



RĪGAS STRADIŅA
UNIVERSITĀTE

Artūrs Ozoliņš

MOLEKULĀRO MARKĪERU NOZĪME VAIROGDZIEDZERU MEZGLU IZVĒRTĒŠANĀ

Promocijas darba kopsavilkums
Medicīnas doktora zinātniskā grāda iegūšanai

Specialitāte - ķirurģija

Rīga, 2012

Promocijas darbs izstrādāts:
Rīgas Stradiņa universitātē;
VSIA Paula Stradiņa Klīniskās universitātes slimnīcā

Darba zinātniskie vadītāji:
Dr. habil. med., profesors **Jānis Gardovskis**, Rīgas Stradiņa universitāte
Dr. med., docents **Zenons Narbutis**, Rīgas Stradiņa universitāte

Darba zinātniskais konsultants:
Dr. med., asociētā profesore **Ilze Štrumfa**, Rīgas Stradiņa universitāte

Oficiālie recenzenti:
Dr. habil. med., profesors **Aivars Lejnieks**, Rīgas Stradiņa universitāte
Dr. med., asociētā profesore **Inese Folkmane**, Latvijas Universitāte
Dr. med., profesors **Peter E. Goretzki**, Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf, Vācija

Promocijas darba aizstāvēšana notiks 2012. gada 14. novembrī plkst.
15:00, Rīgas Stradiņa universitātes Ķirurģijas promocijas padomes
atklātā sēdē Rīgā, Dzirciema ielā 16, Hipokrāta auditorijā.

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

Promocijas darbs veikts ar Eiropas sociālā fonda projekta “Atbalsts
doktorantiem studiju programmas apguvei un zinātniskā grāda ieguvei
Rīgas Stradiņa universitātē” finansiālu atbalstu



Promocijas padomes sekretārs:
Dr. habil. med., profesors **Andrejs Skaģers**

SATURS

LIETOTIE SAĪSINĀJUMI	5
1. IEVADS	6
1.1. Darba mērķis	9
1.2. Darba uzdevumi	9
1.3. Darba hipotēzes	10
1.4. Zinātniskā un praktiskā novitāte	10
1.5. Personīgais ieguldījums	10
1.6. Ētiskie apsvērumi	11
1.7. Promocijas darba struktūra un apjoms	11
2. MATERIĀLS UN METODES	11
2.1. Pētījuma uzbūve	11
2.2. Materiāls	13
2.3. Metodes	13
2.3.1. Audu apstrāde un histoloģiskā izvērtēšana	13
2.3.2. Imunohistoķīmija	13
2.3.3. Aspirācijas citoloģija un imunocitoķīmija	15
2.3.4. Statistiskās analīzes metodes	16
3. REZULTĀTI	16
3.1. Imunohistoķīmisko izmeklējumu rezultāti	16
3.1.1. E-CAD ekspresija	17
3.1.2. CD56 ekspresija	19
3.1.3. HBME-1 ekspresija	21
3.1.4. COX-2 ekspresija	22
3.1.5. Ki-67 ekspresija	23
3.1.6. p53 ekspresija	24

3.2. Imunocitohīmisko izmeklējumu rezultāti	26
3.2.1. E-CAD ekspresija FNA materiālā	26
3.2.2. CD56 ekspresija FNA materiālā	27
3.2.3. HBME-1 ekspresija FNA materiālā	27
4. DISKUSIJA	29
5. SECINĀJUMI	35
6. PRAKTISKĀS REKOMENDĀCIJAS	35
7. PUBLIKĀCIJAS PAR PĒTĪJUMA TĒMU	36
8. ZIŅOJUMI PAR PĒTĪJUMA TĒMU	36
9. ATSAUCES	38

LIETOTIE SAĪSINĀJUMI

CD56 - neirālo šūnu adhēzijas molekula 56

COX-2 - ciklooksigenāze-2

DNS - dezoksiribonukleīnskābe

E-CAD -epiteliālais kadherīns

FNA - fine-needle aspiration (angl.val.) - tievās adatas aspirācija

FV - folikulārs vēzis

HBME-1 - Hector Battifora mezotēlija antigēns-1

HE - hematoksilīns - eozīns

ICĶ - imunocitoķīmija

IHK - imunohistoķīmija

Ki-67 - antigēns Ki-67

KS - koloīda struma

p53 - proteīns 53

PNV - paredzamā negatīvā vērtība

PPV - paredzamā pozitīvā vērtība

PV - papillārs vēzis

PVO - Pasaules Veselības organizācija

SD - standarta deviācija

TI - ticamības intervāls

US - ultrasonoskopija

1. IEVADS

Vairogdziedzera mezgli ir klīniski bieži sastopami un pārsvarā tiek atklāti ikdienas medicīniskajās apskatēs. Apmēram 5% cilvēku dzīves laikā attīstīsies palpējams vairogdziedzera mezgls. Pieaugot ultrasonoskopijas (US) pielietošanas biežumam, nepalpējamus vairogdziedzera mezglus ir iespējams konstatēt pat līdz 20-67% gadījumu [1, 2]. Lielākā daļa no atklātajiem vairogdziedzera mezgliem ir labdabīgi, taču vairogdziedzera vēža biežums ar katru gadu palielinās.

Latvijā vairogdziedzera vēža biežums laika posmā kopš 1991. gada līdz 2011. gadam palielinājies 3,62 reizes. 1991. gadā tā biežums uz 100,000 cilvēku bija 2,59, bet 2011. gadā jau 9,39/100,000 un, visticamāk, šāda tendence saglabāsies [3, 4]. Amerikas Savienotajās Valstīs 2010. gadā atklāja 44,000 vairogdziedzera vēža gadījumus, no kuriem 1700 gadījumos tas bija pacienta nāves iemesls [5]. Vairogdziedzera vēža biežums 1973. gadā bija 3,6/100,000, bet 2002. gadā jau 8,7/100,000. Novērotais pieaugums ir 2,4 reizes, un šāda tendence turpina saglabāties arī turpmākajos gados [6]. Lielā mērā tas izskaidrojams ar diagnostisko iespēju pieaugumu, kā rezultātā ievērojami biežāk atklāti izmēros mazi papillāri vēži (PV), kuru biežums pieaudzis 2,9 reizes - no 2,7 līdz 7,7/100,000 [6].

Vairogdziedzera vēzi novēro ~1-2% no visām ļaundabīgajām saslimšanām, un 90% no neiroendokrīniem audzējiem [7]. PV savukārt veido ~80% no vairogdziedzera ļaundabīgajiem audzējiem [8].

Vairogdziedzera mezglu diferenciālā diagnostika bieži ir sarežģīta, jo morfoloģiskās pazīmes nav viennozīmīgi nosakāmas konkrētā pacienta materiālā, kā arī tievās adatas aspirācijas (FNA) citoloģiskajā materiālā nav iespējams izteikties par ieaugšanu asinsvados vai kapsulā. Tā rezultātā 80-85% pacientu pēc vairogdziedzera operācijas konstatē labdabīgu patoloģisku procesu [9].

Vairogdziedzera operācija ir saistīta ar virkni komplikāciju, starp kurām, kā dzīves kvalitāti ļoti ietekmējošas jāmin hipoparatiroidoze dēļ epitēlijuķermenīšu bojājuma un balsenes nerva bojājums, kas traucē balss funkciju un rada hronisku aspirāciju. Bez tam pacientam pēc vairogdziedzera operācijas jāsaņem hormonu aizvietojošā terapija, kā arī nepieciešamas regulāras kontroles pie ārsta.

Kaut gan vairogdziedzera vēzis visbiežāk ir maz agresīvs, tas tomēr var būt letāls, tādēļ būtisks ir jautājums, kā efektīgi un mērķtiecīgi izmeklēt nejausi atklātos mezglus, lai tiktu atklāti pacienti, kuriem malignitātes risks ir palielināts.

Pašlaik jaunākajā zinātniskajā literatūrā arvien lielāka uzmanība tiek pievērsta pētījumiem, kuri ļautu atrast papildus diagnostiskos kritērijus, kas palīdzētu atšķirt folikulāras adenomas no vēžiem gan ķirurģiskajā materiālā, gan arī FNA citoloģiskajā materiālā.

Ar ļoti atšķirīgiem rezultātiem tiek atklāti un pētīti arvien vairāk molekulāro vai imunohistoķīmisko (IHĶ) marķieru. Pastāv uzskats, ka viens marķieris nevar būt pietiekoši jutīgs un specifisks, lai to izmantotu par diagnostisko kritēriju, tādēļ šinī virzienā notiek daudzi pētījumi un tiek meklēts vairāku marķieru kopums, kurš atbilst šīm prasībām.

No lielā pētīto IHĶ marķieru skaita tikai daži pierādīti kā potenciāli noderīgi. Vēl jo vairāk, pastāv virkne pretrunīgu pētījumu šinī jautājumā. Acīmredzot atšķirības ir lielākoties dēļ marķieru viltus pozitīviem ekspresijas rezultātiem normālos vairogdziedzera audos un adenomās [10, 11].

Šajā darbā pētījām sekojošu IHĶ marķieru kopumu: *Hector Battifora* mezotēlija antigēns-1 (HBME-1), neirālo šūnu adhēzijas molekula 56 (CD56), epitēliālais kadherīns (E-CAD), ciklooksigenāze-2 (COX-2), antigēns Ki-67 (Ki-67), kā arī proteīns 53 (p53). Marķieru kopumu analizējām operācijas materiālā ar tālāku perspektīvāko marķieru sekojošu izmeklēšanu FNA materiālā.

Hector Battifora mezotēlija antigēnu-1 (HBME-1) pirmo reizi literatūrā apraksta 1992. gadā *Battifora et al.* [12], kā monoklonālu antivielu, kas vērsta pret mezoteliālās šūnas virsmas antigēnu [13]. Lai gan sākotnēji šī antiViela tika pielietota, kā mezoteliomas marķieris, vēlāk tika uzsākti pētījumi par šī marķiera pielietojuma efektivitāti vairogdziedzera vēža diagnostikā [12, 14].

CD56 antigēns, kurš atpazīstams arī kā Leu-19, ir glikoproteīns, kas tiek ekspresēts uz ~ 15% perifēro asiņu limfocītiem. 1983. gadā *Griffin et al.* [15] un 1985. gadā *Hercend et al.* [16] atklāja tā klātbūtni *natural killer* šūnās. CD56 ekspresija arī ir sastopama aktivētās T šūnās, granulocītos, specifiskās endokrīnās un smadzeņu šūnās, līdz ar to pastāv uzskats, ka CD56 antigēns ir iesaistīts šūnu adhēzijas procesos. CD56 ir neirāla šūnas adhēzijas molekula, kas sastopama vairogdziedzera folikulārajās epitēlijā šūnās [17].

