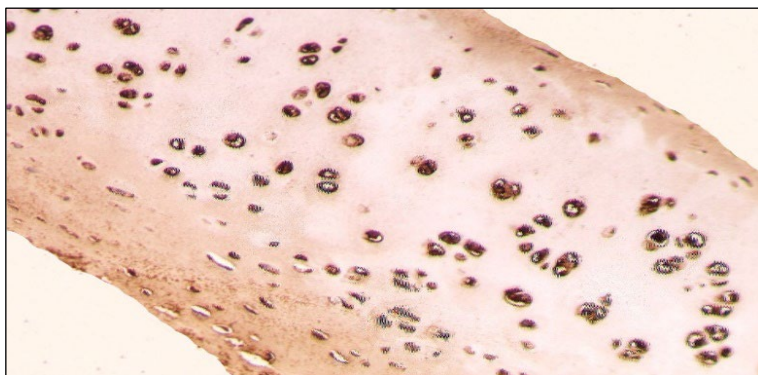
Statistikas dati. Statistiski nozīmīga atšķirība starp TGFβ1 pozitīviem osteocītiem pirmo reizi operētos šķeltnes pacientu kaulaudos un atkārtoti

operētos šķeltņes pacientu kaulaudos netika konstatēta. Tāpat arī netika novērota statistiski nozīmīga atšķirība starp kontroles grupu un šķeltņes skartu pacientu grupām.

TGFβ1 klātbūtne novērota visos kontroles grupas pacientu skrimšļaudos. To atrade variēja no maz līdz vidēji daudz (+/++) līdz daudz līdz ļoti daudz (+++/++++). Kopumā kontroles grupas skrimšļaudos TGFβ1 pozitīvie hondrocīti tika novēroti vidēji daudz līdz daudz (+/+++).

TGFβ1 klātbūtne tika novērota visos pirmo reizi operēto pacientu skrimšļaudos. Tā atrade variēja no maz (+) līdz ļoti daudz (++++) (skatīt 2.12. attēlu). Kopumā pirmo reizi operēto pacientu skrimšļaudos TGFβ1 pozitīvie hondrocīti tika novēroti daudz (+++).

TGFβ1 klātbūtne tika novērota visos atkārtoti operēto šķeltņņu pacientu skrimšļaudos. Tā variēja no vidēji daudz (++) līdz ļoti daudz (++++). Kopumā atkārtoti operēto šķeltņņu pacientu skrimšļaudos TGFβ1 pozitīvie hondrocīti tika konstatēti daudz (+++).



2.12. attēls. **Vidēji daudz līdz daudz (+/+++)** TGFβ1 pozitīvu hondrocītu 13 gadu un 1 mēneša veca šķeltņes skarta pirmo reizi operēta pacienta skrimšļaudos
TGFβ1 IMH, × 200

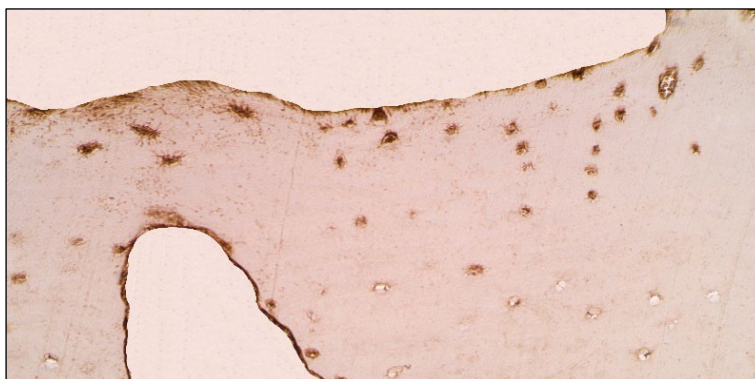
Statistikas dati. Izvērtējot imūnhistoķīmiski noteiktos TGFβ1 pozitīvo hondrocītu relatīvā daudzuma vidējos rangus, statistiski ticama atšķirība starp pētījuma un kontroles grupām netika novērota.

2.2.7. MMP-2

MMP-2 klātbūtne tika novērota visos kontroles grupas pacientu kaulaudos. Kopumā kontroles grupas kaulaudos MMP-2 pozitīvie osteocīti tika novēroti maz (+), tomēr atrade bija variabla. Tā variēja no retām (0/+) līdz vidēji daudz līdz daudz (++) MMP-2 pozitīvām šūnām redzes laukā.

MMP-2 klātbūtne tika novērota visos pirmo reizi operēto šķeltnes pacientu kaulaudos. Tā variēja no reti (0/+) MMP-2 pozitīviem osteocītiem redzes laukā līdz vidēji daudz (++) MMP-2 pozitīviem osteocītiem redzes laukā (skatīt 2.13. attēlu). Kopumā MMP-2 pozitīvie osteocīti tika novēroti reti (0/+).

MMP-2 klātbūtne netika konstatēta visos atkārtoti operēto šķeltnes pacientu kaulaudos. MMP-2 pozitīvie osteocīti tika novēroti maz līdz vidēji daudz (+/+). To rezultāti variēja robežās no nevienas pozitīvas struktūras redzes laukā (0) līdz daudz pozitīvu struktūru redzes laukā (+++).



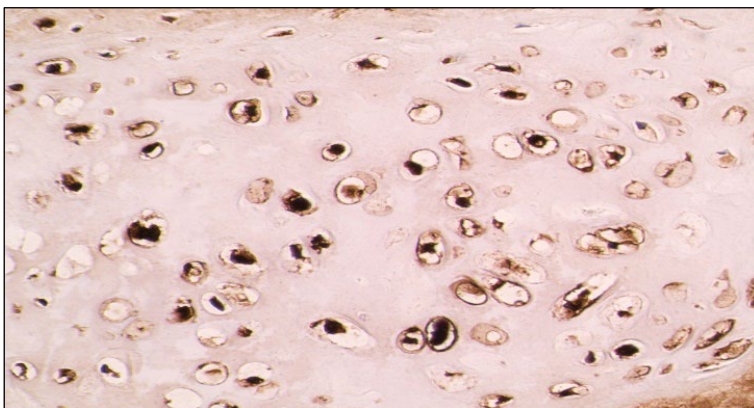
2.13. attēls. Vidēji daudz (++) MMP-2 pozitīvu osteocītu 9 gadus un 11 mēnešu veca šķeltnes skarta pirmo reizi operēta pacienta kaulaudos
MMP-2 IMH, × 200

Statistikas dati. Tika atklāta **statistiski nozīmīga atšķirība MMP-2 pozitīvos osteocītos starp pirmo reizi operētiem šķeltnes pacientu kaulaudiem un atkārtoti operētiem šķeltnes pacientu kaulaudiem**. Tas nozīmē, ka MMP-2 pozitīvie osteocīti ir pārliecinošā vairākumā atkārtoti operēto šķeltnes pacientu kaulaudos ($U = 95,50$; $p = 0,05$). Statistiski nozīmīga atšķirība starp kontroles grupu un šķeltnu skartu pacientu abām grupām ar Manna–Vitnija U testu netika konstatēta.

MMP-2 klātbūtne tika novērota visos kontroles grupas pacientu skrimšļaudos. Kopumā kontroles grupas skrimšļaudos MMP-2 pozitīvie hondrocīti tika konstatēti vidēji daudz (++), tomēr atrade bija variabla. Pozitīvo hondrocītu daudzums variēja no maz līdz vidēji daudz (+/++) līdz daudz (+++).

MMP-2 klātbūtne tika novērota visos pirmo reizi operēto pacientu skrimšļaudos. Kopumā pirmo reizi operēto pacientu skrimšļaudos MMP-2 pozitīvie hondrocīti konstatēti daudz (+++) (skatīt 2.14. attēlu). To daudzums variēja no maz līdz vidēji daudz (+/++) līdz ļoti daudz (++++).

MMP-2 klātbūtne tika novērota visos atkārtoti operēto šķeltnu pacientu skrimšļaudos. Kopumā kontroles grupas skrimšļaudos MMP-2 pozitīvie hondrocīti tika novēroti daudz (+++). To daudzums variēja no maz līdz vidēji daudz (+/++) līdz ļoti daudz (++++).



2.14. attēls. Daudz (+++) MMP-2 pozitīvu hondrocītu 16 gadu un 6 mēnešus veca šķeltnes skarta pirmo reizi operēta pacienta skrimšļaudos
MMP-2 IMH, $\times 250$

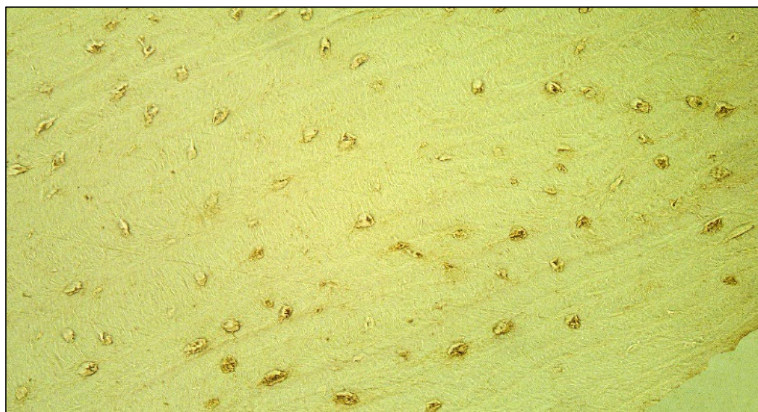
Statistikas dati. Vidējais MMP-2 saturošo hondrocītu daudzums skrimšļaudos **statistiski ticami lielāks bija gan pirmo reizi operētiem šķeltnes skartiem pacientiem** ($U = 38,50$; $p = 0,008$), **gan atkārtoti operētiem šķeltnes skartiem pacientiem** ($U = 37,00$; $p = 0,002$), salīdzinot ar kontroles grupas pacientiem. Statistiski ticama atšķirība MMP-2 pozitīvos hondrocītos starp pirmo reizi operētiem šķeltnes pacientu skrimšļaudiem un atkārtoti operētiem šķeltnes pacientu skrimšļaudiem netika novērota.

2.2.8. MMP-8

MMP-8 klātbūtne tika konstatēta visos kontroles grupas pacientu kaulaudos. Kopumā MMP-8 pozitīvie osteocīti tika novēroti vidēji daudz (++) .

MMP-8 pozitīvie osteocīti tika konstatēti visos pirmo reizi operēto šķeltnes pacientu kaulaudos. Tie variēja robežās no retiemi (0/+) līdz daudz (+++) (skatīt 2.15. attēlu). Kopumā MMP-8 pozitīvie osteocīti bija maz līdz maz līdz vidēji daudz (+ līdz +/+++).

MMP-8 pozitīvie osteocīti netika novēroti visos atkārtoti operēto šķeltnes pacientu kaulaudos. Kopumā MMP-8 pozitīvie osteocīti tika konstatēti maz līdz maz līdz vidēji daudz (+ līdz +/+++). MMP-8 pozitīvo osteocītu daudzums variēja no neviena pozitīva osteocīta redzes laukā (0) līdz daudz pozitīvu osteocītu redzes laukā (+++).



2.15. attēls. Maz (+) MMP-8 pozitīvu osteocītu 9 gadus un 5 mēnešus veca šķeltnes skarta pirmo reizi operēta pacienta kaulaudos
MMP-8 IMH, $\times 250$

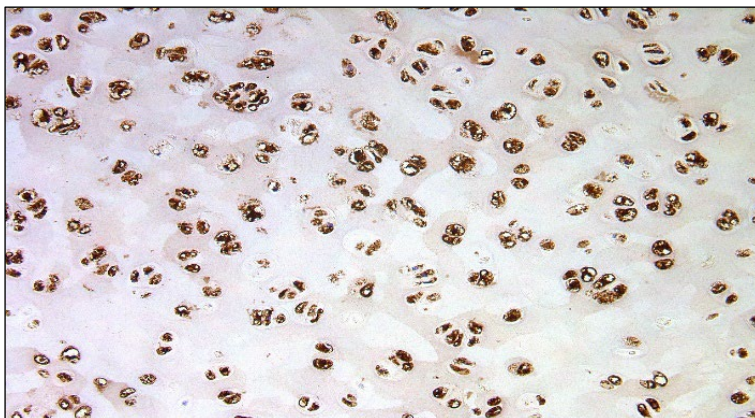
Statistikas dati. Statistiski nozīmīga atšķirība MMP-8 pozitīvos osteocītos starp pirmo reizi operētiem šķeltnes pacientu kaulaudiem un atkārtoti operētiem šķeltnes pacientu kaulaudiem netika konstatēta. Tāpat arī netika atrasta statistiski nozīmīga atšķirība starp pirmo reizi operētiem šķeltnes pacientu kaulaudiem un kontroles grupu. Tomēr **statistiski nozīmīga atšķirība tika atklāta starp kontroles grupu un atkārtoti operētiem šķeltnes pacientu kaulaudiem** ($U = 34,50$; $p = 0,025$), kur atkārtoti operēto šķeltnes pacientu grupā MMP-8 pozitīvo osteocītu, salīdzinot ar kontroles grupu, bija mazāk.

MMP-8 tika konstatēta visos kontroles grupas pacientu skrimšļaudos. Tās rezultāti variēja no vidēji daudz līdz daudz (+/+++) līdz ļoti daudz (++++).

Kopumā kontroles grupas skrimšļaudos MMP-8 pozitīvie hondrocīti bija daudz līdz ļoti daudz (+++/++++).

MMP-8 pozitīvi hondrocīti tika konstatēti visos pirmo reizi operēto pacientu skrimšļaudos. Tie variēja no vidēji daudz (++) līdz ļoti daudz (++++) (skatīt 2.16. attēlu). Kopumā pirmo reizi operēto pacientu skrimšļaudos MMP-8 pozitīvie hondrocīti tika novēroti daudz līdz ļoti daudz (+++/++++).

MMP-8 pozitīvi hondrocīti tika novēroti visos atkārtoti operēto šķeltņu pacientu skrimšļaudos. To rezultāti variēja no vidēji daudz (++) līdz ļoti daudz (++++). Kopumā atkārtoti operēto šķeltņu pacientu skrimšļaudos MMP-8 pozitīvie hondrocīti tika konstatēti daudz līdz ļoti daudz (+++/++++).



**2.16. attēls. Ļoti daudz (++++) MMP-8 pozitīvu hondrocītu
12 gadu un 8 mēnešus veca šķeltnes skarta
pirmo reizi operēta pacienta skrimšļaudos
MMP-8 IMH, × 400**

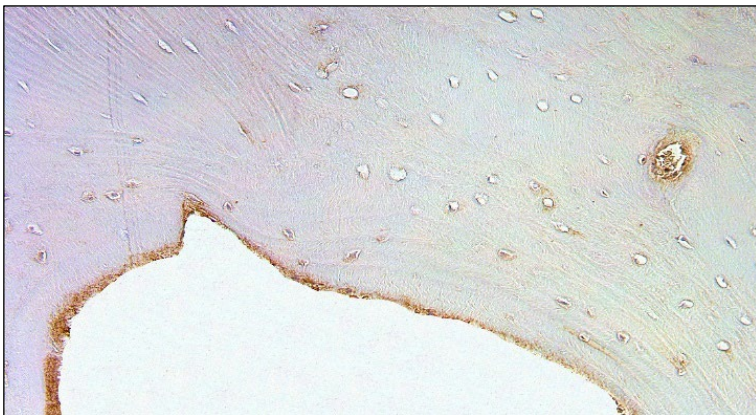
Statistikas dati. Tika konstatēts, ka vidējais imūnhistoķīmiski noteikto MMP-8 pozitīvo hondrocītu relatīvais daudzums skrimšļaudos statistiski ticami neatšķīrās starp pētījuma un kontroles grupām.

2.2.9. MMP-9

MMP-9 pozitīvie osteocīti tika novēroti visos kontroles grupas audu paraugos. To atrade variēja no retiem (0/+) līdz vidēji daudz līdz daudz (++/+++). Kopumā kontroles grupas kaulaudos MMP-9 pozitīvie osteocīti tika novēroti maz līdz vidēji daudz (+/+++).

MMP-9 saturoši osteocīti tika novēroti visos pirmo reizi operēto šķeltnes pacientu kaulaudos. To atrade variēja robežās no reti (0/+) līdz vidēji daudz (++). Kopumā pirmo reizi operēto šķeltnes pacientu kaulaudos MMP-9 pozitīvie osteocīti tika novēroti maz (+) (skatīt 2.17. attēlu).

MMP-9 klātbūtne netika konstatēta visos atkārtoti operēto šķeltnes pacientu kaulaudos. Kopumā MMP-9 pozitīvie osteocīti atkārtoti operēto šķeltnes pacientu kaulaudos bija maz līdz maz līdz vidēji daudz (+ līdz +/+++), bet to atrade variēja no nevienas pozitīvas struktūras (0) līdz daudz pozitīvu struktūru redzes laukā (+++).



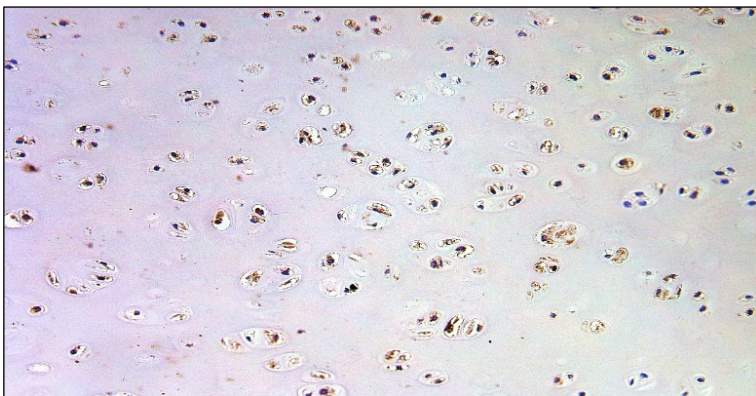
2.17. attēls. Maz (+) MMP-9 pozitīvu osteocītu 8 gadus un 5 mēnešus veca šķeltnes skarta pirmo reizi operēta pacienta kaulaudos
MMP-9 IMH, × 200

Statistikas dati. Statistiski nozīmīga atšķirība starp MMP-9 pozitīviem osteocītiem starp pirmo reizi operētiem šķeltnes pacientu kaulaudiem un atkārtoti operētiem šķeltnes pacientu kaulaudiem netika konstatēta. Tāpat arī netika atrasta statistiski nozīmīga atšķirība starp kontroles grupu un šķeltnes skartu pacientu grupām.

MMP-9 klātbūtne tika novērota visos kontroles grupas pacientu skrimšļaudos. MMP-9 pozitīvo hondrocītu daudzums variēja no maz (+) līdz daudz (+++). Kopumā kontroles grupas skrimšļaudos MMP-9 pozitīvie hondrocīti tika novēroti maz līdz vidēji daudz (+/+++).

MMP-9 novēroja visos pirmo reizi operēto pacientu skrimšļaudos. MMP-9 pozitīvo hondrocītu rezultāti variēja no vidēji daudz (++) līdz ļoti daudz (++++). Kopumā pirmo reizi operēto pacientu skrimšļaudos MMP-9 pozitīvos hondrocītus konstatēja daudz (+++) (skatīt 2.18. attēlu).

MMP-9 klātbūtne tika konstatēta visos atkārtoti operēto šķeltnu pacientu skrimšļaudos. Pozitīvo hondrocītu daudzums variēja no vidēji daudz (++) līdz daudz līdz ļoti daudz (+++/++++). Kopumā atkārtoti operēto šķeltnu pacientu skrimšļaudos MMP-9 pozitīvie hondrocīti tika novēroti vidēji daudz līdz daudz (++/++++).



2.18. attēls. **Daudz (+++) MMP-9 pozitīvu hondrocītu 7 gadus un 7 mēnešus veca šķeltnes skarta pirmo reizi operēta pacienta skrimšļaudos**
MMP-9 IMH, $\times 400$

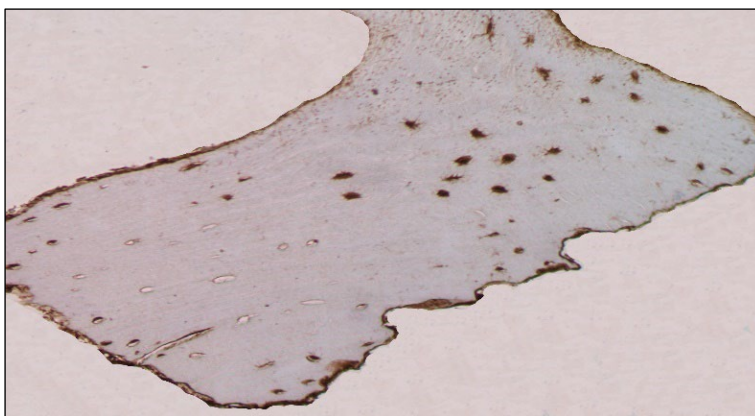
Statistikas dati. MMP-9 pozitīvo hondrocītu relatīvā daudzuma gadījumā statistiski nozīmīga atšķirība starp pirmo reizi operētiem šķeltnes pacientu skrimšļaudiem un atkārtoti operētiem šķeltnes pacientu skrimšļaudiem netika konstatēta. **Statistiski nozīmīga atšķirība tika konstatēta gan starp kontroles grupu un pirmo reizi operēto šķeltnes pacientu grupu ($U = 12,50$; $p < 0,001$), gan starp atkārtoti operēto šķeltnes pacientu grupu un kontroles grupu ($U = 23,50$; $p < 0,001$).** Tas nozīmēja, ka šķeltnes skartu pacientu skrimšļaudos gan pēc pirmās, gan atkārtotās balstaudu operācijas bija ievērojami vairāk MMP-9 pozitīvu hondrocītu nekā kontroles grupā.

2.2.10. TIMP-2

TIMP-2 klātbūtne tika novērota visos kontroles grupas pacientu kaulaudos. TIMP-2 pozitīvi osteocīti variēja no retiem (0/+) līdz vidēji daudz (++) . Kopumā kontroles grupas kaulaudos TIMP-2 pozitīvie osteocīti tika novēroti maz (+).