E-CAD ir transmembranozs glikoproteīns, kas pieder pie adhēzijas receptoru saimes un ir sastopams lielākā daļā epiteliālo šūnu [18]. Uzskata, ka tas ir būtisks šūnu polaritātes un audu struktūras uzturētājs, kam ir nozīmīga loma vēža attīstībā. Šūnas, kuras normālos apstākļos ekspresē E-CAD pēc morfoloģiskā tipa ir epiteloīdas bez invazīvas augšanas, turpretim bez E-CAD ekspresijas šūnas ir fibroblastoīdas ar izteikti invazīvu augšanu [19]. Pirmo reizi E-CAD ekspresiju normālos vairogdziedzera audos aprakstīja *Eidelman et al.* 1989. gadā [20].

COX-2 ir ātrās atbildes gēns, kuru inducē augšanas faktori, tumora promoteri, onkogēni un kancerogēni. Virkne pētījumu pierāda COX-2 nozīmi kancerogēnēzē. COX-2 ekspresiju ļaundabīgos vairogdziedzeru audzējos, kā arī tā iztrūkumu labdabīgos vairogdziedzera audos pirmo reizi 2002. gadā aprakstījis *Specht et al.* [21].

Ki-67 antigēns, pazīstams arī kā monoklonālā antiviela MIB1, tiek ekspresēta šūnas aktīvajā fāzē. Tiklīdz šūna nonāk neproliferatīvā fāzē, antigēns tiek strauji noārdīts. Morfoloģiskajā vēžu diagnostikā Ki-67 noteikšana kļuvusi aktuāla, jo tas kalpo kā šūnas proliferatīvās aktivitātes marķieris. Ki-67 ekspresiju vairogdziedzeru veidojumos pirmo reizi aprakstījis *Rigaud et al.* 1991. gadā [22].

p53 ir svarīgs audzēja supresorgēns, kurš regulē šūnas atbildi uz DNS bojājumu, kā arī spēj inhibēt šūnas proliferāciju un transformāciju [23, 24]. Aptuveni 50% visu vēžu gadījumu ir sastopamas mutācijas p53 audzēja supresorgēnā, kas ir arī biežākā ģenētiskā mutācija audzēja šūnās [25].

1.1. Darba mērķis

Izvērtēt molekulāro marķieru diagnostisko nozīmi vairogdziedzera mezglu ārstēšanas taktikas izvēlē.

1.2. Darba uzdevumi

1. Noteikt molekulāro marķieru (E-CAD, CD56, HBME-1, COX-2, Ki-67 un p53) ekspresiju labdabīgos un ļaundabīgos vairogdziedzera audos.
2. Izveidot marķieru kopumu, kas varētu tikt rekomendēts vairogdziedzera mezglu histoloģiskajā diagnostikā papildus morfoloģiskajiem kritērijiem.
3. Pielietot un izvērtēt šo marķieru nozīmi vairogdziedzera tievās adatas punkcijas biopsijas (FNA) imunocitoķīmiskajā izmeklējumā.
4. Izstrādāt praktiskas rekomendācijas molekulāro marķieru pielietojumam vairogdziedzera mezglu diagnostikā un ārstēšanas taktikas izvēlē.

1.3. Darba hipotēzes

1. Izvēlēto molekulāro marķieru (HBME-1, COX-2, E-CAD, CD56, Ki-67 and p53) noteikšana ir lietderīga un papildina vairogdziedzera morfoloģiskos kritērijus.
2. Katra marķiera ekspresijas veids ir atšķirīgs, tādēļ, savstarpēji kombinējot vairākus, sasniedzama laba diagnostiskā precizitāte.
3. Ir iespējams izstrādāt tehnoloģiju un noteikt molekulāros marķierus vairogdziedzera FNA materiālā
4. Pirms operācijas klīniski un radioloģiski neviennozīmīgi interpretējamus vairogdziedzera mezglos, papildus var imunocitoķīmiski (ICK) noteikt molekulāros marķierus

1.4. Zinātniskā un praktiskā novitāte

Trīs no sešiem mūsu darbā analizētajiem molekulārajiem marķieriem uzrādīja ticamus rezultātus ekspresijai labdabīgos un ļaundabīgos audos. Šāda diagnostiskā paneļa izveide atbilst pasaules medicīnas aktualitātēm. Izveidota un pielietota praksē vairogdziedzera FNA materiāla ICK izmeklēšanas tehnoloģija. Līdzīgi tā pielietojama citos punkcijas biopsijas materiāla izmeklējumos. Līdz šim Latvijā pirmo reizi ICK izmeklēts vairogdziedzera FNA materiāls.

1.5. Personīgais ieguldījums

Autors personīgi piedalījies visās pētījuma stadijās, ieskaitot pētījuma plānojumu un marķieru izvēli. Piedalījies vairogdziedzera operācijās, US izmeklējumos un FNA biopsijās, kā arī pacientu pēcoperācijas aprūpē. Autors personīgi veicis literatūras izpēti, zinātniskos mērījumus, kā arī datu analīzi un aprakstu. Autors piedalījies IHK tehnoloģijas procesā un ir darbā iegūto mikrofotogrāfiju autors.

1.6. Ētiskie apsvērumi

Pētījums apstiprināts VSIA Paula Stradiņa Klīniskās universitātes slimnīcas Ētikas komitejā, atzinums Nr. 151209-3L.

1.7. Promocijas darba struktūra un apjoms

Promocijas darbs uzrakstīts angļu valodā. Tam ir klasiska uzbūve. Darbs ietver ievadu, literatūras apskatu, materiālu un metožu apskatu, rezultātus, diskusiju, secinājumus, praktiskās rekomendācijas un literatūras avotu sarakstu. Promocijas darbs noformēts uz 116 lappusēm, iekļautas 20 tabulas un 20 attēli. Darbā izmantoti 258 literatūras avoti.

2. MATERIĀLS UN METODES

2.1. Pētījuma uzbūve

Pētījuma pirmā etapa ietvaros laika posmā no 2006. - 2010. gadam no Paula Stradiņa Klīniskās universitātes slimnīcas Patoloģijas institūta arhīva tika atlasīti 163 vairogdziedzera operāciju audu materiāli. Pēc histoloģiskās diagnozes verificācijas tika veikta IHĶ audu izmeklēšana, nosakot sekojošus IHĶ marķierus: HBME-1, COX-2, E-CAD, CD56, Ki-67 un p53.

Iekļaušanas kritēriji:

- Diferencēts vairogdziedzera vēzis, iekļaujot visus papillāra vēža tipus, kā arī folikulāro vēzi (FV);
- Viennozīmīga morfoloģiskā atradne;
- Lielākā mezgla diametrs ne mazāks kā 1 cm;
- Analizēšanai pietiekošs audu parafīna materiāls;

- Laika posms kopš operācijas līdz IHĶ izmeklēšanai nepārsniedz 8 gadus.

Izslēgšanas kritēriji:

- Folikulārā vēža *Hürthle* šūnu variants;
- Anaplastisks vēzis;
- Lielākā mezgla diametrs mazāks par 1 cm;
- Medullārs vairogdziedzeru vēzis;
- Metastātisks vēzis vai maligna limfoma;
- Analizēšanai nepietiekošs audu parafīna materiāls;
- Laika posms kopš operācijas līdz IHĶ izmeklēšanai lielāks par 8 gadiem.

Pētījuma otrā etapa ietvaros tika iekļauti 68 pacienti, kuriem laika posmā no 2010. līdz 2011. gadam Paula Stradiņa Klīniskās universitātes slimnīcā veikta vairogdziedzeru FNA ar sekojošu vairogdziedzeru operāciju.

Imunocitoķīmiski FNA materiālā noteikti sekojoši marķieri: E-CAD, CD56, HBME-1, kuri pēc pirmā pētījuma etapa rezultātiem uzrādīja visdaudzsološākos rezultātus.

Iekļaušanas kritēriji:

- Pieejams FNA materiāls, kā arī operācijas materiāls tam pašam gadījumam, ņemot vērā augšminētos iekļaušanas kritērijus;
- Laika posms kopš FNA līdz operācijai mazāks par vienu gadu.

Izslēgšanas kritēriji:

- Nepieejams operācijas materiāls;
- Laika posms kopš FNA līdz operācijai lielāks par vienu gadu.

2.2. Materiāls

Pēc histoloģiskās diagnozes verifikācijas pētījuma pirmajā etapā tika iekļauti 113 labdabīgi vairogdziedzeru audi, tai skaitā 36 folikulāras adenomas (FA) un 77 koloīdas strumas (KS), kā arī 50 ļaundabīgi audi, starp kuriem 36 PV un 14 FV.

Pētījuma otrajā grupā tika iekļauti 42 labdabīgi vairogdziedzera audi, tai skaitā 22 FA un 20 KS, kā arī 26 ļaundabīgi audzēju audi, starp kuriem 25 PV un 1 FV.

2.3. Metodes

2.3.1. Audu apstrāde un histoloģiskā izvērtēšana

Operāciju materiāla audi tika fiksēti 10% formalīnā ar sekojošu fiksēšanu parafīna blokos, kā aprakstījis *Bancroft* ar līdzautoriem [26].

Pārskata vizualizācijas mērķiem formalīnā fiksēti, parafīnā ieguldīti audi tika griezti 4 µm biezos griezumos ar automātisko mikrotomu *Microm*, HM 360 (*Microm Int., Walldorf, Vācija*) uz *Histobond* priekšmetstikliem (*Menzel Glasser, Braunschweig, Vācija*) un krāsoti ar hematoksilīnu - eozīnu. Morfoloģiskā diagnoze precizēta mikropreparātu apskates laikā saskaņā ar Pasaules Veselības Organizācijas (PVO) audzēju klasifikāciju [27]. Tālākā pētījumā iekļauti vienīgi gadījumi ar nešaubīgu histoloģisko diagnozi.

2.3.2. Imunohistoķīmija

Imunohistoķīmiskās vizualizācijas veikšanai, formalīnā fiksēti un parafīnā ieguldināti audi tika griezti 3 µm biezos griezumos uz elektrostātiski uzlādētiem *Histobond* priekšmetstikliem un ievietoti termostātā uz vienu stundu

60°C, lai nodrošinātu audu adhēziju. Deparafinizēšana un rehidratācija tika veikta ar inkubāciju ksilolā 4×5 min un etanolā 2×3 min - 99.9%, 4×3 min - 96%, 5 min - 70%. Endogēnās peroksidāzes aktivitāte tika bloķēta, pielietojot 0.5% ūdeņraža peroksīdu metanolā 10 min. Visu ķīmisko izejvielu ražotājs *Sigma-Aldrich (Steinheim, Vācija)*.

Pēc 5 min skalošanas TBS buferī (pH 7.6, *TriBufer* šķīdums, THAM-HCl 50 mM/L, NaCl 150mM/L), mikropreparāti tika pakļauti karstuma - inducētai antigēna struktūras atjaunošanai, ko panāca, ievietojot tos mikroviļņu krāsnī 3×5 min uz maksimālo jaudu bāziskā buferī (TEG, pH 9.0, Tris bāze 10mM/L, EGTA 0.5 mM/L). Pēc karstuma - inducētās antigēna struktūras atjaunošanas mikropreparāti tika atdzesēti istabas temperatūrā 20 min.

Griezumi tika apvilkti ar *DAKO pen (Dako, Glostrup, Dānija)* un pārnesti uz imunokrāsošanas platformu (*CellPath plc, Newtown, Lielbritānija*). Pēc skalošanas ar TBS buferi 5 min, tika veikta inkubācija ar primārām antivielām istabas temperatūrā 60 min. Nesaistītās antivielas vēlāk tika noņemtas, atkārtoti skalojot ar TBS buferi 2×5 min. Primāro antivielu raksturojošie parametri apkopoti tabulā 2.1.

2.1. tabula

Primāro antivielu raksturojums

Mērķa antigēns	Antivielas klons	Antivielas atšķaidījums
E-CAD	NCH-38	1:50
CD56	123C3	1:100
HBME-1	HBME-1	1:50
COX-2	CX-294	1:200
p53	DO-7	1:400

Antivielu ražotājs - *Dako, Glostrup, Dānija*

Vizualizācijai tika pielietota komerciāli pieejamā polimērās vizualizācijas sistēma *EnVision+*, kas saistīta ar peroksidāzi (*Dako*). Katrā grupā tika iekļauti pozitīvie un negatīvie kontroles audi.

Pieredzējuša patologa uzraudzībā autors veica rezultātu novērtējumu un aprēķinus. Proteīnu p53 un Ki-67 ekspresija tika izvērtēta audzēju šūnu kodolos, skaitot pozitīvos kodolus starp 200 neoplastiskām šūnām un rezultātus atspoguļojot, kā procentuālu pozitīvo šūnu skaitu. E-CAD, CD56 un HBME-1 ekspresija, kā arī COX-2 ekspresija, tika aprēķināta semikvantitatīvi, ņemot vērā krāsojuma intensitāti un procentuālu pozitīvo šūnu skaitu. Krāsojuma intensitāte tika vērtēta kā negatīva - 0; vāji pozitīva - 1; vidēji pozitīva - 2; intensīvs krāsojums - 3. Lai novērtētu augstākminēto marķieru ekspresiju visā analizējamā materiālā, ekspresijas intensitāte tika aprēķināta kā krāsojuma intensitātes reizinājums ar procentuālu pozitīvo šūnu skaitu. Par pozitīvu kādam no molekulāriem marķieriem tika uzskatīts materiāls, kura ekspresijas intensitāte sasniedza 1,5.

2.3.3. Aspirācijas citoloģija un imunocitokīmija

Vairogdziedzera mezgla FNA US kontrolē veica viens radioloģijas speciālists VSIA Paula Stradiņa Klīniskās universitātes slimnīcā, pielietojot GE *Voluson E8* ultrasonoskopijas aparāturu ar 11L-D lineāro zondi.

Viena vairogdziedzera mezgla gadījumā FNA veica, ja mezgls lielāks par 1 cm. Multiplu vairogdziedzera mezglu gadījumā izmeklēts tika lielākais mezgls vai mezgls ar US malignitātes pazīmēm. Pie šādām pazīmēm pieder: pazemināta ehogenitāte, mikrokalcinātu klātbūtne, nehomogēna struktūra, neregulāras mezgla robežas, halo zonas iztrūkums, kā arī haotiska centrāla vaskularitāte mezglā un izmainīta mezgla forma [28].

Tika veiktas vismaz 2 punkcijas ar aspirāciju, dokumentējot adatas stāvokli. Iegūtais aspirāts tika izsmērēts uz *Histobond* adhezīvajiem

priekšmetstikliem un nožāvēts istabas temperatūrā.

Imunocitoķīmiskiem pētījumiem, šūnu iztriepes pēc nožāvēšanas tika fiksētas 96% etanolā 10 min. Tālākā tehnoloģija veikta kā aprakstīts punktā 2.3.2., sākot ar primārās antivielas aplikāciju.

2.3.4. Statistiskās analīzes metodes

Pētījumā izmantota aprakstošā statistika, kā arī 95% ticamības intervāla noteikšana vienai proporcijai, un vidējās vērtības analīzei, kā aprakstījis *Altman et al.* [29]. Ticamības intervāla aprēķini veikti, pielietojot CIA programmu (*Confidence Interval Analysis*). Izvērtējot rezultātus, noteikti jutība, specifiskums, paredzamā pozitīvā vērtība (PPV) un paredzamā negatīvā vērtība (PNV).

Datu statistiskai apstrādei tika pielietotas programmas *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS® v18.0) un Microsoft Excel 2011 (Mac).

3. REZULTĀTI

3.1. Imunohistoķīmisko izmeklējumu rezultāti

Pētījuma pirmajā etapā tika analizēti 50 ļaundabīgi un 113 labdabīgi vairogdziedzera operācijas audu materiāli, tai skaitā 36 PV, 14 FV, kā arī 36 FA un 77 KS. Pētījumā tika iekļautas 143 sievietes un 20 vīrieši; vidējais pacientu vecums bija 57 ± 14.52 (24 - 85 gadi).

Audzēju stadija bija sekojoša: I stadija, 26/36 PV un 10/14 FV; II stadija, 10/36 PV un 4/14 FV.

3.1.1. E-CAD ekspresija

E-CAD vidējā ekspresijas intensitāte FA bija 2,2 (95% TI = 1,92-2,48), kas ir ievērojami augstāka, salīdzinot ar audiem ap FA - 0,63 (95% TI = 0,39-0,87). Augsta E-CAD ekspresija bija sastopama arī FV - 2,1 (95% TI = 1,64-2,56), taču diemžēl nebija iespējas analizēt E-CAD ekspresiju audos ap FV dēļ vēža plašās invāzijas.

PV atšķirībā no FA un FV konstatēta ļoti zema E-CAD ekspresija - 0,55 (95% TI = 0,34-0,75).

E-CAD ekspresija KS bija 1,39 (95% TI = 1,23-1,54), kas ir zemāka nekā FA vai FV, taču augstāka nekā PV gadījumā.

E-CAD ekspresijas intensitātes rezultāti dažādos vairogdziedzera patoloģiskos procesos ir atspoguļoti tabulā 3.1.

3.1. tabula

E-CAD ekspresijas intensitāte dažādos vairogdziedzera patoloģiskos procesos

Mērķa audi	E-CAD ekspresijas intensitāte				
	N	Vidējā ± SD	95% TI	Min	Max
Folikulāra adenoma	36	2,20 ± 0,82	1,92 - 2,48	0,15	3
Audi ap folikulāru adenomu	32	0,63 ± 0,71	0,39 - 0,87	0	1,5
Papillārs vēzis	36	0,55 ± 0,61	0,34 - 0,75	0	2,4
Audi ap papillāru vēzi	34	1,60 ± 0,85	1,30 - 1,90	0,3	3
Koloīda struma	77	1,39 ± 0,69	1,23 - 1,54	0	3
Folikulārs vēzis	14	2,10 ± 0,80	1,64 - 2,56	0	3

Tabulā izmantotie saīsinājumi: N, mērījumu skaits; SD, standarta deviācija; TI, ticamības intervāls vidējai vērtībai; Min, minimālā iegūtā vērtība; Max, maksimālā iegūtā vērtība.

Ņemot vērā iegūtos E-CAD ekspresijas rezultātus, tika aprēķināta jutība, specifiskums, PPV un PNV. Augsta jutība un specifiskums piemīt E-CAD FA atšķiršanai no audiem ap FA - 0,88 un 0,87. PPV un PNV bija attiecīgi - 0,88 un 0,87.

FA atšķiršanai no PV jutība un specifiskums bija 0,91 un 0,89, bet PV atšķiršanai no audiem ap PV jutība un specifiskums bija 0,70 un 0,86.

E-CAD ekspresijas biežums FA bija 32/36 (88,8%; 95% TI = 74,7-96,0%). Turpretim E-CAD ekspresijas biežums audos ap FA tika novērots 4/32 (12,5%; 95% TI = 5,0-28,0%). Zīmīgi, ka E-CAD ekspresijas biežums PV gadījumā tika novērots tikai 3/36 gadījumos (8,3%; 95% TI = 2,8-21,8%). Audos ap PV E-CAD ekspresijas biežums bija 20/34 (58,8%; 95% TI = 42,2-73,6%).

E-CAD ekspresijas biežums dažādos vairogdziedzera patoloģiskos procesos apkopots tabulā 3.2. E-CAD ekspresija FA un PV redzami attēlos 3.1.A, B.

3.2. tabula

E-CAD ekspresijas biežums dažādos vairogdziedzera patoloģiskos procesos

Mērķa audi	E-CAD	
	Ekspresija n (%)	95% TI
Folikulāra adenoma (n=36)	32 (88,8%)	74,7 - 96,0
Audi ap folikulāru adenomu (n=32)	4 (12,5%)	5,0 - 28,0
Papillārs vēzis (n=36)	3 (8,3%)	2,8 - 21,8
Audi ap papillāru vēzi (n=34)	20 (58,8%)	42,2 - 73,6
Koloīda struma (n=77)	25 (32,4%)	23,0 - 43,5
Folikulārs vēzis (n=14)	13 (92,8%)	68,5 - 98,7

Tabulā izmantotie saīsinājumi: n, absolūtais skaits; TI, ticamības intervāls proporcijai.

3.1.2. CD56 ekspresija

CD56 vidējā ekspresijas intensitāte FA bija 2,2 (95% TI = 1,88-2,51), kas ir izteiktāka, salīdzinot ar audiem ap FA, kur vidējā vērtība bija 0,95 (95% TI = 0,67-1,22). Visaugstākā CD56 vidējā ekspresija bija FV gadījumā - 2,3 (95% TI = 1,72-2,87).

PV gadījumā vidējā CD56 ekspresija bija 0,2 (95% TI = 0,13-0,26), kas ir ievērojami zemāka nekā audos ap PV - 1,02 (95% TI = 0,85-1,18).