TIMP-2 klātbūtne tika novērota visos pirmo reizi operēto šķeltnes pacientu kaulaudos. Tā variēja no reti (0/+) līdz vidēji daudz (++) TIMP-2 pozitīviem osteocītiem redzes laukā (skatīt 2.19. attēlu). Kopumā pirmo reizi operēto šķeltnes pacientu kaulaudos TIMP-2 pozitīvie osteocīti tika novēroti reti (0/+).

TIMP-2 novēroja visos atkārtoti operēto šķeltnes pacientu kaulaudos. Tā rezultāti variēja no reti (0/+) līdz daudz (+++). Kopumā atkārtoti operēto šķeltnes pacientu kaulaudos TIMP-2 pozitīvi osteocīti tika novēroti reti (0/+).



2.19. attēls. **Vidēji daudz (++) TIMP-2 pozitīvu osteocītu 6 gadus un 7 mēnešus veca šķeltnes skarta pirmo reizi operēta pacienta kaulaudos**
TIMP-2 IMH, $\times 200$

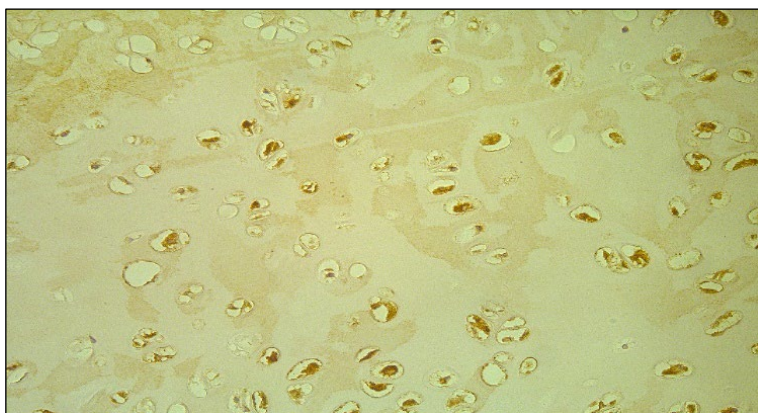
Statistikas dati. Šī faktora gadījumā netika konstatēta statistiski nozīmīga atšķirība starp pirmo reizi operētiem šķeltnes pacientu kaulaudiem un atkārtoti operētiem šķeltnes pacientu kaulaudiem. Statistiski nozīmīga atšķirība starp kontroles grupu un abām šķeltnu skartu pacientu grupām ar Manna–Vitnija U testu netika konstatēta.

TIMP-2 tika novērots visos kontroles grupas pacientu skrimšļaudos. Tā klātbūtne variēja no maz līdz vidēji daudz (+/++) līdz daudz līdz ļoti

daudz (+++/++++). Kopumā kontroles grupas skrimšļaudos TIMP-2 pozitīvi hondrocīti tika konstatēti vidēji daudz līdz daudz (++/+++).

TIMP-2 klātbūtne tika novērota visos pirmo reizi operēto pacientu skrimšļaudos. Pozitīvo hondrocītu daudzums variēja no maz līdz vidēji daudz (+/++) līdz ļoti daudz (++++) (skatīt 2.20. attēlu). Kopumā pirmo reizi operēto pacientu skrimšļaudos TIMP-2 pozitīvie hondrocīti tika novēroti daudz (+++).

TIMP-2 tika novērots visos atkārtoti operēto šķeltņu pacientu skrimšļaudos. Tas variēja no maz līdz vidēji daudz (+/++) līdz daudz līdz ļoti daudz (+++/++++). Kopumā atkārtoti operēto šķeltņu pacientu skrimšļaudos TIMP-2 pozitīvie hondrocīti tika novēroti vidēji daudz līdz daudz (++/+++).



2.20. attēls. **Vidēji daudz (++) TIMP-2 pozitīvu hondrocītu 13 gadu un 9 mēnešus veca šķeltnes skarta pirmo reizi operēta pacienta skrimšļaudos**
TIMP-2 IMH, × 400

Statistikas dati. Šī faktora gadījumā netika konstatēta statistiski nozīmīga atšķirība starp pirmo reizi operētiem šķeltnes pacientu skrimšļaudiem un atkārtoti operētiem šķeltnes pacientu skrimšļaudiem. Statistiski nozīmīga

atšķirība starp kontroles grupu un abām šķeltņu skartu pacientu grupām ar Manna–Vitnija U testu netika konstatēta.

2.2.11. IL-1 α

IL-1 α klātbūtne netika novērota visos kontroles grupas pacientu kaulaudos. Kopumā kontroles grupas kaulaudos IL-1 α pozitīvie osteocīti tika novēroti maz (+).

IL-1 α saturoši osteocīti tika novēroti visos pirmo reizi operēto šķeltnes pacientu kaulaudos. To daudzums variēja no reti (0/+) līdz vidēji daudz (++). Kopumā pirmo reizi operēto šķeltnes pacientu kaulaudos IL-1 α pozitīvie osteocīti tika novēroti reti (0/+) (skatīt 2.21. attēlu).

IL-1 α tika novērots visos atkārtoti operēto šķeltnes pacientu kaulaudos. Tas variēja no reti (0/+) līdz daudz (+++). Kopumā plānveidā atkārtoti operēto šķeltnes pacientu kaulaudos IL-1 α pozitīvus osteocītus novēroja maz (+).



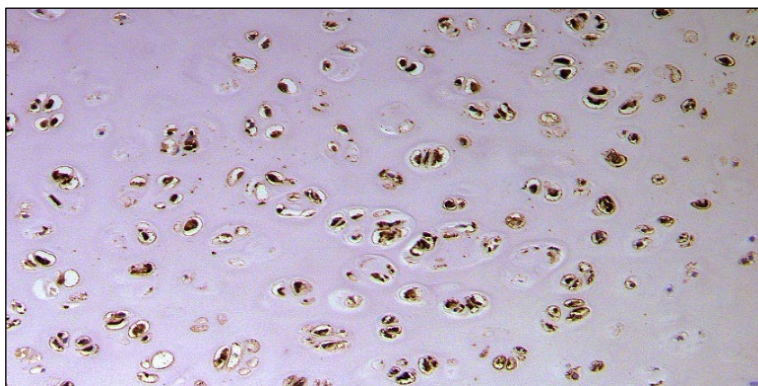
2.21. attēls. **Reti (0/+) IL-1 α pozitīvi osteocīti 13 gadu un 9 mēnešus veca pirmo reizi operēta šķeltnes skarta pacienta kaulaudos**
IL-1 α IMH, $\times 200$

Statistikas dati. Izvērtējot imūnhistoķīmiski noteiktos IL-1 α relatīvā daudzuma vidējos rangus, statistiski ticama atšķirība starp pētījuma un kontroles grupām netika novērota.

IL-1 α tika konstatēts visos kontroles grupas pacientu skrimšļaudos. IL-1 α pozitīvie hondrocīti variēja no vidēji daudz (++) līdz ļoti daudz (++++). Kopumā kontroles grupas skrimšļaudos IL-1 α pozitīvus hondrocītus konstatēja vidēji daudz līdz daudz (++/+++).

IL-1 α klātbūtne tika konstatēta visos pirmo reizi operēto pacientu skrimšļaudos. Tā rezultāti variēja no vidēji daudz (++) līdz ļoti daudz (++++). Kopumā pirmo reizi operēto pacientu skrimšļaudos IL-1 α pozitīvie hondrocīti tika konstatēti daudz (+++) (skatīt 2.22. attēlu).

IL-1 α tika konstatēts visos atkārtoti operēto šķeltņu pacientu skrimšļaudos. Tā daudzums variēja no vidēji daudz (++) līdz ļoti daudz (++++). Kopumā atkārtoti operēto šķeltņu pacientu skrimšļaudos IL-1 α pozitīvie hondrocīti novēroti daudz (+++).



2.22. attēls. **Daudz (+++) IL-1 α pozitīvu hondrocītu 18 gadu veca šķeltnes skarta pirmo reizi operēta pacienta skrimšļaudos**
IL-1 α IMH, $\times 400$

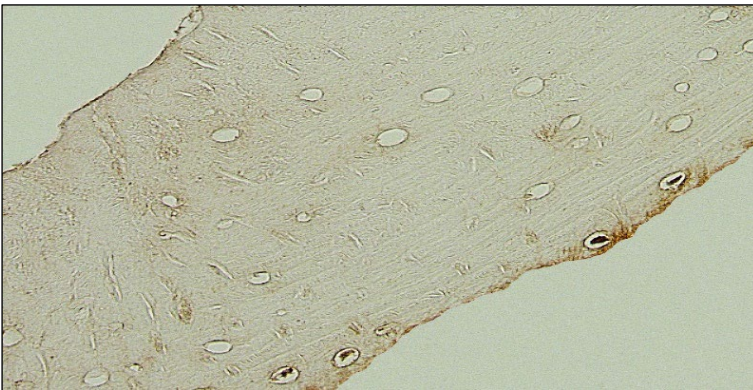
Statistikas dati. Tika konstatēts, ka vidējais imūnhistoķīmiski noteikto IL-1 α pozitīvo hondrocītu relatīvais daudzums skrimšļaudos statistiski ticami neatšķīrās starp pētījuma un kontroles grupām.

2.2.12. IL-10

IL-10 klātbūtne tika novērota visos kontroles grupas pacientu kaulaudos. Kopumā kontroles grupas kaulaudos IL-10 pozitīvie osteocīti tika novēroti maz līdz vidēji daudz (+/+).

IL-10 pozitīvie osteocīti tika novēroti visos pirmo reizi operēto šķeltnes pacientu kaulaudos. IL-10 saturošo osteocītu daudzums variēja no reti (0/+) līdz maz līdz vidēji daudz (+/++) (skatīt 2.23. attēlu). Kopumā pirmo reizi operēto šķeltnes pacientu kaulaudos IL-10 pozitīvi osteocīti tika novēroti maz (+).

IL-10 klātbūtne tika novērota visos atkārtoti operēto šķeltnes pacientu kaulaudos. Tā klātbūtne variēja no reti (0/+) līdz daudz (+++). Kopumā atkārtoti operēto šķeltnes pacientu kaulaudos IL-10 pozitīvie osteocīti tika konstatēti maz (+).



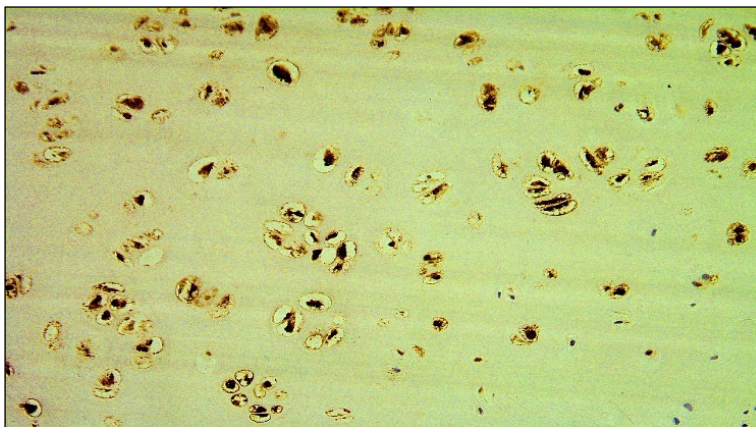
2.23. attēls. Reti (0/+) IL-10 pozitīvi osteocīti 7 gadus un 5 mēnešus veca pirmo reizi operēta šķeltnes skarta pacienta kaulaudos
IL-10 IMH, $\times 250$

Statistikas dati. **Statistiski nozīmīga atšķirība IL-10 pozitīvo osteocītu relatīvajā daudzumā kaulaudos tika konstatēta starp kontroles grupu un pirmo reizi operēto šķeltnes pacientu grupu** ($U = 36,50$; $p = 0,022$), kur pirmo reizi operēto šķeltnes pacientu grupā IL-10 pozitīvo osteocītu, salīdzinot ar kontroles grupu, bija mazāk. Starp pārējām pētījuma un kontroles grupām statistiski nozīmīga atšķirība netika konstatēta.

IL-10 klātbūtne bija novērota visos kontroles grupas pacientu skrimšļaudos. Tā rezultāti variēja no maz līdz vidēji daudz (+/++) līdz daudz (+++). Kopumā kontroles grupas skrimšļaudos IL-10 pozitīvie hondrocīti tika konstatēti vidēji daudz (++).

IL-10 klātbūtne tika konstatēta visos pirmo reizi operēto pacientu skrimšļaudos. Tā daudzums variēja no vidēji daudz (++) līdz ļoti daudz (++++). Kopumā pirmo reizi operēto pacientu skrimšļaudos IL-10 pozitīvie hondrocīti tika konstatēti daudz (+++) (skatīt 2.24. attēlu).

IL-10 tika novērots visos atkārtoti operēto šķeltnu pacientu skrimšļaudos. IL-10 pozitīvo hondrocītu relatīvajā daudzuma rezultāti variēja no vidēji daudz (++) līdz ļoti daudz (++++). Kopumā atkārtoti operēto šķeltnu pacientu skrimšļaudos IL-10 pozitīvie hondrocīti tika konstatēti daudz (+++).



2.24. attēls. **Daudz (+++) IL-10 pozitīvu hondrocītu 5 gadus un 7 mēnešus veca šķeltnes skarta pirmo reizi operēta pacienta skrimšļaudos**
IL-10 IMH, $\times 400$

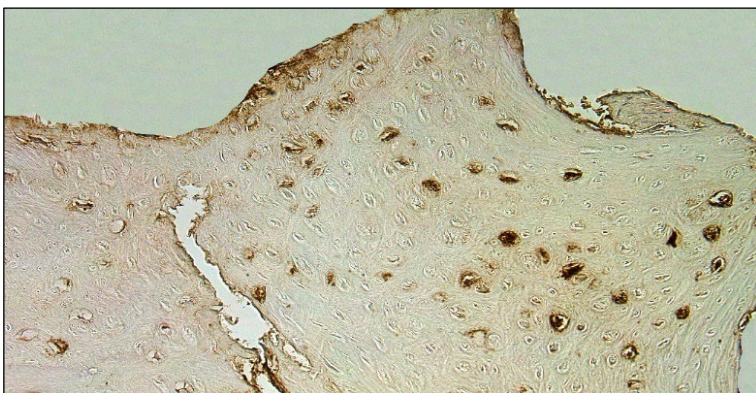
Statistikas dati. IL-10 gadījumā statistiski nozīmīga atšķirība starp pirmo reizi operētiem šķeltnes pacientu skrimšļaudiem un atkārtoti operētiem šķeltnes pacientu skrimšļaudiem netika konstatēta. **Statistiski nozīmīga atšķirība tika konstatēta gan starp kontroles grupu un pirmo reizi operēto šķeltnes pacientu grupu** ($U = 29,50$; $p = 0,002$), **gan starp atkārtoti operēto šķeltnes pacientu grupu un kontroles grupu** ($U = 58,00$; $p = 0,018$). Tas nozīmēja, ka šķeltnes skartu pacientu skrimšļaudos gan pēc pirmās, gan atkārtotās balstaudu operācijas bija ievērojami vairāk IL-10 pozitīvu hondrocītu nekā kontroles grupā.

2.2.13. HBD-2

HBD-2 tika konstatēts visos kontroles grupas pacientu audu paraugos. Tā klātbūtne variēja no maz (+) līdz daudz un līdz ļoti daudz (+++/++++) HBD-2 pozitīvu osteocītu redzes laukā. Kopumā kontroles grupas kaulaudos HBD-2 pozitīvie osteocīti tika novēroti vidēji daudz (++) .

HBD-2 klātbūtne tika konstatēta visos pirmo reizi operēto šķeltnes pacientu kaulaudos. Tā variēja robežās no reti (0/+) līdz vidēji daudz līdz daudz (++) (skatīt 2.25. attēlu). Kopumā pirmo reizi operēto šķeltnes pacientu kaulaudos HBD-2 pozitīvi osteocīti tika novēroti reti līdz maz (0/+ līdz +).

HBD-2 tika konstatēts visos atkārtoti operēto šķeltnes pacientu kaulaudos. Tā daudzums variēja no reti (0/+) līdz daudz (+++). Kopumā atkārtoti operēto šķeltnes balstaudu pacientu kaulaudos HBD-2 pozitīvie osteocīti tika novēroti maz (+).



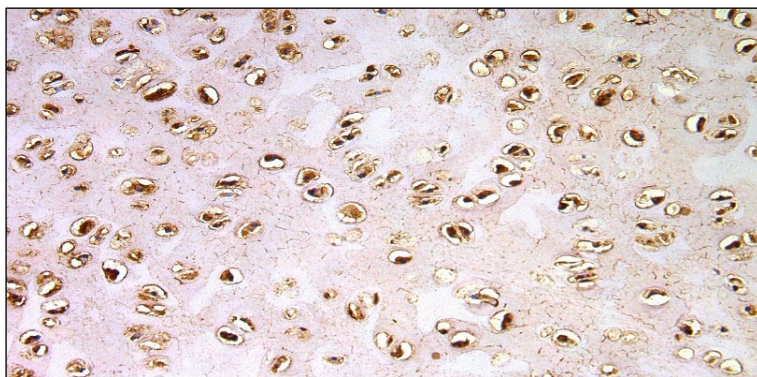
2.25. attēls. Vidēji daudz (++) HBD-2 pozitīvu osteocītu 13 gadu un 9 mēnešus veca šķeltnes skarta pirmo reizi operēta pacienta kaulaudos
HBD-2 IMH, $\times 200$

Statistikas dati. Vidējais HBD-2 saturošo osteocītu daudzums kaulaudos statistiski ticami mazāks bija gan pirmo reizi operētiem šķeltnes skartiem pacientiem ($U = 21,00$; $p = 0,002$), gan atkārtoti operētiem šķeltnes skartiem pacientiem ($U = 53,00$; $p = 0,008$), salīdzinot ar kontroles grupas pacientiem. Statistiski ticama atšķirība HBD-2 pozitīvos osteocītos starp pirmo reizi operētiem šķeltnes pacientu kaulaudiem un atkārtoti operētiem šķeltnes pacientu kaulaudiem netika novērota.

HBD-2 klātbūtne tika novērota visos kontroles grupas pacientu skrimšļaudos. Pozitīvo HBD-2 hondrocītu daudzums variēja no maz līdz vidēji daudz (+/++) līdz ļoti daudz (++++). Kopumā kontroles grupas skrimšļaudos HBD-2 pozitīvie hondrocīti bija vidēji daudz (++).

HBD-2 tika novērots visos pirmo reizi operēto pacientu skrimšļaudos. Tā relatīvais daudzums variēja no vidēji daudz (++) līdz ļoti daudz (++++). Kopumā pirmo reizi operēto pacientu skrimšļaudos HBD-2 pozitīvie hondrocīti bija daudz līdz ļoti daudz (+++ /++++) (skatīt 2.26. attēlu).

HBD-2 klātbūtne tika novērota visos atkārtoti operēto šķeltņu pacientu skrimšļaudos. Tā rezultāti variēja no maz līdz vidēji daudz (+/++) līdz ļoti daudz (++++). Kopumā atkārtoti operēto šķeltņu pacientu skrimšļaudos HBD-2 pozitīvie hondrocīti tika konstatēti vidēji daudz līdz daudz (++/+++).



2.26. attēls. Daudz līdz ļoti daudz (+++ /++++) HBD-2 pozitīvu hondrocītu 11 gadu un 9 mēnešus veca šķeltnes skarta pirmo reizi operēta pacienta skrimšļaudos
HBD-2 IMH, × 250

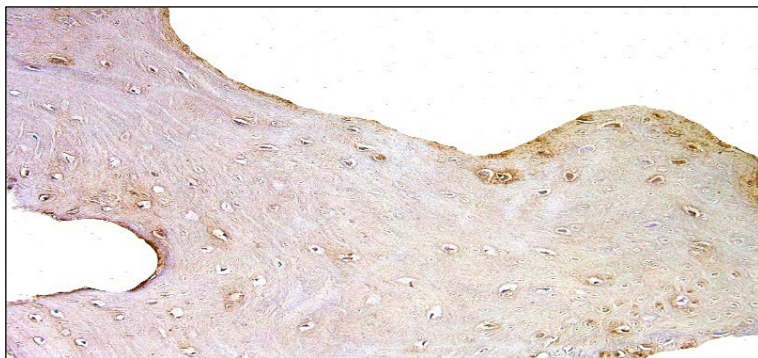
Statistikas dati. Izvērtējot imūnhistoķīmiski noteiktos HBD-2 pozitīvo hondrocītu relatīvā daudzuma vidējos rangus, statistiski ticama atšķirība starp pētījuma un kontroles grupām netika novērota.

2.2.14. HBD-3

HBD-3 klātbūtne tika novērota visos kontroles grupas pacientu kaulaudos. HBD-3 pozitīvie osteocīti redzes laukā variēja no maz (+) līdz daudz līdz ļoti daudz (+++/++++). Kopumā kontroles grupas kaulaudos HBD-3 pozitīvie osteocīti tika novēroti maz līdz vidēji daudz (+/+++).

HBD-3 pozitīvie osteocīti tika novēroti visos pirmo reizi operēto šķeltnes pacientu kaulaudos. HBD-3 saturošo osteocītu daudzums variēja no reti (0/+) līdz vidēji daudz (++) (skatīt 2.27. attēlu). Kopumā pirmo reizi operēto šķeltnes pacientu kaulaudos HBD-3 pozitīvie osteocīti novēroti reti līdz maz (0/+ līdz +).

HBD-3 netika konstatēts visos atkārtoti operēto šķeltnes pacientu kaulaudos. Tā rezultāti variēja no neviena pozitīva osteocīta (0) līdz vidēji daudz (++) HBD-3 pozitīviem osteocītiem redzes laukā. Kopumā atkārtoti operēto šķeltnes balstaudu pacientu kaulaudos HBD-3 pozitīvo osteocītu bija maz (+).