CD56 ekspresija KS bija 0,85 (95% TI = 0,70-0,99), kas ir zemāka nekā FA vai FV, taču augstāka nekā PV gadījumā.

CD56 ekspresijas intensitātes rezultāti dažādos vairogdziedzera patoloģiskos procesos ir atspoguļoti tabulā 3.3.

3.3. tabula

CD56 ekspresijas intensitāte dažādos vairogdziedzera patoloģiskos procesos

Mērķa audi	CD56 ekspresijas intensitāte				
	N	Vidējā ± SD	95% TI	Min	Max
Folikulāra adenoma	36	2,20 ± 0,92	1,88 - 2,51	0.6	3
Audi ap folikulāru adenomu	32	0,95 ± 0,77	0,67 - 1,22	0	3
Papillārs vēzis	36	0,20 ± 0,19	0,13 - 0,26	0	0.6
Audi ap papillāru vēzi	34	1,02 ± 0,47	0,85 - 1,18	0.6	2.4
Koloīda struma	77	0,85 ± 0,63	0,70 - 0,99	0	3
Folikulārs vēzis	14	2,30 ± 1,00	1,72 - 2,87	0.4	3

Tabulā izmantotie saīsinājumi: N, mērījumu skaits; SD, standarta deviācija; TI, ticamības intervāls vidējai vērtībai; Min, minimālā iegūtā vērtība; Max, maksimālā iegūtā vērtība.

Ņemot vērā iegūtos CD56 ekspresijas rezultātus, tika aprēķināta jutība, specifiskums, PPV un PNV. CD56 jutība un specifiskums FA atšķiršanai no audiem ap FA bija attiecīgi - 0,88 un 0,82, kā arī PPV un PNV bija - 0,83 un 0,87. Salīdzinot FA ar PV, jutība un specifiskums bija 1,00 un 0,86, taču PV atšķiršanai no audiem ap PV jutība un specifiskums bija 0,53 un 1,00.

CD56 ekspresijas biežums FA bija 28/36 (78,0%; 95% TI = 62,0-88,2%), bet audos ap FA CD56 ekspresijas biežums bija ievērojami retāks 4/32 (12,5%; 95% TI = 5,0-28,0%). PV gadījumā CD56 ekspresija netika konstatēta, un audos ap PV tā bija tikai 1/34 gadījumiem. Savukārt FV gadījumā CD56 ekspresijas biežums bija 13/14 (92,8%; 95% TI = 68,5-99,0%).

CD56 ekspresijas biežums dažādos vairogdziedzera patoloģiskos procesos apkopots tabulā 3.4. CD56 ekspresija FA un ekspresijas zudums PV redzami attēlos 3.1.D, E.

3.4. tabula

CD56 ekspresijas biežums dažādos vairogdziedzera patoloģiskos procesos

Mērķa audi	CD56	
	Ekspresija n (%)	95% TI
Folikulāra adenoma (n=36)	28 (78,0%)	62,0 - 88,2
Audi ap folikulāru adenomu (n=32)	4 (12,5%)	5,0 - 28,0
Papillārs vēzis (n=36)	0 (0%)	0 - 9,6
Audi ap papillāru vēzi (n=34)	1 (3,0%)	0,5 - 15,0
Koloīda struma (n=77)	10 (13,0%)	7,2 - 22,2
Folikulārs vēzis (n=14)	13 (92,8%)	68,5 - 99,0

Tabulā izmantotie saīsinājumi: n, absolūtais skaits; TI, ticamības intervāls proporcijai.

3.1.3. HBME-1 ekspresija

HBME-1 ekspresijas praktiski nebija labdabīgos audos, tai skaitā: FA, KS un audos ap PV un ap FV, bet tā ekspresija bija ļoti intensīva PV gadījumā, kur vidējā ekspresija bija 2,80 (95% TI = 2,68-2,91). FV gadījumā vidējā HBME-1 ekspresija bija 0,90 (95% TI = 0,10-1,70), kas bija sastopama 4/14 FV gadījumiem.

HBME-1 ekspresijas intensitātes rezultāti dažādos vairogdziedzera patoloģiskos procesos ir atspoguļoti tabulā 3.5.

3.5. tabula

HBME-1 ekspresijas intensitāte dažādos vairogdziedzera patoloģiskos procesos

Mērķa audi	HBME-1 ekspresijas intensitāte				
	N	Vidējā ± SD	95% TI	Min	Max
Folikulāra adenoma	36	0,09 ± 0,37	0 - 0,22	0	1,8
Audi ap folikulāru adenomu	32	0,001 ± 0,003	0 - 0,002	0	0,03
Papillārs vēzis	36	2,80 ± 0,33	2,68 - 2,91	2,1	3
Audi ap papillāru vēzi	34	0,006 ± 0,03	0 - 0,016	0	0,15
Koloīda struma	77	0	0	0	0.15
Folikulārs vēzis	14	0,90 ± 1,40	0,10 - 1,70	0	2,85

Tabulā izmantotie saīsinājumi: N, mērījumu skaits; SD, standarta deviācija; TI, ticamības intervāls vidējai vērtībai; Min, minimālā iegūtā vērtība; Max, maksimālā iegūtā vērtība.

Ņemot vērā iegūtos HBME-1 ekspresijas rezultātus, tika aprēķināta jutība, specifiskums, PPV un PNV. PV atšķiršanai no audiem ap PV jutība, specifiskums, PPV un PNV bija 1,00. Jutība un specifiskums FA atšķiršanai no PV bija 1,00 un 0,97, turklāt PPV un PNV bija attiecīgi 0,97 un 1,00.

Izmantojot HBME-1, konstatēts visaugstākais diagnostiskais potenciāls PV atšķiršanai no FA vai citiem labdabīgiem audiem.

HBME-1 ekspresijas biežums FA bija tikai 1/36 gadījumiem (3%; 95% TI = 0,5-14,1%), turklāt ekspresija netika konstatēta nevienā KS gadījumā, kā arī audos ap FA. PV gadījumā ekspresija tika konstatēta 36/36 (100%; 95% TI= 90,3-100%), bet tās nebija audos ap PV. Analizējot FV, HBME-1 ekspresija tika konstatēta 4/14 gadījumos (28,5%; 95% TI = 11,7-54,6%).

HBME-1 ekspresijas biežums dažādos vairogdziedzera patoloģiskos procesos apkopots tabulā 3.6. HBME-1 ekspresija PV un FV redzami attēlos 3.1.C, F.

3.6. tabula

HBME-1 ekspresijas biežums dažādos vairogdziedzera patoloģiskos procesos

Mērķa audi	HBME-1	
	Ekspresija n (%)	95% TI
Folikulāra adenoma (n=36)	1 (3,0%)	0,5 - 14,1
Audi ap folikulāru adenomu (n=32)	0 (0%)	0 - 10,7
Papillārs vēzis (n=36)	36 (100%)	90,3 - 100,0
Audi ap papillāru vēzi (n=34)	0 (0%)	0 - 10,1
Koloīda struma (n=77)	0 (0%)	0 - 4,7
Folikulārs vēzis (n=14)	4 (28,5%)	11,7 - 54,6

Tabulā izmantotie saīsinājumi: n, absolūtais skaits; TI, ticamības intervāls proporcijai.

3.1.4. COX-2 ekspresija

Analizējot COX-2 vidējo ekspresijas intensitāti, tā bija zema visos analizētajos vairogdziedzera audos un neuzrādīja nekādas statistiski ticamas atšķirības starp grupām.

COX-2 ekspresijas intensitātes rezultāti dažādos vairogdziedzera patoloģiskos procesos ir atspoguļoti tabulā 3.7.

3.7. tabula

COX-2 ekspresija dažādos vairogdziedzera patoloģiskos procesos

Mērķa audi	COX-2 pozitīvo šūnu īpatsvars, %				
	N	Vidējā ± SD	95% TI	Min	Max
Folikulāra adenoma	36	0,25 ± 0,41	0,11 - 0,39	0	0,53
Audi ap folikulāru adenomu	32	0,12 ± 0,24	0,03 - 0,20	0	0,31
Papillārs vēzis	36	0,21 ± 0,38	0,08 - 0,34	0	0,51
Audi ap papillāru vēzi	34	0,20 ± 0,32	0,09 - 0,31	0	0,47
Koloīda struma	77	0,34 ± 0,42	0,24 - 0,43	0	0,72
Folikulārs vēzis	14	0,34 ± 0,67	0 - 0,73	0	0,85

Tabulā izmantotie saīsinājumi: N, mērījumu skaits; SD, standarta deviācija; TI, ticamības intervāls vidējai vērtībai; Min, minimālā iegūtā vērtība; Max, maksimālā iegūtā vērtība.

3.1.5. Ki-67 ekspresija

Ki-67 ekspresija kopumā bija zema, nesasniedzot 5%, taču tā statistiski ticami atšķīrās starp PV un audiem ap PV, attiecīgi - 2,36 (95% TI = 2,07-2,64) un 0,99 (95% TI = 0,83-1,14). FV gadījumā ekspresija bija 3,62 (95% TI = 3,00-4,25), kas ir ievērojami augstāka, salīdzinot ar FA - 1,07 (95% TI = 0,85-1,29) vai KS - 0,69 (95% TI = 0,56-0,82).

Kopumā lielāka proliferatīvā aktivitāte bija novērojama ļaundabīgos audzējos. Ki-67 ekspresijas rezultāti dažādos vairogdziedzera patoloģiskos procesos ir atspoguļoti tabulā 3.8.