2.27. attēls. Maz (+) HBD-3 pozitīvu osteocītu 14 gadu un 1 mēneša veca šķeltnes skarta pirmo reizi operēta pacienta kaulaudos
HBD-3 IMH, $\times 200$

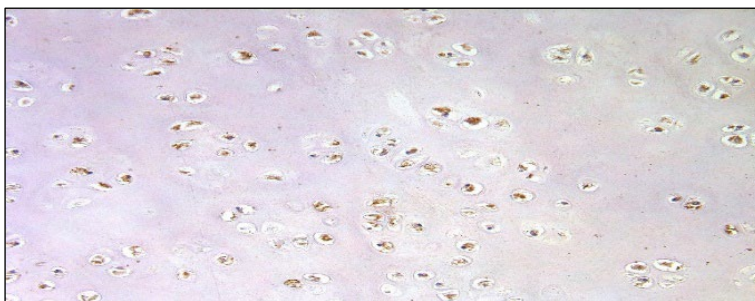
Statistikas dati. Šī faktora gadījumā netika konstatēta statistiski nozīmīga atšķirība HBD-3 pozitīvo osteocītu daudzumā starp pirmo reizi operētiem šķeltnes pacientu kaulaudiem un atkārtoti operētiem šķeltnes pacientu

kaulaudiem. Tomēr **statistiski nozīmīga atšķirība tika konstatēta gan starp kontroles grupu un pirmo reizi operēto šķeltnes pacientu grupu** ($U = 22,00$; $p = 0,002$), **gan starp atkārtoti operēto šķeltnes pacientu grupu un kontroles grupu** ($U = 41,00$; $p = 0,002$). Tas nozīmēja, ka šķeltnes skartu pacientu kaulaudos gan pēc pirmās, gan atkārtotās balstaudu operācijas bija ievērojami mazāk HBD-3 pozitīvu osteocītu nekā kontroles grupā.

HBD-3 tika konstatēts visos kontroles grupas pacientu skrimšļaudos. Tā atrade variēja no maz (+) līdz daudz (+++). Kopumā kontroles grupas skrimšļaudos HBD-3 pozitīvie hondrocīti tika novēroti vidēji daudz (++).

HBD-3 klātbūtne tika novērota visos pirmo reizi operēto pacientu skrimšļaudos. Tā variēja no vidēji daudz (++) līdz ļoti daudz (++++). Kopumā pirmo reizi operēto pacientu skrimšļaudos HBD-3 pozitīvie hondrocīti tika novēroti vidēji daudz līdz daudz (++) (skatīt 2.28. attēlu).

HBD-3 klātbūtne tika konstatēta visos atkārtoti operēto šķeltņu pacientu skrimšļaudos. Tā variēja no vidēji daudz (++) līdz ļoti daudz (++++). Kopumā atkārtoti operēto šķeltņu pacientu skrimšļaudos HBD-3 pozitīvie hondrocīti bija novēroti daudz (+++).



2.28. attēls. **Vidēji daudz līdz daudz (++) HBD-3 pozitīvu hondrocītu 8 gadus un 3 mēnešus veca šķeltnes skarta pirmo reizi operēta pacienta skrimšļaudos**
HBD-3 IMH, $\times 400$

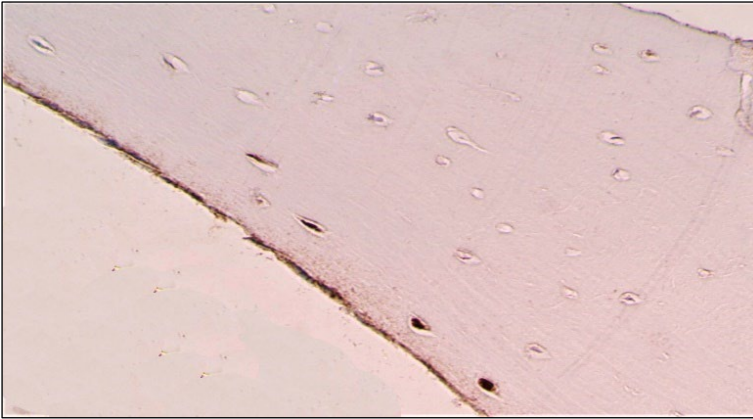
Statistikas dati. HBD-3 pozitīvo hondrocītu relatīvais daudzums neuzrādīja statistiski nozīmīgu atšķirību starp pirmo reizi un atkārtoti operētiem šķeltnes pacientu skrimšļaudiem. **Statistiski nozīmīga atšķirība tika atrasta gan starp kontroles grupu un pirmo reizi operēto šķeltnes pacientu grupu** ($U = 45,50$; $p = 0,019$), **gan starp atkārtoti operēto šķeltnes pacientu grupu un kontroles grupu** ($U = 63,00$; $p = 0,030$). Tas nozīmēja, ka šķeltnes skartu pacientu skrimšļaudos gan pēc pirmās, gan atkārtotās balstaudu operācijas bija ievērojami vairāk HBD-3 pozitīvu hondrocītu nekā kontroles grupā.

2.2.15. Runx2

Runx2 klātbūtne netika konstatēta visos kontroles grupas pacientu kaulaudos. Kopumā kontroles grupas kaulaudos Runx2 pozitīvie osteocīti netika novēroti (0).

Runx2 saturošie osteocīti netika novēroti visos pirmo reizi operēto šķeltnes pacientu kaulaudos. Kopumā pirmo reizi operēto šķeltnes pacientu kaulaudos Runx2 pozitīvie osteocīti tika novēroti reti (0/+) (skatīt 2.29. attēlu).

Runx2 netika konstatēts visos atkārtoti operēto šķeltnes pacientu kaulaudos. Tā daudzums variēja no nevienas redzamas pozitīvas struktūras redzes laukā (0) līdz maz līdz vidēji daudz (+/++) pozitīvu struktūru redzes laukā. Kopumā atkārtoti operēto šķeltnes pacientu kaulaudos Runx2 pozitīvos osteocītus novēroja reti (0/+).



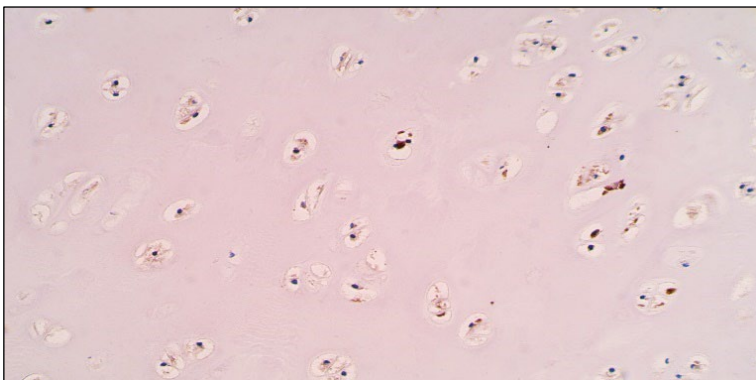
**2.29. attēls. Reti (0/+) Runx2 pozitīvi osteocīti 7 gadus un 5 mēnešus
veca pirmo reizi operēta šķeltnes skarta pacienta kaulaudos**
Runx2 IMH, × 250

Statistikas dati. Tika konstatēts, ka vidējais imūnhistoķīmiski noteikto Runx2 pozitīvo osteocītu relatīvais daudzums kaulaudos statistiski ticami neatšķīrās starp pētījuma un kontroles grupām.

Runx2 bija novērots visos kontroles grupas pacientu skrimšļaudos. Tā daudzums variēja no maz (+) līdz daudz (+++). Kopumā kontroles grupas skrimšļaudos Runx2 pozitīvos hondrocītus novēroja vidēji daudz (++)

Runx2 klātbūtne tika konstatēta visos pirmo reizi operēto pacientu skrimšļaudos. Tā rezultāti variēja no reti (0/+) līdz daudz (+++). Kopumā pirmo reizi operēto pacientu skrimšļaudos Runx2 pozitīvie hondrocīti tika konstatēti vidēji daudz (++) (skatīt 2.30. attēlu).

Runx2 klātbūtni konstatēja visos atkārtoti operēto šķeltņu pacientu skrimšļaudos. Tā rezultāti variēja no reti (0/+) līdz daudz (+++). Kopumā atkārtoti operēto šķeltņu pacientu skrimšļaudos Runx2 pozitīvie hondrocīti tika konstatēti maz (+).



2.30. attēls. Vidēji daudz (++) Runx2 pozitīvu hondrocītu 5 gadus un 7 mēnešus veca šķeltnes skarta pirmo reizi operēta pacienta skrimšļaudos
Runx2 IMH, × 400

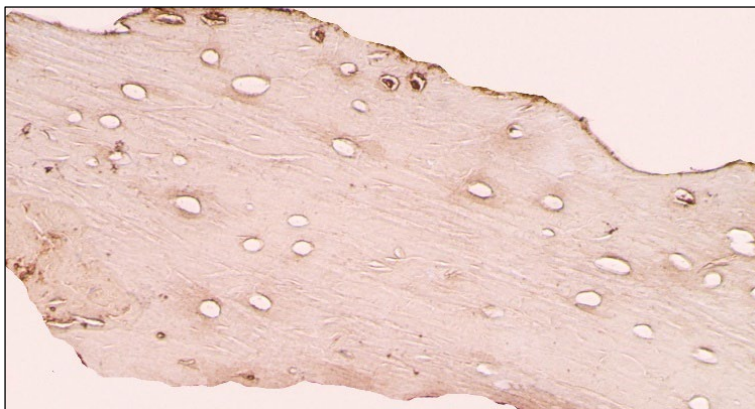
Statistikas dati. Tika konstatēts, ka vidējais imūnhistoķīmiski noteikto Runx2 pozitīvo hondrocītu relatīvais daudzums skrimšļaudos statistiski ticami neatšķīrās starp pētījuma un kontroles grupām.

2.2.16. Wnt3a

Wnt3a klātbūtne netika konstatēta visiem kontroles grupas pacientiem. Kopumā kontroles grupas kaulaudos tika novēroti reti (0/+) Wnt3a pozitīvi osteocīti.

Wnt3a klātbūtne tika konstatēta visos pirmo reizi operēto šķeltnes pacientu kaulaudos. Tā variēja robežās no reti (0/+) līdz vidēji daudz (++) (skatīt 3.31. attēlu). Kopumā pirmo reizi operēto šķeltnes pacientu kaulaudos Wnt3a pozitīvie osteocīti tika novēroti maz (+).

Wnt3a klātbūtne netika novērota visos atkārtoti operēto šķeltnes pacientu kaulaudos. Tā variēja no nav redzamu struktūru redzes laukā (0) līdz daudz (+++) pozitīvo struktūru redzes laukā. Kopumā atkārtoti operēto šķeltnes pacientu kaulaudos Wnt3a pozitīvie osteocīti tika novēroti maz (+).



2.31. attēls. **Reti (0/+) Wnt3a pozitīvi osteocīti 8 gadus un 11 mēnešu veca pirmo reizi operēta šķeltnes skarta pacienta kaulaudos**

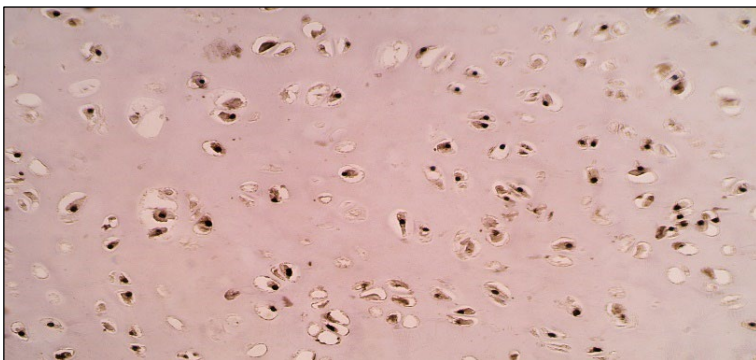
Wnt3a IMH, × 200

Statistikas dati. Vidējais imūnhistoķīmiski noteikto Wnt3a pozitīvo osteocītu relatīvais daudzums kaulaudos statistiski ticami neatšķirās starp pētījuma un kontroles grupām.

Wnt3a klātbūtne tika konstatēta visos kontroles grupas pacientu skrimšļaudos. Wnt3a atrade variēja no vidēji daudz (++) līdz daudz līdz ļoti daudz (+++/++++). Kopumā kontroles grupas skrimšļaudos Wnt3a pozitīvo hondrocītu bija vidēji daudz līdz daudz (++/+++).

Wnt3a tika novērota visos pirmo reizi operēto pacientu skrimšļaudos. Tās relatīvais daudzums variēja no maz (+) līdz ļoti daudz (++++). Kopumā pirmo reizi operēto pacientu skrimšļaudos Wnt3a pozitīvie hondrocīti tika novēroti daudz (+++) (skatīt 2.32. attēlu).

Wnt3a bija novērota visos atkārtoti operēto šķeltņu pacientu skrimšļaudos. Tās daudzums variēja no vidēji daudz (++) līdz ļoti daudz (++++). Kopumā atkārtoti operēto šķeltņu pacientu skrimšļaudos Wnt3a pozitīvie hondrocīti tika novēroti daudz (+++).



2.32. attēls. **Daudz (+++) Wnt3a pozitīvu hondrocītu 6 gadus un 7 mēnešus veca šķeltnes skarta pirmo reizi operēta pacienta skrimšļaudos**
Wnt3a IMH, $\times 400$

Statistikas dati. Šī faktora gadījumā statistiski nozīmīga atšķirība starp pirmo reizi un atkārtoti operētiem šķeltnes pacientu skrimšļaudiem netika konstatēta. Statistiski nozīmīga atšķirība starp kontroles grupu un abām šķeltnu skartu pacientu grupām ar Manna–Vitnija U testu arī netika konstatēta.

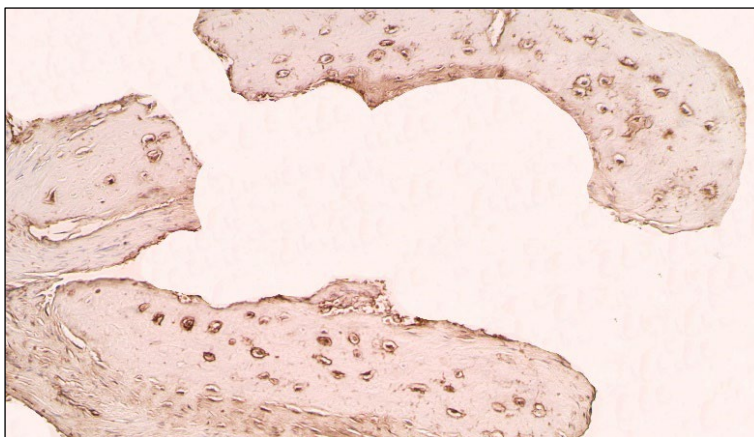
2.2.17. Apoptoze

Apoptotiskās šūnas tika novērotas visos kontroles grupas pacientu kaulaudos. Apoptozes pozitīvie osteocīti redzes laukā variēja robežās no maz (+) līdz daudz (+++). Kopumā kontroles grupas kaulaudos apoptotiski osteocīti tika novēroti vidēji daudz (++).

Apoptotiskie osteocīti tika novēroti visos pirmo reizi operēto šķeltnes pacientu kaulaudos. Apoptotisko osteocītu daudzums redzes laukā variēja no reti (0/+) līdz daudz (+++) (skatīt 2.33. attēlu). Kopumā pirmo reizi operēto šķeltnes pacientu kaulaudos apoptotiskie osteocīti tika novēroti maz līdz maz līdz vidēji daudz (+ līdz +/+++).

Apoptotiskās šūnas tika konstatētas visos atkārtoti operēto šķeltnes pacientu kaulaudos. To klātbūtne variēja no reti (0/+) līdz daudz (+++). Kopumā

atkārtoti operēto šķeltnes pacientu kaulaudos apoptozes pozitīvie osteocīti tika konstatēti maz līdz vidēji daudz (+/++).



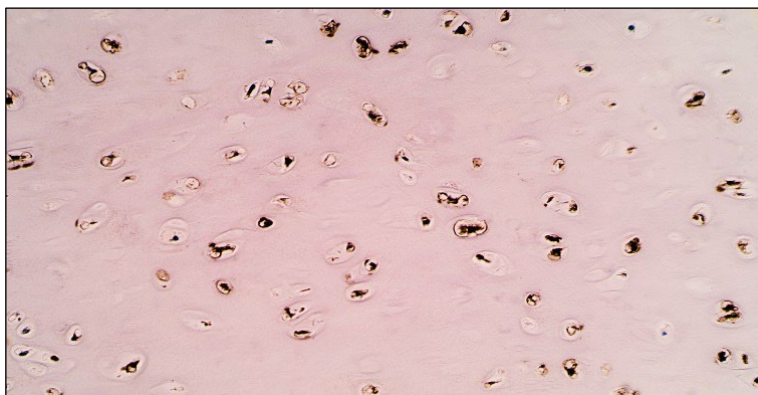
2.33. attēls. Daudz (+++) apoptozes pozitīvu osteocītu 8 gadus un 1 mēneša veca šķeltnes skarta pirmo reizi operēta pacienta kaulaudos
TUNEL, × 200

Statistikas dati. Apoptozes gadījumā statistiski nozīmīga atšķirība starp pirmo reizi operētiem šķeltnes pacientu kaulaudiem un atkārtoti operētiem šķeltnes pacientu kaulaudiem netika konstatēta. **Statistiski nozīmīga atšķirība tika konstatēta gan starp kontroles grupu un pirmo reizi operēto šķeltnes pacientu grupu ($U = 33,00$; $p = 0,013$), gan starp atkārtoti operēto šķeltnes pacientu grupu un kontroles grupu ($U = 37,50$; $p = 0,001$).** Tas nozīmēja, ka šķeltnes skartu pacientu kaulaudos gan pēc pirmās, gan atkārtotās balstaudu operācijas bija ievērojami mazāk apoptozes pozitīvu osteocītu nekā kontroles grupā.

Apoptotiskās šūnas novēroja visos kontroles grupas pacientu skrimšļaudos. Apoptozes pozitīvo hondrocītu relatīvā daudzuma rezultāti variēja no vidēji daudz (++) līdz daudz līdz ļoti daudz (+++/++++). Kopumā kontroles grupas skrimšļaudos apoptozes pozitīvie hondrocīti tika novēroti vidēji daudz līdz daudz (+/+++).

Apoptotiskās šūnas tika novērotas visos pirmo reizi operēto pacientu skrimšļaudos. Apoptozes pozitīvo hondrocītu daudzums variēja no maz līdz vidēji daudz (+/++) līdz ļoti daudz (++++). Kopumā pirmo reizi operēto pacientu skrimšļaudos apoptozes pozitīvie hondrocīti tika konstatēti vidēji daudz līdz daudz (+/++) (skatīt 2.34. attēlu).

Apoptotiskās šūnas tika novērotas visos atkārtoti operēto šķeltņu pacientu skrimšļaudos. To rezultāti variēja no vidēji daudz (++) līdz daudz (+++). Kopumā atkārtoti operēto šķeltņu pacientu skrimšļaudos apoptozes pozitīvie hondrocīti tika novēroti vidēji daudz (++).



2.34. attēls. **Vidēji daudz līdz daudz (+/++) apoptozes pozitīvu hondrocītu 7 gadus veca šķeltnes skarta pirmo reizi operēta pacienta skrimšļaudos**
TUNEL, × 400

Statistikas dati. Tika atklāta **statistiski nozīmīga atšķirība apoptozes pozitīvos hondrocītos starp pirmo reizi operētiem šķeltnes pacientu skrimšļaudiem un atkārtoti operētiem šķeltnes pacientu skrimšļaudiem**. Tas nozīmē, ka apoptozes pozitīvie hondrocīti ir pārliecinošā vairākumā pirmo reizi operēto šķeltnes pacientu skrimšļaudos ($U = 107,50$; $p = 0,021$). Tāpat **statistiski nozīmīgi vairāk apoptozes pozitīvos hondrocītus novēroja**

kontroles grupā, salīdzinot ar atkārtoti operēto šķeltnes skartu pacientu skrimšļaudiem ($U = 63,00$; $p = 0,016$). Statistiski nozīmīga atšķirība starp kontroles grupu un pirmo reizi operēto šķeltņu skartu pacientu grupu ar Manna–Vitnija U testu netika konstatēta.

2.3. Imūnhistoķīmiski noteikto marķieru savstarpējo korelāciju izvērtēšanas dati pirmo reizi un atkārtoti operēto šķeltnes pacientu kaulaudos

Tika konstatētas 16 ciešas un 38 vidēji ciešas, pozitīvas korelācijas pirmo reizi operēto šķeltnes pacientu kaulaudos. No statistiski nozīmīgām, ciešām, pozitīvām korelācijām tās visbiežāk tika konstatētas ar TIMP-2, BMP-2/4, IL-10 un Wnt3a. MMP-8, MMP-9, bFGF, IL-1 α , HBD-3 un apoptozei statistiski nozīmīgas, ciešas, pozitīvas korelācijas netika konstatētas. No statistiski nozīmīgām, vidēji ciešām, pozitīvām korelācijām tās visbiežāk tika konstatētas ar bFGF, HBD-2, IL-1 α un OPN. Vismazākais daudzums statistiski nozīmīgu, vidēji ciešu, pozitīvu korelāciju tika konstatēts ar MMP-9, Runx2 un Wnt3a.

Atkārtoti operēto šķeltnes pacientu kaulaudos tika konstatētas 52 ciešas un 70 vidēji ciešas, pozitīvas korelācijas. No statistiski nozīmīgām, ciešām, pozitīvām korelācijām tās visbiežāk tika konstatētas ar bFGF, HBD-2 un IL-10. Vismazāk korelāciju tika konstatētas ar TIMP-2 un MMP-2. Runx2 statistiski nozīmīgas, ciešas, pozitīvas korelācijas netika konstatētas. No statistiski nozīmīgām, vidēji ciešām, pozitīvām korelācijām tās visbiežāk tika konstatētas ar MMP-8, IL-1 α un Runx2. Vismazāk statistiski nozīmīgu, vidēji ciešu, pozitīvu korelāciju tika konstatēts ar MMP-9 un OPG.

2.4. Imūnhistoķīmiski noteikto marķieru savstarpējo korelāciju izvērtēšanas dati pirmo reizi un atkārtoti operēto šķeltnes pacientu skrimšļaudos

Pirmo reizi operēto šķeltnes pacientu skrimšļaudos tika konstatētas 42 ciešas un 24 vidēji ciešas, pozitīvas korelācijas. No statistiski nozīmīgām,

ciešām, pozitīvām korelācijām tās visbiežāk tika konstatētas ar BMP-2/4, bFGF un IL-1 α . MMP-2, MMP-9, Runx2 un apoptozei statistiski nozīmīgas, ciešas, pozitīvas korelācijas netika konstatētas. No statistiski nozīmīgām, vidēji ciešām, pozitīvām korelācijām tās visbiežāk tika konstatētas ar HBD-3 un OPN. Vismazākais daudzums statistiski nozīmīgu, vidēji ciešu, pozitīvu korelāciju tika konstatēts ar bFGF, MMP-2, MMP-8, BMP-2/4, HBD-2 un apoptozi. Runx2 statistiski nozīmīgas, ciešas, pozitīvas korelācijas pirmo reizi operēto šķeltnes pacientu skrimšļaudos netika konstatētas.

Atkārtoti operēto šķeltnes pacientu skrimšļaudos tika konstatētas 7 ciešas un 42 vidēji ciešas, pozitīvas korelācijas. No statistiski nozīmīgām, ciešām, pozitīvām korelācijām tās visbiežāk tika konstatētas ar TGF β 1 un IL-10. Vismazāk korelāciju tika konstatētas ar BMP-2/4, OPG un HBD-3. No statistiski nozīmīgām, vidēji ciešām, pozitīvām korelācijām tās visbiežāk tika konstatētas ar MMP-2 un IL-1 α . Vismazāk statistiski nozīmīgu, vidēji ciešu, pozitīvu korelāciju tika konstatēts ar TIMP-2, Runx2 un apoptozi.

3. Diskusija

Pasaulē daudzviet tiek veikti pētījumi sejas šķeltņu skartu pacientu populācijā, tomēr nav daudz pētījumu, kur būtu apskatīti tieši šķeltnes skarti balstaudi (kaulaudi un skrimšļaudi). Šo pētījumu unikālu padara tas, ka balstaudi un to izmaiņas pirmo reizi tika apskatīti gan pēc pirmreizējas, gan atkārtotas to operācijas. Tāpat pasaulē nav daudz visaptverošu datu par dažādu audu faktoru un apoptozes sadalījuma imūnhistoķīmiskajiem datiem šķeltnes skartu pacientu balstaudos. Mūsu pētījumā tika izvērtēts OC, OPN, OPG, BMP-2/4, bFGF, TGFβ1, MMP-2, MMP-8, MMP-9, TIMP-2, IL-1α, IL-10, HBD-2, HBD-3, Runx2, Wnt3a un apoptozes pozitīvo osteocītu un hondrocītu relatīvais daudzums šķeltnes skartos balstaudos gan pēc to pirmreizējas, gan plānveida atkārtotas operācijas.

Kopumā cieto audu morfoloģiskā atrade šķeltnes skartiem pacientiem atbilda vispārpieņemtajai normai. Tomēr šķeltnes skartu pacientu kaulaudos tika novēroti dažādu izmēru osteoni, to caururbējkanāli bija pildīti ar saistaudiem, kas varētu liecināt par izmaiņām kaula vaskularizācijā un inervācijā. Kaulaudu plātnītes bija neviendabīga krāsojuma un neregulāra izmēra, kas varētu norādīt uz izmaiņām kaula izturībā. Šķeltnes skartu pacientu skrimšļaudos tika novērotas visas skrimšļa zonas, kā arī tie atbilda vispārpieņemtajai morfoloģiskajai normai.

OC ir proteīns, ko galvenokārt ekspresē osteoblasti. Tas ir specifisks, nekolagēns ECM proteīns, ko kontrolē Runx2/Cbfa1 transkripcijas faktors (Oury and Oury, 2018). OC atrodas kortikālā kaula blīvi mineralizētajā rajonā (Weinreb et al., 1990). Tas regulē kaulu remodelāciju, modulējot osteoblastu un osteoklastu aktivitāti, kā arī ir kaulu mineralizācijas faktors, kuram ir nozīme kalcija vielmaiņā (Zhang, 2023).

Mūsu pētījuma grupās iegūtie rezultāti liecināja par OC klātbūtni visos kaulu un skrimšļu audos. Kaulaudu un skrimšļaudu kontroles grupā tika konstatēts daudz OC pozitīvo osteocītu un hondrocītu. Tomēr tika novērotas

statistiski nozīmīgas atšķirības starp pirmo reizi operētiem un atkārtoti operētiem šķeltnes pacientu kaulaudiem salīdzinājumā ar kontroles grupu, kur šķeltnes skartajos kaulaudos tika konstatēts mazāks OC pozitīvo osteocītu daudzums. Tā kā OC tiek uzskatīts par vienu no faktoriem, kas ietekmē kaulu augšanu un atjaunošanos, tā daudzums varētu atspoguļot osteoblastu aktivitātes pakāpi un kaulu metabolisma raksturu (Cundy et al., 2014), kur tā trūkums var izraisīt ievērojamu samazinājumu kaula izturībā un kolagēna šķiedru pareizā novietojumā kaulā (Yildirim et al., 2023).

Agrākie pētījumi ar OC deficīta pelēm parādīja, ka OC funkcijas zuduma rezultātā tiek kavēta kaulu resorbcija un nomākta osteoklastu ģenēze. Šī procesa rezultātā kaula masa palielinājās bez ietekmes uz mineralizācijas procesu (Ducy et al., 1996; Boskey et al., 1998). Tomēr tālākie pētījumi pierādīja, ka OC nav ietekmes uz kaula veidošanos vai tā masu, bet gan tam ir nozīme hidroksilapatīta kristālu novietojumā paralēli kolagēna šķiedrām (Moriishi et al., 2023). Šo kristālu izvietojuma traucējumi OC deficīta pelēm rada izmaiņas kaula minerālu sastāvā, kas ietekmē kaula struktūras integrāciju, padarot to par nozīmīgu faktoru kaula mineralizācijas procesā (Diegel et al., 2020; Xu et al., 2023). Turklāt OC funkcijas zudums neietekmē kolagēna orientāciju. Tomēr OC deficīta pelēm kaulu stiprums bija samazināts (Manolagas, 2020). Mūsu pētījuma rezultātus varētu skaidrot ar šķeltnes skarto kaulaudu reducēto mineralizācijas potenciālu, kas, iespējams, liecina par kaula mehānisko īpašību zudumu un līdz ar to labilām pārmaiņām ķirurģiskās iejaukšanās laikā (Monir, 2010).

OC var atrast arī hondrocītos. OC saturoši hondrocīti līdztekus skrimšļa ECM mineralizācijai piedalās šajā procesā (Farnum and Wilsman, 1987). OC ekspresija hondrocītos norāda uz hondrocītu diferenciāciju hipertrofiskā fenotipā, kas pēc traumas ir fizioloģisks un nepieciešams process ar sekojošu skrimšļa mineralizāciju (Pullig et al., 2000).

Mūsu pētītajās skrimšļaudu šķeltņes grupās, tāpat kā kontroles grupā, tika konstatēts daudz OC pozitīvo hondrocītu bez statistiski nozīmīgas atšķirības starp grupām. To varētu skaidrot ar skrimšļaudu labāku mehāniskās izturības spēju, salīdzinot ar kaulaudiem gan pēc pirmreizējas, gan atkārtotas ķirurģiskas iejaukšanās, jo šī spēja būtiski neatšķiras no veselīem audiem.

OPN ir fosfoproteīns, kuru var atrast mineralizēto audu ECM. OPN saistās ar kalciju un nodrošina sākotnējo mineralizāciju (Botham and Murray, 2018). To izdala daudzi šūnu veidi, piemēram, osteoklasti, hondrocīti, makrofāgi, limfocīti, epitēlija šūnas un asinsvadu gludās muskulatūras šūnas (Denhardt et al., 1998). Turklāt OPN ir saistīts ar kaulu remodelāciju un minerālo blīvumu, kas ietekmē kaula veidošanos (Cho et al., 2013).

Mūsu pētījumā atšķirība OPN pozitīvo osteocītu daudzumā tika konstatēta starp kontroles grupu un abām šķeltņes skarto pacientu grupām. Pozitīvo OPN osteocītu relatīvais daudzums šķeltņes skartajos audos bija mazs, bet kontroles grupā tas bija vēl mazāks. OPN pozitīvo šūnu statistiski ticami bija vairāk arī abās šķeltņes skartu skrimšļaudu grupās salīdzinājumā ar kontroles grupu. Tomēr, salīdzinot ar kaulaudiem, OPN pozitīvo struktūru daudzums skrimšļaudos bija lielāks. Atklāts, ka augstāks OPN līmenis ir novērots audos ar zemu kaula blīvumu, kas var būt saistīts ar lūzumu veidošanos (Fodor et al., 2013; Vancea et al., 2021), progresējošu locītavu bojājumu, (Martinez-Calleja et al., 2014), skrimšļa deģenerāciju un kaula remodelāciju (Lin et al., 2022). Mūsu pētījuma datus konstatētās atšķirības starp šķeltņes skartiem balstaudiem un kontroles grupu balstaudiem varētu liecināt par palielinātu kaula un skrimšļa homeostāzi uz samazināta mineralizācijas procesa fona. Tas varētu liecināt par iespējamu šķeltņes skartu kaulaudu un skrimšļaudu kompensatoru reakciju uz traumas ietekmi.

2021. gada pētījumā pierādīja, ka, inhibējot OPN un iekaisuma citokīnus, tiek aizkavēta OA tālāka attīstība (Li et al., 2021). Tāpat tika novērots, ka

paaugstinātos OPN un MMP-9 līmeņus OA gadījumā stimulē citokīni IL-1 un IL-6 (Slovacek et al., 2020). Šie dati sakrīt arī ar mūsu pētījuma rezultātiem, kur šķeltnes skartu kaulaudu grupās tika atrastas vidēji ciešas, pozitīvas korelācijas gan pirmo reizi operētos šķeltnes pacientu kaulaudos starp OPN un MMP-9 un starp OPN un IL-1 α , gan atkārtoti operēto šķeltnes pacientu kaulaudos starp OPN un MMP-9 un OPN un IL1 α . Šķeltnes skartos skrimšļaudos pēc pirmreizējās operācijas OPN uzrādīja vidēji ciešu, pozitīvu korelāciju ar IL-1 α , bet pēc atkārtotās operācijas ar IL-1 α un MMP-9. Šie dati varētu liecināt par palielinātām kaula un skrimšļa remodelācijas spējām pacientiem ar šķeltņi.

OPG ir galvenais osteoklastu ģenēzes modulators, zināms arī kā osteoklastu terminālas diferenciacijas un aktivācijas inhibitors (Hsu et al., 2006). OPG izdala osteoblasti un osteocīti. Tas mijiedarbojas ar kodolfaktora κ B liganda (RANKL) receptora aktivatoru, kavējot RANKL saistīšanos ar RANK, un tādējādi veicina osteoklastoģenēzi un kavē kaulu resorbciju (Kwan et al., 2008; Nakashima et al., 2011).

Analizējot OPG atradi, nenovērojām statistiski ticamas atšķirības starp pētījuma grupām. Tomēr, salīdzinot ar kaulaudiem, OPG relatīvais daudzums lielāks bija skrimšļaudos. Lielāka OPG daudzuma klātesamība varētu būt skrimšļaudus pasargājošs process, jo ar paaugstinātu OPG līmeni samazinās osteoklastu aktivitāte, kas varētu nodrošināt mazāku skrimšļaudu bojājumu. Šķeltnes skartos skrimšļaudos ciešas, pozitīvas korelācijas tika novērotas ar bFGF un TGF β 1, kas varētu norādīt uz palielinātu skrimšļa audu proliferācijas procesu. Ir pierādījumi, ka endogēnais OPG aizsargā no skrimšļa degradācijas OA gadījumā (Shimizu et al., 2007). Tomēr pretēji šim Takegami et al. atklāja, ka OPG var piedalīties arī skrimšļa deģenerācijas progresēšanā, ko novēro iekaisušos intravertebrālos diskos (Takegami et al., 2017). Savukārt 2019. gada pētījumā pierādīts, ka OPG/RANKL mazināšanās skrimslī izraisa hondrocītu apoptozi un ECM zudumu caur MMP aktivācijas mehānismu (Kovacs et al., 2019).

OPG pasargā kaulu no pārmērīgas resorbcijas, saistoties ar RANKL un neļaujot tam piesaistīties RANK. Tādējādi RANKL un OPG relatīvā koncentrācija kaulos ir nozīmīgs kaulu masas un stipruma noteicošais faktors (Boyce et al., 2008). Mūsu pētījuma zemais OPG relatīvais daudzums kaulaudos, kā arī ciešas, pozitīvas korelācijas ar apoptozi varētu norādīt uz palielinātu kaulu resorbciju un kaulu masas samazināšanos šķeltnes skartos kaulaudos, kas, iespējams, varētu būt slikta prognoze kaulaudu dzišanai un reģenerācijai pēc ķirurģiskas iejaukšanās.

Visas dzīves laikā kaula remodelācija ir nepārtraukts process. To nodrošina balanss starp osteoblastiem, kuri ir svarīgi kaula veidošanās procesā, un osteoklastiem, kuriem ir nozīme kaula resorbcijas procesā (Huntley et al., 2019). **BMP-2/4** ir augšanas faktors, kurš pieder pie TGFβ klases. Tas ir spēcīgs osteoģenēzes un hondroģenēzes stimulators ar ietekmi uz osteoblastu veidošanos un aktivāciju (Capulli et al., 2014; Wu et al; 2016).

Mūsu iegūtie rezultāti atklāja BMP-2/4 ekspresiju visos kaula un skrimšļa audos, kas pamato tā būtisko lomu kaulu un skrimšļu homeostāzes uzturēšanā. Pirmo reizi operētajos šķeltnes pacientu kaulaudos BMP-2/4 pozitīvie osteocīti bija sastopami statistiski ticami mazākā daudzumā nekā kontroles grupā. Tas varētu norādīt uz to, ka šķeltnes defektam ir ietekme uz BMP-2/4 ekspresiju vai aktivitāti kaulaudos. Tāpat šie dati varētu liecināt, ka šiem pacientiem kaula reģenerācija un veiksmīga brūču dzišana ir traucēta. Līdzīgi dati ir arī citos pētījumos, kur BMP trūkums izraisīja osteopēniju un samazināja kaula veidošanos (Devlin et al., 2003; Medici et al., 2006). Tomēr, lai arī BMP-2/4 pozitīvos osteocītus vairāk novēroja atkārtoti operēto pacientu kaulaudos, nekā pirmo reizi operēto pacientu kaulaudos, statistiski ticama atšķirība starp grupām netika konstatēta. Tas varētu liecināt par to, ka pati ķirurģiskā iejaukšanās tik būtiski neietekmē BMP-2/4 līmeni, cik to ietekmē šķeltnes defekts. Citi pētījumi liecina par to, ka BMP līmenis palielinās kaula resorbcijas gadījumā, veicinot

osteoblastu ģenēzi un jauna kaula veidošanos (Charles et al., 2014), kā arī kaula lūzuma vietā traumas gadījumā (Spector et al., 2001). Šie rezultāti sakrīt ar mūsu pētījumā iegūtajiem datiem, ka BMP-2/4 līmenis šķeltnes skartos kaulaudos pēc to atkārtotas operācijas tomēr palielinās, iespējams, atkārtotas traumas ietekmē.

Šķeltnes skartu pacientu grupām novēroja lielāku BMP-2/4 pozitīvo hondrocītu daudzumu nekā kontroles grupai, bet statistiski ticama atšķirība tika novērota tikai starp atkārtoti operētajiem šķeltnes pacientiem un kontroles grupu. BMP ir labi zināma loma hondroģenēzē, veicinot hondrocītu proliferāciju, diferenciaciju un nobriešanu (Chen et al., 1997). BMP-2/4 palielināta ekspresija šķeltnes pacientu skrimšļaudos liecina par tā aktīvu lomu reģenerācijas procesā pēc operācijas, kas varētu būt kā kompensējošs mehānisms pēc ķirurģiskas traumas. Tas sakrīt ar 2006. gada pētījuma datiem, kad lūzuma apstākļos BMP stimulēja skrimšļa reģenerāciju (Kuo et al., 2006). Skrimšļaudu palielinātais BMP-2/4 daudzums, salīdzinot ar kaulaudiem, varētu liecināt par skrimšļaudu pārāku reģenerācijas un dzīšanas potenciālu par kaulaudiem.

BMP-2/4 gan kaulaudu, gan skrimšļaudu grupās uzrādīja pozitīvas korelācijas ar TIMP-2, HBD, IL-10 un Wnt3a, kas varētu liecināt par saglabātām kaula un skrimšļa reģenerācijas un plasticitātes, kā arī brūču dzīšanas spējām šķeltnes skartos audos.

Noslēgumā jāsecina, ka mūsu pētījums sniedz vērtīgu ieskatu BMP-2/4 daudzuma atradē kaulu un skrimšļu audos pacientiem ar aukslēju šķeltni un kontroles grupām. Lai gan precīzi mehānismi, kas nosaka šo atradi, vēl ir jānoskaidro, mūsu atklājumi uzsver BMP-2/4 nozīmi reģenerācijas procesos pēc aukslēju remodelācijas. Vienlaikus šie dati uzsver BMP-2/4 potenciālo terapeitisko vērtību, ko varētu izmantot, lai uzlabotu audu atjaunošanos un ķirurģiskās ārstēšanas rezultātus pacientiem ar aukslēju škeltni.

bFGF ir būtiska nozīme kaulu un skrimšļu audu attīstībā un reģenerācijā. Tas piedalās daudzos bioloģiskos procesos, tostarp embrionālajā attīstībā, šūnu

augšanā, morfoģenēzē, brūču dzišanā un audu atjaunošanā, stimulējot jaunu asinsvadu veidošanos (Presta et al., 2018; Zhang X et al., 2018). bFGF stimulē to osteogēno šūnu diferenciaciju un proliferāciju, kurām ir nozīme kaulu matricas veidošanā un mineralizācijā (Du et al., 2017). bFGF ir viens no plašāk pētītajiem faktoriem saistībā ar brūču dzišanu (Guo et al., 2006; Yang et al., 2004). Caur citu augšanas faktoru, kā TGFβ un BMP, palielināšanu bFGF stimulē arī hondrocītu proliferāciju un ECM sintēzi skrimšļaudos, tostarp paātrinot skrimšļa reparāciju (Li et al., 2013). Tādējādi bFGF līmeņa izmaiņas potenciāli varētu ietekmēt kaulu un skrimšļu homeostāzi un integritāti.

Mūsu pētījumā bFGF klātbūtne tika konstatēta visās pētījuma grupās. Pētījuma grupās iegūtie dati liecina, ka osteocītos konstatētais bFGF relatīvais daudzums bija mazāks nekā hondrocītos. Tikmēr šķeltnes skartos kaulaudos bFGF relatīvais daudzums bija mazāks nekā kontroles kaulaudos, tomēr bez statistiski ticamas atšķirības starp grupām. Tā kā bFGF ir nepieciešams kaula remodelācijā agrīnos kaulaudu dzišanas procesos (Kawaguchi et al., 2007; Ueno et al., 2011), iespējams, ka šķeltnes skartiem kaulaudiem, salīdzinot ar veselīgiem kaulaudiem, ir mazāks audu dzišanas potenciāls.

Pētījuma šķeltnes skartos skrimšļaudos bFGF relatīvais daudzums bija augstāks, salīdzinot ar kontroles grupu, bez statistiski ticamas atšķirības starp grupām. Palielināts bFGF pozitīvo hondrocītu skaits šķeltnes skartu pacientu skrimšļaudos varētu liecināt par ķirurģiskas iejaukšanās ietekmi uz notiekošu audu dzišanas vai remodelācijas procesu. Paaugstinātu bFGF klātbūtni hondrocītos potenciāli varētu uzskatīt par pozitīvu ietekmi, jo tas norādītu uz aktīvāku šķeltnes skartu skrimšļaudu reģeneratīvo procesu un atjaunošanos pēc ķirurģiskās iejaukšanās (Everts et al., 2020).

Statistiskā datu analīze liecina, ka nav būtisku atšķirību starp bFGF relatīvo daudzumu pirmo reizi un atkārtoti operētajiem šķeltņu pacientiem. Tas varētu nozīmēt, ka ķirurģiskā iejaukšanās neatkarīgi no tā, vai tā ir pirmreizēja

vai atkārtota, varētu izraisīt vienādu bFGF izdali. Tomēr, salīdzinot šķeltnes skarto pacientu grupas ar kontroles grupām, bFGF izdalē tika konstatētas atšķirības. Tas varētu pamatot iespējami atšķirīgo bFGF lomu audu reģenerācijā un atjaunošanā pēc operācijas starp kaulaudu un skrimšļaudu grupām.

TGFβ ir pluripotentu citokīnu saime, kas sastāv no trim izoformām – TGFβ1, TGFβ2 un TGFβ3 – ar TGFβ1 kā dominējošo augšanas faktoru brūču dzīšanas procesā. Pēc akūta traumatiska procesa TGFβ1 regulē un izdala keratinocīti, trombocīti, fibroblasti un makrofāgi. Tas ir būtisks augšanas faktors iekaisuma procesa ierosināšanai un granulācijas audu veidošanai (Barrientos et al., 2008). TGFβ1 piedalās arī angiogēnēzes procesā, regulējot asinsvadu endotēlija augšanas faktoru izdali un veicinot keratinocītu migrāciju brūces slēgšanas laikā (Yang et al., 2007). TGFβ1 ir nozīmīgs augšanas faktors kaulu veidošanās un remodelācijas procesā, un pētījumi liecina, ka TGFβ var stimulēt agrīnu osteoblastu diferenciāciju, vienlaikus kavējot vēlīno osteoblastu diferenciāciju osteocītos (Tang and Allison, 2013).