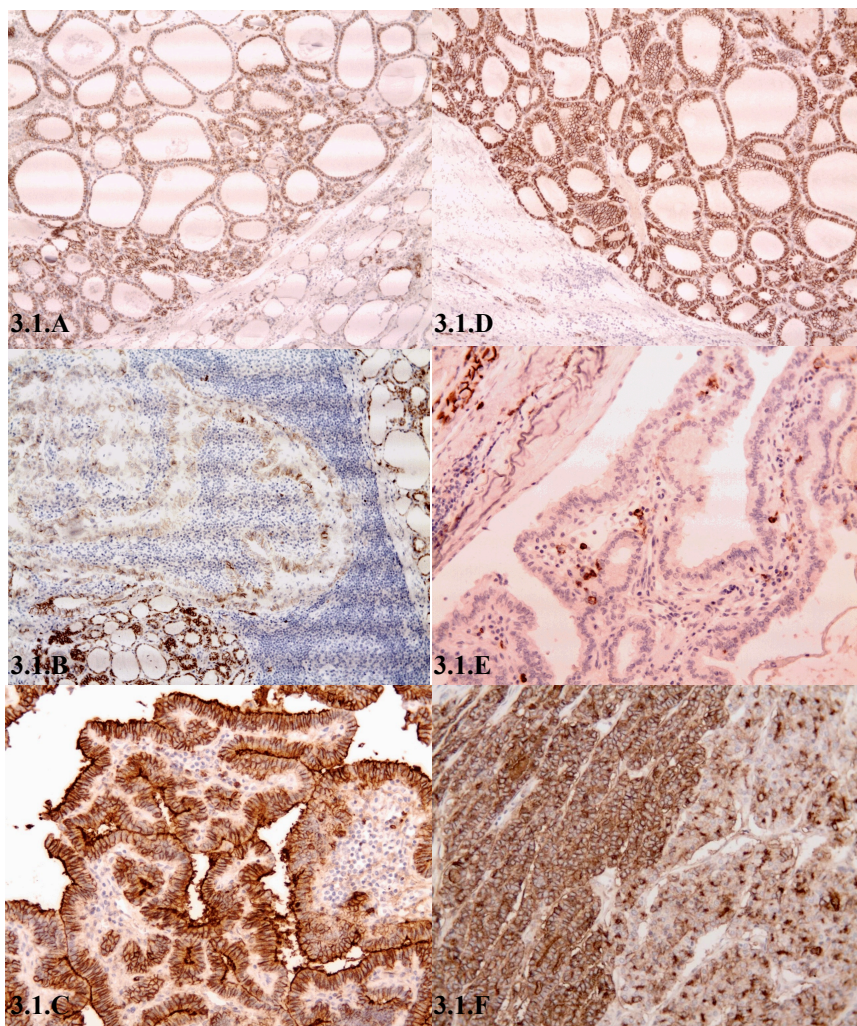
Ki-67 proliferācijas frakcija dažādos vairogdziedzera patoloģiskos procesos

Mērķa audi	Ki-67 pozitīvo šūnu īpatsvars, %				
	N	Vidējā ± SD	95% TI	Min	Max
Folikulāra adenoma	36	1,07 ± 0,65	0,85 - 1,29	0,1	1,7
Audi ap folikulāru adenomu	32	0,75 ± 0,52	0,56 - 0,93	0	1,2
Papillārs vēzis	36	2,36 ± 0,85	2,07 - 2,64	0,2	4,7
Audi ap papillāru vēzi	34	0,99 ± 0,45	0,83 - 1,14	0	1,3
Koloīda struma	77	0,69 ± 0,57	0,56 - 0,82	0	1,0
Folikulārs vēzis	14	3,62 ± 1,10	3,00 - 4,25	0,4	4,9

Tabulā izmantotie saīsinājumi: N, mērījumu skaits; SD, standarta deviācija; TI, ticamības intervāls vidējai vērtībai; Min, minimālā iegūtā vērtība; Max, maksimālā iegūtā vērtība.

3.1.6. p53 ekspresija

p53 ekspresija netika konstatēta nevienā no grupām.



Attēls 3.1.A, intensīva membranoza E-kadherīna ekspresija folikulārā adenomā. Imunoperoxidāze, palielinājums $\times 50$. **3.1.B**, vāja membranoza E-kadherīna ekspresija papillārā vēzī. Intensīva ekspresija apkārtējos labdabīgos audos. Imunoperoxidāze, palielinājums $\times 50$. **3.1.C**, intensīva membranoza HBME-1 ekspresija papillārā vēzī. Imunoperoxidāze, palielinājums $\times 100$. **3.1.D**, intensīva membranoza CD56 ekspresija folikulārā adenomā. Imunoperoxidāze, palielinājums $\times 50$. **3.1.E**, CD56 ekspresijas iztrūkums papillārā vēzī. Imunoperoxidāze, palielinājums $\times 100$. **3.1.F**, intensīva heterogēna HBME-1 ekspresija folikulārā vēzī. Imunoperoxidāze, palielinājums $\times 100$.

3.2. Imunocitoķīmisko izmeklējumu rezultāti

Pētījuma otrajā etapā izvēlējamies trīs no sešiem marķieriem (E-CAD, CD56 un HBME-1), kuri pirmajā etapā uzrādīja vērā ņemamus rezultātus. Pēc veiktas vairogdziedzera FNA, pēcooperācijas morfoloģiskajā atradnē konstatēti ļaundabīgi audi 26 gadījumos, tai skaitā 25 PV un viens FV, kā arī labdabīga atradne 42 gadījumos, tai skaitā 22 FA un 20 KS.

Pacientu vidējais vecums pētījuma otrajā etapā bija $54 \pm 13,96$ (22 - 77 gadi). No 68 pacientiem sievietes - 62, vīrieši - 6. Konstatētie ļaundabīgie audzēji pārsvarā bija I stadijā (24/26). Divi audzēji II stadijā (24/26).

3.2.1. E-CAD ekspresija FNA materiālā

E-CAD imunocitoķīmiska ekspresija FA bija 16/22 (72,7%; 95% TI = 52,0-87,0%), turpretim E-CAD ekspresija PV gadījumā bija vienīgi 2/25 (8%; 95% TI = 2,2-25,0%). KS gadījumā ekspresija līdzīgi PV ļoti zema 2/20 (10%; 95% TI = 2,8-30,1%). FV gadījumā ekspresija netika konstatēta.

E-CAD imunocitoķīmiskās izmeklēšanas rezultāti atspoguļoti tabulā 3.9. E-CAD imunocitoķīmiska ekspresija redzama attēlā 3.2.A.

3.9. tabula

E-CAD ekspresijas biežums dažādos vairogdziedzera patoloģiskajos procesos FNA materiālā

Mērķa audi	E-CAD	
	Ekspresija n (%)	95% TI
Folikulāra adenoma (n=22)	16 (72,7%)	52,0 - 87,0
Koloīda struma (n=20)	2 (10%)	2,8 - 30,1
Papillārs vēzis (n=25)	2 (8%)	2,2 - 25,0
Folikulārs vēzis (n=1)	0 (0%)	0 - 80,0

Tabulā izmantotie saīsinājumi: n, absolūtais skaits; TI, ticamības intervāls proporcijai.

3.2.2. CD56 ekspresija FNA materiālā

CD56 imunocitoķīmiska ekspresija FA bija 12/22 (54,5%; 95% TI = 34,6-73,0%), turpretim PV gadījumā CD56 ekspresija bija ļoti zema 1/25 (4%; 95% TI = 0,7-20,0%). KS gadījumā CD56 ekspresija bija līdzīgi PV tikai 1/20 (5%; 95% TI = 0,9-23,6%) FV gadījumā ekspresija netika konstatēta.

CD56 imunocitoķīmiskās izmeklēšanas rezultāti atspoguļoti tabulā 3.10. CD56 imunocitoķīmiska ekspresija redzama attēlā 3.2.B.

3.10. tabula

CD56 ekspresijas biežums dažādos vairogdziedzera patoloģiskajos procesos FNA materiālā

Mērķa audi	CD56	
	Ekspresija n (%)	95% TI
Folikulāra adenoma (n=22)	12 (54,5%)	34,6 - 73,0
Koloīda struma (n=20)	1 (5%)	0,9 - 23,6
Papillārs vēzis (n=25)	1 (4%)	0,7 - 20,0
Folikulārs vēzis (n=1)	0 (0%)	0 - 79,3

Tabulā izmantotie saīsinājumi: n, absolūtais skaits; TI, ticamības intervāls proporcijai.

3.2.3. HBME-1 ekspresija FNA materiālā

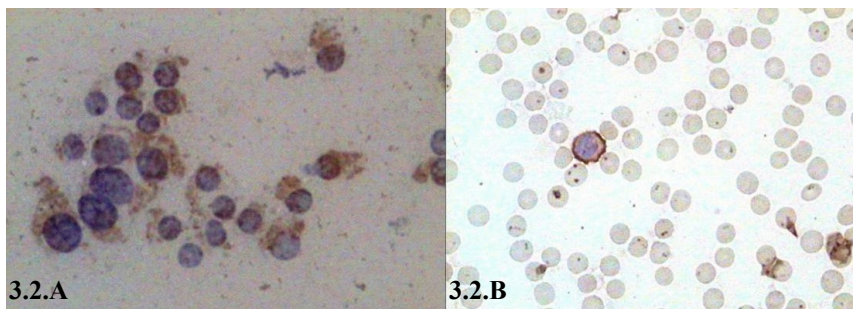
HBME-1 imunocitoķīmiska ekspresija PV gadījumā bija ļoti augsta un sastopama praktiski visos analizējamajos FNA gadījumos 24/25 (96%; 95% TI = 80,4-99,3%). FA, KS, kā arī vienīgajā FV gadījumā HBME-1 netika konstatēta.

HBME-1 imunocitoķīmiskās izmeklēšanas rezultāti atspoguļoti tabulā 3.11.

**HBME-1 ekspresijas biežums dažādos vairogdziedzeru patoloģiskajos
procesos FNA materiālā**

Mērķa audi	HBME-1	
	Ekspresija n (%)	95% TI
Folikulāra adenoma (n=22)	0 (0%)	0 - 15,0
Koloīda struma (n=20)	0 (0%)	0 - 16,1
Papillārs vēzis (n=25)	24 (96%)	80,4 - 99,3
Folikulārs vēzis (n=1)	0 (0%)	0 - 80,0

Tabulā izmantotie saīsinājumi: n, absolūtais skaits; TI, ticamības intervāls proporcijai.



Attēls 3.2.A, citoplazmātiska E-CAD ekspresija vairogdziedzeru epiteliālo šūnu grupā. Imunoperoxidāze, anti-E-CAD, palielinājums $\times 400$. **3.2.B**, intensīva membranoza CD56 ekspresija epiteliālā šūnā, neskatoties uz daudzu eritrocītu klātbūtni. Imunoperoxidāze, anti-CD56, palielinājums $\times 400$.

4. DISKUSIJA

Klīniskajā praksē vairogdziedzera mezgli ir sastopami ~ 40% cilvēku vecumā no 30-60 gadiem, bez tam vairogdziedzera vēzis ir visbiežākais no ļaundabīgajiem endokrīnajiem audzējiem. Lielākā daļa no mezgliem ir labdabīgi. Ir salīdzinoši maz ļaundabīgu vai aizdomīgu mezglu, kuru gadījumā nepieciešama ķirurģiska ārstēšana. Tieši tādēļ ir ļoti būtiski atklāt potenciāli ļaundabīgos mezglus un nodrošināt pacientam adekvātu ārstēšanas taktiku. Precīza morfoloģiskā diagnostika ir ļoti būtiska pacienta tālākajā ārstēšanā. Kļūdas jebkurā no šiem diagnostikas un ārstēšanas etapiem izraisa būtiskas sociāli ekonomiskas problēmas, nepamatotas ķirurģiskas operācijas, kā arī paaugstina izdevumus veselības aprūpei [13].