Mūsu pētījumā netika atrasta statistiski nozīmīga atšķirība starp šķeltnes skartiem kaulaudiem un kontroles grupu, kur TGFβ1 tika konstatēts mazā daudzumā. Iespējams, ka salīdzinoši mazā TGFβ1 klātbūtne kaulaudos varēja ietekmēt šķeltnu skartu kaulaudu brūces dzīšanas procesu pēc ķirurģiskās iejaukšanās. Līdzīgi dati tika publicēti pētījumā, kur salīdzinoši mazais TGFβ daudzums tika atrasts hronisku nedzīstošu brūču epidermā (Pastar et al., 2010).

TGFβ ietekmē visu hondrocītu dzīves ciklu un veicina virkni šūnu reakciju, tostarp šūnu izdzīvošanu, proliferāciju, migrāciju un diferenciāciju. Tā kā TGFβ ir iesaistīts līdzsvara uzturēšanā starp hondrogēno diferenciāciju un hondrocītu hipertrofiju, tā regulējošā loma ir īpaši svarīga skrimšļa attīstībai. Skrimšļaudos tas var veicināt hondrocītu dzīvotspēju (Horner et al., 1998), ietekmēt hondrogēnēzi un palīdzēt atjaunot bojāto skrimslī (Choi et al., 2013; Yang et al., 2021). Mūsu pētījumā netika atklātas statistiski nozīmīgas atšķirības

starp šķeltnes skartiem skrimšļaudiem un kontroles grupu. Tomēr TGFβ1 relatīvais daudzums šeit bija lielāks nekā kaulaudos, kas varētu liecināt par skrimšļaudu labāku reģenerācijas spēju, salīdzinot ar kaulaudiem.

MMP-2, kas pazīstama arī kā A želatināze, galvenokārt ir atbildīga par IV un V tipa kolagēna noārdīšanu. MMP-2 ekspresija būtiski iesaistīta dažādos fizioloģiskos un patoloģiskos procesos, tostarp embriogēnēzē (Zhang et al., 2003), audu remodelācijā, brūču dzīšanā, iekaisuma procesā (Parks et al., 2004) un audzēju invāzijā (Deryugina and Ouigley, 2006).

Mūsu pētījuma un kontroles grupās iegūtie rezultāti liecināja par MMP-2 klātbūtni visos kaulu un skrimšļu audos. Pozitīvo osteocītu un hondrocītu daudzums variēja no retiem līdz daudz. Šādas atšķirības var skaidrot ar kaulu un skrimšļa audu iekšējo pārveides procesu, kas saistīts ar nepārtraukto pārbūves procesu.

MMP-2 pozitīvo osteocītu relatīvais daudzums mūsu pirmo reizi operētajiem pacientiem bija rets, kas nenorāda uz potenciāli atšķirīgu pārbūves procesu salīdzinājumā ar kontroles grupu, kur to daudzums arī statistiski ticami nebija lielāks. Interesanti, ka MMP-2 pozitīvo osteocītu relatīvais daudzums statistiski ticami atšķīrās starp pirmo reizi un atkārtoti operētiem šķeltnes pacientu kaulaudiem. Proti, atkārtoti operētajiem šķeltņu pacientiem bija vērojams būtisks MMP-2 pozitīvo osteocītu skaita pieaugums, kas varētu liecināt par pastiprinātu kaulu remodelāciju kā reakciju uz atkārtotu ķirurģisko iejaukšanos un turpmāko dzīšanas procesu. Līdzīgs MMP-2 pieaugums arī tika novērots pastiprinātas brūču dzīšanas laikā (Hsu et al., 2006). Tas liecina, ka pēc vairākkārtējām ķirurģiskām procedūrām kaulaudu remodelēšanas un atjaunošanās procesi var kļūt agresīvāki vai disregulētāki. Tāds pats secinājums tika izdarīts *Henriet* ar līdzautoriem 2019. gada pētījumā, kur palielināts MMP-2 līmenis saistījās ar sliktāku terapijas prognozi (Henriet et al., 2019). To apstiprina arī *Dutta* ar līdzautoriem, kuri parādīja, ka, palielinoties MMP-2 līmenim,

palielinās tā katalītiskā aktivitāte kaula ECM ar sekojošu osteoblastu disfunkciju un kaula destrukciju (Dutta et al., 2014).

Mūsu pētījumā MMP-2 pozitīvi korelēja ar TGFβ1, kas varētu norādīt uz pastiprinātu kaula remodelāciju un destrukciju, palielinot osteoklastu resorbīvo funkciju (Luis-Ravelo et al., 2014). Līdzīgus rezultātus novēro pelēm ar pastiprinātu TGFβ ekspresiju, kuru kaulu masa un izturība samazinās (Balooch et al., 2005). Angioģenēze ir nepieciešama, lai osteoģenēzes procesā veidotos jauns kauls. MMP-2 proteolītiskā darbība var atbrīvot un aktivēt ECM esošos vaskulāros augšanas faktoros, kā VEGF un bFGF (Cheng et al., 2007). Šādus datus mēs novērojām arī mūsu pētījumā, kur tika konstatēta vidēja, cieša, pozitīva korelācija ar bFGF, liecinot par angioģenēzes veidošanos un, potenciāli, osteoģenēzes procesa sākumu.

Līdzīgu MMP-2 tendenci atradām šķeltnes skartu pacientu skrimšļaudos, kur MMP-2 pozitīvo hondrocītu bija vairāk nekā kontroles grupā. Tas saskan ar teoriju, ka skrimslis, tāpat kā kauls, pastiprināti degradējas un remodelējas, reaģējot uz patoloģiskiem apstākļiem, ko vēl vairāk varētu pastiprināt ķirurģiskas iejaukšanās. Līdzīgi dati ir 2020. gada pētījumā, kur pacientiem ar atkārtotu ceļa meniska operāciju tika novērota MMP-2 daudzuma palielināšanās (Mull et al., 2020). Jāatzīmē, ka mūsu pētījumā netika novērotas būtiskas atšķirības starp pirmo reizi operēto un atkārtoti operēto šķeltnes pacientu skrimšļaudiem, kas, iespējams, liecina par mazāk izteiktu skrimšļa remodelācijas reakciju uz atkārtotu ķirurģisku iejaukšanos.

Tomēr mēs atklājām interesantus datus MMP-2 pozitīvo hondrocītu relatīvā daudzuma korelācijā ar audu faktoriem. Kamēr pirmo reizi operēto šķeltnes pacientu skrimšļaudu rezultāti pozitīvi korelēja tikai ar TIMP2, atkārtoti operēto šķeltnes pacientu skrimšļaudos tika novērotas MMP-2 vidēji ciešas, pozitīvas korelācijas ar TGFβ1, bFGF, IL-1α, IL-10 un HBD-3. Tas varētu liecināt par to, ka pirmo reizi operētajā skrimslī joprojām ir saglabāts līdzsvars

starp MMP un TIMP ekspresiju, tādējādi iespējams, ka nenotiek pastiprināta skrimšļa noārdīšanās (Tanigawa et al., 2005). Atkārtoti operēto šķeltnes pacientu skrimšļaudos novērotās pozitīvās korelācijas savukārt liecina par palielinātu imūnās funkcijas iesaisti, kā arī izteiktāku brūces dzīšanas procesu atkārtotas audu traumas rezultātā (Xie et al., 2020).

MMP-8, kas ir pazīstama arī kā neitrofilu kolagenāze, ir būtiska ECM sašķelšanā fizioloģiskos procesos, piemēram, embrionālajā attīstībā, reproduktīvajā procesā, audu remodelācijā, arī patoloģiskos procesos, piemēram, iekaisumā un onkoģenēzē (Visse et al., 2003; Zucker et al., 2000).

Literatūrā nav daudz datu par MMP-8 ietekmi uz kauliem un skrimšļiem pēc traumas. Vairāk MMP-8 ir aprakstīts saistībā ar dažādām mutes dobuma iekaisīgām slimībām, kuras var norītēt ar kaulu bojājumu, kad augstāki siekalu MMP-8 līmeņi korelēja ar lielāku alveolārā kaula bojājumu (Al-Majid et al., 2018; Gursoy et al., 2010). Pirmo reizi operēto šķeltnes pacientu grupā MMP-8 pozitīvo osteocītu relatīvais daudzums bija no retiem līdz daudz. No otras puses, MMP-8 ekspresija nebija novērojama visiem atkārtoti operētiem šķeltnu pacientiem. Šī atšķirība varētu liecināt, ka ķirurģiskā iejaukšanās ietekmē MMP-8 ekspresiju šķeltnes pacientu kaulaudos.

Atšķirība MMP-8 pozitīvo osteocītu daudzumā tika konstatēta starp kontroles grupu un atkārtoti operētajiem šķeltnes pacientiem. MMP-8 klātbūtne bija zemāka pirmo reizi operētajiem šķeltnes pacientiem salīdzinājumā ar kontroles grupu. Brūču dzīšanas procesā iekaisuma apstākļos neitrofilie leukocīti dodas uz brūces vietu, atbrīvojot MMP-8, kas ir nepieciešama brūces dzīšanas procesā. Samazināta MMP-8 ekspresija var izraisīt novēlotu brūces dzīšanu (Gutierrez-Fernandez et al., 2007). Tas liek domāt, ka MMP-8 līmeni potenciāli varētu ietekmēt ķirurģiskā iejaukšanās, jo šī degradācijas enzīma ekspresija pēc operācijas samazinās, norādot uz sliktāku brūces dzīšanu. Tomēr ir vērts atzīmēt,

ka starp pirmo reizi operētiem un atkārtoti operētiem šķeltnes pacientiem nebija statistiski nozīmīgas atšķirības MMP-8 pozitīvo osteocītu relatīvajā daudzumā.

Izvērtējot skrimšļaudus, MMP-8 tika konstatēts visos kontroles un šķeltnes skartu pacientu grupu paraugos, un tā pozitīvo struktūru daudzums visās grupās bija no daudz līdz ļoti daudz. MMP-8 intensīvāka ekspresija, salīdzinot ar kaulaudiem, varētu norādīt uz pastiprinātu skrimšļa remodelācijas procesu un varbūtēju skrimšļa degradācijas procesa intensīvāku norisi, kas sakrīt ar cita pētījuma datiem par skrimšļa bojājumu (Cole et al., 1996). Arī šajā gadījumā MMP-8 pozitīvo hondrocītu relatīvais daudzums neatšķīrās starp visām pētījuma grupām.

MMP-9, pazīstama arī kā želatināze B, galvenokārt noārda elastīnu, IV, V un XI tipa kolagēnus, kas ir būtiski audu un orgānu strukturālās integritātes uzturēšanā (Murphy, 2011). Interesanti, ka osteoklasti un trofoblasti agrīni ekspresē MMP-9, bet vēlāk to pārsvarā izdala iekaisuma šūnas (Vu and Werb, 2000). MMP-9 arī ir iesaistīts angiogēnēzes procesā, šūnu migrācijā uz brūces vietu, kā arī tās epitelizācijā. Tā izdali stimulē TGF β aktivācija (Salo et al., 1994), bet palielināta MMP-8 un MMP-9 ekspresija veicina sliktāku brūces dzīšanu (Chang et al., 2016).

Kontroles grupas pacientiem MMP-9 pozitīvie osteocīti tika novēroti visos paraugos. Pirmo reizi un atkārtoti operēto šķeltņu pacientu kaulos MMP-9 pozitīvie osteocīti tika novēroti kopumā mazākā skaitā nekā kontroles grupā, tomēr bez statistiski ticamas atšķirības. Iespējams, MMP-9 pozitīvo osteocītu relatīvais samazinājums kaulaudos salīdzinājumā ar MMP-9 pozitīvo hondrocītu daudzumu skrimšļaudos norāda uz to, ka kaulaudos brūču dzīšana varētu notikt intensīvāk nekā skrimšļaudos. 2011. gada pētījums parādīja, ka MMP-9 zudums uzlaboja kaula trabekulu blīvumu (Nyman et al., 2011). Līdz šim MMP-9 palielinātā ekspresija tika novērota iekaisuma un audzēja audos (Giraud et al., 2006), salīdzinot ar veselīgiem audiem (Yousef et al., 2014). Mūsu pacientiem,

iespējams, kaulaudos operācijas trauma nav bijusi pietiekami izteikta, lai provocētu intensīvu MMP-9 ekspresiju. Tomēr MMP-9 ir nepieciešams kaula attīstībai un dzīšanai, jo MMP-9 nulles pelēm tika novērota izmainīta osifikācija, kā arī novēlota kaula lūzumu sadzīšana (Colnot et al., 2003).

Skrimšļa mehāniskajai izturībai un remodelācijai ir būtiska regulēta kolagēna homeostāze, kam ir nepieciešama neizmainīta, līdzsvarota MMP ekspresija (Clark et al., 2008). Šo MMP balansu var izjaukt iekaisīgas saslimšanas (Burrage et al., 2006), mehānisks stress vai trauma. Pēdējie izraisa MMP, tostarp MMP-9, pieaugošu ekspresiju audos, kas noved pie izteiktākas skrimšļa ECM komponentu šķelšanas un skrimšļaudu degradācijas (Mixon et al., 2021). Mūsu pētījuma skrimšļaudos MMP-9 bija vairāk atrodams pacientiem ar šķeltni, nevis kontroles grupā. Būtiska atšķirība tika novērota starp kontroles grupu gan pirmo reizi, gan atkārtoti operēto šķeltnes pacientu grupās. Tas nozīmē, ka operācija var izraisīt pastiprinātu MMP-9 ekspresiju skrimšļos. Tāpat MMP-9 relatīvais daudzums šķeltnes skartos skrimšļaudos bija vidēji daudz līdz daudz, kas var papildus norādīt uz pastiprinātu ECM šķelšanu un audu bojājumu.

TIMP ir četru proteīnu grupa (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 un TIMP-4), kas inhibē aktivētu MMP aktivitāti (Lambert et al., 2004). MMP un TIMP līdzsvars ir ļoti svarīgs, lai nodrošinātu pareizu ECM funkcionēšanu un līdz ar to audu atjaunošanos un remodelāciju (Wang et al., 2020). TIMP-2 iedarbojas uz MMP-2, to inhibējot un regulējot tā aktivitāti (Bernardo et al., 2003). TIMP spēj inhibēt kaulu resorbciju, kas pati par sevi ir svarīgs fizioloģisks process kaulu augšanā, remodelācijā un brūču dzīšanā, bet pārlietu izteikta ir patoloģiju gadījumā (Katsunuma, 1997).

Analizējot TIMP-2 atradi, nenovērojām statistiski ticamas atšķirības starp pētījuma grupām. Tomēr TIMP-2 relatīvais daudzums lielāks bija skrimslī, salīdzinot ar kaulu. 2019. gada pētījumā tika atklāts, ka pilnīgs TIMP zudums izraisa palielinātu MMP aktivitāti un izmainītu osteoblastu proliferāciju,

mineralizāciju un ECM sintēzi. Osteoklastiem savukārt tika novērota paaugstināta aktivitāte. Visi šie faktori rada kaulu resorbciju un kaulu masas zudumu (Chen et al., 2019). Mūsu pētījuma kaulaudu MMP-2 relatīvā daudzuma atrade atkārtoti operētos šķeltnes skartos kaulos bija lielāka, salīdzinot ar pirmo reizi operētajiem šķeltnes skartu pacientu kaulaudiem, tikmēr TIMP-2 ekspresija statistiski ticami neatšķīrās starp pirmreizēji un atkārtoti operēto šķeltnes pacientu grupu. Līdz šim dati par mūsu pētītajiem audu faktoriem un to mijiedarbību šķeltnes skartos balstaudos pēc atkārtotas ķirurģiskas iejaukšanās nav publicēti. Tādēļ disbalanss MMP-2/TIMP-2 relatīvā daudzuma līdzsvarā varētu liecināt par palielinātu kaula ECM komponentu šķelšanu, degradāciju un iespējamu kaula integritātes ietekmēšanu atkārtotas audu traumas ietekmē.

TIMP-2 pozitīvo struktūru relatīvais daudzums skrimšļaudos bija lielāks nekā kaulaudos, kamēr salīdzinoši ar MMP-2 relatīvo daudzumu tas bija mazāks. Vairākos pētījumos ir konstatēts, ka skrimšļa traumas vai deģenerācijas ietekmē TIMP-2 ekspresijas izmaiņas nav tik izteiktas, salīdzinot ar citiem TIMP grupas pārstāvjiem (Asik et al., 2020; Zhang et al., 2018). Ir svarīgi atzīmēt, ka, neskatoties uz novērotajām TIMP-2 relatīvā daudzuma atšķirībām kaulaudos starp pētījuma grupām, TIMP-2 relatīvais daudzums neatšķīrās starp skrimšļaudu pētījuma grupām. Tas varētu liecināt, ka TIMP-2 loma skrimšļaudu ECM remodelācijā saglabājas nemainīga starp pētījuma grupām, lai gan ķirurģiskās iejaukšanās var ietekmēt TIMP-2 līmeni. Tāpat TIMP-2 atrade mūsu pētījumā statistiski nozīmīgi cieši korelēja ar MMP-2 pirmo reizi operētajiem šķeltnes pacientiem. Tomēr atkārtoti operētajiem šķeltnes pacientiem TIMP2 statistiski nozīmīgi vidēji cieši korelēja ar OPG, kas varētu norādīt uz OPG kā kompensatorā mehānisma lomu skrimšļa degradācijas inhibēšanā (Kadri et al., 2008). Tomēr izteiktāka MMP un TIMP ekspresija varētu norādīt uz aktīvāku ECM remodelāciju šķeltnes skartos skrimšļaudos, salīdzinot ar kaulaudiem, kā arī saglabātu līdzsvaru starp audu noārdīšanu un šī procesa nomākšanu.

IL-1 α ir spēcīgs iekaisumu veicinošais citokīns, kas piesaista neitrofilus un monocītus audu bojājuma vietā un aktivizē MMP. IL-1 α stimulē citu citokīnu, piemēram, IL-6 un TNF- α , veidošanos iekaisuma procesa laikā (Schett et al., 2016).

Kaulā IL-1 α pastiprina osteoklastoģenēzi, osteoklastu diferenciaciju un to aktivitāti kaulos, kas var izraisīt kaulu zudumu (Polzer et al., 2010). Ir pētīts, ka IL-1 α arī samazina OPG ekspresiju osteoblastos (Tanabe et al., 2005). Mūsu pētījumā netika atrastas statistiski ticamas atšķirības starp visām pētījuma grupām, tomēr skrimšļaudos IL-1 α tika konstatēts vairāk nekā kaulaudos. IL-1 α ir viens no svarīgākajiem iekaisuma veicinošajiem citokīniem, kas saistīts ar skrimšļa degradāciju. IL-1 α var izraisīt katabolisko mediatoru skaita pieaugumu hondrocītos, no kuriem lielākā daļa ir iesaistīti skrimšļa iznīcināšanā, ECM noārdīšanās procesa veicināšanā un hondrocītu apoptozē pēc traumatiska bojājuma (Conde et al., 2021). Iespējamā IL-1 α palielinātā klātbūtne mūsu pacientu skrimšļaudos varētu norādīt uz aktīvāku skrimšļa bojājuma procesu ar persistējošu iekaisuma klātbūtni un negatīvu ietekmi uz skrimšļa audu integritāti. Šo pieņēmumu netieši apstiprina citu autoru dati, proti, pārmērīga IL-1 α ekspresija izraisa artrīta attīstību, iznīcinot skrimšļus un kaulus, savukārt pelēm, kurām trūka IL-1 α receptoru, artrīts neattīstījās (Ji et al., 2002; Yi et al., 2018). Turklāt šie novērojumi sakrīt ar konstatējumu OA pacientiem, kur IL-1 α izdales aizture uzlaboja slimības simptomus (Chevalier et al., 2009). No otras puses, IL-1 α receptoru antagonista injekcija izraisīja samazinātu aktivēto osteoklastu skaitu, tādējādi izraisot zobu izšķīlšanās aizkavēšanos (Meng et al., 2020). Mūsu pētījumā gan zemais IL-1 α pozitīvo osteocītu skaits šķeltnes grupā, gan nekonstatētās atšķirības starp šķeltņu un kontroles grupām liecina, ka IL-1 α , iespējams, nav galvenais faktors šķeltnes patoģenēzē.

IL-10 ir pretiekaisuma citokīns, kurš kavē iekaisuma faktoru atbrīvošanu. T un B limfocīti izdala IL-10, kurš regulē osteoblastu diferenciaciju. Tāpat tas ir

gan osteoklastu, gan osteoblastu veidošanās inhibitors caur RANK/RANKL/OPG asi (Moore et al., 2001). IL-10 kavē osteoklastu diferenciāciju, palielinot OPG daudzumu (Liu et al., 2006).

Mūsu pētījuma dati parādīja, ka kaulaudos ir mazāks IL-10 pozitīvo osteocītu skaits, salīdzinot ar IL-10 pozitīvajiem hondrocītiem. Kaulaudu grupā pirmo reizi operētiem šķeltnes skartiem pacientiem IL-10 pozitīvu osteocītu skaits bija mazāks, nekā kontroles grupai, tomēr atkāroti operētajā šķeltnes skarto pacientu grupā IL-10 pozitīvo osteocītu daudzums neatšķīrās no kontroles un pirmo reizi operēto šķeltnes pacientu grupas. Pētījumi par IL-10 ietekmi uz kaulaudiem ir dažādi. Atklāts, ka paaugstināts IL-10 līmenis veicināja zobu pulpas cilmes šūnu osteogēnēzi, uzlabojot osteogēno diferenciāciju (Yuan et al., 2021), kamēr osteoporozes pacientiem IL-10 līmenis bija ievērojami zemāks, nekā veselīem cilvēkiem (Ma et al., 2021). Tāpat arī pelēm ar IL-10 deficītu bija samazināta kaulu masa, palielināts kaulu trauslums un kavēta to veidošanās (Dresner-Pollak et al., 2004). Yi et al. parādīja, ka palielināts IL-10 skaits samazināja osteoblastu apoptozi, kaula absorbciju un samazināja TNF-alfa sintēzi un izdalīšanos (Yi et al., 2018).