Šīs problēmas būtiskumu apliecina pieaugošais vairogdziedzera vēža biežums Latvijā [30]. Saskaņā ar Latvijas Republikas Centrālās statistikas pārvaldes datiem, vairogdziedzera vēža biežums kopš 1990. gada līdz 2011. gadam ir pieaugusi 3,3 reizes. 1990. gadā tie bija 59 vēža gadījumi, savukārt 2011. gadā jau 195 gadījumi. Sievietēm vairogdziedzera vēža biežums, saskaņā ar 2011. gada datiem, ir 5 reizes lielāks nekā vīriešiem [30].

Lai pieņemtu lēmumu, vai pacientu ar vairogdziedzera mezglu novērot, vai rekomendēt ķirurģisku ārstēšanu, parasti izmanto sekojošus kritērijus: klīniskie izmeklējumi, vairogdziedzera US, scintigrāfija un vairogdziedzera FNA. Vairogdziedzera vēža diferenciālā diagnostika bieži ir ļoti sarežģīta.

Latvijā pirmo vairogdziedzera FNA veica *Dr. med.* Pēteris Priedītis 1991. gadā. Kopš tā laika FNA veikta epizodiski, nepārsniedzot 20-30 izmeklējumus gadā [31]. Pēdējo 3 gadu laikā FNA skaits ir ievērojami pieaudzis, un to Latvijā, patreiz veic sekojošās vietās: Valsts SIA Paula Stradiņa Klīniskās universitātes slimnīcā, Teikas Klīnikā, Rīgas Austrumu Klīniskās universitātes slimnīcā Onkoloģijas centrā, kā arī ievērojami mazākā daudzumā

Valmierā un Liepājā. Lielākā daļa FNA tiek veiktas Teikas Klīnikā - 1200 FNA gadā (2011. gada dati), tad seko Rīgas Austrumu Klīniskās universitātes slimnīca Onkoloģijas centrs - 700 FNA gadā un Valsts SIA Paula Stradiņa Klīniskās universitātes slimnīca - 400 FNA gadā [32].

Šobrīd tiek uzskatīts, ka vairogdziedzera mezgla FNA ar sekojošu materiāla citoloģisko izmeklēšanu ir pirmās izvēles metode mezglu tālākai izvērtēšanai un pacientu ārstēšanas taktikas tālākai lemšanai. Tomēr, vairogdziedzera FNA citoloģiskajai izmeklēšanai ir vairāki būtiski ierobežojumi, kas neļauj atšķirt labdabīgus un ļaundabīgus folikulāros veidojumus, jo morfoloģiskā diagnostika ir balstīta uz kapsulāras un / vai vaskulāras ieaugšanas histoloģisku identifikāciju, ko nav iespējams atklāt citoloģiskajā materiālā. Tā rezultātā šiem pacientiem tiek veikta operācija, kur morfoloģiskajā atradnē tikai ~ 10% gadījumu atklāj ļaundabīgu audzēju [9].

Ņemot vērā iepriekš minētos apsvērumus, pēdējo gadu laikā literatūrā īpaša uzmanība tiek pievērsta jaunu diagnostisko kritēriju vai molekulāro / imunohistoķīmisko marķieru meklējumiem.

Saskaņā ar mūsu darba rezultātiem, **HBME-1** uzrādīja augstus ekspresijas rādītājus visos papillāra vēža gadījumos, kā arī 4/14 folikulāra vēža gadījumos operācijas audu materiālā. Augsta HBME-1 ekspresija tika konstatēta arī analizētajā FNA materiālā.

HBME-1 ekspresija labdabīgos vairogdziedzera audos operāciju materiālā, kā arī FNA materiālā netika konstatēta. Šie rezultāti ir saskaņā ar pētījumu, ko veicis *Nasr et al.* [14], analizējot HBME-1 ekspresiju vairogdziedzera operāciju audu materiālā, kur HBME-1 konstanti uzrādīja pozitīvu ekspresiju 49/51 (96%) papillāra vēža gadījumos, taču labdabīgie vairogdziedzera audi bija sistemātiski negatīvi. Pēc šī pētījuma datiem papillāra vēža gadījumā, HBME-1 jutība un specifiskums bija attiecīgi 96% un 93%.

Arī *Miettinen et al.* [33] publicētais pētījums uzrāda augstu HBME-1 ekspresiju 145/145 papillāra un 27/27 folikulāra vēža gadījumos, turpretim 33%

koloīdās strumās ekspresija bija negatīva vai arī bija viegli fokāli pozitīva. Šinī pētījumā zīmīgs šķiet fakts, ka visi folikulāra vēža gadījumi bija ar augstu ekspresiju, taču pēc mūsu pētījuma datiem pozitīvi bija 4/14 gadījumi. Šī atšķirība būtu izskaidrojama ar atšķirīgiem primārās antivielas tehnoloģiskajiem parametriem. Tomēr mēs uzskatām, ka nemainīgi augsta ekspresija varētu liecināt par iespējamiem tehnoloģiskiem trūkumiem.

Saleh et al. [34] analizēja HBME-1 imunocitoķīmisku ekspresiju vairogdziedzera FNA materiālā un konstatēja, ka 24/27 (88,8%) HBME-1 uzrādīja augstu ekspresiju papillārā vēzī, salīdzinot ar labdabīgiem audiem, kur tā bija attiecīgi 12/44 (27,3%). Šie rezultāti sakrīt ar mūsu pētījuma datiem, kā arī ar iepriekš publicētajiem rezultātiem.

Analizējot mūsu datus, papillārā vēža gadījumā ir ievērojami zemāka **E-CAD** ekspresija, salīdzinot to ar folikulāru adenomu vai audiem ap papillāru vēzi. Turpretim folikulāra vēža gadījumā E-CAD neuzrādīja ievērojamas atšķirības, salīdzinot ar folikulāru adenomu un kopējā ekspresijas intensitāte bija ļoti augsta. Kā jau minēts iepriekš, mūsu darba otrajā etapā bija tikai viens folikulāra vēža gadījums.

Līdzīgi mūsu pētījuma datiem, *Brabant et al.* [35] uzrāda zemu un neviendabīgu E-CAD ekspresiju papillārā vēzī, bet intensīvu audos ap vēzi un adenomā. Autors pētījumā analizēja 16 papillārus vēžus, no kuriem 9 konstatēja zemu E-CAD ekspresiju, salīdzinājumā ar apkārtējiem audiem.

Vienu no retajiem publicētajiem pētījumiem par E-CAD ekspresiju FNA materiālā veicis *Pazaitou-Panayiotou et al.* [36]. Autora darbā iekļautajos 83 FNA izmeklējumos, kas diagnosticēti kā papillāri vēži, un ļoti zema E-CAD ekspresija bija 79/83 (93,97%). Šī atradne ir ļoti līdzīga mūsu darba rezultātiem. Autors izsaka secinājumu, ka E-CAD samazinājums varētu liecināt par paaugstinātu papillārā vēža risku, jo īpaši noderīgs marķieris varētu būt diagnostiski neviennozīmīgos gadījumos.

Pieejami ļoti nedaudzi pētījumi par **CD56** ekspresiju vairogdziedzera veidojumos. Nav publicēti dati, kur CD56 ekspresija būtu analizēta starp tik daudz folikulāra vēža gadījumiem, kā tas ir mūsu darbā un ir tikai viens pētījums, kur CD56 ekspresija ir analizēta vairogdziedzera FNA materiālā.

Mūsu rezultātiem līdzīgu atradni ir publicējis *Migita et al.* [37], analizējot CD56 ekspresijas intensitāti vairogdziedzera operācijas materiālā. Rezultāti pārliecinoši uzrādīja CD56 ekspresiju zemāku par 10% papillārā vēzī, turklāt ekspresija bija augsta 70% koloīdas strumas un folikulāras adenomas paraugos. *Migita et al.* rezultāti ir līdzīgi mūsu iegūtajiem datiem, vienīgi CD56 ekspresija papillārā vēzī mūsu pētījumā bija ievērojami zemāka.

Zeromski et al. [17] analizēja CD56 ekspresiju vairogdziedzera operācijas materiālā koloīdās strumās, kur CD56 uzrādīja pozitīvu ekspresiju. Autors izsaka pieņēmumu, ka CD56 ir iesaistīts vairogdziedzera normālā un patoloģiskā morfoģenēzē, veicinot homotipisko šūnu adhēziju vairogdziedzera attīstībā un funkcionēšanā [17].

Viens no jaunākajiem publicētajiem ziņojumiem, ko veica *Kim et al.* [38], analizējot CD56 ekspresiju 72 papillāros vēžos, atklāja iepriekš minētajiem pētījumiem un arī mūsu iegūtajiem datiem līdzīgus rezultātus. Visos 72 paraugos bija pozitīva CD56 ekspresija, tomēr tās intensitāte bija samazināta 65 papillāros vēžos - 90,3%. Šajā pētījumā tika iekļauti visi papillāro vēžu veidi, turklāt CD56 ekspresija starp tiem neuzrādīja nekādas statistiski ticamas atšķirības ($p>0.05$). Ņemot vērā iepriekš minēto, mūsu darbā papillāro vēžu veidi netika atsevišķi izdalīti.

Pētījumā, ko veicis *Specht et al.* [21], ir publicēti pretēji rezultāti mūsu atradnei. Autors analizēja **COX-2** imunohistoķīmisko ekspresiju 28 vairogdziedzera audu paraugos, kuru skaitā bija 12 papillāri vēži un 1 folikulārs vēzis. Lielākā daļā gadījumu COX-2 uzrādīja multifokālu ekspresiju ar mērenu vai stipru intensitāti. Normālos audos COX-2 ekspresija bija nenozīmīga. Vēža audos COX-2 ekspresija bija lokalizēta tikai neoplastiskās šūnās. Ekspresiju

nekonstatēja ne apkārtējās stromas šūnās, ne iekaisuma šūnās. Šie rezultāti ir pretrunā ar mūsu iegūtajiem datiem, jo mēs nekonstatējām statistiski ticamu atšķirību COX-2 ekspresijā starp koloīdu strumu, folikulāru adenomu, papillāru vēzi un folikulāru vēzi. Pastāv tehnoloģiskas variācijas, kas rada atšķirības COX-2 imunohistoķīmiskajā ekspresijā [39].

Mūsu pētījuma rezultātiem līdzīgu atradni ir publicējis *Kim et al.* [40]. Imunohistoķīmiski analizējot COX-2 ekspresiju 19 papillāros vēžos, 8 folikulāros vēžos, 14 folikulārās adenomās un 8 koloīdās strumās. COX-2 ekspresija netika atklāta nevienā no koloīdas strumas audiem, taču COX-2 ekspresējās visos papildārā vēža, kā arī 7/8 folikulārā vēža un 11/14 folikulāras adenomas audu paraugos. *Kim et al.* secināja, ka COX-2 nevar būt noderīgs marķieris vairogdziedzera audzēja diagnostikā. Autors uzskata, ka šis marķieris varētu būt iesaistīts agrīnā vairogdziedzera vēža attīstības procesā. Mūsu pētījuma rezultāti neuzrādīja nozīmīgu COX-2 ekspresijas atšķirību dažādos vairogdziedzera audu paraugos, līdz ar to uzskatām, ka COX-2 noteikšanas nozīme vairogdziedzeru mezglu diferenciālā diagnostikā ir apšaubāma.

Analizējot **Ki-67**, *Mehrotra et al* [41], ir publicējis pārliecinošus rezultātus, kas apstiprina arī mūsu atradni. Šī pētnieku grupa Ki-67 ekspresiju izvērtēja 128 pacientiem ar sekojošām histoloģiskajām diagnozēm: 38 papillāri vēži, 22 folikulāri vēži, 33 folikulāras adenomas un 35 koloīdas strumas. Imunohistoķīmiski Ki-67 ekspresiju analizēja formalīnā fiksētos, parafīnā ieguldinātos audu paraugos. Ki-67 ekspresijas intensitāte bija augstāka folikulārā vēža un papillārā vēža gadījumā, salīdzinot ar folikulāru adenomu vai koloīdu strumu. Turklāt šī ekspresijas intensitāte statistiski ticami atšķīrās folikulārā vēzī un folikulārā adenomā ($P < 0.0001$). Tomēr, jāpiemin, ka Ki-67 ekspresija ļoti plaši pārklājās starp analizētajām histoloģiskajām grupām un arī vienas grupas ietvaros tā bija ļoti nevienmērīga. *Mehrotra et al.* secina, ka Ki-67 pašlaik nevar tikt rekomendēts praktiskā lietošanā vairogdziedzeru mezglu diferenciālā diagnostikā.

Līdzīgus rezultātus ir publicējis *Liang et al.* [42], kurš analizēja vairāk kā 10 IHĶ marķierus 119 vairogdziedzera pacientu audu paraugos, tai skaitā 71 papillārs vēzis, 26 folikulāri vēži un 48 folikulārās adenomas. Ki-67 ekspresija statistiski neatšķīrās starp grupām, un tā ekspresija bija ļoti variabla no + līdz ++++. Autors secinājis, ka rezultāti varētu būt atkarīgi no primārās antivielu izvēles, kā arī antigēna identifikācijas metodes. Praktiskajā lietošanā viens pats Ki-67 nav rekomendējams vairogdziedzera mezglu diferenciālā diagnostikā.

Mūsu pētījumā **p53** ekspresija netika novērota nevienā no analizētajām grupām. Tas būtu izskaidrojams ar to, ka mūsu darbā netika iekļauti mazdiferencēta vēža veidi, kā arī paraugi no limfmezglu metastāzēm. Iespējamās rezultātu atšķirības būtu izskaidrojamas arī ar dažādu primāro antivielu ražotāju pielietojumu.

Pārliecinošus rezultātus ir aprakstījis *Morita et al.* [43], analizējot p53 ekspresiju 68 pacientiem, kuriem veikta tireoidektomija ar limfadenektomiju dēļ papillāra vēža. IHĶ rezultāti uzrādīja intensīvu p53 ekspresiju papillārā vēzī un atklāj statistiski ticamu korelāciju starp p53 ekspresiju un vēža izmēru, metastāžu klātbūtni limfmezglos un vidējo metastāžu skaitu limfmezglos. Līdz šim šis ir vienīgais pētījums, kurā analizēts tik liels pozitīvo limfmezglu skaits (n=196).

Vairogdziedzera mezglu diferenciālā diagnostika un terapijas izvēles iespējas joprojām ir aktuāla problēma, ņemot vērā gan medicīniskos, gan sociālos un ekonomiskos faktoros. Domājams, ka šī tēma nākotnē vēl ilgi nezaudēs savu aktualitāti. Mūsdienās atklājumiem molekulārajās tehnoloģijās, kā arī radioloģiskajā diagnostikā ir izšķiroša nozīme vairogdziedzera mezglu izmeklēšanas un ārstēšanas taktikas izvēlē.

5. SECINĀJUMI

1. Dažādos vairogdziedzeru mezglos imunohistoķīmiski ir atrodamas ievērojamas atšķirības.
2. Pielietojot marķieru kopumu (HBME-1, E-CAD un CD56), var ticami atšķirt papillāru vēzi no folikulāriem veidojumiem (folikulāra adenoma un folikulārs vēzis).
3. HBME-1 ir jutīgākais un specifiskākais papillāra vēža diagnostiskais marķieris. Tā ekspresijas nav labdabīgos audos.
4. E-CAD un CD56 ekspresija folikulārā adenomā un folikulārā vēzī ir ievērojami augstāka, salīdzinot ar apkārtējiem audiem. Ekspresijas zudums var liecināt par papillāru vēzi.
5. Proliferatīvā Ki-67 aktivitāte bija zema, nerasniedzot 5%, taču tā bija statistiski ticami palielināta ļaundabīgos audzējos.
6. p53 ekspresija netika konstatēta nevienā no grupām.
7. COX-2 ekspresija neuzrādīja statistiski ticamas atšķirības starp grupām un kopumā bija zema.
8. Izstrādātās FNA tehnoloģijas atklāj atšķirīgu E-CAD, HBME-1 un CD56 ekspresijas biežumu vairogdziedzera folikulārā adenomā un papillārā vēzī.

6. PRAKTISKĀS REKOMENDĀCIJAS

1. Izstrādātās imunohistoķīmiskās metodes jāievieš praktiskajā darbā vairogdziedzeru mezglu histoloģiskajā diagnostikā.
2. Iesakam imunocitoķīmiskās izmeklēšanas tehnoloģijas pielietošanu FNA materiālā.
3. Izveidoto molekulāro marķieru kopumu (HBME-1, E-CAD and CD56) FNA materiālā rekomendējam pielietot kā papildus kritēriju vēža diagnostikai gadījumos, kad US malignitātes kritēriji nav viennozīmīgi interpretējami.

4. Ņemot vērā marķieru ekspresijas rezultātus FNA materiālā, iespējams atbilstošāk izvērtēt indikācijas vairogdziedzera ķirurģiskai ārstēšanai un nepieciešamajam operācijas apjomam

7. PUBLIKĀCIJAS PAR PĒTĪJUMA TĒMU

1. Ozolins A., Narbutis Z., Strumfa I., Volanska G., Gardovskis J. *DIAGNOSTIC UTILITY OF IMMUNOHISTOCHEMICAL PANEL IN VARIOUS THYROID PATHOLOGIES*. Langenbeck's Archives of Surgery, 2010 p. 885-891.
2. Ozolins A., Narbutis Z., Strumfa I., Prieditis P., Gardovskis J. *DIAGNOSIS AND MANAGEMENT OF THE THYROID NODULES*. Acta Chirurgica Latviensis, 2010, p. 86-91.
3. Ozolins A., Narbutis Z., Strumfa I., Volanska G., Prieditis P., Stepanovs K., Gardovskis J. *IMMUNOCYTOCHEMISTRY AS AN ADJUNCT TO FINE-NEEDLE ASPIRATION OF THYROID IN DISTINCTION BETWEEN BENIGN AND MALIGNANT THYROID NEOPLASMS*. Acta Chirurgica Latviensis, 2011, p. 39-43.
4. Ozolins A., Narbutis Z., Strumfa I., Volanska G., Stepanovs K., Gardovskis J. *IMMUNOHISTOCHEMICAL EXPRESSION OF HBME-1, E-CADHERIN AND CD56 IN THE DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF THYROID NODULES*. Medicina (Kaunas). 2012; pieņemts publicēšanai.

8. ZIŅOJUMI PAR PĒTĪJUMA TĒMU

1. Mutiskā uzstāšanās - Ozolins A., Narbutis Z., Strumfa I., Volanska G., Gardovskis J. *DIAGNOSTIC UTILITY OF IMMUNOHISTOCHEMICAL PANEL IN VARIOUS THYROID PATHOLOGIES*. Rīgas Stradiņa universitāte, 2010. gada Zinātniskās konferences tēzes, 2010., p. 245.

2. Stenda ziņojums - Ozolins A., Narbutis Z., Strumfa I., Volanska G., Gardovskis J. *IMMUNOHISTOCHEMICAL PANEL IN THE DIAGNOSTICS OF THYROID CANCER*. Book of abstracts 5th Baltic Congress of Oncology. May 14-15, Riga, Latvia 2010, p. 8.
3. Mutiskā uzstāšanās - Ozolins A., Narbutis Z., Strumfa I., Volanska G., Gardovskis J. *DIAGNOSTIC UTILITY OF IMMUNOHISTOCHEMICAL PANEL IN VARIOUS THYROID PATHOLOGIES*. Book of abstracts European Society of Endocrine Surgeons 4th Biennial congress. May 13-15, Vienna, Austria 2010.
4. Stenda ziņojums - Ozolins A., Narbutis Z., Strumfa I., Prieditis P., Stepanovs K., Gardovskis J. *THE IMMUNOCYTOCHEMISTRY AS AN ADJUNCT TO FINE NEEDLE ASPIRATION CYTOLOGY OF THYROID NODULES. FIRST EXPERIENCE IN LATVIA*. Rīgas Stradiņa universitāte, 2011. gada Zinātniskās konferences tēzes, 2011., p. 286.
5. Stenda ziņojums - Ozolins A., Narbutis Z., Strumfa I., Gardovskis J. *IMPACT OF IMMUNOHISTOCHEMICAL VISUALISATION TECHNOLOGY ON THE DIAGNOSTICS OF THYROID PATHOLOGY*. Rīgas Stradiņa universitāte, 2011. gada Zinātniskās konferences tēzes, 2011., p. 288.
6. Stenda ziņojums - Ozolins A., Narbutis Z., Strumfa I., Volanska G., Gardovskis J. *DIAGNOSTIC SIGNIFICANCE OF HBME-1, CD56 AND E-CAD EXPRESSION FOR VARIOUS THYROID PATHOLOGIES*. Rīgas Stradiņa universitāte, 2011. gada Zinātniskās konferences tēzes, 2011., p. 289.
7. Stenda ziņojums - Artūrs Ozoliņš, Zenons Narbutis, Ilze Štrumfa, Guna Volanska, Kaspars Stepanovs, Jānis Gardovskis. *IMUNOCITOĶĪMISKO MARĶIERU NOZĪME VAIROGDZIEDZERU MEZGLU TIEVĀS ADATAS PUNKCIJAS BIOPSIJAS IZVĒRTĒŠANĀ*. Rīgas Stradiņa universitāte, 2012. gada Zinātniskās konferences tēzes, 2012., lpp. 275.
8. Mutiskā uzstāšanās - Ozolins A., Narbutis Z., Strumfa I., Volanska G.,

Stepanovs K., Gardovskis J. *IMMUNOCYTOCHEMICAL PANEL AS AN ADJUNCT TO FINE-NEEDLE ASPIRATION OF THE THYROID IN VARIOUS THYROID PATHOLOGIES*. European Society of Endocrine Surgeons 5th Biennial congress. May 24-26, Gothenburg, Sweden 2012.