Iespējams, ka samazinātais IL-10 daudzums šķeltnes skartos audos varētu norādīt uz iekaisuma gaitas nelīdzsvarotību un traucējumiem kaulaudu homeostāzē, kas potenciāli varētu pasliktināt šķeltnes pacientu pēcoperācijas atveseļošanās procesu. Kaulaudi, iespējams, pastiprināti reaģē uz pirmo reizi veiktu ķirurģisku iejaukšanos, tomēr pēc atkārtotās operācijas notiek audu adaptēšanās un pretiekaisuma darbība atgriežas normas līmenī, tomēr šī ir tikai hipotēze, kas nākotnē būtu vēl jāpierāda.

Zināms, ka IL-10 skrimšļaudos stabilizē hondrogēno fenotipu pēc skrimšļaudu kompresijas un saglabā ECM integritāti (Behrendt et al., 2018). Turklāt IL-10 atjauno bojāto locītavu hondrocītu biosintētisko aktivitāti iekaisuma vidē un uzlabo proteoglikānu sintēzi (Jansen et al., 2008). Mūsu

pētījumā IL-10 relatīvais daudzums skrimšļaudos bija lielāks, nekā kaulaudos, kur šķeltnu skartu pacientu grupās statistiski ticami novēroja lielāku IL-10 daudzumu nekā kontroles grupā.

Konstatējām, ka IL-10 pozitīvie hondrocīti veidoja spēcīgu, statistiski nozīmīgu pozitīvu korelāciju ar IL-1 α gan pirmreizējās operācijas grupā, gan atkārtotās operācijas šķeltnu grupā, kas, visticamāk, norāda uz kompensējošo pretiekaisuma aizsargmehānismu pacientu skrimšļos. Šie dati sakrīt ar Jin un līdzautoru 2013. gada pētījumu, kur pierādīja, ka iekaisuma citokīnu izdale stimulē IL-10 izdali imūnreakcijas regulēšanai un pārmērīga iekaisuma novēršanai (Jin et al., 2013). IL-10 varētu būt indikators kompensējošam pretiekaisuma aizsargmehānismam šķeltnes skartos skrimšļaudos, jo, papildus pievadīts IL-10 skrimslim, mākslīgi radītas traumas apstākļos uzlaboja hondrocītu diferenciāciju un skrimšļa ECM veidošanos (Behrendt et al., 2018).

HBD ir īpaši proteīni jeb pretmikrobu peptīdi, kas ir daļa no imūnās sistēmas. Tie var mainīt imūno reakciju un ir iesaistīti aizsardzībā pret patogēniem, piesaistot imūnās sistēmas šūnas un modulējot to funkcijas (Fruitwala, et al., 2019). HBD pretmikrobu mehānisms darbojas caur šūnas iznīcināšanu osmolīzes ceļā (Hoover et al., 2003). Visbiežāk HBD atrodas gļotādās, ādā un ķermeņa daļās, kurām ir saskarsme ar potenciāli kaitīgām vielām (Ghosh et al., 2019). Kaulos un skrimšļos HBD izdala stimulējas pēc iekaisuma un audu reģenerācijas procesā. Lai kaulu defekts tiktu labots, osteogēnēze ir būtisks kaula atjaunošanas procesa aspekts. Pierādīts, ka HBD-2 uzlabo osteogēnēzi, palielinot Runx2, OC un OPN ekspresiju *in vitro* (Peng et al., 2020). Mūsu pētījumā kaulaudos tika novērots mazāks HBD-2 un HBD-3 līmenis nekā skrimšļaudos. Kaulaudu infekcijas ir viens no galvenajiem neveiksmīgas kaulu transplantāta operācijas cēloņiem. Transplantātā iestrādātais HBD-2 kavē baktēriju augšanu, kā arī veicina osteogēno diferenciāciju un kaulu dzīšanu (Ren et al., 2021). Citā pētījumā pazeminātais HBD-2 līmenis cilvēka smaganu

epitēlijā tika norādīts kā iespējams periodonta slimības pastiprināšanās iemesls (Mahanonda et al., 2009). Savukārt HBD-3 mRNS ekspresija pēc žokļa osteonekrozes ārstēšanas bija palielināta, kas liecina, ka HBD varētu būt kaula patoloģiju ārstēšanas efektivitātes rādītājs (Thiel et al., 2020). Zemais IL-10, HBD-2 un HBD-3 un pozitīvo osteocītu relatīvais daudzums šķeltnes skartu pacientu kaulaudos varētu liecināt par tendenci uz samazinātu pretiekaisuma mehānismu un kaula atjaunošanos pēc primārās un atkārtotas ķirurģiskas iejaukšanās.

Tomēr HBD-2 nenovēroja statistiski ticamas atšķirības skrimšļaudu salīdzināmās grupās, bet HBD-3 abu šķeltnes grupu pacientiem tika novērots lielākā daudzumā nekā kontroles grupai. Nav daudz pētījumu, kuri parādītu palielināta HBD-3 ietekmi uz skrimšļaudiem, bet pētījumos par brūču dzīšanu, proti, pēc apstrādes ar HBD-3 brūces sadzija ātrāk un tajās bija palielināts fibroblastu un asinsvadu skaits (Takahashi et al., 2021). HBD-3 veidošanās var tikt inducēta arī bez baktēriju iedarbības. TNF- α un IL-1 ir spēcīgi HBD-3 induktori. HBD-3 aplikācija uz skrimšļiem rada palielinātu TIMP-1 un TIMP-2 produkciju. Tas varētu liecināt par HBD-3 daudzfunkcionālu spēju saistīt aizsardzības mehānismus un iekaisumu caur audu remodelācijas procesiem (Varoga et al., 2005). Uzskata, ka HBD-3 ir iesaistīts locītavu skrimšļa audu remodelācijas procesā, un, lai arī HBD-3 piemīt pretiekaisuma īpašības, tam ir pierādīta pozitīva korelācija ar iekaisuma procesu un iekaisumu veicinošiem citokīniem, kā TNF- α un IL-1 β (Mohammed et al., 2023).

Mūsu pētījuma rezultāti atklāj: lai arī HBD relatīvais daudzums bija lielāks skrimšļaudos nekā kaulaudos, kas varētu liecināt par skrimšļaudu labākām aizsardzības spējām pēc traumas, tomēr iespējams, ka palielinātā HBD-3 ekspresija izraisītu pastiprinātu imūnās sistēmas iesaisti, kas varētu būt pamats audu bojājumam. Tomēr palielinātais IL-10 relatīvais daudzums un neatrastās atšķirības IL-1 α relatīvajos daudzumos audos starp šķeltnes un

kontroles grupām pieļauj labākas skrimšļaudu antimikrobās un pretiekaisuma īpašības.

Runx2 pieder Runx ģēnu saimei un ir transkripcijas faktors. Tas ir nepieciešams pareizam osteoblastu šūnu izvietojumam (Dos Santos Pereira et al., 2017). Runx2 veicina kaulu veidošanos, mineralizāciju, osteoblastu proliferāciju un inducē mezenhimālo šūnu diferenciāciju nobriedušos osteoblastos līdz šī procesa pēdējai stadijai, kurā osteoblastu nobriešana tiek inhibēta (Komori, 2010). Tāpat Runx2 inducē daudzu hondrocītu hipertrofiju saistītus ģēnus un pozitīvi regulē hondrocītu hipertrofisko diferenciāciju un osifikāciju (Nagata et al., 2022).

Mūsu pētījumā netika atrastas atšķirības Runx2 pozitīvos hondrocītos un osteocītos starp pētījuma grupām. Tomēr kaulaudos Runx2 pozitīvie osteocīti tika novēroti reti, tikmēr Runx2 pozitīvie hondrocīti novēroti vidēji daudz. Tas, iespējams, varētu liecināt par problemātisku osteoblastu veidošanos un, iespējams, arī samazinātu kaula un skrimšļa mineralizācijas potenciālu. Līdzīgi rezultāti bija arī Qin et al. 2018. gada pētījumā, kur Runx2 funkciju izslēgšana negatīvi ietekmēja osteoblastu veidošanos, potenciāli izraisot zobu erupcijas traucējumus (Qin et al., 2018). Tādus pašus rezultātus ziņoja Stricker et al., kur nulles Runx2 vistu embrijiem novēroja endohondrālās osifikācijas samazināšanos, ko izraisīja kavēts hondrocītu nobriešanas process (Stricker et al., 2002).

Wnt3a ir signālmolekula, kas pieder pie Wnt ģēna proteīna ģimenes un ir iekļauta dažādos skeleta attīstības procesos, tostarp cilmes šūnu diferenciācijā un migrācijas procesos (Logan et al., 2004). Wnt3a ir spēcīgs kaulu reģenerācijas veicinātājs, jo uzlabo osteoblastu ģenēzi un tādējādi arī kaulu veidošanos. Turklāt ir zināms, ka Wnt kaulu resorbiciju ietekmē, samazinot osteoklastu aktivitāti, modulējot osteoklastu cilmes šūnu diferenciāciju un RANKL/OPG asi (Wang et al., 2018). Savukārt Wnt signālu ceļa inaktivācija izraisa osteopēniskus

stāvokļus (Wagner et al., 2020). Mūsu pētījumā netika konstatētas statistiski nozīmīgas atšķirības starp pētījuma grupām Wnt3a relatīvajā daudzumā. Tomēr kaulaudos tika novērots mazs Wnt3a pozitīvo osteocītu daudzums, kamēr skrimšļaudos konstatēts daudz Wnt3a pozitīvo hondrocītu.

Šie Wnt3a relatīvajā daudzuma rezultāti pamato reto Runx2 pozitīvo osteocītu klātbūtni kaulaudos, jo Wnt signālu ceļš izraisa endogēnu Runx2 gēna ekspresiju mezenhīmas šūnās, kas vēlāk piedalās kaulu veidošanā (Gaur et al., 2005). Ir pierādīta Wnt3a aplikāciju pozitīvā ietekme uz osteogēnēzi un angiogēnēzi kaulu bojājuma vietā (Wagner et al., 2020). Tādējādi Wnt3a nepietiekams daudzums kaulaudos varētu liecināt par sliktāku kaulu dzīšanu, kā arī tā saistība ar Runx2 varētu norādīt uz samazinātu mineralizācijas potenciālu šķeltnes skartos kaulaudos.

Jaunākie pētījumi liecina, ka Wnt3a var veicināt skrimšļa reģenerāciju un osteohondrālo defektu sadzīšanu (Thomas et al., 2021). Pārmērīga Wnt signālu aktivizēšana izraisa skrimšļa ECM zudumu (Loughlin et al., 2004), tomēr faktora ekspresija traumas vietā ir nepieciešama sekmīgai skrimšļaudu reģenerācijai (Cheverud et al., 2014). Mūsu pētījumā Wnt relatīvais daudzums skrimšļaudos bija lielāks nekā kaulaudos, kas varētu norādīt uz lielāku skrimšļaudu reģenerācijas potenciālu.

Šūnu nāvei fizioloģiskos un patoloģiskos apstākļos izšķir trīs dažādus veidus: apoptozi, autofagiju un nekrozi. Atšķirībā no nekrozes apoptozes un autofagijas procesā tiek saglabātas citoplazmas membrānas un šūna iet bojā bez iekaisuma procesa (Komori et al., 2013). Apoptozes regulēšanas traucējumi izraisa patoloģiskus audu stāvokļus, piemēram, vēzi, attīstības anomālijas un deģeneratīvas slimības. **Apoptozei** ir izšķiroša loma dažādu audu homeostāzes uzturēšanā, kā arī normālas embrija attīstības regulēšanā. Pēc audu traumas tās vietā migrē dažādas šūnas, tostarp neitrofili, makrofāgi un limfoцитi, lai uzsāktu audu atjaunošanos. Pēc dzīšanas procesa beigām daļā šo šūnu sākas apoptozes,

kas novērš pārmērīgu iekaisumu un no tā izrietošu audu bojājumu (Greenhalgh et al., 1998). Arī osteoblastos vai hondrocītos apoptozi var izraisīt fizioloģiski vai patoloģiski faktori (Izu et al., 2011; Liu et al., 2007). IL-1 trūkums var izraisīt osteoklastu apoptozes palielināšanos, samazinot prostaglandīnu koncentrāciju vai citus antiapoptotiskus faktoros. Tāpat TGFβ spēj palielināt osteoklastu apoptozi (Manolagas et al., 2000). Apoptotiskie osteocīti savukārt sūta signālus osteoklastiem, lai tie uzsāktu mērķtiecīgu kaulu resorbciju, kā rezultātā var tikt uzlabotas kaula mehāniskās īpašības (Bellido et al., 2013).

Mūsu rezultāti parādīja, ka kaulaudos šķeltnes skartu pacientu grupām bija mazāks apoptozes pozitīvo osteocītu skaits nekā kontroles grupai. Mazais IL-1α relatīvais daudzums un palielinātais OPN daudzums salīdzinājumā ar kontroles grupu un tā pozitīvā korelācija ar apoptozi sakrīt ar citu pētījumu datiem (Liu et al., 2007). Iespējams, ka samazinātais apoptotisko šūnu daudzums šķeltnes skartos kaulaudos varētu liecināt par nepietiekamu iekaisuma šūnu iznīcināšanu un līdz ar to palielinātu iekaisuma procesu kaulaudos, kā arī samazinātu kaula resorbcijas spēju.

Hondrocītu nāve un ECM zudums veido korelāciju starp skrimšļa bojājuma pakāpi un hondrocītu apoptozi. Tā kā apoptoze parasti ir ātrs process, augsts apoptozes ātrums skrimšļos teorētiski izraisītu ECM degradāciju īsā laika periodā (Hwang et al., 2015). Mūsu pētījuma rezultāti parādīja samazinātu apoptotisko šūnu daudzumu atkārtoti operētiem šķeltnu skartiem pacientiem salīdzinājumā ar kontroles grupu, kā arī ar pirmreizēji operētu pacientu grupu. Šie dati varētu liecināt par traumas ietekmi un traucētu brūču dzīšanu pēc atkārtotas plānveida ķirurģiskas iejaukšanās.

No vērā ņemamiem faktoriem skrimšļaudu kontroles grupā visvairāk novēroja OPG, MMP-8, Runx2 un apoptozes pozitīvos hondrocītus. Pirmo reizi operētiem šķeltnes skartiem pacientiem bija palielināts skaits OC, OPN, OPG, BMP-2/4 bFGF, TGFβ1, MMP-2, MMP-8, MMP-9, TIMP-2, IL-1a, IL-10,

HBD-2, Wnt-3a un apoptozes pozitīvo hondrocītu. Atkārtoti operētiem šķeltnes skartiem pacientiem šo iepriekš minēto faktoru skaits bija palielināts, kā arī palielināts bija HBD-3 skaits. Šo faktoru pozitīvo šūnu relatīvā daudzuma palielinājums salīdzinoši ar kontroles audiem, kā arī šo faktoru skaita daudzums norāda uz visu procesu (mineralizācija, augšana, lokālā aizsardzība, remodelācija) intensifikāciju.

No vērā ņemamiem faktoriem kaulaudu kontroles grupā novēroja OC, BMP-2/4, MMP-8, MMP-9, IL-10, HBD-2 un apoptozes pozitīvos osteocītus. Pirmo reizi operēto šķeltnes skartu pacientu kaulaudos bija novērots gandrīz visu faktoru izteikts relatīvā daudzuma samazinājums, no kuriem vislielākajā daudzumā tika konstatēts OC. No atkārtoti operēto šķeltnes skarto pacientu kaulaudiem MMP-2 pozitīvo šūnu relatīvais daudzums palielinājās līdz kontroles audu līmenim, kā arī lielākā daudzumā tika novēroti OC un apoptozes pozitīvie osteocīti, kuri nerasniedza kontroles audu pozitīvo šūnu relatīvā daudzuma līmeni. Tas nozīmē, ka šķeltnes skartos kaulaudos prevalē degradācijas un mineralizācijas procesi.

Secinājumi

1. Šķeltnes skartu pacientu kaulaudos novērotie dažādu izmēru osteoni, saistaudu ieaugšana caururbējkanālos, kaulaudu plātnišu nevienbālgais krāsojums un neregulārais izmērs liecina par nespecifiskām kaulaudu pārmaiņām šķeltnes skartos kaulos. Skrimšļaudu atbilstība vispārpieņemtajai normai pamato šo balstaudu lielāku izturību šķeltnes procesam. Šķeltnes skartu pacientu balstaudu pārmaiņu trūkums pirmās reizes un atkārtoti operētajiem pacientiem liecina par ķirurģiskas traumas ietekmes trūkumu uz šiem audiem rutīnās mikroskopijas līmenī.
2. Veselus sejas skrimšļaudus raksturo vidēji izteikts OPN, BMP-2/4, bFGF, MMP-2, IL-10, HBD-2,-3, Runx2; izteikts TGFβ1, TIMP-2, IL-1α, Wnt3a, apoptozes un īpaši izteikts OC pozitīvo struktūru daudzums, liecinot par aktīvu šo balstaudu remodelāciju, augšanu, aizsardzības faktoru izdali un mineralizāciju. Veselu kaulaudu fenotipu raksturo daudz mazāka OC, MMP-8, un HBD-2 klātbūtne, kas norāda galvenokārt uz atsevišķu faktoru galveno lomu kaula degradācijā, aizsardzībā un mineralizācijā.
3. Šķeltnes skartu pacientu pirmreizēji operētie skrimšļaudi atklāj palielinātu OPN, bFGF, MMP-2 un -9, IL-10 un HBD-3, kā arī apoptozes pozitīvo struktūru skaitu, norādot uz selektīvu procesu – skrimšļu homeostāzes – aktivēšanu (OPN), augšanas stimulāciju (bFGF), pastiprinātu deģenerāciju (MMP-2), arī lokālās aizsardzības stimulāciju (IL-10 un HBD-3), kā arī programmētas šūnu nāves veicināšanu audu ķirurģiskās korekcijas gadījumā. Atkārtoti operētajos skrimšļaudos minētajam fenotipam pievienojas arī BMP-2/4 palielināto struktūru daudzums, liecinot par vēl intensīvāku koriģēto skrimšļaudu augšanu.
4. Šķeltnes skartu pacientu pirmreizēji operētos kaulaudus raksturo palielināts OPN, bet samazināts OC, bFGF, BMP-2/4, IL-10, HBD-2 un -3 un apoptozes pozitīvo šūnu daudzums, liecinot par plastiskas skartu kaulaudu homeostāzes

aktivāciju samazinātas mineralizācijas, augšanas, lokālās aizsardzības un programmētas šūnu nāves apstākļos. Tomēr nemainīgais OPG, MMPs, TIMP-2, IL-1 α un gēnu proteīnu daudzums pamato saglabātu osteoklastoģenēzes nomākumu, audu remodelāciju un audu resorbcijas balansu. Atkārtoti operēto šķeltņu skarto pacientu kaulaudos BMP-2/4 un IL-10 pozitīvo struktūru skaita palielināšanās līdz kontroles audu līmenim, arī MMP-2 palielināšanās, bet MMP-8 samazināšanās, liecina par selektīvu kaulu augšanas un aizsardzības faktoru atgriešanos normas līmenī, bet selektīvu MMP darbību, aktivējoties galvenajai šūnu MMP – MMP-2.

5. Pirmo reizi operēto šķeltnes pacientu skrimšļaudos savstarpēji visbiežāk korelēja OPN, BMP-2/4, bFGF, IL-1 α un HBD-3, bet atkārtoti operēto šķeltnes pacientu skrimšļaudos visbiežāk savstarpēji korelēja TGF β 1, MMP-2, IL-1 α un IL-10. Šīs korelācijas apstiprina šķeltnes skartu pacientu intensīvāku skrimšļaudu selektīvu augšanas, aizsardzības un homeostāzes regulācijas faktoru saikni uz nemainīga kaulaudu resorbcijas rādītāju fona.
6. Pirmo reizi operēto šķeltnes pacientu kaulaudos visbiežākās korelācijas tika konstatētas ar OPN, BMP-2/4, bFGF, TIMP-2, IL-1 α , IL-10, HBD-2 un Wnt3a. Atkārtoti operēto šķeltnes pacientu kaulaudos visbiežāk savstarpēji korelēja bFGF, MMP-8, IL-1 α , IL-10 un HBD-2. Šīs korelācijas pamato šķeltnes skartu pacientu kaulaudu augšanu stimulējošo, lokālo aizsardzību un resorbciju stimulējošo faktoru saikni, tomēr selektīvi izvirzot korelācijas starp kaulu augšanu, homeostāzi, šūnu proliferāciju veicinošiem faktoriem vairāk pēc pirmreizējām operācijām. Atkārtoti skartajos kaulaudos kopējā korelāciju samazināšanās liecina par iespējamu kaulaudu funkciju disbalansu, ko kompensē aizsardzības faktoru un mazina degradācijas faktoru darbības intensificēšanās.

Priekšlikumi pētījumiem nākotnē

Šajā pētījumā apskatītie audu faktori ir tikai daļa no zināmajiem sejas šķeltņu morfoloģiskajos procesos iesaistītajiem faktoriem. Šo un citu faktoru tālāka izpēte varētu būt iespējams virziens sejas šķeltņu morfoloģijas pētniecībā.

Audu faktoru salīdzināšana pēc pirmreizējas un atkārtotas balstaudu operācijas varētu būt nozīmīgs virziens, lai palīdzētu pielāgot un attīstīt šķeltņu operācijas nākotnē ar labākiem invazīvo procedūru un ķirurģijas rezultātiem. Turpmākā BMP-2/4, bFGF, MMP-2, IL-1 α , IL-10, HBD-2 un HBD-3 izpēte būtu nozīmīgs klīnikā lietojamo faktoru pētniecības virziens.

Sejas šķeltņu skartu balstaudu izpēte gēnu līmenī ar *in situ* hibridizācijas metodi, kā arī gēnu, augšanas faktoru un citokīnu koncentrāciju izpēte ar ELISA metodi būtu potenciāli perspektīvi morfoloģiskie pētījumi nākotnē.

Publikāciju, ziņojumu un patentu saraksts par promocijas darba tēmu

Publikācijas:

1. **Buile, D.**, Pilmane, M., & Akota, I. (2022). Evaluation of the multiple tissue factors in bone of primary osteoplasty and rhinoplasty in patients affected by cleft lip palate. *Histology and Histopathology*, 37(7), 679–690. Article 18451. <https://doi.org/10.14670/HH-18-451>
2. **Buile, D.**, Pilmane, M., & Akota, I. (2022). Evaluation of the Multiple Tissue Factors in the Cartilage of Primary and Secondary Rhinoplasty in Cleft Lip and Palate Patients. *Pediatric Reports*, 14(4), 419–433. <https://doi.org/10.3390/pediatric14040050>
3. **Buile, D.**, Pilmane, M., & Akota, I. (2020). Appearance and distribution of tissue remodellation factors in the hard tissue of patients affected by cleft lip palate. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences, Section B: Natural, Exact, and Applied Sciences*, 74(3), 171–180. <https://doi.org/10.2478/prolas-2020-0028>

Ziņojumi un tēzes:

1. **Buile, D.**, Pilmane, M., & Akota, I. (2024). Evaluation of 17 morphopathological tissue factors in cartilage and bone after first time and repeated osteoplasty and rhinoplasty in patients with cleft lip and palate. In P. Fedirko, M. Pilmane, T. F. Babenko, & N. Garkava (Eds.), *Practical Ophthalmology. Medical and Environmental Problems of our Days: Collection of Works International Scientific and Practical Interdisciplinary Conference* (pp. 11–12). State Institution “National Research Center for Radiation medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine”.
2. **Buile, D.**, Pilmane, M., & Akota, I. (2023). Evaluation of 17 morphopathological tissue factors in cartilage for first-time rhinoplasty or rhinoplasty performed after osteoplasty in patients with cleft lip and palate. In P. Fedirko, M. Pilmane, O. Maksymuk, T. F. Babenko, & N. A. Garkava (Eds.), *Practical Ophthalmology. Medical and Environmental Problems of our Days : Collection of Works International Scientific and Practical Interdisciplinary Conference* (pp. 7-9). State Institution “National Research Center for Radiation medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine”.
3. **Buile, D.**, Pilmane, M., & Akota, I. (2023). Evaluation of various tissue factors in the bone of first and second time performed surgery (osteoplasty and rhinoplasty) in cleft lip palate patients. *Medicina (Kaunas)*, 59(Suppl. 2), 553.
4. **D. Buile, M. Pilmane, I. Akota** ‘‘Characterisation of OPN, OC, β def-2, bFGF and MMP-2 in bone of cleft lip palate (CLP) patients from first time plastic alveolar osteoplasty ‘‘16th joint symposium of Rostock University and Rīga Stradiņš University and 10th congress of Baltic Association for Maxillofacial and Plastic Surgery 03–04 June 2022, pp 31.

5. **Buile, D.**, Pilmane, M., & Akota, I. (2022). Evaluation of the multiple tissue factors in cartilage of performed primary and secondary rhinoplasty in patients affected by cleft lip palate. *Anatomy*, 16(Suppl.2), S168. <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/2870381>
6. **Buile, D.**, Pilmane, M., & Akota, I. (2021). Morphopathogenic aspects of tissue factors in bone of primary osteoplasty and rhinoplasty in cleft lip palate patients. 423. Abstract from RSU Research week 2021: Knowledge for Use in Practice, Rīga, Latvia.
7. Pilmane, M., Jain, N., **Buile, D.**, Akota, I., & Kroiča, J. (2021). The concentrations of different cytokines in the cleft lip palate affected tissue. 425. Abstract from RSU Research week 2021: Knowledge for Use in Practice, Rīga, Latvia.
8. **Buile, D.**, Pilmane, M., & Akota, I. (2019). Characterisation of OPG, TGF- β , Runx2 and Wnt3a in Cleft Lip Palate (CLP) Hard Tissue from First Surgical Intervention. 569. Abstract from RSU International Research Conference 2019, Rīga, Latvia.
9. **Buile, D.**, Pilmane, M., & Akota, I. (2019). Morphopathogenetic aspects of cleft lip palate affected tissue. *Medicina (Kaunas)*, 55(Suppl.2), 231.

Literatūras un avotu saraksts

1. Akota, I., Barkāne, B., Grasmāne, N. (2001). Iedzimto sejas šķeltņu biežuma rādītāji Latvijā no 1960. līdz 1997. gadam. *LMA/RSU Zinātniskie raksti*. Rīga: LMA/RSU, 2001, pp. 166.–170. (in Latvian).
2. Andrade, C. (2019). The P Value and Statistical Significance: Misunderstandings, Explanations, Challenges, and Alternatives. *Indian J Psychol Med*, 41(3), 210–215.
3. Al-Majid, A., Alassiri, S., Rathnayake, N., Tervahartiala, T., Gieselmann, D. R., & Sorsa, T. (2018). Matrix Metalloproteinase-8 as an Inflammatory and Prevention Biomarker in Periodontal and Peri-Implant Diseases. *Int J Dent*, 2018, 7891323.
4. Aşık, M. D., Gürsoy, S., Akkaya, M., Kozacı, L. D., Doğan, M., & Bozkurt, M. (2020). Microarray analysis of cartilage: comparison between damaged and non-weight-bearing healthy cartilage. *Connect Tissue Res*, 61(5), 456–464.
5. Bai, N., Liu, Y., Chen, G., & Zhu, Z. (2014). Analysis of genetic regulation and cytokine expressions of distraction osteogenesis reconstruction for cleft palate. *J Craniofac Surg*, 25(6), 2231–2236.
6. Balooch, G., Balooch, M., Nalla, R. K., Schilling, S., Filvaroff, E. H., Marshall, G. W., Alliston, T. (2005). TGF-beta regulates the mechanical properties and composition of bone matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(52), 18813–18818.
7. Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M. S., Brem, H., & Tomic-Canic, M. (2008). Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen*, 16(5), 585–601.
8. Bhat, M. (2020). The human face: genes, embryological development and dysmorphology. *Int J Dev Biol*, 64(4-5-6), 383–391.
9. Behrendt, P., Feldheim, M., Preusse-Prange, A., Weitkamp, J. T., Haake, M., Eglin, D., Kurz, B. (2018). Chondrogenic potential of IL-10 in mechanically injured cartilage and cellularized collagen ACI grafts. *Osteoarthritis Cartilage*, 26(2), 264–275.
10. Bellido, T. (2014). Osteocyte-driven bone remodeling. *Calcif Tissue Int*, 94(1), 25–34.
11. Bernardo, M. M., & Fridman, R. (2003). TIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinase-2) regulates MMP-2 (matrix metalloproteinase-2) activity in the extracellular environment after pro-MMP-2 activation by MT1 (membrane type 1)-MMP. *Biochem J*, 374(Pt 3), 739–745.
12. Boskey, A. L., Gadaleta, S., Gundberg, C., Doty, S. B., Ducey, P., & Karsenty, G. (1998). Fourier transform infrared microspectroscopic analysis of bones of osteocalcin-deficient mice provides insight into the function of osteocalcin. *Bone*, 23(3), 187–196.

13. Botham K. M. and Murray R. K. (2018). The Extracellular Matrix. *In Harper's Illustrated Biochemistry*, 31e, eds. 2018; V. W. Rodwell, D. A. Bender, K. M. Botham, P. J. Kennelly & P.A. Weil. New York, NY: McGraw-Hill Education 347–351.
14. Boyce, B. F., & Xing, L. (2008). Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys*, 473(2), 139–146.
15. Burrage, P. S., Mix, K. S., & Brinckerhoff, C. E. (2006). Matrix metalloproteinases: role in arthritis. *Front Biosci*, 11, 529–543.
16. Capulli, M., Paone, R., & Rucci, N. (2014). Osteoblast and osteocyte: games without frontiers. *Arch Biochem Biophys*, 561, 3–12.
17. Chang, M. (2016). Restructuring of the extracellular matrix in diabetic wounds and healing: A perspective. *Pharmacol Res*, 107, 243–248.
18. Charles, J. F., & Aliprantis, A. O. (2014). Osteoclasts: more than 'bone eaters'. *Trends Mol Med*, 20(8), 449–459.
19. Chen, D., Harris, M. A., Rossini, G., Dunstan, C. R., Dallas, S. L., Feng, J. Q., Harris, S. E. (1997). Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) enhances BMP-3, BMP-4, and bone cell differentiation marker gene expression during the induction of mineralized bone matrix formation in cultures of fetal rat calvarial osteoblasts. *Calcif Tissue Int*, 60(3), 283–290.
20. Chen, Y., Aiken, A., Saw, S., Weiss, A., Fang, H., & Khokha, R. (2019). TIMP Loss Activates Metalloproteinase-TNF α -DKK1 Axis To Compromise Wnt Signaling and Bone Mass. *J Bone Miner Res*, 34(1), 182–194.
21. Cheng, X. W., Kuzuya, M., Kim, W., Song, H., Hu, L., Inoue, A., Murohara, T. (2010). Exercise training stimulates ischemia-induced neovascularization via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent hypoxia-induced factor-1 alpha reactivation in mice of advanced age. *Circulation*, 122(7), 707–716.
22. Chevalier, X., Goupille, P., Beaulieu, A. D., Burch, F. X., Bensen, W. G., Conrozier, T., Appleton, B. E. (2009). Intraarticular injection of anakinra in osteoarthritis of the knee: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Arthritis Rheum*, 61(3), 344–352.
23. Cheverud, J. M., Lawson, H. A., Bouckaert, K., Kossenkov, A. V., Showe, L. C., Cort, L., Heber-Katz, E. (2014). Fine-mapping quantitative trait loci affecting murine external ear tissue regeneration in the LG/J by SM/J advanced intercross line. *Heredity (Edinb)*, 112(5), 508–518.
24. Cho, E. H., Cho, K. H., Lee, H. A., & Kim, S. W. (2013). High serum osteopontin levels are associated with low bone mineral density in postmenopausal women. *J Korean Med Sci*, 28(10), 1496–1499.

25. Choi, S., Cho, T. J., Kwon, S. K., Lee, G., & Cho, J. (2013). Chondrogenesis of periodontal ligament stem cells by transforming growth factor- β 3 and bone morphogenetic protein-6 in a normal healthy impacted third molar. *Int J Oral Sci*, 5(1), 7–13.
26. Clark, I. M., Swingler, T. E., Sampieri, C. L., & Edwards, D. R. (2008). The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Int J Biochem Cell Biol*, 40(6–7), 1362–1378.
27. Conde, J., Ruiz-Fernandez, C., Francisco, V., Scotece, M., Gómez, R., Lago, F., Gualillo, O. (2021). Dickkopf-3 (DKK3) Signaling in IL-1 α -Challenged Chondrocytes: Involvement of the NF- κ B Pathway. *Cartilage*, 13(2_suppl), 925s–934s.
28. Cole, A. A., Chubinskaya, S., Schumacher, B., Huch, K., Szabo, G., Yao, J., Kuettner, K. E. (1996). Chondrocyte matrix metalloproteinase-8. Human articular chondrocytes express neutrophil collagenase. *J Biol Chem*, 271(18), 11023–11026.
29. Colnot, C., Thompson, Z., Mielau, T., Werb, Z., & Helms, J. A. (2003). Altered fracture repair in the absence of MMP9. *Development*, 130(17), 4123–4133.
30. Cowan, R. W., Mak, I. W. Y., Colterjohn, N., Singh, G., & Ghert, M. (2009). Collagenase expression and activity in the stromal cells from giant cell tumour of bone. *Bone*, 44(5), 865–871.
31. Cundy, T., Grey, A. Metabolic bone disease. In: Marshall WJ, Lapsley M, Ayling RM, editors. Clinical biochemistry: metabolic and clinical aspects. New York: Churchill Livingstone; 2014. 604–635.
32. Denhardt, D. T., & Noda, M. (1998). Osteopontin expression and function: Role in bone remodeling. *J Cell Biochem*, 72 Suppl 30–31(S30–31), 92–102.
33. Deryugina, E. I., & Quigley, J. P. (2006). Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews*, 25(1), 9–34.
34. Devlin, R. D., Du, Z., Pereira, R. C., Kimble, R. B., Economides, A. N., Jorgetti, V., & Canalis, E. (2003). Skeletal overexpression of noggin results in osteopenia and reduced bone formation. *Endocrinology*, 144(5), 1972–1978.
35. Diegel, C. R., Hann, S., Ayturk, U. M., Hu, J. C. W., Lim, K. E., Droscha, C. J., Williams, B. O. (2020). An osteocalcin-deficient mouse strain without endocrine abnormalities. *PLoS Genet*, 16(5), e1008361.
36. Dos Santos Pereira, R., Boos, F. B., Gorla, L. F., Garcia, I. R., Jr., Okamoto, R., & Hochuli-Vieira, E. (2017). Maxillary Sinus Elevation Surgery with ChronOS and Autogenous Bone Graft: Immunohistochemical Assessment of RUNX2, VEGF, TRAP, and Osteocalcin. *Int J Periodontics Restorative Dent*, 37(6), e321–e327.
37. Dresner-Pollak, R., Gelb, N., Rachmilewitz, D., Karmeli, F., & Weinreb, M. (2004). Interleukin 10-deficient mice develop osteopenia, decreased bone formation, and mechanical fragility of long bones. *Gastroenterology*, 127(3), 792–801.

38. Du, M., Zhu, T., Duan, X., Ge, S., Li, N., Sun, Q., & Yang, P. (2017). Acellular dermal matrix loading with bFGF achieves similar acceleration of bone regeneration to BMP-2 via differential effects on recruitment, proliferation and sustained osteodifferentiation of mesenchymal stem cells. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 70(Pt 1), 62–70.
39. Ducy, P., Desbois, C., Boyce, B., Pinero, G., Story, B., Dunstan, C., Karsenty, G. (1996). Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature*, 382(6590), 448–452.
40. Dutta, A., Li, J., Lu, H., Akech, J., Pratap, J., Wang, T., Languino, L. R. (2014). Integrin $\alpha\beta 6$ promotes an osteolytic program in cancer cells by upregulating MMP2. *Cancer Res*, 74(5), 1598–1608.
41. Everts, P., Onishi, K., Jayaram, P., Lana, J. F., & Mautner, K. (2020). Platelet-Rich Plasma: New Performance Understandings and Therapeutic Considerations in 2020. *Int J Mol Sci*, 21(20).
42. Fischer, A. H., Jacobson, K. A., Rose, J., & Zeller, R. (2008). Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *CSH Protoc*, 2008, pdb.prot4986.
43. Fodor, D., Bondor, C., Albu, A., Simon, S. P., Craciun, A., & Muntean, L. (2013). The value of osteopontin in the assessment of bone mineral density status in postmenopausal women. *J Investig Med*, 61(1), 15–21.
44. Fruitwala, S., El-Naccache, D. W., & Chang, T. L. (2019). Multifaceted immune functions of human defensins and underlying mechanisms. *Seminars in cell & developmental biology*, 88, 163–172.
45. Gaur, T., Lengner, C. J., Hovhannisyan, H., Bhat, R. A., Bodine, P. V. N., Komm, B. S., Lian, J. B. (2005). Canonical WNT Signaling Promotes Osteogenesis by Directly Stimulating Runx2 Gene Expression *. *Journal of Biological Chemistry*, 280(39), 33132–33140.
46. Ghosh, S. K., McCormick, T. S., & Weinberg, A. (2019). Human Beta Defensins and Cancer: Contradictions and Common Ground. *Front Oncol*, 9, 341.
47. Giraud, E., Inoue, M., & Hanahan, D. (2004). An amino-bisphosphonate targets MMP-9-expressing macrophages and angiogenesis to impair cervical carcinogenesis. *J Clin Invest*, 114(5), 623–633.
48. Greenhalgh, D. G. (1996). The role of growth factors in wound healing. *J Trauma*, 41(1), 159–167.
49. Guo, X., Zheng, Q., Kulbatski, I., Yuan, Q., Yang, S., Shao, Z., Tang, S. (2006). Bone regeneration with active angiogenesis by basic fibroblast growth factor gene transfected mesenchymal stem cells seeded on porous beta-TCP ceramic scaffolds. *Biomed Mater*, 1(3), 93–99.
50. Gursoy, U. K., Könönen, E., Pradhan-Palikhe, P., Tervahartiala, T., Pussinen, P. J., Suominen-Taipale, L., & Sorsa, T. (2010). Salivary MMP-8, TIMP-1, and ICTP as markers of advanced periodontitis. *Journal of clinical periodontology*, 37(6), 487–493.

51. Gutiérrez-Fernández, A., Inada, M., Balbín, M., Fueyo, A., Pitiot, A. S., Astudillo, A., Puente, X. S. (2007). Increased inflammation delays wound healing in mice deficient in collagenase-2 (MMP-8). *Faseb j*, 21(10), 2580–2591.
52. Ha, S., Koh, K. S., Moon, H., Jung, S., & Oh, T. S. (2015). Clinical Outcomes of Primary Palatal Surgery in Children with Nonsyndromic Cleft Palate with and without Lip. *BioMed research international*, 2015, 185459–185459.
53. Hartmann, C. (2006). A Wnt canon orchestrating osteoblastogenesis. *Trends in Cell Biology*, 16(3), 151–158.
54. Henriët, P., & Emonard, H. (2019). Matrix metalloproteinase-2: Not (just) a “hero” of the past. *Biochimie*, 166, 223–232.
55. Hoover, D. M., Wu, Z., Tucker, K., Lu, W., & Lubkowski, J. (2003). Antimicrobial characterization of human beta-defensin 3 derivatives. *Antimicrob Agents Chemother*, 47(9), 2804–2809.
56. Horner, A., Kemp, P., Summers, C., Bord, S., Bishop, N. J., Kelsall, A. W., . . . Compston, J. E. (1998). Expression and distribution of transforming growth factor-beta isoforms and their signaling receptors in growing human bone. *Bone*, 23(2), 95–102.
57. Hsu, J. Y., McKeon, R., Goussev, S., Werb, Z., Lee, J. U., Trivedi, A., & Noble-Hausslein, L. J. (2006). Matrix metalloproteinase-2 facilitates wound healing events that promote functional recovery after spinal cord injury. *J Neurosci*, 26(39), 9841–9850.
58. Hsu, S. M., Raine, L., & Fanger, H. (1981). The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics. *Am J Clin Pathol*, 75(6), 816–821.
59. Hsu, Y.-H., Niu, T., Terwedow, H. A., Xu, X., Feng, Y., Li, Z., . . . Xu, X. (2006). Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men. *Human genetics*, 118(5), 568–577.
60. Huntley, R., Jensen, E., Gopalakrishnan, R., & Mansky, K. C. (2019). Bone morphogenetic proteins: Their role in regulating osteoclast differentiation. *Bone Rep*, 10, 100207.
61. Hwang, H. S., & Kim, H. A. (2015). Chondrocyte Apoptosis in the Pathogenesis of Osteoarthritis. *Int J Mol Sci*, 16(11), 26035–26054.
62. Izu, Y., Sun, M., Zwolanek, D., Veit, G., Williams, V., Cha, B., Birk, D. E. (2011). Type XII collagen regulates osteoblast polarity and communication during bone formation. *J Cell Biol*, 193(6), 1115–1130.
63. Jansen, N. W., Roosendaal, G., Hooiveld, M. J., Bijlsma, J. W., van Roon, J. A., Theobald, M., & Lafèber, F. P. (2008). Interleukin-10 protects against blood-induced joint damage. *Br J Haematol*, 142(6), 953–961.

64. Ji, H., Pettit, A., Ohmura, K., Ortiz-Lopez, A., Duchatelle, V., Degott, C., Benoist, C. (2002). Critical roles for interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha in antibody-induced arthritis. *The Journal of experimental medicine*, 196(1), 77–85.
65. Jin, J. O., Han, X., & Yu, Q. (2013). Interleukin-6 induces the generation of IL-10-producing Tr1 cells and suppresses autoimmune tissue inflammation. *J Autoimmun*, 40, 28–44.
66. Jin, Y. R., Han, X. H., Taketo, M. M., & Yoon, J. K. (2012). Wnt9b-dependent FGF signaling is crucial for outgrowth of the nasal and maxillary processes during upper jaw and lip development. *Development*, 139(10), 1821–1830.
67. Kadri, A., Ea, H. K., Bazille, C., Hannouche, D., Lioté, F., & Cohen-Solal, M. E. (2008). Osteoprotegerin inhibits cartilage degradation through an effect on trabecular bone in murine experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 58(8), 2379–2386.
68. Katsunuma, N. (1997). Molecular mechanisms of bone collagen degradation in bone resorption. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 15(1), 1–8.
69. Kawaguchi, H., Oka, H., Jingushi, S., Izumi, T., Fukunaga, M., Sato, K., Nakamura, K. (2010). A local application of recombinant human fibroblast growth factor 2 for tibial shaft fractures: A randomized, placebo-controlled trial. *J Bone Miner Res*, 25(12), 2735–2743.
70. Komori, T. (2010). Regulation of osteoblast differentiation by Runx2. *Adv Exp Med Biol*, 658, 43–49.
71. Kovács, B., Vajda, E., & Nagy, E. E. (2019). Regulatory Effects and Interactions of the Wnt and OPG-RANKL-RANK Signaling at the Bone-Cartilage Interface in Osteoarthritis. *Int J Mol Sci*, 20(18).
72. Kuo, A. C., Rodrigo, J. J., Reddi, A. H., Curtiss, S., Grotkopp, E., & Chiu, M. (2006). Microfracture and bone morphogenetic protein 7 (BMP-7) synergistically stimulate articular cartilage repair. *Osteoarthritis Cartilage*, 14(11), 1126–1135.
73. Kwan Tat, S., Pelletier, J. P., Lajeunesse, D., Fahmi, H., Lavigne, M., & Martel-Pelletier, J. (2008). The differential expression of osteoprotegerin (OPG) and receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) in human osteoarthritic subchondral bone osteoblasts is an indicator of the metabolic state of these disease cells. *Clin Exp Rheumatol*, 26(2), 295–304.
74. Li, C., Lan, Y., & Jiang, R. (2017). Molecular and Cellular Mechanisms of Palate Development. *Journal of Dental Research*, 96(11), 1184–1191.
75. Li, S., Liu, J., Liu, S., Jiao, W., & Wang, X. (2021). Chitosan oligosaccharides packaged into rat adipose mesenchymal stem cells-derived extracellular vesicles facilitating cartilage injury repair and alleviating osteoarthritis. *J Nanobiotechnology*, 19(1), 343.