9. Mutiskā uzstāšanās - Ozolins A., Narbuts Z., Strumfa I., Volanska G., Stepanovs K., Gardovskis J. *IMMUNOHISTOCHEMICAL EXPRESSION OF HBME-1, E-CADHERIN, AND CD56 IN THE DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF THYROID NODULES*. 7th Congress of Baltic Association of Surgeons. September 27-29, Riga, Latvia 2012.

9. ATSAUCES

1. Gharib H, Papini E: Thyroid nodules: clinical importance, assessment, and treatment. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2007, 36(3):707-735.
2. Topliss D: Thyroid incidentaloma: the ignorant in pursuit of the impalpable. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004, 60(1):18-20.
3. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E: Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 2010, 60(5):277-300.
4. Davies L, Welch HG: Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973-2002. *JAMA* 2006, 295(18):2164-2167.
5. POPULATION AND MAIN DATA OF VITAL STATISTICS [<http://data.csb.gov.lv>]. Central Statistical Bureau of Latvia. 2012.
6. CASES OF MALIGNANT NEOPLASMS BY SELECTED SITES [<http://data.csb.gov.lv>]. 2011.
7. Hundahl SA, Fleming ID, Fremgen AM, Menck HR: A National Cancer Data Base report on 53,856 cases of thyroid carcinoma treated in the U.S., 1985-1995. *Cancer* 1998, 83(12):2638-2648.
8. Finley DJ, Arora N, Zhu B, Gallagher L, Fahey TJ, 3rd: Molecular profiling distinguishes papillary carcinoma from benign thyroid nodules. *J Clin Endocrinol Metab* 2004, 89(7):3214-3223.

9. Haugen BR, Woodmansee WW, McDermott MT: Towards improving the utility of fine-needle aspiration biopsy for the diagnosis of thyroid tumours. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2002, 56(3):281-290.
10. Papotti M, Rodriguez J, De Pompa R, Bartolazzi A, Rosai J: Galectin-3 and HBME-1 expression in well-differentiated thyroid tumors with follicular architecture of uncertain malignant potential. *Mod Pathol* 2005, 18(4):541-546.
11. Saggiorato E, De Pompa R, Volante M, Cappia S, Arecco F, Dei Tos AP, Orlandi F, Papotti M: Characterization of thyroid 'follicular neoplasms' in fine-needle aspiration cytological specimens using a panel of immunohistochemical markers: a proposal for clinical application. *Endocr Relat Cancer* 2005, 12(2):305-317.
12. Bancroft JD, Gamble M: Theory and practice of histological techniques, international edition.: Churchill Livingstone, Edinburgh; 2003.
13. DeLellis RA: Pathology and genetics of thyroid carcinoma. *J Surg Oncol* 2006, 94(8):662-669.
14. Sheibani K, Esteban JM, Bailey A, Battifora H, Weiss LM: Immunopathologic and molecular studies as an aid to the diagnosis of malignant mesothelioma. *Hum Pathol* 1992, 23(2):107-116.
15. Saleh HA, Jin B, Barnwell J, Alzohaili O: Utility of immunohistochemical markers in differentiating benign from malignant follicular-derived thyroid nodules. *Diagn Pathol* 2010, 5:9.
16. Nasr MR, Mukhopadhyay S, Zhang S, Katzenstein AL: Immunohistochemical markers in diagnosis of papillary thyroid carcinoma: Utility of HBME1 combined with CK19 immunostaining. *Mod Pathol* 2006, 19(12):1631-1637.
17. Griffin JD, Hercend T, Beveridge R, Schlossman SF: Characterization of an antigen expressed by human natural killer cells. *J Immunol* 1983, 130(6):2947-2951.
18. Hercend T, Griffin JD, Bensussan A, Schmidt RE, Edson MA, Brennan A, Murray C, Daley JF, Schlossman SF, Ritz J: Generation of monoclonal antibodies to a human natural killer clone. Characterization of two natural killer-associated antigens, NKH1A and

- NKH2, expressed on subsets of large granular lymphocytes. *J Clin Invest* 1985, 75(3):932-943.
19. Zeromski J, Bagnasco M, Paolieri F, Dworacki G: Expression of CD56 (NKH-1) differentiation antigen in human thyroid epithelium. *Clin Exp Immunol* 1992, 89(3):474-478.
 20. Hirohashi S, Kanai Y: Cell adhesion system and human cancer morphogenesis. *Cancer Sci* 2003, 94(7):575-581.
 21. Vleminckx K, Vakaet L, Jr., Mareel M, Fiers W, van Roy F: Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell* 1991, 66(1):107-119.
 22. Eidelman S, Damsky CH, Wheelock MJ, Damjanov I: Expression of the cell-cell adhesion glycoprotein cell-CAM 120/80 in normal human tissues and tumors. *Am J Pathol* 1989, 135(1):101-110.
 23. Specht MC, Tucker ON, Hocever M, Gonzalez D, Teng L, Fahey TJ, 3rd: Cyclooxygenase-2 expression in thyroid nodules. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2002, 87(1):358-363.
 24. Rigaud C, Bogomoletz WV: Apparent lack of usefulness of monoclonal antibody Ki-67 in thyroid tumour pathology. Relation to histological typing and classification. *Pathol Res Pract* 1991, 187(2-3):198-200.
 25. Martinez J, Georgoff I, Martinez J, Levine AJ: Cellular localization and cell cycle regulation by a temperature-sensitive p53 protein. *Genes & development* 1991, 5(2):151-159.
 26. Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ: The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 1989, 57(7):1083-1093.
 27. Donghi R, Longoni A, Pilotti S, Michieli P, Della Porta G, Pierotti MA: Gene p53 mutations are restricted to poorly differentiated and undifferentiated carcinomas of the thyroid gland. *The Journal of clinical investigation* 1993, 91(4):1753-1760.
 28. Petrone L, Mannucci E, De Feo ML, Parenti G, Biagini C, Panconesi R, Vezzosi V, Bianchi S, Boddi V, Di Medio L *et al*: A simple us score for the identification of candidates to fine needle aspiration of thyroid nodules. *J Endocrinol Invest* 2011.

29. Altman D, David M, Trevor B, Martin G: Statistics with Confidence - Confidence Intervals and Statistical Guidelines. Bristol: British Medical Journal; 2000.
30. CASES OF MALIGNANT NEOPLASMS BY SELECTED SITES [http://data.csb.gov.lv]. 2011.
31. Prieditis P. Personal communication. First FNA of the Thyroid in Latvia. 20.03.2012.
32. Prieditis P, Saulite J. Personal communication. Number of Thyroid FNA Performed per Year in Latvia. 20.03.2012.
33. Miettinen M, Karkkainen P: Differential reactivity of HBME-1 and CD15 antibodies in benign and malignant thyroid tumours. Preferential reactivity with malignant tumours. *Virchows Arch* 1996, 429(4-5):213-219.
34. Saleh HA, Feng J, Tabassum F, Al-Zohaili O, Husain M, Giorgadze T: Differential expression of galectin-3, CK19, HBME1, and Ret oncoprotein in the diagnosis of thyroid neoplasms by fine needle aspiration biopsy. *Cytojournal* 2009, 6:18.
35. Brabant G, Hoang-Vu C, Cetin Y, Dralle H, Scheumann G, Molne J, Hansson G, Jansson S, Ericson LE, Nilsson M: E-cadherin: a differentiation marker in thyroid malignancies. *Cancer Res* 1993, 53(20):4987-4993.
36. Pazaitou-Panayiotou K, Mygdakos N, Boglou K, Kiziridou A, Chrisoulidou A, Destouni C: The Immunocytochemistry Is a Valuable Tool in the Diagnosis of Papillary Thyroid Cancer in FNA's Using Liquid-Based Cytology. *Journal of oncology* 2010, 2010:963926.
37. Migita K, Eguchi K, Kawakami A, Ida H, Fukuda T, Kurata A, Ishikawa N, Ito K, Nagataki S: Detection of Leu-19 (CD56) antigen on human thyroid epithelial cells by an immunohistochemical method. *Immunology* 1991, 72(2):246-249.
38. Kim JH, Kim YH, Han JH, Lee KB, Sheen SS, Lee J, Soh EY, Park TJ: Silencing of homeobox B9 is associated with down-regulation of CD56 and extrathyroidal extension of tumor in papillary thyroid carcinoma. *Hum Pathol* 2012.

39. Strumfa I: Ciklooksigenāzes-2 Proteīna Ekspresija Barības Vada un Kuņģa Audzējos. Riga Stradins University; 2005.
40. Kim SJ, Lee JH, Yoon JS, Mok JO, Kim YJ, Park HK, Kim CH, Byun DW, Suh KI, Yoo MH: Immunohistochemical expression of COX-2 in thyroid nodules. *The Korean journal of internal medicine* 2003, 18(4):225-229.
41. Mehrotra P, Gonzalez MA, Johnson SJ, Coleman N, Wilson JA, Davies BR, Lennard TW: Mcm-2 and Ki-67 have limited potential in preoperative diagnosis of thyroid malignancy. *Laryngoscope* 2006, 116(8):1434-1438.
42. Liang HS, Zhong YH, Luo ZJ, Huang Y, Lin HD, Luo M, Su HX, Zhou SB, Xie KQ: Comparative analysis of protein expression in differentiated thyroid tumours: a multicentre study. *The Journal of international medical research* 2009, 37(3):927-938.
43. Morita N, Ikeda Y, Takami H: Clinical significance of p53 protein expression in papillary thyroid carcinoma. *World journal of surgery* 2008, 32(12):2617-2622.