76. Li, L., Wang, Y., Lin, M., Yuan, G., Yang, G., Zheng, Y., & Chen, Y. (2013). Augmented BMPRIA-mediated BMP signaling in cranial neural crest lineage leads to cleft palate formation and delayed tooth differentiation. *PLoS One*, *8*(6), e66107.
77. Li, X., Su, G., Wang, J., Zhou, Z., Li, L., Liu, L., Wang, H. (2013). Exogenous bFGF promotes articular cartilage repair via up-regulation of multiple growth factors. *Osteoarthritis Cartilage*, *21*(10), 1567–1575.
78. Lin, C., Chen, Z., Guo, D., Zhou, L., Lin, S., Li, C., Ding, Y. (2022). Increased expression of osteopontin in subchondral bone promotes bone turnover and remodeling, and accelerates the progression of OA in a mouse model. *Aging (Albany NY)*, *14*(1), 253–271.
79. Liu, D., Yao, S., & Wise, G. E. (2006). Effect of interleukin-10 on gene expression of osteoclastogenic regulatory molecules in the rat dental follicle. *Eur J Oral Sci*, *114*(1), 42–49.
80. Liu, X., Bruxvoort, K. J., Zylstra, C. R., Liu, J., Cichowski, R., Faugere, M. C., Clemens, T. L. (2007). Lifelong accumulation of bone in mice lacking Pten in osteoblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *104*(7), 2259–2264.
81. Logan, C. Y., & Nusse, R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*, *20*, 781–810.
82. Loughlin, J., Dowling, B., Chapman, K., Marcelline, L., Mustafa, Z., Southam, L., Corr, M. (2004). Functional variants within the secreted frizzled-related protein 3 gene are associated with hip osteoarthritis in females. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(26), 9757–9762.
83. Luis-Ravelo, D., Antón, I., Zandueta, C., Valencia, K., Ormazábal, C., Martínez-Canarias, S., Lecanda, F. (2014). A gene signature of bone metastatic colonization sensitizes for tumor-induced osteolysis and predicts survival in lung cancer. *Oncogene*, *33*(43), 5090–5099.
84. Lund, S. A., Giachelli, C. M., & Scatena, M. (2009). The role of osteopontin in inflammatory processes. *J Cell Commun Signal*, *3*(3–4), 311–322.
85. Ma, X., Zhu, X., He, X., Yi, X., & Jin, A. (2021). The Wnt pathway regulator expression levels and their relationship to bone metabolism in thoracolumbar osteoporotic vertebral compression fracture patients. *Am J Transl Res*, *13*(5), 4812–4818.
86. Mahanonda, R., Sa-Ard-Iam, N., Eksomtramate, M., Rerkyen, P., Phairat, B., Schaecher, K. E., Pichyangkul, S. (2009). Cigarette smoke extract modulates human beta-defensin-2 and interleukin-8 expression in human gingival epithelial cells. *J Periodontal Res*, *44*(4), 557–564.
87. Manolagas, S. C. (2020). Osteocalcin promotes bone mineralization but is not a hormone. *PLoS Genet*, *16*(6), e1008714.

88. Martínez-Calleja, A., Velasquillo, C., Vega-López, M., Arellano-Jiménez, M. J., Tsutsumi-Fujiyoshi, V. K., Mondragón-Flores, R., & Kouri-Flores, J. B. (2014). Osteopontin expression and localization of Ca⁺⁺ deposits in early stages of osteoarthritis in a rat model. *Histol Histopathol*, 29(7), 925–933.
89. Medici, M., van Meurs, J. B., Rivadeneira, F., Zhao, H., Arp, P. P., Hofman, A., Uitterlinden, A. G. (2006). BMP-2 gene polymorphisms and osteoporosis: the Rotterdam Study. *J Bone Miner Res*, 21(6), 845–854.
90. Meng, M., Chen, Y., Chen, X., Zhang, Q., Guo, W., Zhou, X., & Zou, J. (2020). *IL-1α regulates osteogenic differentiation and osteoclastic activity of dental follicle cells via JNK and p38 MAPK pathways*.
91. Mixon, A., Savage, A., Bahar-Moni, A. S., Adouni, M., & Faisal, T. (2021). An in vitro investigation to understand the synergistic role of MMPs-1 and 9 on articular cartilage biomechanical properties. *Scientific Reports*, 11(1), 14409.
92. Mohammed, N. U., Isho Gorial, F., Khaleel, F., Abed, B., Ali, S., Farhan, L., & Salman, I. (2023). Role of Human β-Defensin-3 in Rheumatoid Arthritis: An Observational Single-Center Study. *Al-Rafidain Journal of Medical Sciences (ISSN 2789-3219)*, 5, S71–75.
93. Monir, A. U., Gundberg, C. M., Yagerman, S. E., van der Meulen, M. C., Budell, W. C., Boskey, A. L., & Dowd, T. L. (2010). The effect of lead on bone mineral properties from female adult C57/BL6 mice. *Bone*, 47(5), 888–894.
94. Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L., & O'Garra, A. (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*, 19, 683–765.
95. Moriishi, T., Ozasa, R., Ishimoto, T., Nakano, T., Hasegawa, T., Miyazaki, T., Komori, T. (2020). Osteocalcin is necessary for the alignment of apatite crystallites, but not glucose metabolism, testosterone synthesis, or muscle mass. *PLoS Genet*, 16(5), e1008586.
96. Mull, C., Wohlmuth, P., Krause, M., Alm, L., Kling, H., Schilling, A. F., & Frosch, K. H. (2020). Hepatocyte growth factor and matrix metalloprotease 2 levels in synovial fluid of the knee joint are correlated with clinical outcome of meniscal repair. *Knee*, 27(4), 1143–1150.
97. Murphy, G. (2011). Tissue inhibitors of metalloproteinases. *Genome Biol*, 12(11), 233.
98. Nagata, K., Hojo, H., Chang, S. H., Okada, H., Yano, F., Chijimatsu, R., Saito, T. (2022). Runx2 and Runx3 differentially regulate articular chondrocytes during surgically induced osteoarthritis development. *Nature Communications*, 13(1), 6187.
99. Nakajima, A., Ito, Y., Tanaka, E., Sano, R., Karasawa, Y., Maeno, M., Shuler, C. F. (2014). Functional role of TGF-β receptors during palatal fusion in vitro. *Arch Oral Biol*, 59(11), 1192–1204.

100. Nakashima, T., Hayashi, M., Fukunaga, T., Kurata, K., Oh-Hora, M., Feng, J. Q., Takayanagi, H. (2011). Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat Med*, *17*(10), 1231–1234.
101. Nasreddine, G., El Hajj, J., & Ghassibe-Sabbagh, M. (2021). Orofacial clefts embryology, classification, epidemiology, and genetics. *Mutat Res Rev Mutat Res*, *787*, 108373.
102. Negoescu, A., Lorimier, P., Labat-Moleur, F., Drouet, C., Robert, C., Guillermet, C., Brambilla, E. (1996). In situ apoptotic cell labeling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations. *J Histochem Cytochem*, *44*(9), 959–968.
103. Nyman, J. S., Lynch, C. C., Perrien, D. S., Thiolloy, S., O'Quinn, E. C., Patil, C. A., Mundy, G. R. (2011). Differential effects between the loss of MMP-2 and MMP-9 on structural and tissue-level properties of bone [Article]. *Journal of Bone and Mineral Research*, *26*(6), 1252–1260.
104. Oury, J., & Oury, F. (2018). [Osteocalcin, a key molecule for bone endocrine functions]. *Med Sci (Paris)*, *34*(1), 54–62.
105. Parks, W. C., Wilson, C. L., & López-Boado, Y. S. (2004). Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol*, *4*(8), 617–629.
106. Pastar, I., Stojadinovic, O., Krzyzanowska, A., Barrientos, S., Stuelten, C., Zimmerman, K., Tomic-Canic, M. (2010). Attenuation of the transforming growth factor beta-signaling pathway in chronic venous ulcers. *Mol Med*, *16*(3–4), 92–101.
107. Peng, Y., Li, L., Yuan, Q., Gu, P., You, Z., Zhuang, A., & Bi, X. (2020). Effect of Bifunctional β Defensin 2-Modified Scaffold on Bone Defect Reconstruction. *ACS Omega*, *5*(8), 4302–4312.
108. Pilmane, M., Šūmahers, G. H. (2006). *Medicīniskā embrioloģija* [Medical embryology]. Rīgas Stradiņa universitāte, Rīga. 164–172 (in Latvian).
109. Polzer, K., Joosten, L., Gasser, J., Distler, J. H., Ruiz, G., Baum, W., Zwerina, J. (2010). Interleukin-1 is essential for systemic inflammatory bone loss. *Ann Rheum Dis*, *69*(1), 284–290.
110. Presta, M., Foglio, E., Churrua Schuind, A., & Ronca, R. (2018). Long Pentraxin-3 Modulates the Angiogenic Activity of Fibroblast Growth Factor-2. *Front Immunol*, *9*, 2327.
111. Qin, H., & Cai, J. (2018). Effect of Runx2 silencing on autophagy and RANKL expression in osteoblasts. *Arch Oral Biol*, *95*, 74–78.
112. Ren, L., Zhang, Z., Deng, C., Zhang, N., & Li, D. (2021). Antibacterial and pro-osteogenic effects of β -Defensin-2-loaded mesoporous bioglass. *Dent Mater J*, *40*(2), 464–471.

113. Rezzoug, F., Seelan, R. S., Bhattacharjee, V., Greene, R. M., & Pisano, M. M. (2011). Chemokine-mediated migration of mesencephalic neural crest cells. *Cytokine*, 56(3), 760–768.
114. Riffenburgh, R. H. 2012. Chapter 11 – Tests on Ranked Data. In: *Statistics in Medicine* (Third Edition). California: Elsevier Inc., 221–248.
115. Riffenburgh, R. H. 2012. Chapter 21 – Regression and Correlation. In: *Statistics in Medicine* (Third Edition). California: Elsevier Inc, 443–472.
116. Schett, G., Dayer, J. M., & Manger, B. (2016). Interleukin-1 function and role in rheumatic disease. *Nat Rev Rheumatol*, 12(1), 14–24.
117. Salo, T., Mäkelä, M., Kylmäniemi, M., Autio-Harmainen, H., & Larjava, H. (1994). Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 during early human wound healing. *Lab Invest*, 70(2), 176–182.
118. Shimizu, S., Asou, Y., Itoh, S., Chung, U. I., Kawaguchi, H., Shinomiya, K., & Muneta, T. (2007). Prevention of cartilage destruction with intraarticular osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin in a murine model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 56(10), 3358–3365.
119. Slovacek, H., Khanna, R., Poredos, P., Jezovnik, M., Hoppensteadt, D., Fareed, J., & Hopkinson, W. (2020). Interrelationship of Osteopontin, MMP-9 and ADAMTS4 in Patients With Osteoarthritis Undergoing Total Joint Arthroplasty. *Clin Appl Thromb Hemost*, 26.
120. Spector, J. A., Luchs, J. S., Mehrara, B. J., Greenwald, J. A., Smith, L. P., & Longaker, M. T. (2001). Expression of bone morphogenetic proteins during membranous bone healing. *Plast Reconstr Surg*, 107(1), 124–134.
121. Stefanini, M., De Martino, C., & Zamboni, L. (1967). Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature*, 216(5111), 173–174.
122. Stricker, S., Fundele, R., Vortkamp, A., & Mundlos, S. (2002). Role of Runx genes in chondrocyte differentiation. *Dev Biol*, 245(1), 95–108.
123. Takahashi, M., Umehara, Y., Yue, H., Trujillo-Paez, J. V., Peng, G., Nguyen, H. L. T., Niyonsaba, F. (2021). The Antimicrobial Peptide Human β -Defensin-3 Accelerates Wound Healing by Promoting Angiogenesis, Cell Migration, and Proliferation Through the FGFR/JAK2/STAT3 Signaling Pathway. *Front Immunol*, 12, 712781.
124. Takegami, N., Akeda, K., Yamada, J., Sano, T., Murata, K., Huang, J., Sudo, A. (2017). RANK/RANKL/OPG system in the intervertebral disc. *Arthritis Res Ther*, 19(1), 121.
125. Tanabe, N., Maeno, M., Suzuki, N., Fujisaki, K., Tanaka, H., Ogiso, B., & Ito, K. (2005). IL-1 alpha stimulates the formation of osteoclast-like cells by increasing M-CSF and PGE2 production and decreasing OPG production by osteoblasts. *Life Sci*, 77(6), 615–626.

126. Tang, S. Y., & Alliston, T. (2013). Regulation of postnatal bone homeostasis by TGF β . *Bonekey Rep*, 2, 255.
127. Tanigawa, S., Aida, Y., Kawato, T., Honda, K., Nakayama, G., Motohashi, M., Maeno, M. (2011). Interleukin-17F affects cartilage matrix turnover by increasing the expression of collagenases and stromelysin-1 and by decreasing the expression of their inhibitors and extracellular matrix components in chondrocytes. *Cytokine*, 56(2), 376–386.
128. Thiel, Y., Ghayor, C., Lindhorst, D., Essig, H., Weber, F., Rucker, M., & Schumann, P. (2020). Antimicrobial peptide gene expression in medication-related osteonecrosis of the jaw. *Pathology – Research and Practice*, 216(12), 153245.
129. Thomas, B. L., Eldridge, S. E., Nosrati, B., Alvarez, M., Thorup, A. S., Nalesso, G., Dell'Accio, F. (2021). WNT3A-loaded exosomes enable cartilage repair. *J Extracell Vesicles*, 10(7), e12088.
130. Ueno, M., Urabe, K., Naruse, K., Uchida, K., Minehara, H., Yamamoto, T., Itoman, M. (2011). Influence of internal fixator stiffness on murine fracture healing: two types of fracture healing lead to two distinct cellular events and FGF-2 expressions. *Exp Anim*, 60(1), 79–87.
131. Vancea, A., Serban, O., & Fodor, D. (2021). Relationship between Osteopontin and Bone Mineral Density. *Acta Endocrinol (Buchar)*, 17(4), 509–516.
132. Varoga, D., Pufe, T., Harder, J., Schröder, J.-M., Mentlein, R., Meyer-Hoffert, U., Paulsen, F. (2005). Human β -defensin 3 mediates tissue remodeling processes in articular cartilage by increasing levels of metalloproteinases and reducing levels of their endogenous inhibitors. *Arthritis & Rheumatism*, 52(6), 1736–1745.
133. Verstappen, J., & Von den Hoff, J. W. (2006). Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): their biological functions and involvement in oral disease. *J Dent Res*, 85(12), 1074–1084.
134. Visse, R., & Nagase, H. (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*, 92(8), 827–839.
135. Vu, T. H., & Werb, Z. (2000). Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev*, 14(17), 2123–2133.
136. Vyas, T., Gupta, P., Kumar, S., Gupta, R., Gupta, T., & Singh, H. P. (2020). Cleft of lip and palate: A review. *J Family Med Prim Care*, 9(6), 2621–2625.
137. Wagner, J. M., Reinkemeier, F., Dadras, M., Wallner, C., Huber, J., Sogorski, A., Behr, B. (2020). Local Wnt3a treatment restores bone regeneration in large osseous defects after surgical debridement of osteomyelitis. *J Mol Med (Berl)*, 98(6), 897–906.
138. Wang, C., Shen, J., Ying, J., Xiao, D., & O'Keefe, R. J. (2020). FoxO1 is a crucial mediator of TGF- β /TAK1 signaling and protects against osteoarthritis by maintaining articular cartilage homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 117(48), 30488–30497.

139. Wang, D., Weng, Y., Guo, S., Zhang, Y., Zhou, T., Zhang, M., Ma, J. (2018). Platelet-rich plasma inhibits RANKL-induced osteoclast differentiation through activation of Wnt pathway during bone remodeling. *Int J Mol Med*, *41*(2), 729–738.
140. Warnke, P. H., Voss, E., Russo, P. A., Stephens, S., Kleine, M., Terheyden, H., & Liu, Q. (2013). Antimicrobial peptide coating of dental implants: biocompatibility assessment of recombinant human beta defensin-2 for human cells. *Int J Oral Maxillofac Implants*, *28*(4), 982–988.
141. Weinreb, M., Shinar, D., & Rodan, G. A. (1990). Different pattern of alkaline phosphatase, osteopontin, and osteocalcin expression in developing rat bone visualized by in situ hybridization. *J Bone Miner Res*, *5*(8), 831–842.
142. Wu, M., Chen, G., & Li, Y. P. (2016). TGF- β and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. *Bone Res*, *4*, 16009.
143. Xie, Y., Zinkle, A., Chen, L., & Mohammadi, M. (2020). Fibroblast growth factor signalling in osteoarthritis and cartilage repair. *Nat Rev Rheumatol*, *16*(10), 547–564.
144. Xu, Z., Yang, C., Wu, F., Tan, X., Guo, Y., Zhang, H., Li, Y. (2023). Triple-gene deletion for osteocalcin significantly impairs the alignment of hydroxyapatite crystals and collagen in mice [Original Research]. *Frontiers in Physiology*, *14*.
145. Yang, C., Yang, S. H., Du, J. Y., Li, J., Xu, W. H., & Xiong, Y. F. (2004). Basic fibroblast growth factor gene transfection to enhance the repair of avascular necrosis of the femoral head. *Chin Med Sci J*, *19*(2), 111–115.
146. Yang, L. T., & Kaartinen, V. (2007). Tgfb1 expressed in the Tgfb3 locus partially rescues the cleft palate phenotype of Tgfb3 null mutants. *Dev Biol*, *312*(1), 384–395.
147. Yang, Y., Liu, W., Wei, J., Cui, Y., Zhang, D., & Xie, J. (2021). Transforming growth factor- β 1-induced N-cadherin drives cell-cell communication through connexin43 in osteoblast lineage. *Int J Oral Sci*, *13*(1), 15.
148. Yi, L., Li, Z., Jiang, H., Cao, Z., Liu, J., & Zhang, X. (2018). Gene Modification of Transforming Growth Factor β (TGF- β) and Interleukin 10 (IL-10) in Suppressing Mt Sonicate Induced Osteoclast Formation and Bone Absorption. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, *24*, 5200–5207.
149. Yildirim, G., Budell, W. C., Berezovska, O., Yagerman, S., Maliath, S. S., Mastrokostas, P., Dowd, T. L. (2023). Lead induced differences in bone properties in osteocalcin +/+ and -/- female mice. *Bone Rep*, *18*, 101672.
150. Yoon, S. O., Park, S. J., Yun, C. H., & Chung, A. S. (2003). Roles of matrix metalloproteinases in tumor metastasis and angiogenesis. *J Biochem Mol Biol*, *36*(1), 128–137.

151. Yousef, E. M., Tahir, M. R., St-Pierre, Y., & Gaboury, L. A. (2014). MMP-9 expression varies according to molecular subtypes of breast cancer. *BMC Cancer*, *14*, 609.
152. Yu, J., Mursu, E., Typpö, M., Laaksonen, S., Voipio, H. M., Pesonen, P., Pirttiniemi, P. (2019). MMP-3 and MMP-8 in rat mandibular condylar cartilage associated with dietary loading, estrogen level, and aging. *Arch Oral Biol*, *97*, 238–244.
153. Yuan, L., You, H., Qin, N., & Zuo, W. (2021). Interleukin-10 Modulates the Metabolism and Osteogenesis of Human Dental Pulp Stem Cells. *Cell Reprogram*, *23*(5), 270–276.
154. Zhang, J., Bai, S., Zhang, X., Nagase, H., & Sarras, M. P., Jr. (2003). The expression of gelatinase A (MMP-2) is required for normal development of zebrafish embryos. *Dev Genes Evol*, *213*(9), 456–463.
155. Zhang, J. F., Wang, G. L., Zhou, Z. J., Fang, X. Q., Chen, S., & Fan, S. W. (2018). Expression of Matrix Metalloproteinases, Tissue Inhibitors of Metalloproteinases, and Interleukins in Vertebral Cartilage Endplate. *Orthop Surg*, *10*(4), 306–311.
156. Zhang, Q. (2023). New Insights into Nutrients for Bone Health and Disease. In *Nutrients* (Vol. 15).
157. Zhang, Q., Chen, B., Yan, F., Guo, J., Zhu, X., Ma, S., & Yang, W. (2014). Interleukin-10 inhibits bone resorption: a potential therapeutic strategy in periodontitis and other bone loss diseases. *Biomed Res Int*, *2014*, 284836.
158. Zhou, X., Tang, X., Long, R., Wang, S., Wang, P., Cai, D., & Liu, Y. (2019). The Influence of bFGF on the Fabrication of Microencapsulated Cartilage Cells under Different Shaking Modes. *Polymers (Basel)*, *11*(3).
159. Zucker, S., Cao, J., & Chen, W. T. (2000). Critical appraisal of the use of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer treatment. *Oncogene*, *19*(56), 6642–6650.

Pateicības

Vislielākā pateicība manai promocijas darba vadītājai *Dr. habil. med.* profesorei Mārai Pilmanei par darba vadīšanu, padomiem, neatsveramajām stundām, konsultācijām un ieguldījumu, kā arī morālo atbalstu šī promocijas darba izstrādē.

Liela pateicību izsaku arī otrai promocijas darba vadītājai *Dr. med.* profesorei Ilzei Akotai par promocijas darba vadīšanu, konsultēšanu, palīdzību, morālo atbalstu un ieguldījumu pētījuma materiāla ieguvē.

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

Tāpat vēlos pateikties manai ģimenei par pacietību, iejūtību un sapratni, izstrādājot promocijas darbu visu šo gadu garumā.